



HAL
open science

Nécessite d'une approche analytique confondante dans l'évaluation des dispositifs médicaux implantables en biopolymères : application aux lentilles intraoculaires à base de polyacrylates.

Lionel Tortolano

► To cite this version:

Lionel Tortolano. Nécessite d'une approche analytique confondante dans l'évaluation des dispositifs médicaux implantables en biopolymères : application aux lentilles intraoculaires à base de polyacrylates.. Sciences pharmaceutiques. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS121 . tel-01968038

HAL Id: tel-01968038

<https://theses.hal.science/tel-01968038>

Submitted on 2 Jan 2019

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.

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N°569

Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Spécialité de doctorat : Biologie, médecine et santé

Par

Mr Lionel TORTOLANO

Nécessité d'une approche analytique confondante dans l'évaluation des dispositifs médicaux implantables en biopolymères : application aux lentilles intraoculaires à base de polyacrylates.

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 30 Mai 2016 :

Composition du Jury :

Directrice de Thèse :	Mme Najet Yagoubi	Professeure Université Paris-Sud
Président :	Mr Elias Fattal	Professeur, Université Paris-Sud
Rapporteur :	Mme Valérie Sautou	PU-PH, Université d'Auvergne
Rapporteur :	Mr Yves Grohens	Professeur, Université de Bretagne-Sud
Examineur :	Mr Gaël Grimandi	PU-PH, Université de Nantes
Examineur :	Mr Patrice Prognon	PU-PH, Université Paris-Sud
Examineur :	Mr François Lemare	MCU-PH, Université Paris-Descartes

« Cette lutte pour en apprendre et en connaître davantage dura des semaines : avec entêtement je poursuivais mon forage vers le noyau de feu que je croyais sentir, comme un volcan, sous le rocher de son silence. »

Stefan Zweig (1881 – 1942)

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de thèse, le Pr Najet Yagoubi, qui m'a accueilli au sein du laboratoire Matériaux et Santé de la Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry. Je lui suis profondément reconnaissant de m'avoir permis de développer et d'avancer sur cet axe de recherche.

A Mme la Pr. Valérie Sautou. Merci d'avoir jugé ce travail en acceptant d'être rapporteur. Votre point de vue hospitalo-universitaire dans l'évaluation de dispositifs médicaux est pour moi très important. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Mr le Pr Yves Grohens. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance d'avoir accepté de juger ce travail de votre point de vue d'expert dans l'analyse des polymères. Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger mes travaux en acceptant d'être rapporteur.

A Mr le Pr Elias Fattal. Je vous adresse mes plus profonds remerciements pour m'avoir permis de réaliser ce travail au cours des années passées au sein du pôle Pharmacotechnie et Physico-chimie Pharmaceutique, de m'avoir conseillé à chacun de nos rendez-vous.

A Mr le Pr Gaël Grimandi. Je vous remercie d'avoir accepté de porter votre regard critique et expert dans l'évaluation des lentilles intraoculaires et des biomatériaux sur mes travaux.

A Mr le Pr Patrice Prognon. Je vous suis grée de m'avoir orienté au cours de mon internat afin de rencontrer Najet Yagoubi. Je vous remercie également d'avoir consacré du temps à mes travaux lors du concours de la médaille de l'internat. Sans vos conseils avisés, l'ensemble de ce travail de doctorat n'aurait pu voir le jour.

A Mr le Dr François Lemare. Je vous remercie de m'avoir accueilli comme interne, et m'avoir soutenu au long de mes travaux de doctorat. Je vous remercie également de la

confiance que vous m'avez montré en m'accueillant comme assistant hospitalo-universitaire, sur les thématiques de l'évaluation des dispositifs médicaux implantable, au sein de votre équipe pharmaceutique de Gustave Roussy.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux membres du conseil scientifique de l'ANSM pour avoir récompensé ce sujet d'évaluation des lentilles intraoculaires lors de l'appel à projet jeunes chercheurs de 2014. Sans ce financement le projet n'aurait pas pu atteindre les résultats obtenus.

Le doctorat n'est pas qu'un projet individuel, c'est également le travail d'une équipe. Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe EA 401, et plus particulièrement Katia Manerlax et Emile Jubeli, pour leur aide, leur patience et leur soutien. La bonne humeur générale au sein du labo est d'une aide précieuse au quotidien.

Je remercie Céline Boursier, Claudine Delomenie, Stéphanie Nicolaÿ-Yen et Audrey Solgadi pour leur aide précieuse dans ce travail et sur les autres projets au sein des plateformes de l'IPSIT Transprot et le SAMM.

J'adresse également mes remerciements aux équipes pharmaceutiques et ophtalmologiques des Hôpitaux Universitaires de Cochin et d'Hôtel-Dieu pour m'avoir accueilli et conseillé au cours de la réalisation de mon année de médaille de l'internat.

Je tiens à remercier les équipes de la pharmacie de Gustave Roussy pour leur soutien au cours de ces années de doctorat.

Une pensée pour l'ensemble des étudiants ayant travaillé à mes côtés sur ce sujet à ce projet : Carole, Senda, Victoria, Housseem et Katarina.

Enfin, aux présents, aux absents, aux patients et aux soutiens, merci.

Table des matières

Liste des illustrations.....	11
Liste des tableaux.....	15
Abréviations	17
Introduction.....	19
Contexte	21
Chapitre I : Physiologie de l'œil.....	21
I. Caractéristiques métaboliques de l'œil.....	21
II. Facteurs exogènes participant au métabolisme de l'œil.....	29
III. Vieillessement de l'œil.....	31
Chapitre II : Physiopathologie de la cataracte	34
I. Epidémiologie et chiffres clefs	34
II. Signes cliniques.....	34
Chapitre III : Traitement et complications de la cataracte	39
I. Procédure chirurgicale – Extraction du cristallin.....	39
II. Lentilles intraoculaires pour l'œil aphake	40
III. Complications postopératoires.....	50
Chapitre IV : L'opacification capsulaire postérieure.....	53
I. Epidémiologie et signes cliniques.....	53
II. Traitement de la PCO	55
III. Physiopathologie de la PCO et biocompatibilité.....	55
IV. Prévention de la PCO.....	61
Chapitre IV : Evaluation préclinique	65
I. Contexte réglementaire européen.....	65
II. Modèle d'évaluation préclinique appliqué aux lentilles intraoculaires	66
III. L'évaluation clinique des lentilles intraoculaires.....	70

IV. Innovation dans l'évaluation préclinique des lentilles intraoculaires.....	71
Partie expérimentale.....	75
Chapitre 1 : Matériels et méthodes.....	75
I. Echantillons.....	75
II. Procédures de vieillissement des échantillons.....	77
III. Evaluation analytique post-vieillessement.....	83
Chapitre 2 : Etude des phénomènes de vieillissement des copolymères d'acryliques.	94
I. Analyse thermodynamique du polymère.....	94
II. Relargage des composés de faible masse moléculaire.....	110
III. Cinétique des composés de faibles masses moléculaires.....	138
Chapitre 3 : Analyse de la surface par AFM.....	142
I. Caractéristiques de surface des implants neufs.....	142
II. Action du vieillissement par hydrolyse sur la surface des implants.....	144
III. Action de la photo-oxydation sur la rugosité de surface.....	150
IV. Action de la photo-oxydation combinée à l'hydrolyse sur l'état de surface	152
V. Analyse croisée état de surface et relargage.....	155
Chapitre 4 : Evaluation de la biocompatibilité.....	156
I. Cytotoxicité.....	156
II. Morphologie cellulaire.....	158
III. Interaction protéique.....	160
IV. Induction de l'EMT.....	162
Discussion.....	165
Conclusions.....	185
Annexe 1 : Structure chimique des monomères d'enVISTA®.....	191
Annexe 2 : Validation de la méthode de dosage des acrylates en RP-CLHP.....	193
Annexe 3 : Dosage de la fibronectine par ELISA.....	205
Annexe 4 : Publication scientifique.....	209

Annexe 5 : Liste des normes ISO consultées	219
Références bibliographiques	221

Liste des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique de l'œil (coupe transversale).....	21
Figure 2 : Coupe longitudinale d'un cristallin dans son sac capsulaire ⁴¹	22
Figure 3 : Accommodation de l'œil phake.	23
Figure 4 : Cycle de l'humeur aqueuse (flèches bleues) ⁵⁴	25
Figure 5 : Représentation du spectre UV-visible et des subdivisions de classes d'ultraviolets	30
Figure 6 : Filtration des ultraviolets par l'œil ⁷²	30
Figure 7 : Facteurs visuels en fonction de l'âge	32
Figure 8 : Coupe histologique de cornée humaine	33
Figure 9 : Blanchissement clinique du cristallin cataracté	35
Figure 10 : Cataracte en « fleur de tournesol ».....	36
Figure 11 : Lentille intraoculaire en PMMA utilisée par Sir H. Ridley	41
Figure 12 : Implants à bord rond (fig. A) et à bord carré (fig. B)	44
Figure 13 : Structure générale d'un monomère d'acrylate	45
Figure 14 : Réaction de Norrish (Type II) ¹⁴¹	47
Figure 15 : Photographies de PCO en rétro-illuminescence ¹⁷	54
Figure 16 : Voie des SMADS des cellules épithéliales de cristallin ¹⁷⁶	58
Figure 17 : Formule de vieillissement par photo-oxydation selon l'ISO 11979-5:2006.....	66
Figure 18 : Logigramme pour l'évaluation chimiques selon l'ISO 10993-18	68
Figure 19 : Implant en VISTA [®] MX60.....	76
Figure 20 : Représentation schématique d'une enceinte Q-sun.....	79
Figure 21 : Spectre solaire vrai et reproduit par arc au xénon	79
Figure 22 : Calcul du facteur d'accélération du vieillissement, norme ISO EN NF 11979-5 .80	
Figure 23 : Intérieur de l'enceinte Qsun-Xe1 lors du vieillissement de lentilles intraoculaires	81
Figure 24 : TGA Q500.....	84
Figure 25 : TGA Q500 vue schématique du four.....	84
Figure 26 : Schéma théorique des caractéristiques visibles en DSC.....	85
Figure 27 : Formule de calcul de la rugosité quadratique moyenne.....	88

Figure 28 : Représentation schématique du protocole d'imagerie des surfaces par AFM	89
Figure 29 : Détails de l'analyse des pertes de masses en ATG et des dérivations du poids en fonction de la température.....	96
Figure 30 : Dérivée de la courbe ATG de la perte de masse	101
Figure 31 : Comparaison des températures moyennes caractéristiques des pertes de masse	102
Figure 32 : Comparaison des dérivées de la masse par la température pour les implants vieillis avec photo-oxydation	105
Figure 33 : Tracé DSC des implants uniquement vieillis par hydrolyse.....	108
Figure 34 : Tracé DSC des implants vieillis par photo-oxydation.....	109
Figure 35 : Spectrogramme bidimensionnel des CFMM relargués dans la solution de conservation (λ 218nm)	113
Figure 36 : Chromatogramme tridimensionnel des CFMM relargués dans SV photo-oxydation combinée longue	113
Figure 37 : AUC totales des CFMM du groupe II des solutions de conservation (λ 218nm)	114
Figure 38 : AUC relatives des CFMM du groupe II des solutions de conservation (λ 218nm)	115
Figure 39 : AUC absolue des CFMM du groupe II des solutions de conservation (λ 218nm)	115
Figure 40 : Spectrogramme bidimensionnel des CFMM du groupe II des SV hydrolyse courte (λ 218nm).....	117
Figure 41 : Chromatogramme tridimensionnel des CFMM relargués dans les SV hydrolyse courte.....	117
Figure 42 : AUC relative des CFMM du groupe II relargués dans SC et SV hydrolyse courte d'un même implant.....	118
Figure 43 : Spectrogrammes bidimensionnels à 218nm des CFMM en fonction du type d'hydrolyse	120
Figure 44 : Chromatogramme tridimensionnel des CFMM de SV hydrolyse forcée	120
Figure 45 : AUC relative de chaque composé du groupe 2 pour les SV hydrolyse et SC.....	121
Figure 46 : AUC relatives des SV selon les conditions d'hydrolyse excluant le CFMM 8min	123
Figure 47 : Chromatogramme en 3D des CFMM du groupe I de la SV photo-oxydation combinée longue	126

Figure 48 : Chromatogramme tridimensionnel des CFMM du groupe II de SV Ph-Ox combinée longue (détail)	127
Figure 49 : AUC totale des CFMM du groupe II relargués dans les SV photo-oxydation combinée longue	128
Figure 50 : AUC relatives moyennes des CFMM du groupe II relargués dans SV photo-oxydation combinée de longue durée.....	129
Figure 51 : Spectrogrammes des CFMM du groupe I en fonction de la durée de photo-oxydation combinée	130
Figure 52 : AUC relatives des CFMM du groupe II selon la durée de photo-oxydation combinée	131
Figure 53 : Distribution du profil de relargage des CFMM du groupe II selon la durée de photo-oxydation combinée.....	131
Figure 54 : AUC relative des CFMM du groupe II relargués par hydrolyse forcée et photo-oxydation combinée longue.....	136
Figure 55 : Profil des CFMM du groupe II relargués par hydrolyse forcée et photo-oxydation combinée longue	136
Figure 56 : Cinétique précoce du relargage des CFMM du groupe II en fonction de la durée de photo-oxydation combinée à l'hydrolyse	139
Figure 57: Cinétique du relargage des CFMM du groupe II en fonction de la durée de photo-oxydation combinée à l'hydrolyse.....	139
Figure 58 : Cinétique des CFMM du groupe II sous l'effet de la photo-oxydation combinée à l'hydrolyse	140
Figure 59 : Surface de l'implant BL001. Vue en 2D, vue en 3D et profil de rugosité	143
Figure 60 : Rugosité des implants vieillis par hydrolyse seule.....	145
Figure 61 : Comparaison de profils de surface de chaque groupe d'hydrolyse (détails)	146
Figure 62 : Caractéristiques de surface après hydrolyse forcée (BL008)	148
Figure 63 : Vue tridimensionnelle de la surface comportant un pic de PHEMA	149
Figure 64 : Profil de la rugosité de surface présentant un pic de PHEMA.....	149
Figure 65 : Rugosité des implants vieillis par photo-oxydation seule	151
Figure 66 : Caractéristique de surface après photo-oxydation combinée à l'hydrolyse pour une longue durée	153
Figure 67 : Rugosité des implants vieillis par photo-oxydation combinée à l'hydrolyse	154

Figure 68 : Viabilité cellulaire sur hLECs après contact direct des monomères à différentes concentrations	157
Figure 69 : Viabilité cellulaire au MTT après contact direct des implants et des solutions de vieillissement	157
Figure 70 : Morphologie cellulaire sur hLECs en contact direct avec de l'EGPEA à 40ppm	158
Figure 71 : Morphologie cellulaire sur hLECs en contact direct avec de l'HEMA 40ppm...	159
Figure 72 : Morphologie cellulaire de hLECs après contact direct avec implant neuf (A) et photo-oxydé (B)	159
Figure 73 : Quantité relative de fibronectine adsorbant sur la surface totale des implants en fonction du vieillissement	160
Figure 74 : Taille de surfaces projetées en fonction des conditions de vieillissement.....	161
Figure 75 : Taux relatif d'expression de fibronectine par les hLECs	162

Liste des tableaux

Tableau I : Composition ionique de l'humeur aqueuse humaine de l'œil sain ⁵³⁻⁵⁵	26
Tableau II : Principales complications associées à la chirurgie de la cataracte ¹²	51
Tableau III : Equivalence entre exposition naturelle et accélérée par arc au xénon réglé à 1,5W/m ²	81
Tableau IV : Conditions de vieillissement.....	82
Tableau V : Pertes de masse en fonction du vieillissement mesurée par ATG.....	97
Tableau VI : Répartition des échantillons selon leur 1 ^{ère} perte de masse mesurée en ATG.....	97
Tableau VII : Relevés de températures des dérivés des courbes ATG des pertes de masse .	101
Tableau VIII : Valeurs des Tg et des ΔCp moyennes selon les conditions de vieillissement	108
Tableau IX : valeur de la 3 ^{ème} λmax de chaque CFMM du groupe II	127
Tableau X : Ratio 2ans/ 2 mois relargage photo-oxydation combinée de 8 à 15 minutes.....	132

Abréviations

α -SMA : alpha smooth muscle actin

AA : Alkyle acrylate

AFM : Atomic Force microscopy

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

ATG : Analyse Thermogravimétrique

AUC : Aire sous courbe (Area Under Curve)

BA : Butyle Acrylate

CFMM : Composés de Faible Masse Moléculaire

-co- : copolymère

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DSC : Differential Scanning Calorimetry

EA : Ethyle Acrylate

EGDM : Ethylène Glycol Dimétharylate

EGPEA : Ethylène Glycol Phényl éther acrylate

EMA : Ethyle méthacrylate

EMT : Transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse

FDA : Food and Drug Administration

HEMA : 2-Hydroxyéthyle méthacrylate

hLECs : human Lens epithelial cells (cellules épithéliales de cristallin humain)

ISO : International Standard Organization

IOL : Lentilles intraoculaires (Intraocular lenses)

LIO : Lentilles intraoculaires

LCST : Low Critical Solution Temperature

MA : méthyle acrylate

MMA : Méthyle méthacrylate

NaCl : Chlorure de Sodium

Nd :YAG : neodymium-doped yttrium aluminium garnet ou grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme

PCO : Opacification capsulaire postérieure (posterior capsular opacification)

PEG : poly éthylène glycol

PEO : Poly éthylène oxyde

PHEMA : poly(hydroxy éthyle méthacrylate) ou polyHEMA

Ph-Ox : Photo-oxydation

PMMA : polyméthacrylate de méthyle

Ra : Rugosité moyenne

RGD : motif L-arginine, glycine et L-acide aspartique

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

Rq : Rugosité quadratique

Rmax : Rugosité maximale

Rmin : Rugosité minimale

RP-HPLC ; Reverse Phase – High Pression Liquid Chromatography

SC : Solution de Conservation

SV : Solution de Vieillissement

Tg : Température de transition vitreuse

TGF- β : Tissular growth factor beta

TR : Temps de rétention

UV : ultraviolets

XPS : Spectrométrie Photoélectronique à rayon X

λ_{\max} : longueur d'onde maximale

Introduction

Selon l'OMS la cataracte est la principale pathologie cécitante au monde¹. Elle se définit par le blanchiment progressif du cristallin et la perte de l'acuité visuelle aussi bien de jour que de nuit². Il existe de nombreuses physiopathologies. Les formes congénitales sont principalement dues à des mutations génétiques ou des infections lors de la grossesse³⁻⁵. La cataracte sénile est la forme la plus fréquente⁶. Elle résulte du vieillissement naturel de l'œil et de comorbidités. Le diabète et les pathologies inflammatoires chroniques sont les facteurs de risque les plus fréquemment relevés^{2,6-11}. Enfin, certaines formes sont le fait d'agressions extérieures mécaniques, chimiques ou physiques².

Quelle que soit l'origine de la cataracte, seule une intervention chirurgicale par phacoémulsification permet de restaurer la vision. Lors de la chirurgie, une lentille intraoculaire est implantée dans le sac capsulaire pour substituer le cristallin extrait¹². Il existe de multiples références de lentilles intraoculaires. Les formes et les matériaux proposés sont nombreux. Les implants sont principalement composés de polymères d'acrylates dont le polyméthacrylate de méthyle (PPMA ou plexiglas[®]) était le premier matériau utilisé. Des implants en silicone sont également commercialisés¹³.

Les implants proposés sont souples à température ambiante permettant leur injection dans l'œil à travers une incision très fine. Celle-ci diminue le taux de complications postopératoires dont l'endophtalmie infectieuse est l'évènement iatrogénique le plus grave. Ainsi, l'intervention est réalisée en chirurgie ambulatoire et permet d'étendre l'indication à des patients plus jeunes et atteints de comorbidités intraoculaires^{12,14,15}.

Après chirurgie, les cellules épithéliales de cristallin résiduelles prolifèrent de manière anarchique le long de la capsule du cristallin. Dès lors que les cellules atteignent le centre de la capsule, l'acuité visuelle du patient diminue provoquant une opacification capsulaire postérieure (PCO). Une nouvelle intervention chirurgicale fait au laser Nd : YAG permet de réaliser une capsulotomie restaurant une bonne vision au patient. Cependant, celle-ci présente des complications dont certaines graves et représente un coût pour la société¹⁶.

La PCO concerne tous les types d'implants et survient entre 1 mois et plusieurs années après la chirurgie¹⁷⁻¹⁹. La survenue de la PCO dépend de l'adhésion de l'implant à la capsule du

cristallin médiée par la fibronectine. Une adhésion rapide permet de limiter la prolifération cellulaire entre l'implant et la capsule. Cette théorie dite « du sandwich » ne permet pas d'expliquer les cas tardifs de PCO survenant jusqu'à neuf ans après l'implantation²⁰⁻²³. L'importance de l'implant dans la physiopathologie de la PCO fait débat. Il est établi que seule la forme de l'implant, qui joue le rôle de barrière mécanique à la prolifération cellulaire *in vivo*, retarde la survenue de la PCO²⁴⁻²⁷. Cependant, plusieurs travaux *in vitro* ont montré que l'état de surface et le type de polymère participent à la biocompatibilité des implants et donc à la prévention de la PCO. Les implants en acrylates hydrophobes sont associés aux plus faibles taux de PCO^{14,28-30}. Aucune distinction n'est faite entre d'acrylates hydrophobes constitutif de l'implant alors que tous ne possèdent pas la même composition chimique et donc les mêmes caractéristiques de biocompatibilité^{31,32}.

L'ensemble de ces observations incitent les fabricants à proposer de nouvelles lentilles intraoculaires dont la géométrie et les copolymères sont choisis pour réduire le risque de PCO. Toutefois, aucune étude ou évaluation préclinique ne porte sur l'impact des mécanismes de vieillissement des lentilles intraoculaires sur la survenue des cas de PCO tardives. En outre, il est établi que la photo-oxydation modifie les propriétés thermodynamiques et l'état de surface des polyacrylates utilisés dans les résines dentaires et les peintures³³⁻³⁶.

L'hypothèse défendue dans ce travail est que l'impact des modifications des propriétés des lentilles intraoculaires, au cours de leur vieillissement, influence la biocompatibilité et par conséquent explique en partie la survenue de PCO tardives.

L'objectif de ce travail est de proposer l'évaluation des lentilles intraoculaires d'un point de vue transversale et multiparamétrique pour relier les modifications du biopolymère à la biocompatibilité.

Pour ce faire, la première étape sera de proposer une évaluation physico-chimique confondante des lentilles intraoculaires destinée à mettre en évidence les modifications de propriétés thermodynamiques, le relargage de produits de dégradation et les changements de l'état de surface des implants au cours de leur vieillissement.

La seconde étape sera d'estimer l'effet de ces modifications physico-chimiques sur la biocompatibilité évaluée par l'interaction avec les composés relargués et l'interface entre l'implant, le milieu biologique pour définir *in fine* si les modifications représentent un risque de développement de PCO tardive.

Contexte

Chapitre I : Physiologie de l'œil

I. Caractéristiques métaboliques de l'œil

A. Œil et vision

L'œil est un organe sensoriel apparaissant très tôt dans l'organogénèse. Il est issu de la combinaison de trois tissus embryonnaires : l'ectoderme neural, l'ectoderme de surface et le mésenchyme périoculaire³⁷. Il s'agit d'un organe complexe tant dans le fonctionnement, l'irrigation vasculaire que le fonctionnement immunitaire^{38,39}.

Le rôle premier de l'œil est d'assurer la transmission des informations spectrales du domaine visible vers le cerveau. Le signal filtré par la cornée est focalisé au travers du cristallin sur la rétine puis transmis via le nerf optique à l'aire visuelle du cortex occipital⁴⁰.

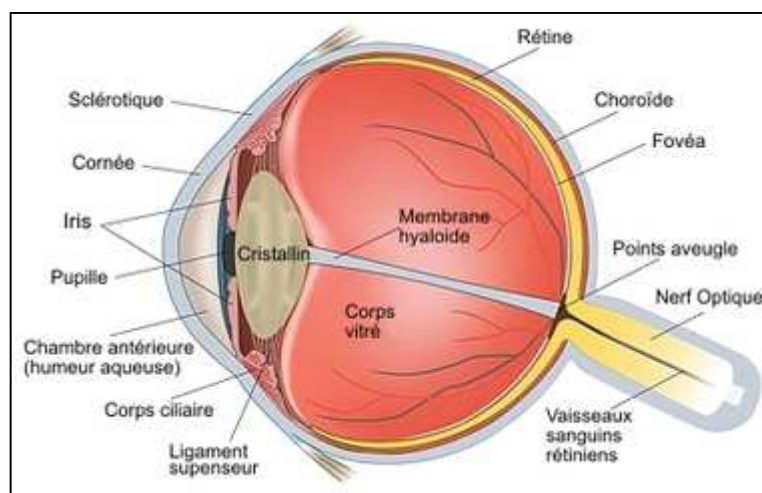


Figure 1 : Représentation schématique de l'œil (coupe transversale)

Chaque composant de l'œil possède un indice de réfraction et une transparence assurant le bon acheminement de l'information vers la rétine⁴⁰. Plusieurs pathologies impactent significativement la vision. Certaines sont innées ou congénitales, d'autres apparaissent avec l'âge ou sous l'influence de différents facteurs endogènes et exogènes⁶.

De l'ensemble des organes constitutifs de l'œil, le cristallin est celui le plus souvent touché par des pathologies cécitantes telle que la cataracte.

B. Le cristallin

Le cristallin est l'organe pivot dans l'accommodation. Il est situé en arrière de la pupille, repose sur l'humeur vitrée et est entouré du sac capsulaire. Le contact entre le cristallin et l'humeur vitrée n'est pas direct. Le sac capsulaire, ou capsule du cristallin, sépare physiquement les deux composants rendant physiologiquement impossible tout contact entre les deux organes. L'humeur aqueuse irrigue le cristallin à son pôle antérieur indirectement au travers de la capsule (figure 2).

L'histochimie du cristallin est simple. Il est composé d'un amas de cellules fibreuses nucléaires (au centre) ou corticales (périphériques) cernées par la lame basale de la capsule du cristallin. La démarcation entre la capsule et les cellules fibreuses est assurée par une couche monocellulaire de cellules épithéliales⁴¹.

Les cellules ectodermiques composant le cristallin n'ont pas toutes le même stade de développement. Les cellules superficielles sont nucléées et possèdent un métabolisme assurant l'apport nutritif au cristallin. À l'inverse, les cellules centrales, plus anciennes, n'ont aucun métabolisme. Leur fonction principale est la réfraction de la transmission visuelle⁴².

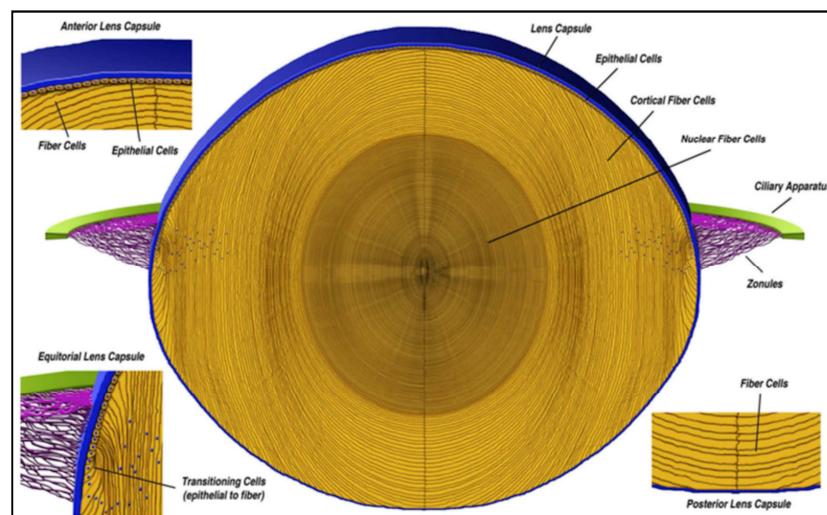


Figure 2 : Coupe longitudinale d'un cristallin dans son sac capsulaire⁴¹

La transparence du cristallin est permise grâce à l'absence de noyaux dans les cellules, à l'absence de vascularisation, à la présence de jonctions cellulaires serrées et d'une forte teneur en cristalline. Cette protéine a un rôle important dans le cristallin. Elle est de loin la principale protéine en proportion avec 90% des protéines totales retrouvées dans le cristallin.

Trois isoformes de la cristalline sont connues (α , β et γ). La forme α est qualifiée de protéine chaperon. La cristalline α est exprimée par deux gènes codant pour deux isoformes de la protéine : l' αA et αB . La première est majoritaire. Selon Horwitz J., le rôle des deux formes d' α -cristalline est d'assurer la transparence du cristallin en maintenant les protéines dans leurs formes natives et en freinant la formation d'agrégats protéiques. Ces agrégats réduisent la transmission lumineuse du cristallin⁴³.

Le cristallin filtre également une partie de la lumière pénétrant l'œil.

Les mouvements du cristallin, nécessaires à l'accommodation, sont dus à la contraction des muscles ciliaires et aux zonules de Zinn tous deux situés aux extrémités équatoriales de l'organe (figure 3).

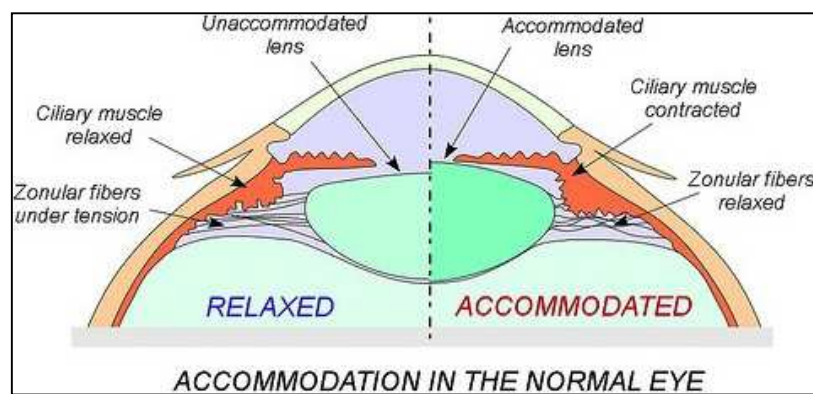


Figure 3 : Accommodation de l'œil phaque.

La contraction des muscles ciliaires, partie de gauche, induit le relâchement des fibres de la zonule de Zinn et l'arrondissement du cristallin⁶.

C. La capsule du cristallin

La capsule est une membrane basale principalement constituée de collagène assurant l'isolement total du cristallin du reste de l'œil²⁰. Elle joue le rôle de filtre anti-infectieux, de réserve de nutriments et de facteurs de croissance. Elle est fine mais résistante et transparente pour ne pas gêner la transmission du signal lumineux. La capsule est semi-perméable aux protéines ainsi qu'à d'autres éléments nutritifs dont les sucres^{44,45}. Le passage des protéines dépendrait de leur taille ainsi que de leur charge ionique. Les protéines neutres ou cationiques auraient un meilleur passage que celui des protéines anioniques⁴⁵. En outre, la diffusion des protéines dépend de leur taille (limite de diffusion à 250KDa), de leur point isoélectrique mais ne dépend pas de leur hydrophobicité. Toutefois, il existe une grande variabilité interindividuelle de la perméabilité de la capsule aux protéines⁴⁶.

Les molécules et les xénobiotiques de petites tailles peuvent ainsi passer librement au travers de la capsule^{41,47}.

Plus récemment, en 2010, Danysh *et al.* ont spécifié que le passage des éléments nutritifs et de petites tailles (ions, minéraux, vitamines et sucres) n'était pas limité⁴⁶.

La composition biochimique de la capsule est semblable à celle d'autres capsules dans l'organisme. La matrice extracellulaire est un enchevêtrement de laminine, d'entactine et de nidogène à laquelle s'ajoute un protéoglycane de nature héparane sulfate : la perlécane. Les collagènes de type XVIII et XV entrent également dans la composition de la capsule. La structure tridimensionnelle contient également de la fibrilline-1⁴¹.

Il existe très peu de preuves de présence de la fibronectine dans la capsule. Chez la souris, elle n'est présente qu'aux stades embryonnaires. Elle est détectée lors du processus de cicatrisation de la capsule et/ou dans les processus de transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans le phénomène d'opacification capsulaire postérieure. Le rôle majeur de la fibronectine est celui de messenger cellulaire et ne participe que très peu au maintien de la structure de la capsule.

Le même constat est fait pour les secreted protein, acidic, cysteine-rich ou SPARC dont le rôle principal est de réguler les interactions entre la capsule et le cristallin. Les SPARC ont la capacité de lier des facteurs de la croissance cellulaire circulants (Platelet-derived growth factor ou PDGF, vascular endothelial growth factor ou VEGF et le fibroblast growth factor de type 2 ou FGF-2). Ces facteurs sont impliqués dans la survenue des pathologies intraoculaires telle que la PCO^{48,49}. La capsule serait une réserve de facteurs de croissance piégés dans la structure tridimensionnelle de la matrice extracellulaire.

Cette dernière peut être détruite par l'action de métalloprotéinases (MMPs). Ces endopeptidases agissent par couple enzyme-inhibiteurs (notés TIMP). Leur action est à l'origine de la libération de facteurs de croissance cellulaire. Dans l'œil, les MMP-2 et MMP-9, également nommées gélatinases A et B, ont un rôle important dans le processus de cicatrisation de la cornée. Elles sont retrouvées dans l'humeur aqueuse et dans l'humeur vitrée. Elles sont impliquées dans les processus physiopathologiques dont la cataracte^{41,50,51}. L'activité basale de ces deux isoformes de métalloprotéinases est nulle dans l'œil sain et ne s'accroît que dans les processus physiopathologiques du cristallin⁵¹.

L'interaction de la capsule et du cristallin se fait également via les intégrines. Ces récepteurs transmembranaires sont capables de se lier au collagène de type IV, à la laminine, à la fibronectine ainsi qu'à la perlécane. Leur absence, ou leur mutation, est source d'instabilité du cristallin⁵².

D. L'humeur aqueuse

1. Cycle de l'humeur aqueuse

Le cristallin est en contact indirect avec l'humeur aqueuse au travers de la capsule. La perméabilité de la capsule du cristallin permet d'apporter l'eau et les nutriments nécessaires à la croissance et au maintien en vie des cellules du cristallin⁴¹.

L'humeur aqueuse assure l'homéostasie de l'œil et contribue au maintien de la pression intraoculaire⁵³. Elle est produite en continu par les procès ciliaires (ou corps ciliaires), de petites glandes situées derrière l'iris, et possède une composition complexe. Bien que qualitativement très riche, l'humeur aqueuse est faiblement concentrée afin de maintenir un indice de réfraction compatible avec la transmission du signal lumineux. Outre les rôles nutritif et optique, l'humeur aqueuse possède également un rôle dans l'évacuation des produits du catabolisme de l'œil⁵⁴. Deux compartiments d'humeur aqueuse sont décrits. Le compartiment postérieur au cristallin de l'humeur aqueuse est d'un volume de 50 à 60 μL . Il est entièrement renouvelé toutes les 30 minutes. Le second est le compartiment antérieur, plus vaste, d'une capacité de 250 μL . Il se renouvèle en 120 minutes⁵⁴.

L'humeur aqueuse est éliminée par le canal de Schlemm situé à l'angle entre la cornée et l'iris.

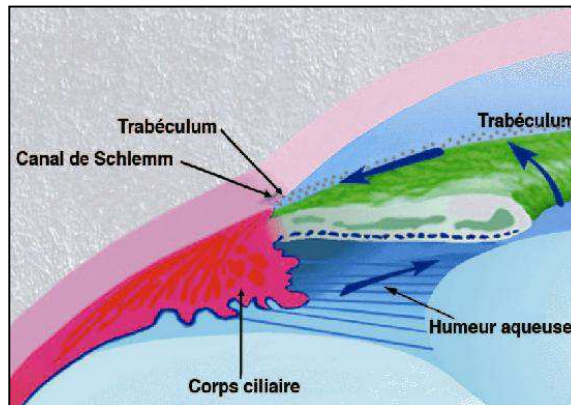


Figure 4 : Cycle de l'humeur aqueuse (flèches bleues)⁵⁴

2. Composition de l'humeur aqueuse

La composition de l'humeur aqueuse s'assimile pour certains auteurs, à un « plasma pauvre ». De Berardinis *et al.* ont déterminé et dosé la présence de cinq composants majeurs de l'humeur aqueuse. Il s'agit de l'acide ascorbique, des ions bicarbonates, des ions chlorures, de l'acide lactique et du glucose⁵⁵. La composition ionique est qualitativement la même que

le plasma dont elle est le produit de l'ultrafiltration. Toutefois, les concentrations de chaque élément varient au regard de celles du plasma sanguin. L'humeur aqueuse est plus riche en ions sodium et chlorure mais plus pauvre en ions calcium ou potassium (*cf.* tableau I)⁵⁴. Dans les situations non pathologiques, l'humeur aqueuse est pauvre en glucose mais riche en sodium ainsi qu'en ascorbate. L'ascorbate et l'acide ascorbique forment un couple d'oxydo-réduction jouant un rôle important dans l'homéostasie de l'œil. Enfin, de nombreux travaux dont ceux de de Berardinis ont conclu à la quasi absence d'acides aminés dans l'humeur aqueuse.

Tableau I : Composition ionique de l'humeur aqueuse humaine de l'œil sain⁵³⁻⁵⁵

Ions présents dans l'humeur aqueuse	Concentration moyenne mesurée (mMol/L)
<i>Sodium</i>	163
<i>Potassium</i>	4
<i>Calcium</i>	1,2
<i>Chlorure</i>	134
<i>Bicarbonates</i>	20
<i>Acide ascorbique</i>	1,06
<i>Glucose</i>	3
<i>Acide lactique</i>	4,5

3. Equilibre cationique de l'humeur aqueuse

L'humeur aqueuse contient également plusieurs cations métalliques dont le calcium, le magnésium et le fer. Le métabolisme de régulation de ces cations permet de prévenir leur précipitation et ainsi de préserver l'indice de réfraction de l'œil.

La concentration calcique dans les cellules du cristallin est strictement régulée par une série de transporteurs entre le cytoplasme et l'humeur aqueuse^{56,57}. Une dérégulation de l'homéostasie du calcium modifie l'indice de réfraction des cellules ainsi que leur capacité de prolifération^{58,59}. Le déséquilibre de l'homéostasie peut se compliquer par une opacification du cristallin.

Le magnésium contribue activement à l'équilibre du calcium et du potassium dans l'œil. L'homéostasie minérale cationique du cristallin est particulièrement importante. Le magnésium, à l'inverse du calcium, y est fortement concentré. Le gradient de magnésium est principalement orienté vers les cellules périphériques du cristallin. Selon les travaux de Agarwal *et al.*, une carence prolongée en magnésium augmenterait le risque de développer une cataracte. Cette corrélation négative serait la concordance d'un déséquilibre de

l'homéostasie minérale en faveur d'une concentration intraoculaire en calcium augmentée et d'une induction du stress oxydant dans l'œil. Une augmentation de l'expression du monoxyde d'azote (NO) dans l'œil serait due à l'augmentation du calcium intraoculaire. Le relargage de NO observé dans ce déséquilibre cationique induirait également une nitration du cristallin, facteur aggravant le risque de cataracte⁶⁰.

D'autres études mettent en avant l'importance d'autres homéostasies dans les processus physiopathologiques intraoculaires. Ainsi, l'homéostasie du fer dans l'humeur aqueuse serait perturbée dans les cataractes. Selon d'autres travaux, le taux d'acide lactique supérieur à celui du plasma est lié au catabolisme du glucose par le cristallin. Dans l'œil aphake et pseudophake le taux d'acide lactique de l'humeur aqueuse est diminué. Il est voisin du taux plasmatique⁵⁵.

4. Protéines de l'humeur aqueuse

Escoffier *et al.* ont analysé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (2D-LC/MS) plusieurs échantillons d'humeurs aqueuses humaines. Les profils protéomiques obtenus révèlent une grande diversité de protéines, en très faibles concentrations. La composition protéique retrouvée et la présence en concentration importante d'éléments rares, tels que l'acide ascorbique, permettent d'affirmer que l'humeur aqueuse n'est pas uniquement le produit de l'ultrafiltration du plasma par la barrière hémato-oculaire. Des phénomènes de transports actifs assurent l'équilibre de l'humeur aqueuse. Le délai de constitution à partir du plasma est de minimum 48 heures⁵⁴.

5. Activité enzymatique de l'humeur aqueuse

L'humeur aqueuse comporte de nombreuses enzymes maintenant des conditions protéiques optimales dans le cristallin. Les principales enzymes retrouvées sont l'anhydrase carbonique, des protéases, des hyaluronidases, l'histaminase et la phosphatase alcaline. Une cinquantaine de métabolites différents sont identifiés et quantifiés dans l'œil⁶¹.

6. Les couples d'oxydo-réduction de l'humeur aqueuse

L'autre principale caractéristique de l'humeur aqueuse est la présence de plusieurs couples oxydo-réducteurs dont le but est de prévenir les dommages du stress oxydant sur l'homéostasie oculaire⁶². L'oxygène réagit avec des agents donneurs d'électrons pour former

des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ultraviolets sont connus pour être un facteur important dans la synthèse des ROS⁶³. La première molécule générée par le stress oxydant est l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cet anion est réduit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) grâce à l'action réductrice de l'acide ascorbique⁶⁴. Spector et Garner ont démontré en 1981 que les patients atteints de cataracte avait une augmentation du taux de peroxyde d'hydrogène dans l'humeur aqueuse⁶⁵. L'action délétère du peroxyde d'hydrogène est depuis avérée dans de nombreuses pathologies, ophtalmologiques ou non, liées au stress oxydant. D'autres espèces réactives de l'oxygène peuvent être générées. Leur détoxification est nécessaire au maintien de l'homéostasie oculaire et de la vision.

Plusieurs couples redox sont présents, parmi lesquels la *glutamine synthase*, la *nitric oxyde synthase 2* (NOS 2), les *superoxyde dismutases* (SOD1/2) ou encore la *microsomal glutathione S-transférase 1* (Gst1)⁶⁶. Elles sont toutes produites majoritairement au niveau des cellules épithéliales de la cornée sous l'induction de facteurs exogènes. Le principal facteur connu reste l'exposition de la cornée aux ultraviolets de type B⁶⁷.

Un second groupe de molécules agit pour prévenir la perte de l'homéostasie de la lentille. Il s'agit de la Kynurenine et de ses dérivés. Cette famille biochimique possède des propriétés anti-UV et prévient l'altération de la rétine et du cristallin. L'action est principalement portée sur les rayonnements ultraviolets de type A.

Les travaux de Tsentakivich *et al.* concluent à l'existence de différents métabolismes dans le cristallin. La partie périphérique du cristallin est métaboliquement active. Cette partie est la source de la production de plusieurs métabolites protecteurs du cristallin, à savoir le glutathion réduit ou GSH, l'acide ascorbique et le nicotinamide adénine dinucléotide ou NAD un coenzyme d'oxydo-réduction. À l'inverse, le centre du cristallin possède un faible métabolisme. Les concentrations de GSH, d'acide ascorbique et de NAD sont faibles. Les principaux métabolites retrouvés dans le noyau sont des antioxydants et des capteurs de rayonnements ultraviolets. Le métabolite du noyau est principalement orienté vers la protection des dommages induits par le stress oxydant. De plus, la couche de cellules épithéliales produirait l'ensemble des métabolites antioxydants identifiés dans le cristallin⁶¹.

La barrière hémato-oculaire isole l'œil du reste de l'organisme. De fait, l'immunologie intraoculaire est spécifique. Toutefois, des phénomènes inflammatoires et immunitaires sont présents. De nombreuses cytokines, dont les taux d'expressions varient selon les pathologies, sont retrouvées dans l'œil. Sharma *et al.* ont démontré que les niveaux d'expression du fibrinogène et de métalloprotéinases de la matrice (MMP-2) sont plus importants chez les patients cataractés et diabétiques que chez ceux ne présentant aucun trouble du métabolisme

glucidique. De plus, les auteurs démontrent une diminution significative du taux de glutathion S-transférase chez ces patients⁶⁸.

II. Facteurs exogènes participant au métabolisme de l'œil

A. La photo-oxydation

L'oxygène et les rayons ultraviolets contribuent au métabolisme de l'œil en modifiant l'homéostasie basale.

Le rôle néfaste de l'exposition aux ultraviolets de l'œil et le développement de pathologies ophtalmiques furent établis par Duke-Elder dès 1926^{69,70}.

Le spectre solaire est divisé en plusieurs plages de longueurs d'onde (figure 4). Les rayonnements ultraviolets correspondent aux longueurs d'ondes inférieures à 400nm. Ce groupe est lui-même subdivisé en 3 sous-groupes :

- Les UV-A, proches du spectre du visible ;
- Les UV-B, correspondant à des longueurs d'onde intermédiaires ;
- Les UV-C, correspondant aux longueurs d'ondes les plus courtes.

Tous les rayons ultraviolets émis par le soleil ne parviennent pas à l'œil. La couche d'ozone filtre une grande partie des longueurs d'ondes courtes. Seuls 5% des UVB traversent l'atmosphère alors que presque aucun UVC ne parvient jusqu'au sol. A l'inverse, 95% des UVA parviennent jusqu'à la cornée. Les UVA ont une action néfaste sur la rétine⁶³. Les composants de l'œil ont la capacité de filtrer une partie des UV ce qui contribue à limiter leur toxicité sur la rétine (figure 6). Les longueurs d'ondes inférieures à 290nm (UVB) sont pratiquement toutes absorbées par la cornée. Les longueurs d'ondes allant de 300 à 320nm sont en partie filtrées par la cornée, protégeant ainsi la rétine des dommages dus aux ultraviolets⁷¹.

La capacité de filtration de l'œil possède certaines limites. Une exposition prolongée aux rayons ultraviolets induit l'apoptose et la perte des cellules épithéliales de la cornée. Les quelques UV-B traversant la cornée sont connus pour amorcer la formation de radicaux libres et celle d'autres espèces liées aux mécanismes physiopathologiques du stress oxydant⁷²⁻⁷⁴.

Le cristallin possède également une capacité anti-UV et absorbe les UVB résiduels non filtrés par la cornée. Seuls les UVA ont la capacité de traverser le cristallin pour atteindre la rétine avec un potentiel délétère avéré⁷⁵.

Il existe des variations intra et interindividuelles dans la capacité de filtration des rayonnements. La variation intra et interindividuelle la plus documentée est celle liée à l'âge. L'œil des jeunes enfants ne permet pas 100% de filtration des UVB avant l'âge de 10 ans. Cette population exposée aux UV est considérée à plus fort risque de vieillissement que pour une population adulte. La diminution de la transmission du signal lumineux est un processus physiologique de l'œil. Reinboth *et al.* ont ainsi démontré qu'en vieillissant, l'œil perd sa capacité à transmettre la lumière. La décroissance est constante aboutissant à moins de 50% de transmission du spectre visible après 60 ans⁷⁶.

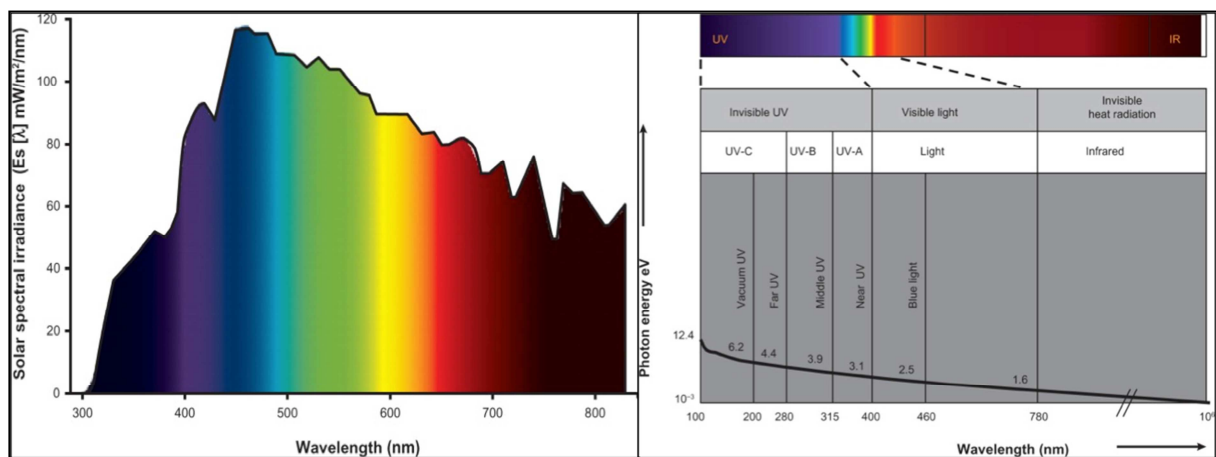


Figure 5 : Représentation du spectre UV-visible et des subdivisions de classes d'ultraviolets

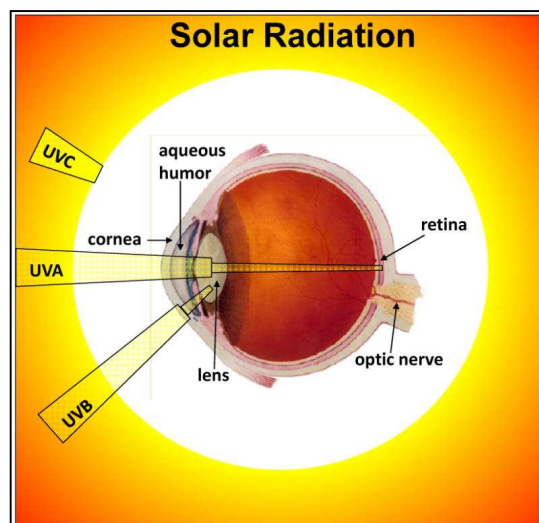


Figure 6 : Filtration des ultraviolets par l'œil⁷²

B. Les comorbidités

D'autres facteurs physiopathologiques, exogènes à l'œil, sont connus pour modifier la composition de l'humeur aqueuse et l'incidence de pathologies oculaires. La glycémie oculaire augmente significativement chez les patients diabétiques. Le diabète est un facteur de risque de la survenue de cataractes, d'uvéites ou encore de dégénérescences maculaires liées à l'âge (DMLA). Les personnes diabétiques mal équilibrées depuis plus de 10 ans sont plus à risque. De même, les patients atteints de diabète de type 1 développent en moyenne une cataracte 20 ans plus tôt que des groupes de populations comparables.

III. Vieillesse de l'œil

La sénescence de l'œil concerne aussi bien les capacités physiques que métaboliques. La capacité de filtration de la lumière diminue avec l'âge. Au niveau clinique, les couleurs perçues par les patients s'estompent, les rayons UV ont une meilleure pénétrance et la capacité d'accommodation diminue.

Plusieurs travaux ont montré l'évolution constante de certaines fonctions physiologiques de l'œil. Les personnes vieillissantes présentent un contraste spatial diminué ainsi qu'une vision nocturne altérée. La difficulté d'avoir une bonne vision dans un environnement faiblement éclairé est multifactorielle. L'augmentation de la densité du cristallin, le myosis pupillaire et la diminution de la densité des photorécepteurs ROD de la rétine sont les physiopathologies les plus communément admises. Toutefois, cette approche multifactorielle se complique sur le plan biochimique. La densité des récepteurs ROD varie selon la zone anatomique de l'œil ; les récepteurs sont plus densément présents au niveau de la rétine par rapport à la zone péri-maculaire. D'autres récepteurs, tels que celui de la rhodopsine, varient également. L'explication physiopathologique de ces variations serait plus celle d'un ralentissement du renouvellement des entités biochimiques que celle d'une disparition nette de ces dernières. Ces faits scientifiques témoignent d'une modification physiologique et biochimique de l'homéostasie de l'œil au cours du vieillissement⁷⁷.

D'autres paramètres évoluent avec l'âge. L'œil âgé présente un seuil critique de fusion du papillotement (*Time-varying target*) lié à la persistance rétinienne plus importante. Le temps nécessaire entre deux stimuli visuels discontinus pour que l'œil et le cerveau les distinguent s'allonge. De plus, une augmentation du temps de perception et d'interprétation d'un signal

visuel est notée. Elle s'accompagne plus globalement, en dehors des démences, de pathologies neurodégénératives, d'un allongement du temps de discrimination, de reconnaissance et identification d'un stimulus visuel. La perte de chaque fonction de l'œil progresse plus ou moins rapidement. La perte de sensibilité aux couleurs survient tardivement (au-delà de 80 ans) mais progresse exponentiellement. La diminution de la sensibilité de contraste en faible luminosité ou exposé à des éblouissements diminue précocement dans le vieillissement de l'œil mais progresse lentement⁷⁸.

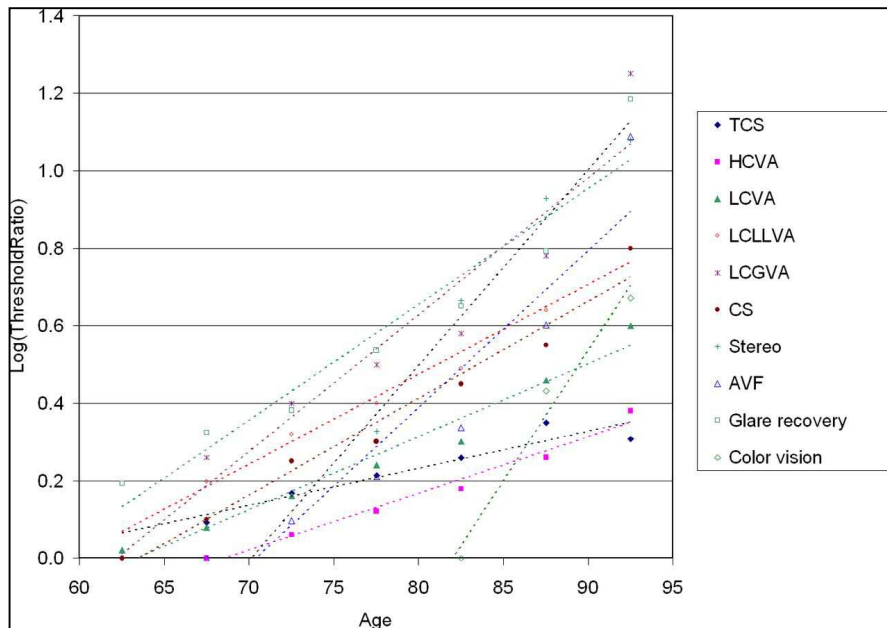


Figure 7 : Facteurs visuels en fonction de l'âge

HCVA : acuité visuelle pour contraste élevé), LCVA : acuité visuelle pour faible contraste, LCLLVA : acuité visuelle pour faible contraste faible luminosité, LCGVA : acuité visuelle pour faible contraste 1 minute d'éblouissement, CS : sensibilité de contraste de Pelli-Robson, stéréo : 4 niveaux d'exposition à des stimuli diffusés en stéréo et AVF : ratio de champs visuel selon Smith Kettlewell⁷⁸.

Sur le plan anatomique, la cornée évolue dès les premières années de la vie. Sa densité cellulaire baisse au cours des cinq premières années de vie. Par la suite, lors du vieillissement, elle s'aplatit, se calcifie aux périphéries de la bordure de Bowman alors que la membrane de Descemet s'épaissit⁷⁹.

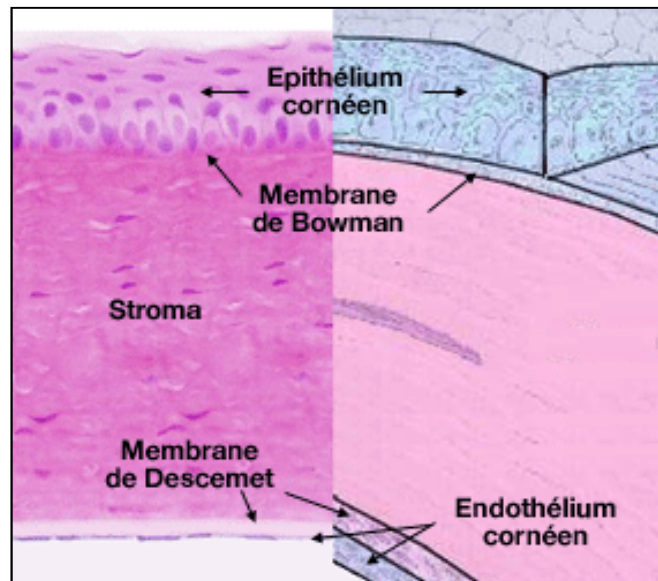


Figure 8 : Coupe histologique de cornée humaine

Le vieillissement du cristallin est un processus physiologique lié à l'âge. Connue sous le terme de cataracte sénile, la physiopathologie est multifactorielle. L'apparition de la cataracte est le pan clinique d'un processus de vieillissement très précoce et multifactoriel du cristallin. En vieillissant, le cristallin change de couleur et s'opacifie au centre sans que cela ne perturbe la vision². La forme du cristallin change durant la croissance. Il est rond à la naissance et tend à s'allonger et à s'ovaliser. Parallèlement à son élongation, le cristallin se densifie. La masse varie de 90 mg à la naissance pour atteindre une masse moyenne de 280 mg vers 80 ans. Sur le plan biochimique, des modifications de l'homéostasie intrinsèque aboutissent à la dégénérescence équatoriale et corticale postérieure des fibres du cristallin. Une oxydation des protéines aboutit à une modification des couleurs du cristallin. L'hématoxyline est une des protéines engagées dans ce processus physiopathologique de modification de la clarté du cristallin⁷⁹.

La capsule du cristallin s'altère également lors du vieillissement de l'œil. Fisher RF a démontré que la perméabilité de celle-ci s'accroît au cours du développement de la cataracte sénile donc du vieillissement de l'œil⁸⁰.

Chapitre II : Physiopathologie de la cataracte

I. Epidémiologie et chiffres clefs

Selon l'organisation mondiale de la santé, sur les 39 millions de personnes aveugles recensées dans le monde, 18 millions le seraient des suites d'une cataracte^{81,82}. La cataracte liée à l'âge est la principale pathologie cécitante au monde⁶. La prévalence double à chaque décade à partir de l'âge de 40 ans¹. La cataracte sénile touche plus de 20% de la population à partir de 65 ans, et plus de 80% au-delà de 85 ans¹⁴. L'âge est de fait assimilé à un facteur de risque bien qu'il s'agisse de la conséquence du vieillissement naturel de l'œil.

Les femmes (sex ratio : 1,5/1) et les populations noires sont plus souvent atteintes de cataracte⁸².

II. Signes cliniques

Il n'existe pas un seul type de cataracte. Selon la partie de la lentille principalement atteinte la cataracte porte différents qualificatifs. L'opacification du cristallin peut débuter en 3 zones distinctes^{42,83}.

- La zone nucléaire du cristallin est la plus fréquemment touchée devant l'atteinte corticale et sous capsulaire postérieure.
- La cataracte nucléaire touche le centre du cristallin. Elle est cliniquement gênante lorsque la taille devient importante. L'opacification corticale touche le cortex cristallinien antérieur et postérieur. La clinique est caractérisée par un phénomène d'éblouissement en lumière vive.
- La cataracte sous-capsulaire postérieure est plus fréquente chez les jeunes adultes que chez les personnes âgées. Elle est souvent la conséquence de traumatisme, de prise de corticoïdes ou d'un diabète mal équilibré. Une inflammation intraoculaire peut également être à l'origine d'une cataracte sous-capsulaire.

L'imagerie par une lampe à fente permet la classification des cataractes selon l'opacification globale, l'opacification nucléaire et la couleur du noyau^{2,84}.

Cliniquement, le cristallin blanchit visiblement et l'acuité visuelle des patients diminue. Ce symptôme est le principal signe clinique d'appel. La perte d'acuité ne concerne que la vision

éloignée alors que la vue de proche est conservée. L'opalescence peut également générer la sensation d'un voile devant les yeux.

Dans le cas des cataractes sous-capsulaire, le tableau peut s'accompagner d'éblouissements caractérisés par des phénomènes de halos autour des sources lumineuses. Une modification de la perception des couleurs est également décrite par certains patients. Elle est la conséquence directe du jaunissement du cristallin et de la modulation des lumières filtrées par celui-ci.

Lorsque la cataracte se développe en plusieurs points du cristallin un phénomène de polyopie peut être signalé².

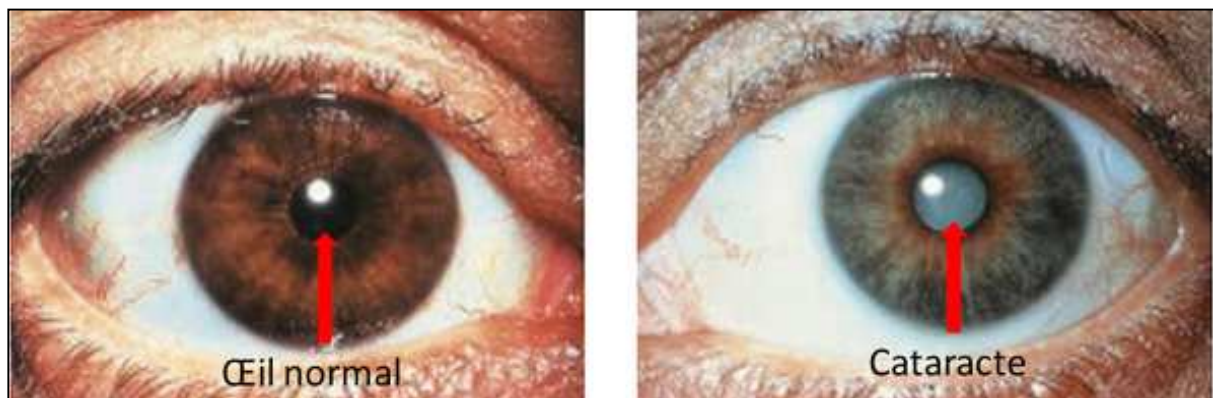


Figure 9 : Blanchissement clinique du cristallin cataracté

Quelle que soit l'étiologie, le développement de la cataracte est la conséquence de la perte de l'équilibre de l'homéostasie de l'œil. Plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques sont impliqués dans la physiopathologie.

Sur le plan protéomique, l'élément responsable de l'opacification du cristallin est la précipitation des protéines présentes dans le corps cellulaire. L'isoforme α de la cristalline perd sa capacité de protéine chaperon. L'effet antiagrégant protéique (ou rôle chaperon) de l' α -cristallin diminue⁸⁵. La quantité croissante d'agrégats protéiques dans le cristallin diminue progressivement la transmission visuelle.

Les cataractes congénitales, peu fréquentes, sont la conséquence physiopathologique d'embryopathies infectieuses (rubéole, toxoplasmose, infections à cytomégalovirus et à herpès simplex virus) ou bien d'anomalies génétiques (transmission autosomique dominante)⁵. Les cataractes chez l'enfant et le jeune adulte sont le plus souvent post-traumatiques^{3,4}. En effet, après un traumatisme, pour environ deux-tiers des cas, les yeux atteints développent rapidement une cataracte. Le lien est fort lorsque le traumatisme est perforant ou violent. En cas de perforation de la capsule, si la taille est supérieure à 3mm aucune cicatrisation n'est possible. Les fibres du cristallin subissent alors un gonflement mécanique par exposition à l'humeur aqueuse. Pour des perforations de tailles inférieures, la

cicatrisation est possible et l'apparition d'une cataracte traumatique n'est pas systématique. Un traumatisme faible mais résultant de l'insertion d'un corps étranger métallique en fer ou en cuivre induit une cataracte jaune-orangée dans le premier cas et en fleur de tournesol dans le second.

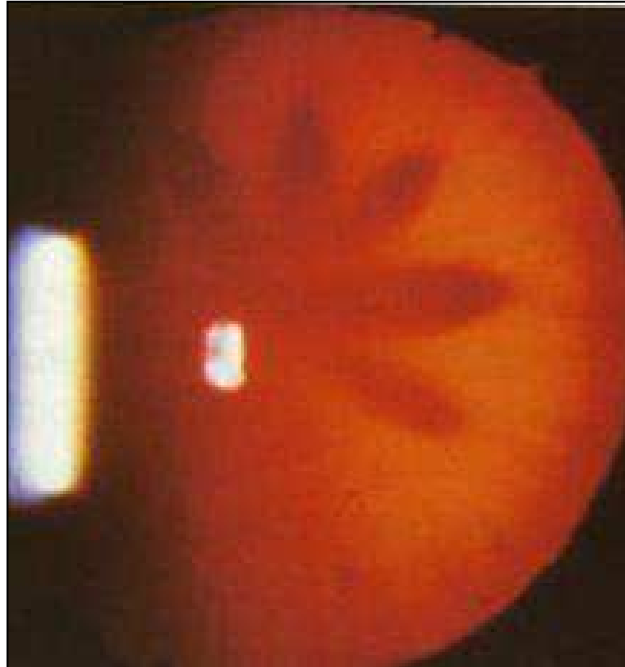


Figure 10 : Cataracte en « fleur de tournesol »

Le traumatisme à l'origine du développement de la cataracte n'est pas seulement mécanique, il peut également être chimique ou physique. L'exposition à de très fortes chaleurs entraîne l'apparition d'une opalescence floconneuse dans la dizaine d'années suivant l'exposition. L'exposition de l'œil à une électrocution ou bien à des rayonnements ionisants (radiothérapie orbitaire par rayon X ou γ , accident nucléaire) induit dans les quelques années suivantes l'apparition d'une cataracte. L'exposition chimique de l'œil à des bases chimiques induit également l'apparition très précoce d'une cataracte caustique.

La cataracte peut être secondaire à une autre pathologie oculaire. En effet, l'inflammation chronique est un facteur de risque connu de développement d'une opalescence du cristallin. Chez les patients atteints d'uvéites, 40 % sont diagnostiqués pour une cataracte le plus souvent sous-capsulaire postérieure. L'origine mixte de l'inflammation, donc du stress oxydant, et la consommation régulière de corticoïdes expliquent le lien de causalité. La présence d'un syndrome de pseudoexfoliation est également liée à l'apparition d'une pathologie oculaire. Au niveau du cristallin une cocarde caractéristique se dépose. La survenue d'une cataracte corticonucléaire est très fréquente chez les patients atteints d'un syndrome de pseudoexfoliation capsulaire. La maladie de Wilson, caractérisée par une

surcharge de l'organisme en cuivre, est également un facteur de risque de développer une cataracte en « fleur de tournesol » (figure 10)^{2,64}.

La pratique d'un geste chirurgical ophtalmique est également un facteur supplémentaire de survenue d'une cataracte. La vitrectomie postérieure est souvent citée comme exemple d'acte chirurgical à risque de complications.

De plus, certaines comorbidités non oculaires sont également corrélées à la survenue de cataracte. L'existence de carences protéiques ou de carences en vitamines est également à l'origine de cataractes de type sénile chez des patients jeunes. Le diabète est la comorbidité dont le lien est le plus avéré. La présence d'une cataracte sous-corticale postérieure chez un patient de moins de 60 ans interroge sur l'existence d'un diabète non diagnostiqué. L'hypocalcémie idiopathique ou liée à une insuffisance parathyroïdienne est également une étiologie du développement de cataractes.

Bien que la pathologie soit le plus souvent diagnostiquée chez les personnes âgées, il existe plusieurs facteurs de risques identifiés permettant la mise en place d'une prévention primaire. L'exposition chronique aux ultraviolets est le facteur de risque le plus souvent cité⁸⁶. La causalité entre l'exposition chronique au soleil et l'incidence de la cataracte est décrite depuis bientôt un siècle⁶⁹. D'autres facteurs tels que la consommation de tabac ou de médicaments (les corticoïdes ou la chlorpromazine) ont été incriminés^{10,82,87}. Le lien entre la prise de corticoïdes et la cataracte est également démontré depuis plusieurs années. Les analyses épidémiologiques concluent que l'effet du corticoïde est indépendant de la voie d'administration. Ainsi, les patients traités par corticoïdes inhalés sur le long court ont un risque supérieur de développer une cataracte^{8,82,88}. D'autres médicaments sont également considérés comme des facteurs de risque de développement d'une cataracte :

- Les collyres contenant des agents anticholinestérases ;
- L'allopurinol, l'amiodarone, les phénothiazines ;
- L'isotrétinoïne, et pour cette dernière, les opacifications sont réversibles si le traitement est de courte durée.

L'hygiène de vie des patients contribue au risque de développement de cataractes. La consommation régulière de tabac induit une augmentation du risque de développer une cataracte sénile précoce. La consommation d'autres drogues ou d'alcool peut également accroître ce risque. Selon une méta-analyse de Gong *et al.*, seuls les grands consommateurs d'alcool (>20g/jour ou 140g/semaine) auraient un risque accru de développer une cataracte sénile. La consommation modérée (<20g/jour) serait un facteur de protection^{89,90}. D'autres facteurs plus atypiques sont jugés à risque dans la physiopathologie. Le taux de cataracte est

supérieur chez les patients asthmatiques et les patients schizophrènes⁸². La quantité de photons reçue annuellement dépend de la latitude et de l'altitude de résidence. Ainsi, la zone géographique d'habitation est considérée comme un facteur de risque de développement d'une cataracte sénile^{82,91,92}.

Chapitre III : Traitement et complications de la cataracte

I. Procédure chirurgicale – Extraction du cristallin

A. Historique

Les premiers textes évoquant la chirurgie de la cataracte datent de 4000 ans. Quelques témoignages du passé révèlent la volonté de soigner la baisse de la vision provoquée par le blanchissement du cristallin. Aulus Cornelius Celsus (-25/50 après JC) est un des premiers à avoir retranscrit en détail l'intervention d'abaissement du cristallin. Cette technique consistant à faire descendre le cristallin dans l'humeur vitrée fut pratiquée jusqu'au milieu du XVIII^{ème} siècle. En 1750, le Français Jacques Daviel (1693-1762) a réalisé pour la première fois une réelle extraction du cristallin.

B. Chirurgie moderne

Actuellement, l'unique technique chirurgicale reconnue est l'extraction du cristallin ou phacoémulsification. La technique fut inventée en 1967 par l'Américain Charles Kelman^{93,94}. Cette nouvelle technique consiste à découper le cristallin en quadrants, les broyer au moyen d'ultrasons et les aspirer dans le même temps chirurgical.

En 1990 la *Food and Drug Administration* (FDA) a autorisé le premier implant souple pour le remplacement du cristallin. Cet implant en silicone a permis par la suite d'améliorer la technique chirurgicale en la rendant moins traumatique⁹⁵. Aujourd'hui la chirurgie de la cataracte est principalement réalisée en chirurgie ambulatoire du fait des avancées majeures réalisées¹⁶ (temps opératoire, complications post-chirurgicales, anesthésie locale, etc.).

Plusieurs conférences de consensus définissent un mode opératoire standard pour réduire les complications traumatiques et infectieuses post-chirurgicales¹².

Durant l'intervention, l'œil anesthésié est maintenu hydraté par une solution viscoélastique d'irrigation. La cornée n'est pas découpée, une incision est réalisée pour permettre l'introduction des dispositifs médicaux de chirurgie. La taille de l'incision est minimisée pour réduire le risque d'astigmatisme postopératoire ainsi que les complications infectieuses.

Actuellement la taille de l'incision est de 2mm mais tend à être réduite pour une incision à 1,8mm⁹⁶.

Le cristallin, logé dans la capsule, n'est pas directement accessible aux instruments. Le chirurgien pratique manuellement une capsulorhexie circulaire continue (CCC)⁹⁷. Ce geste permet la découpe de la partie antérieure de la capsule. Il améliore la biocompatibilité globale de l'implant⁹⁸. Le diamètre de la CCC peut varier, il est dit large à 6 ou 7mm et étroit entre 4,5 et 5,5mm. La taille de la capsulorhexie est un facteur pondérant de survenue de complications postopératoires. Cependant, les résultats des études cliniques divergent quant à la meilleure taille de CCC pour réduire le taux de complications⁹⁸⁻¹⁰². La dextérité du chirurgien, et plus généralement son expérimentation de la technique de chirurgie, est un facteur important dans la survenue des complications postopératoires dans la chirurgie de la cataracte¹⁰³. Pour accroître la reproductibilité du geste de CCC et la chirurgie de la cataracte, l'utilisation d'un femtolaser est actuellement évaluée. La plus-value de la technique ne fait toujours pas consensus tant sur les résultats directs que les considérations indirectes telle que la préservation des cellules endothéliales de la cornée au cours de la chirurgie¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

L'utilisation continue de solution viscoélastique maintient la capsule en forme durant toute l'intervention et atténue également les risques traumatiques liés aux ultrasons.

Lors de la chirurgie, l'objectif principal est d'éliminer le maximum de cellules épithéliales de cristallin. La présence de cellules résiduelles est une condition nécessaire, mais non suffisante, pour expliquer l'apparition de nouvelles opacifications postopératoires. En effet, toutes les cellules résiduelles de cristallin peuvent proliférer de nouveau et générer une nouvelle opacification¹⁰⁷.

II. Lentilles intraoculaires pour l'œil aphake

A. Historique

L'œil aphake ne peut plus focaliser la lumière sur la rétine. Des dispositifs médicaux correctifs sont nécessaires pour restaurer une vision nette. L'utilisation de lunettes correctrices a longtemps été la seule alternative. Ce n'est qu'à partir de la seconde moitié du XX^{ème} siècle que des lentilles intraoculaires artificielles à base de matériaux plastiques ont été proposées.

La découverte de cette thérapeutique est fortuite. Au lendemain de la seconde guerre mondiale, plusieurs ophtalmologistes ont constaté la présence d'éclats de plexiglas dans les

yeux d'aviateurs de la Royal Air Force. Ces morceaux de pare-brise d'avions ne représentaient aucune gêne pour la vision des patients. Ce constat de biocompatibilité a permis, en 1949, à Sir Harold Ridley (1906-2001) la première implantation d'une lentille en polyméthacrylate de méthyle (PMMA)^{94,108}.



Figure 11 : Lentille intraoculaire en PMMA utilisée par Sir H. Ridley

Les dérivés acryliques ont été les premiers matériaux utilisés pour substituer le cristallin manquant de l'œil aphake. Initialement tous les matériaux utilisés étaient rigides. Par la suite, les améliorations parallèles des techniques chirurgicales et de la connaissance des polymères ont permis de réduire la taille des incisions de la cornée et, de ce fait, de limiter l'invasivité de la chirurgie. En effet, la famille chimique des acrylates, dont le PMMA est un représentant, possède des propriétés thermodynamiques propices à l'obtention de copolymères souples à température ambiante. Cette particularité plastique rend possible le repliement de la lentille artificielle et, de fait, son injection dans l'œil. Le fabricant Alcon[®] (Hünenberg, Suisse) a été le premier à développer et commercialiser une lentille en acrylate souple. Cette innovation majeure a permis une amélioration de la qualité du geste chirurgical, une diminution de la durée d'intervention, des complications et *in fine* le développement d'une intervention en chirurgie ambulatoire.

Les implants du fabricant Alcon[®] sont donc souvent considérés comme les implants de référence dans les évaluations précliniques et cliniques.

Les implants intraoculaires disponibles peuvent se définir selon plusieurs caractéristiques.

Aujourd'hui, Alcon[®] n'est plus le seul fabricant de dispositifs médicaux à proposer des implants intraoculaires souples. Le marché des lentilles intraoculaires est très fourni. Plusieurs facteurs permettent le classement des lentilles intraoculaires. Leur forme, leurs sites et technique d'implantation ou encore leurs propriétés optiques démultiplient les références disponibles. Malgré l'hétérogénéité de l'offre, certains critères spécifiques sont associés à meilleurs résultats chirurgicaux.

B. Indications spécifiques retenues des lentilles intraoculaires

D'une manière générale, les indications des lentilles intraoculaires (LIO) portent sur la vision du patient plus que sur le risque de développer une complication postopératoire.

Les implants intraoculaires possèdent des puissances optiques propres pour s'adapter au mieux à la vision du patient opéré. Les propriétés optiques des lentilles varient. Il existe trois types de lentilles intraoculaires :

- Les lentilles dites monofocales dotées d'une dioptrie spécifique. Ces implants ne permettent pas une bonne qualité visuelle et demandent au patient le port de lunettes.
- Les implants multifocaux restaurent la capacité d'accommodation.
- Les implants toriques quant à eux sont façonnés afin de corriger le défaut d'astigmatie présent avant la chirurgie que les autres implants ne peuvent pas corriger.

Pour tous les *designs* de lentilles intraoculaires, deux versions sont commercialisées. Une version avec et une version sans filtre jaune. Ce filtre est destiné à filtrer la lumière bleue. La dichotomie de l'offre résulte de la balance entre la toxicité de la lumière bleue sur la rétine et son influence sur les cycles de sommeil et d'éveil des patients porteurs de lentilles intraoculaires¹⁰⁹.

Aucune lentille intraoculaire ne possède d'indication spécifique ou n'a démontré de meilleurs résultats chez les patients atteints de comorbidités telle que l'uvéite¹¹⁰. Apple *et al.*, ont préconisé de limiter l'utilisation des implants en silicone pour les patients risquant de subir une vitrectomie. En effet, selon leurs observations, l'utilisation d'huile de silicone au cours de la chirurgie altère l'intégrité des implants en silicone^{111,112}. Brage-mele *et al.*, ont proposé de limiter l'utilisation des implants toriques et multifocaux à certains patients en fonction de critères hygiéno-diététique¹¹³.

C. Biocompatibilité des lentilles intraoculaires

La biocompatibilité des lentilles intraoculaires permet de limiter les complications postopératoires et de prévenir l'incidence de l'opacification capsulaire postérieure (PCO) en améliorant l'interaction entre la capsule et l'implant.

La biocompatibilité des lentilles intraoculaires se définit par le maintien de l'axe optique et de l'intégrité de l'œil. L'absence de corps étranger, principalement les cellules inflammatoires, est également un facteur témoignant d'une bonne biocompatibilité¹¹⁴.

Au niveau de l'uvée, la biocompatibilité est définie par le non afflux de cellules pro-inflammatoires (leucocytes principalement). Une fragilité de la barrière hémato-oculaire ou un syndrome inflammatoire (pseudoexfoliation ou uvéites) accroît le risque de mauvaise biocompatibilité uvéale. Dans la capsule, la biocompatibilité assure le maintien du phénotype des cellules épithéliales de cristallin.

La biocompatibilité varie en fonction du type d'implant. Les implants en acrylates hydrophiles sont associés à un risque de contracture capsulaire antérieure¹¹⁵. Pour les implants en acrylates hydrophobes, les bio-incompatibilités rapportées sont la présence de cellules géantes au niveau antérieur et l'existence d'une prolifération cellulaire accompagnée de fibrose responsable d'une opacification capsulaire au pôle postérieur. Au sein d'une même classe chimique, les propriétés de surface, et par conséquent la biocompatibilité, varient d'un fabricant à l'autre¹¹⁴.

D. Géométrie des lentilles intraoculaires

Les implants sont tous constitués d'une lentille à laquelle se fixent les haptiques. Le rôle des haptiques est de figer l'implant dans la capsule pour prévenir sa rotation et limiter la survenue de la PCO. La taille du dispositif médical est homogène. Le diamètre du corps de lentille mesure 6mm. Le diamètre total, incluant les haptiques, est voisin de 13mm¹³.

Les haptiques, quels que soient leur forme et leur nombre, peuvent être monobloc dans le prolongement du corps de la lentille et sont dits 1-pièce. Ils peuvent également être greffés au corps de la lentille, ils sont alors nommés 3-pièces. La forme du bord de la lentille, qui est rond ou carré, joue également un rôle important dans la biocompatibilité (figure 12). Le bord carré est actuellement considéré comme un standard du fait qu'il améliore nettement la biocompatibilité selon l'unique critère de jugement d'incidence de l'opacification capsulaire postérieure¹¹⁶. Nanavaty *et al.*, ont précisé la notion de bord carré. Leur évaluation a mis en évidence qu'une arrête d'angle fine assure un meilleur effet barrière^{117,118} Enfin, la lentille peut être biconvexe ou plano-convexe. Enfin le nombre d'haptiques varie, au nombre de deux ou quatre et peuvent être fin ou épais.

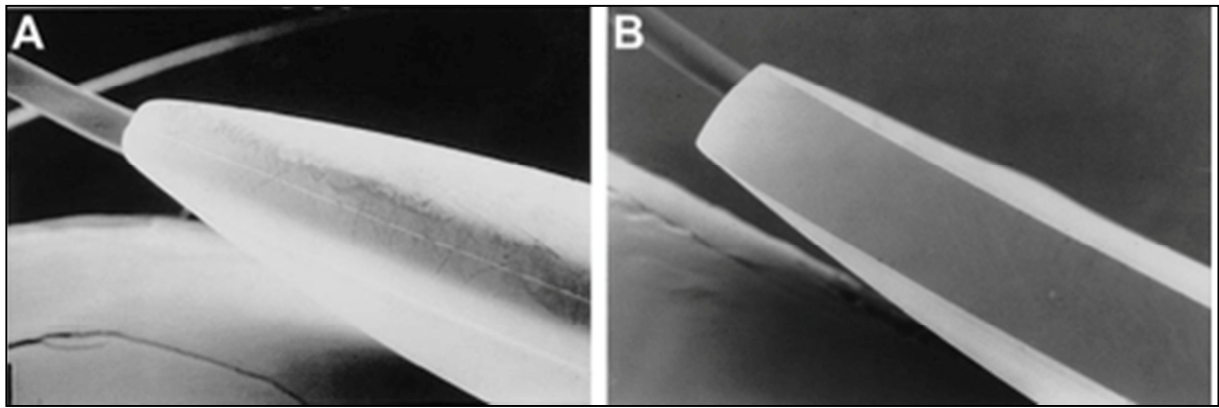


Figure 12 : Implants à bord rond (fig. A) et à bord carré (fig. B)

E. Copolymères des lentilles intraoculaires

Les deux principaux matériaux sont :

- Les acrylates souples.
- Le polydiméthylsiloxane (PDMS) ou silicone¹³.

Les premiers sont commercialisés depuis les années 90. Ils sont dérivés du PMMA rigide. Deux types d'acrylates se distinguent. D'une part, les acrylates hydrophobes dont le degré d'hydratation est inférieur à 5%. En pratique, leur taux d'hydratation est inférieur à 1%¹¹⁹. Les lentilles en acrylates hydrophiles, d'autre part. Celles-ci sont hydratées à plus de 20%.

Plusieurs alternatives aux copolymères historiques sont proposées. Récemment le fabricant Bausch & Lomb[®] (Rochester, États-Unis) a commercialisé une lentille intraoculaire hydrophobe à 4% d'hydratation. Celle-ci est constituée d'un copolymère d'acrylates hydrophobes, d'un acrylate hydrophile et de styrène. Cette lentille intraoculaire devrait permettre, par ses propriétés hydrophobes et hydrophiles, de limiter le risque de toxicité induite par les implants hydrophiles tout en prévenant le risque de PCO par les bords carrés et ses propriétés hydrophobes¹²⁰.

La biocompatibilité des implants dépend pour beaucoup de l'interaction entre la capsule et la surface. De ce fait, plusieurs modèles de greffages chimiques, sur la surface des implants, ont été publiés. Le greffage d'héparine reste celui le plus abouti. Cependant, les résultats des études cliniques n'ont pas donné lieu à des adaptations des pratiques chirurgicales¹²¹.

Des additifs s'ajoutent aux polymères constitutifs des implants. La présence de filtres anti-UV permet, par exemple, de limiter le risque de vieillissement précoce de l'implant. L'ajout de filtre de lumière bleue est également possible pour réduire le risque de toxicité sur la rétine¹²².

F. Les acrylates

1. Définition générale

Les acrylates sont des polyesters vinyliques. Leurs propriétés communes admises sont leur grande transparence et leur résistance aux ruptures tout en restant élastiques. Les termes acryliques, polyacryliques sont utilisés sans distinction comme synonymes pour désigner cette classe chimique.

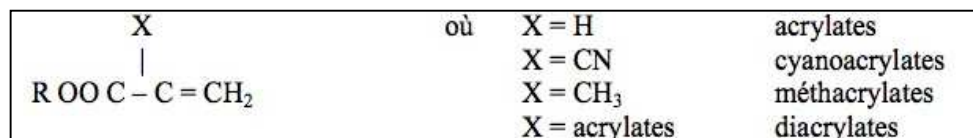


Figure 13 : Structure générale d'un monomère d'acrylate

2. Usages médicaux et industriels

Depuis leur découverte dans les années 1930 les acrylates sont devenus ubiquitaires dans l'industrie et la médecine.

Les monomères et polymères sont utilisés dans la fabrication de colles et de peintures. Les cyanoacrylates synthétisés pour la première fois en 1949 exacerbent les propriétés adhésives communes aux acrylates. Leur utilisation comme colle s'est fortement développée dans différents secteurs industriels tels que ceux liés aux métaux, verres, caoutchoucs, plastiques et textiles.

La polymérisation d'acrylonitrile a permis le développement de fibres acryliques dont l'usage dans le domaine du textile est très répandu.

Le poly-méthyl-méthacrylate (PMMA) plus connu sous le nom de plexiglas[®] ou Altuglas[®] sert de vitre dans l'industrie automobile et aéronautique du fait de l'excellente propriété optique du matériau.

Depuis les premiers essais d'implant en PMMA en 1949, l'utilisation de polymères et de copolymères d'acrylates est devenue un des standards dans le marché des dispositifs médicaux optiques. L'utilisation est commune aux verres des lunettes correctrices, aux lentilles extra et intraoculaires.

Les acrylates ont d'autres usages médicaux en médecine. C'est notamment le cas en orthodontie. Ils sont à la base des résines dentaires ou des dents artificielles. Ils sont également utilisés en chirurgie orthopédique et lors des cranioplasties¹²³⁻¹²⁷. Les acrylates, sous la forme de gels d'acide polyacrylique, ont également été utilisés dans la synthèse de

copolymères pour la vectorisation de principes actifs^{128,129}. La combinaison des deux domaines a mené à des essais de ciments orthopédiques à base d'acrylates contenant des antibiotiques^{130,131}. Les polyacrylates ont également été évalués comme adjuvants de vaccin¹⁸. Enfin, ces polymères ont été développés sous la forme de films dans les soins de supports pour la prévention de l'ulcération de plaies¹³².

3. Vieillessement des acrylates des lentilles intraoculaires

(a) *Principes théoriques du vieillissement des acrylates*

Comme l'ensemble des polymères, les acrylates et les polyacrylates peuvent subir un vieillissement qui peut être induit par plusieurs agents : photo-oxydants, agressions thermiques, attaques à l'ozone, chimiques, catalytiques et la biodégradation¹³³.

La biodégradation est le terme générique regroupant l'ensemble des actions du vivant sur le polymère. Elle se décline en plusieurs procédés de vieillissement : la solubilisation, la dissolution, l'hydrolyse et la dégradation enzymatique¹³⁴. Les carbones insaturés des acrylates constituent une source d'altération possible des polymères. Les principaux retours relatifs aux usages des acrylates font état d'un jaunissement au cours du vieillissement naturel¹³⁵.

Le vieillissement du PMMA a été particulièrement étudié. Les travaux de Holland *et al.*, concluent que la stabilité thermique du PMMA dépend du degré de polymérisation initial ainsi que les modifications dites de pré-oxydation du matériel¹³⁶.

Les travaux de Holland *et al.*, ainsi que ceux menés par Ferriol *et al.*, ont mis en évidence un procédé de dégradation du PMMA en trois étapes dépendantes de la température^{136,137}:

- La première, entre 150 et 200°C, est la rupture des liaisons faibles (H-H) ;
- La deuxième est celle de la dégradation des liaisons insaturées terminales. Elle s'effectue en deux temps. La réaction est initiée par un transfert radicalaire de la chaîne vinyle au polymère. La réaction est entretenue par transfert de chaîne. Les radicaux libres sont de faibles tailles. Ils seraient issus d'impuretés de synthèse, les liaisons hydrogènes, de scission β de la chaîne vinyle ou de scission aléatoire de la chaîne alkyle ;
- La dernière étape concerne la dégradation de la fonction acrylate par scission β plus que par scission aléatoire.

La photo-oxydation des acrylates est un facteur prépondérant dans le mécanisme de vieillissement. L'utilisation des polymères dans les implants dentaires, les peintures

extérieures et les implants intraoculaires place la photo-oxydation comme source prépondérante du vieillissement¹³⁵.

Le procédé de polymérisation et de terminaison des chaînes va fixer la stabilité du polymère. Les polymères de PMMA terminés par des fonctions vinyliques insaturées (PMMA-CH=CH₂) sont plus sensibles que ceux terminés par des liaisons saturées (PMMA-H). Les polymères synthétisés avec des lactames ou des thiols sont plus stables que ceux initiés par l'azobisisobutyronitrile (AIBN). L'ajout de groupements saturés en bout de chaîne permet d'améliorer la stabilité thermique. L'effet obtenu est une dégradation du polymère par pyrolyse plus homogène ainsi que la disparition de la première étape de dépolymérisation par scission des bouts de chaînes¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Bien qu'il existe plusieurs acrylates, le mécanisme de photo-oxydation est toujours identique¹³⁴. Les liaisons insaturées des groupements alkyl et des chaînes carbonées peuvent, sous l'action de la lumière et de l'oxygène, subir une réaction de Norrish (type II)¹⁴¹.

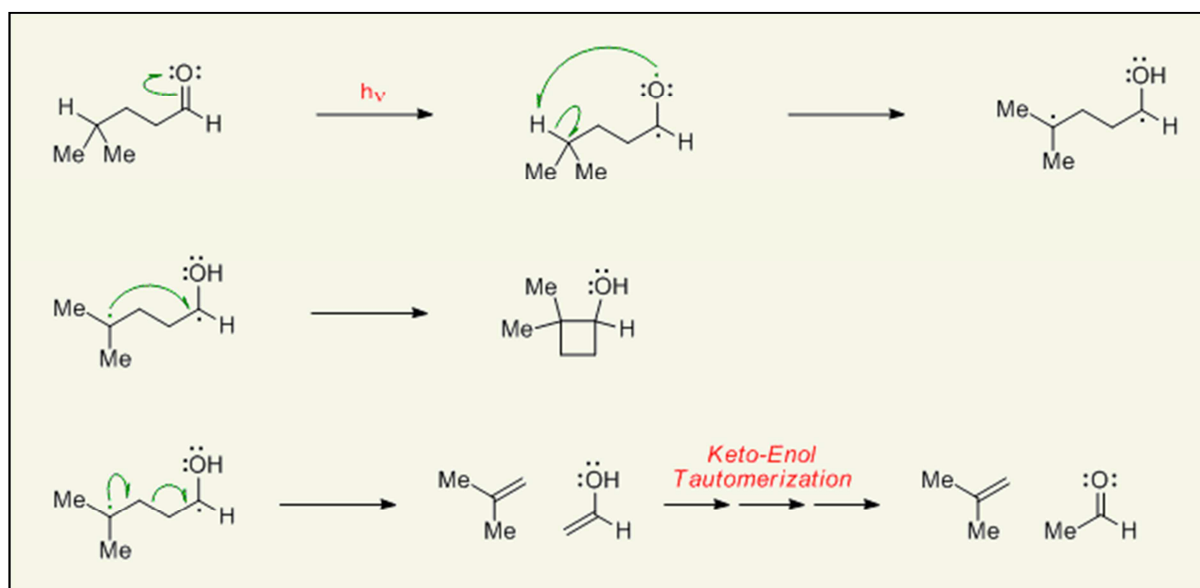


Figure 14 : Réaction de Norrish (Type II)¹⁴¹

La formation de peroxyde et d'hydroperoxyde est l'étape initiale du vieillissement. La forme intermédiaire peroxyde n'est pas stable et génère deux composés distincts par scission de type β . Les produits formés sont des cétones et des aldéhydes.

La photo-oxydation dépend de plusieurs facteurs. La présence d'oxygène est indispensable au phénomène de dépolymérisation par photo-oxydation. L'énergie apportée par l'exposition à la lumière doit être suffisante pour initier la réaction d'oxydation. L'effet de l'exposition aux

UV diffère selon la répartition des masses moléculaires des chaînes et le taux de réticulation du polymère^{36,142}.

Une fois l'oxydation initiée, un cycle d'auto-oxydation peut se mettre en place dans le polymère. L'auto-oxydation est permise par la présence d'éléments radicalaires qui, s'ils ne réagissent pas entre eux, attaquent d'autres liaisons insaturées. Les radicaux libres s'attaquent en priorité aux liaisons les moins fortes du polymère¹³⁴.

Lors de la photo-oxydation surviennent simultanément des dépolymérisations et des réticulations. Lorsque les chaînes alkyles du polymère sont courtes (méthyle et éthyle), les phénomènes sont à l'équilibre et assurent le maintien des caractéristiques du matériau durant le processus de vieillissement^{33,143}. Selon Chiantore *et al.*, la duplicité des phénomènes conduit à de multiples voies de vieillissement. Toutefois, quelle que soit la voie majeure, les produits formés sont toujours les mêmes.

La modification de la distribution moléculaire au sein du polymère est le premier paramètre indiquant un phénomène de vieillissement moléculaire³³. Les travaux de Konaganti *et al.*, confirment l'importance des chaînes alkyles courtes dans un copolymère de poly(méthyle méthacrylate-co-alkyle acrylate). Plus la proportion de chaînes alkyles dans le copolymère est grande, plus ce dernier est stable à la photo-oxydation. Ces travaux démontrent également que la stabilité à la photo-oxydation est supérieure avec des chaînes latérales de butyles qu'avec des chaînes méthyles³⁶. Selon Vinu *et al.*, lors d'une exposition aux UV, le taux de scission de chaînes décroît linéairement avec l'augmentation de la taille des groupes alkyles latéraux³⁵.

L'équilibre entre la scission de chaînes et la réticulation dépend également du degré de réticulation et de la température. Krongauz *et al.* ont établi qu'un taux de réticulation important réduit d'autant l'importance de la dépolymérisation lors de la photo-oxydation. Cela serait dû à la faible mobilité des chaînes du polymère, à la diminution de la diffusion de l'oxygène au travers du polymère et au fort taux de recombinaison des espèces réactives de l'oxygène durant la migration dans le matériau^{144,145}. La température influencerait également l'équilibre. Une température supérieure à la température de transition vitreuse (Tg) serait en faveur d'une réticulation plus importante. À l'inverse, une température inférieure au Tg conduirait à une rupture des chaînes de polymère¹⁴⁶.

L'ensemble des travaux publiés démontre l'importance des groupes alkyle dans la stabilité des copolymères à la photo-oxydation. Tous les groupements n'ont pas la même stabilité à la photo-oxydation. Chiantore *et al.* ont également démontré que les groupes alkyle fluorés

(2,2,2-trifluoroéthyle) améliorent la stabilité chimique, thermique et photochimique globale d'un copolymère d'acrylate¹⁴⁷.

Plusieurs copolymères, dont celui de l'implant en VISTA[®], intègrent d'autres familles chimiques que les acrylates afin d'améliorer les performances optiques et la biocompatibilité. Ainsi, l'implant en VISTA[®] comporte du styrène et des chaînes de polyéthylène glycol (annexe 1).

Lors de la photo-oxydation, le polystyrène jauni et se dépolymérise. La dépolymérisation se déroule en deux étapes :

- Une dégradation des composés instables à la lumière ;
- Une photolyse des structures néoformées par oxydation.

La dégradation est directe par formation de radicaux alcoyle ou indirecte par la production de cétones dérivées des structures alcoyle. La stabilité d'un polymère dépend de nombreux facteurs. Les composés organiques de faible masse moléculaire tels que la benzophénone, l'antraquinone, le peroxyde benzoylé facilite les réactions de photo-dégradation, photo-destruction et photo-oxydation. La benzophénone apportant la plus grande activité dans l'initiation de tels mécanismes de dégradation^{148,149}.

La dégradation dépend de la mobilité des chaînes et des radicaux libres. Les radicaux hydroxyles ont une mobilité supérieure à celle des phényles, en lien direct avec la taille des groupements. Pour prévenir la dégradation du polymère, des additifs sont ajoutés ; à savoir des absorbants d'UV, des filtres de lumières, des stabilisants, des réducteurs des radicaux libres et des molécules dégradant les peroxydes. Les filtres anti-UV proposés pour réduire l'effet de la photo-oxydation présentent une limite concernant l'épaisseur nécessaire pour obtenir un plein effet¹⁴⁸.

Les chaînes polyéthylène glycol et les hydrogels sont sensibles à l'hydrolyse¹⁵⁰. Les hydrogels, dont le poly-HEMA (PHEMA) est un représentant, perdent leur capacité hygroscopique et deviennent fragile à mesure qu'ils réticulent lors d'une exposition aux UV¹⁵¹.

(b) *Vieillessement des acrylates des lentilles intraoculaires*

Le suivi clinique et certaines évaluations précliniques des lentilles intraoculaires permettent de renseigner le comportement des implants lors du vieillissement.

Le vieillissement des lentilles intraoculaires est perçu par la diminution de leur transparence et leur dislocation^{152,153}. Pour les lentilles hydrophobes, le phénomène du *glistening* et le gonflement du polymère en milieu aqueux sont deux signes manifestes d'un vieillissement.

Le glistening a été décrit pour la première fois en 1985. Il s'agit de l'apparition de microvacuoles d'eau au sein des implants en acrylates hydrophobes. Le phénomène est cependant présent pour tous les implants à base d'acrylates ou de silicone mais est principalement diagnostiqué pour les implants du fabricant Alcon®. L'explication proposée pour justifier l'apparition du *glistening* vient du procédé de polymérisation. Les lentilles en acrylates hydrophobes ont, pour la majorité, une hydratation résiduelle voisine de 0,5%. Cette hydratation correspond aux résidus d'impuretés hydrophiles non éliminées lors de la production. Après l'implantation, le réseau du polymère, dont la température de transition vitreuse se situe vers 20°C, devient flexible. Cette mobilité des chaînes permet aux impuretés de se réarranger en diffusant au travers du polymère. Lors d'une diminution de la température, ces impuretés ne pourraient plus diffuser et deviendraient dès lors visibles. Ce phénomène de variation extrême et soudaine des températures est plausible. En effet, il est démontré que les variations extérieures de température influent sur la température physiologique de l'humeur aqueuse. Habituellement de 34°C, la température peut varier entre 30°C et 40 °C selon les conditions extérieures. La formation du *glistening* est visible lors d'un examen intraoculaire à la lampe fine. Toutefois, la communauté des ophtalmologues s'accorde pour conclure que le *glistening* ne perturbe pas significativement la vision des patients. Il n'y a pas d'étude rapportée sur l'influence qu'aurait ce phénomène sur la qualité de vie des patients. Le phénomène ne semble pas impacter la qualité visuelle du patient à l'exception des implants toriques^{119,154-157}.

III. Complications postopératoires

A. Liées à l'acte chirurgical

La chirurgie de la cataracte est accompagnée de nombreuses complications nécessitant un abord pluridisciplinaire afin d'en prévenir la survenue. Les effets indésirables relevés sont aigus (inflammation postopératoire), subaigus, ou chroniques (augmentation de la pression intraoculaire). Les conséquences cliniques sont souvent bénignes dans le cas d'un léger astigmatisme suite à l'incision de la cornée. D'autres complications sont plus graves allant jusqu'à la cécité ou la perte de l'œil.

Le principal effet indésirable grave est l'endophtalmie infectieuse. La contamination bactérienne au décours de la chirurgie induit une infection intraoculaire pouvant amener à

l'ablation de l'œil si la prise en charge n'est pas efficace. Le taux est très faible mais avoisine les 0,8% pour un nombre d'interventions allant croissant (la chirurgie de la cataracte est le premier acte chirurgical pratiqué au monde, et près de 600 000 sont réalisées chaque année en France par exemple¹⁾^{158,159}. Le respect scrupuleux des règles d'asepsie du bloc opératoire, un temps opératoire court, peu invasif et l'usage d'antibiothérapies injectées en intracatéculaire sont les mesures proposées en prévention primaire.

Les autres complications survenant dans la période péri-opératoire sont nombreuses et graves mais leur fréquence est faible. La dextérité du chirurgien et son entraînement, à l'aide de logiciels de simulation, sont deux facteurs notables ayant permis la réduction de ces complications¹⁶⁰.

Tableau II : Principales complications associées à la chirurgie de la cataracte¹²

	Cataract PORT, 1994 ⁴⁵⁶	Schein et al, 1994 ⁴	NEON, 2000 ⁴⁴²	Zaidi et al, 2007 ⁴⁵⁹	Jaycock et al, 2009 ⁴⁴³	Greenberg et al, 2011 ⁴⁵⁷	Clark et al, 2011 ⁴⁶⁰
Number of cases	*	717	2603	1000	55,567	45,082	65,060
Percent phacoemulsification	65	65	92	100	99.7	95 (approx) [†]	100
Intraoperative (%)							
Posterior capsular or zonular rupture	3.1	1.95	1.6	1.5	1.92 [‡]	3.5 [§]	NA
Vitreous loss/anterior vitrectomy or aspiration	0.8	1.39	1.1	1.1	NA	NA	NA
Iris/ciliary body injury	0.7	0.84	0	1.2	0.55	0.1	NA
Loss of nuclear material into vitreous	NA	0.28	<1	0.1	0.18	0.2	0.16
Suprachoroidal hemorrhage	NA	0.14	0	0	0.07	0	NA
Retrobulbar hemorrhage	NA	0	0	0.1	NA	0	NA
Postoperative (%)							
(n=16,731)							
CME	3.5	3.21	NA	1.2	1.62	3.3	NA
Iris abnormalities	1.3	2.51	NA	NA	0.16	NA	NA
Corneal edema	NA	1.95	<1	0.7	5.18	NA	0.03
Wound leak or rupture	NA	0.84	<1	1.1	0.14	NA	0.06
IOL dislocation, removal, or exchange	1.1	0.28	<1	NA	0.22	0.9	0.19
Endophthalmitis	0.13	0.14	<1	0.1	NA	0.2	0.17
Retinal tear, break, or detachment	0.7	0.14	<1	0.2	NA	0.9	0.37
Visually significant CME	NA	NA	<1	NA	NA	NA	NA
Persistent iritis	NA	NA	1.1	1.1	NA	NA	NA

¹ Source : <http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/cataracte>

B. Liées au dispositif médical

Outre le glistening, d'autres complications non chirurgicales sont liées au dispositif médical. Les propriétés optiques initiales de l'implant peuvent évoluer. L'apparition de phénomène d'éblouissement, principalement nocturne, est le signalement clinique le plus fréquent. L'origine de cette complication serait commune à tous les implants et expliquée par la présence de vagues capsulaires sur le trajet de la lumière entre la cornée et la rétine. Plusieurs patients relatent des troubles de vision nocturne dont seule la qualité optique de l'implant serait responsable^{161,162}. Des cas de dislocation d'implants intraoculaires ont été décrits. Il s'agit d'une complication rare. Les séries d'étude sont peu nombreuses. L'observation et la discussion de la complication n'est rapportée que pour de rares cas cliniques¹⁶³⁻¹⁶⁵. La prise en charge d'une dislocation d'implant est lourde. Les principaux facteurs prédictifs identifiés sont la présence d'une dermatite atopique, une vitrectomie quelle que soit l'indication et le délai avant la rupture, une inflammation chronique. Le délai de survenue est en moyenne de 107 mois. Un taux plus important de dislocation est vu chez les patients atteints d'uvéite chronique. Depuis les années 1990, l'incidence des dislocations progresse. Selon Dabrowska-Kloda *et al.*, cette tendance est liée à l'élargissement de la phacoémulsification aux patients porteurs de comorbidités plus qu'au nombre croissant de patients opérés chaque année^{152,153,166-170}.

C. Opacification secondaire de l'œil

L'opacification postopératoire de l'œil peut avoir deux origines. La principale est l'opacification capsulaire postérieure (PCO). Elle est physiologique et correspond à une prolifération anarchique des cellules résiduelles du cristallin. La seconde est la calcification des implants. Elle est quasi exclusivement rencontrée avec les lentilles à base d'acrylates hydrophiles¹⁷¹.

Chapitre IV : L'opacification capsulaire postérieure

L'opacification de la capsule postérieure est la complication la plus fréquemment rencontrée dans la chirurgie de la cataracte. Elle trouve son origine dans la prolifération des cellules de cristallin résiduelles laissées dans la capsule.

La complication est connue depuis les prémices de la chirurgie moderne de la cataracte. Son incidence est très variable selon les études. De nombreuses mesures préventives ont été employées plus ou moins couronnées de succès^{19,172}.

I. Epidémiologie et signes cliniques

Les femmes et les personnes non asiatiques sont plus fréquemment atteintes de PCO¹⁶⁰. La symptomatologie de la PCO est peu complexe. La prolifération cellulaire bloque la transmission de la lumière dès lors que les cellules sont dans l'axe visuel. Ce symptôme clinique cardinal explique le nom de cataracte secondaire attribuée à la PCO. La baisse d'acuité visuelle s'accompagne des mêmes signes que dans le diagnostic de cataracte primaire : diplopie monoculaire, éblouissement nocturne ou encore perte de la sensibilité aux contrastes. La présence des perles d'Elschnig en rétro-illuminescence permet de confirmer le diagnostic¹⁷³.

Le développement des systèmes de rétro illuminations dans les années 1990 a permis l'observation de la capsule et ainsi la quantification du degré de PCO (figure 15). Cette avancée a également permis de distinguer deux formes de prolifération cellulaire postérieure : la forme fibrotique et la forme épithéliale en perle^{17,19}. La technologie liée au diagnostic de la PCO s'est depuis développée pour améliorer l'évaluation de la prolifération cellulaire. En effet, l'évaluation de la PCO s'avère être subjective ce qui limite la comparaison directe des études cliniques^{28,174}. De plus, la corrélation entre l'envahissement de la capsule et la gêne visuelle est très variable selon les patients. Certains patients, atteints de stade sévères de PCO, ne déclarent pas de gêne visuelle nécessitant une prise en charge. À l'inverse, d'autres patients demandent une intervention dès les stades précoces de la PCO. Ce second facteur de subjectivité participe à la grande hétérogénéité de l'évaluation de l'incidence de la PCO dans la population^{172,174}.

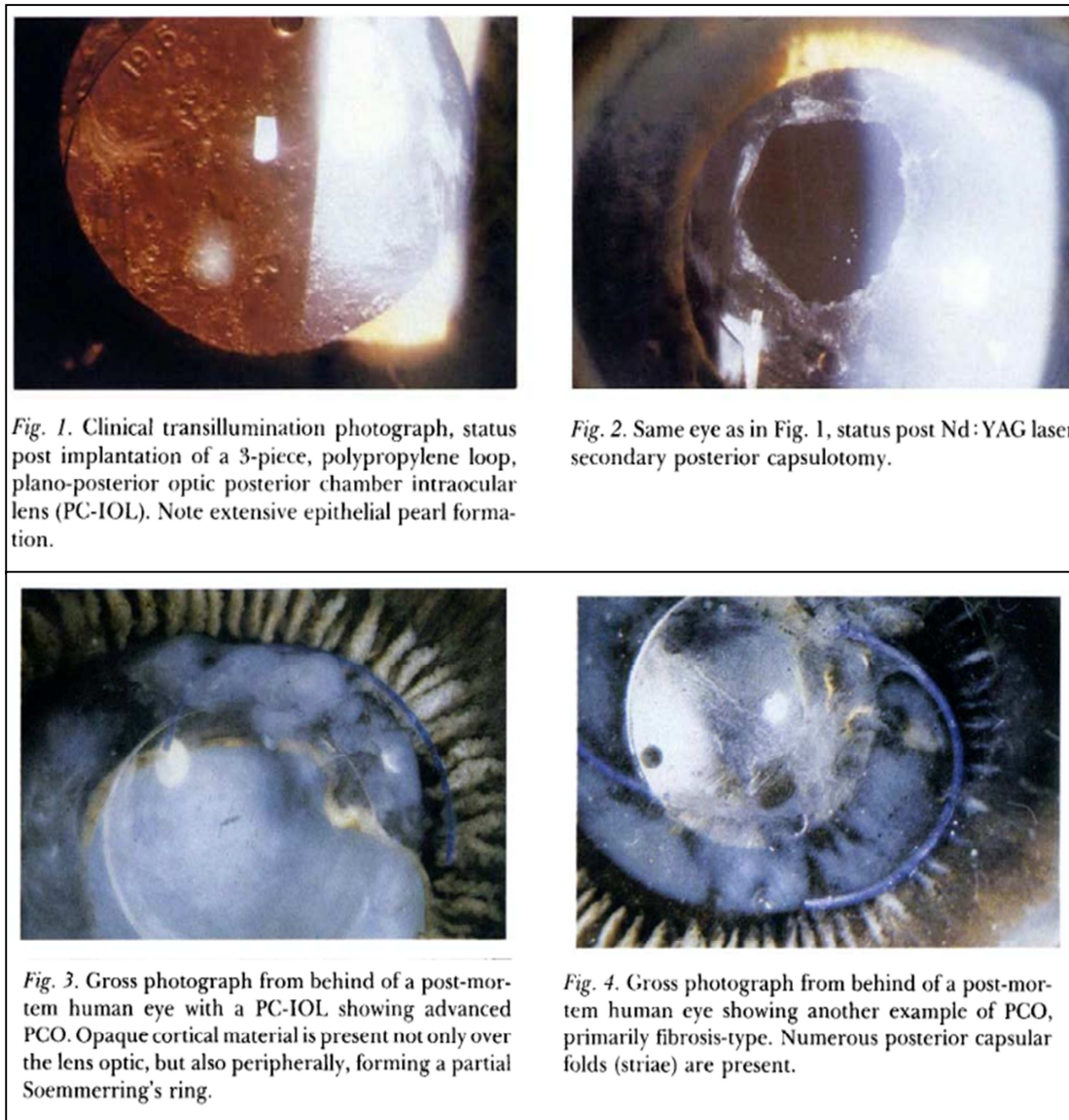


Figure 15 : Photographies de PCO en rétro-illuminescence¹⁷

La représentation no1 est une capsule avec un taux de PCO proche de 100%. La no2 est la même capsule après réalisation de la capsulotomie circulaire. Les photographies 3 et 4 montrent les différents éléments histologiques vus dans la PCO : les anneaux de Soemmerring en 3 et la fibrose de la capsule en 4.

Dans les années 1980 et 1990, l'incidence de la PCO était estimée entre 30 et 50% des patients adultes opérés de la cataracte quelle que soit la technique chirurgicale employée¹⁷². Avec les progrès de la prise en charge chirurgicale, l'incidence a fortement diminué. Toutefois, le taux varie d'une étude à l'autre. Ces écarts sont liés à la reproductibilité de l'évaluation du grade de PCO ainsi qu'aux nombreux facteurs influençant la physiopathologie. Selon la méta-analyse dirigée par Schaumberg *et al.*, l'incidence de la PCO serait de 12% la première année, de 20 % la troisième année et quasiment de 30% cinq ans après la chirurgie. Il est noté une très forte variabilité des résultats à 5 ans¹⁸. Elle atteint des

taux plus important dans la population pédiatrique, certaines études allant jusqu'à rapporter un taux de prévalence de 100%^{4,18,175,176}. Quels que soient les chiffres, il est admis que la PCO est une complication pouvant survenir entre les premiers mois postopératoires et plusieurs années après la phacoémulsification¹⁷⁷. L'incidence est progressive et les cas tardifs à 5, 7 ou 9 ans postopératoires sont décrits^{23,178,179}. Selon Rønbeck *et al.*, l'usure des bords carrés des lentilles intraoculaires, et donc de la barrière s'opposant à la prolifération cellulaire, serait à l'origine de la survenue de cas tardif de PCO²³.

II. Traitement de la PCO

Quel que soit le mécanisme de développement de la PCO et le taux d'envahissement de la capsule, l'extraction de l'implant n'est pas nécessaire. L'unique prise en charge actuellement reconnue est la capsulotomie. Cette intervention est réalisée au laser Nd : YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*). Lors du geste, la capsule postérieure est découpée afin de restaurer l'axe visuel.

Le traitement de la PCO par capsulotomie est un geste peu invasif mais responsable de complications. Elles sont peu fréquentes mais potentiellement graves. Parmi les complications sont rapportées des œdèmes de la cornée, des décollements de la rétine, l'apparition de glaucomes, une altération des propriétés de l'implant intraoculaire, des cas d'endophtalmie, d'uvéïtes ou un trou maculaire^{177,180}.

III. Physiopathologie de la PCO et biocompatibilité

A. Physiopathologie cellulaire

L'opacification capsulaire postérieure est une appellation inexacte. La couche unicellulaire de la capsule ne se modifie pas au cours de la complication. L'origine de la complication vient de la prolifération *de novo* de cellules de cristallin résiduelles. Au cours de leur prolifération, les cellules prennent un phénotype opalescent. Lorsque la prolifération atteint l'axe visuel, la vision diminue.

Suite à l'extraction du cristallin deux types cellulaires, A et E, sont retrouvés sur la membrane de la capsule¹⁷².

Les cellules de type A se trouvent au pôle antérieur. Elles sont présentes dès la fin de l'intervention chirurgicale. D'autres cellules sont décrites au pôle antérieur. Il s'agit de petites cellules rondes et fibroblastiques, et des cellules géantes, majoritairement des macrophages. Le nombre de cellule est maximal entre 1 et 3 mois après l'intervention, puis diminue^{172,181}.

Les cellules de type E, définies comme étant les cellules épithéliales équatoriales résiduelles, peuvent migrer le long de la capsule et acquérir un phénotype de cellule fibreuse. Ce phénotype confère aux cellules la forme de perles ou de ballons ou *bladder cells*¹⁷². Ces cellules évoluent après la chirurgie. Rapidement, la couche cellulaire s'apparente à une fine couche monocellulaire sans conséquence sur l'axe visuel. Par la suite, les *bladder cells* évoluent pour former les *Soemmering's cells*. Cette évolution est la conséquence de la régénérescence cellulaire de type E ainsi que celles du cortex. Suite à l'intervention, d'autres cellules perdent leur transparence pour former des îlots multicouches également nommés *clusters of cells*, qui enflent avec une augmentation de la production de la matrice extracellulaire. L'ensemble peut s'accompagner d'une plicature de la capsule^{172,181}. Les différents phénomènes survenant sur les cellules de type E aboutissent à la formation de deux groupes cellulaires : les *clusters* et les cellules fibreuses.

Les cellules de type A et E peuvent se transformer en cellules fibreuses. La principale différence est la physiopathologie conduisant à l'aspect fibreux. Pour les cellules de type E, le phénomène est celui de la transdifférenciation épithéliale-mésenchymateuse.

Il a été démontré que la vitesse de prolifération cellulaire et les modifications subies dépendent des caractéristiques individuelles des patients^{17,172,173,182}. De plus, la prolifération cellulaire n'est pas irréversible. En effet, Buehl *et al.*, ainsi que Neumayer *et al.*, ont démontré le phénomène pléomorphe de la PCO au cours du temps. Selon leurs travaux, la PCO est subdivisée en deux sous-types, une PCO fibrotique et une PCO régénérative dont l'importance varie au cours du temps chez un même patient. Le phénomène est tel que le taux de PCO varie visiblement d'un jour à l'autre¹⁸³⁻¹⁸⁵.

Des cas de régression spontanée de PCO ont été décrits par Caballero *et al.* ainsi que par Nakashima *et al.*. Ils ont constaté des variations de la surface de PCO proche de 70% d'une semaine à l'autre. Certains cas de régression totale ont également été décrits. Pour chaque études seules les cellules en forme de perles montrent cette évolution^{186,187}.

L'étude au long cours des mêmes patients a permis de suivre la cinétique d'évolution de la PCO. La dynamique des cellules en perle est continue dans le temps au point qu'elles

finissent par se rejoindre pour ne plus former qu'un tapis cellulaire d'aspect continu. À l'inverse, les structures en plaques évoluent plus lentement. Elles se contractent par endroit et s'épaississent donnant un aspect en « fromage suisse » ou « passoire »¹⁸⁴. De leurs observations, Neumayer *et al.*, défendent la thèse de deux phases de PCO : la PCO précoce dont la durée varie de quelques jours à quelques années et la PCO tardive. Dans les premiers temps post-chirurgicaux, les cellules flottantes résiduelles ainsi que les cellules de type A vont avoir tendance à se répliquer pour donner une formation en « trou de fromage » qui s'élargit et s'épaissit. Cette première phase est très influencée par le choix de l'implant, la survie cellulaire étant en partie définie par la capacité d'adhésion entre la capsule, les cellules et l'implant. La phase tardive de la PCO est définie par l'apparition des cellules en forme de perle puis fibreuses. Celles-ci régressent peu dans le temps, leur cinétique de progression est fortement liée à la forme de l'implant, et plus particulièrement à la barrière naturelle que l'implant forme au contact de la capsule. Ce phénomène constitue une barrière mécanique à la prolifération cellulaire^{17,116,184}.

La réalisation d'une capsulotomie pour restaurer la vision modifie le comportement cellulaire. En effet, selon Neumayer *et al.*, le taux de cellules en forme de perle décroît après la réalisation de la capsulotomie. Trois hypothèses expliqueraient cette conséquence : la diminution de la tension mécanique dans la capsule, l'arrivée massive de macrophages de l'humeur vitrée qui augmenteraient la mort cellulaire dans la capsule et l'afflux de cytokines provenant de l'humeur aqueuse¹⁸⁴.

B. Physiopathologie biochimique

L'opacification capsulaire postérieure s'accompagne de modifications de l'homéostasie biochimique des cellules de cristallin résiduelles ainsi que de la composition de la matrice extracellulaire.

Les cellules épithéliales humaines du cristallin expriment plusieurs protéines. Outre les différentes isoformes de la cristalline assurant la transparence des cellules, certaines protéines dont l'*alpha-smooth-muscular* de l'actine (α -SMA) indique un début d'EMT^{188,189}. Les cellules exprimant α -SMA expriment également des protéines de collagène de type I, III, IV, V et VI¹⁸¹. Une partie de la physiopathologie de la PCO serait expliquée par l'action du TGF- β (*Tissular growth factor* β)^{30,176,190}.

Le TGF- β est notamment impliqué dans la fibrose tissulaire. La réponse cellulaire au TGF- β est initiée par sa fixation à des récepteurs membranaires couplés à une activité

sérine/thréonine kinase et emprunte la voie de signalisation des Smads. Il existe trois isoformes de TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Elles sont très similaires sur le plan structural, entre 76 et 80 % d'identités communes sont retrouvées dans les séquences protéiques.

Les récepteurs au TGF- β appartiennent à deux sous-familles : les récepteurs de type I et les récepteurs de type II (RI et RII). Ils possèdent un domaine extracellulaire riche en cystéine et un domaine intracellulaire qui assure l'activité protéine kinase. Le récepteur RII a une activité intrinsèque alors que le récepteur RI doit être phosphorylé au préalable pour être actif. Le TGF- β se fixe au récepteur RII formant un complexe hétérodimérique. Ce dernier va recruter RI et l'activer par phosphorylation des résidus glycine et sérine. RIII est un protéoglycane transmembranaire qui permet d'augmenter l'affinité entre le TGF- β et RII.

La transduction du signal se fait par une cascade de phosphorylations de protéines de la famille des Smads. Il existe trois types de Smads : les Smads associées au récepteur ou R-Smads qui interagissent directement avec le RI activé, les co-Smads qui sont des ligands des R-Smads et les Smads inhibiteurs ou I-Smads (figure 16).

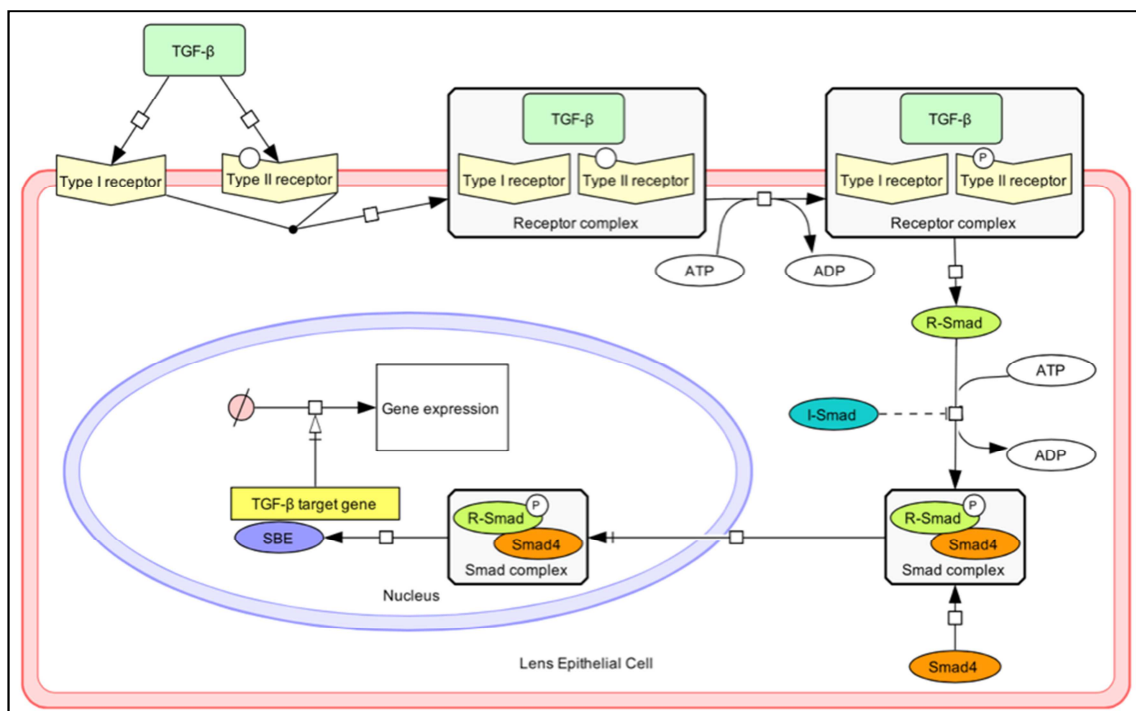


Figure 16 : Voie des SMADS des cellules épithéliales de cristallin¹⁷⁶

Les R-Smads sont constitués de Smad 2 et Smad 3. Après fixation du TGF- β , le récepteur RI phosphoryle Smad 2 et Smad 3, ce qui entraîne un changement de conformation et démasque le NLS (*Nuclear Localization Signal*). Elles s'associent ensuite à l'unique co-Smad mis en évidence à ce jour : Smad 4. Ce complexe (Smad 2, Smad 3 et Smad 4) migre alors vers le

noyau par un mécanisme actif, sous le contrôle de Ran et de l'importine, où il agit comme facteur de transcription. Il est à noter que Smad 4 est importée dans le noyau uniquement lorsqu'elle est associée aux R-Smads alors que Smad 2 et Smad 3 peuvent être importées dans le noyau indépendamment de Smad 4. En l'absence de Smad 4, il n'est pas possible pour Smad 2 et Smad 3 d'avoir une activité transcriptionnelle. Smad 4 joue un rôle dans la régulation de la transcription.

Le complexe Smad 2 - Smad 3 - Smad 4 et d'autres protéines déjà présentes se lient directement à l'ADN, entraînant une activation ou une répression des gènes. L'action du TGF- β dans les cellules du cristallin favorise l'expression de molécules d'adhérence cellulaire et de la matrice extracellulaire. La I-Smad, Smad 7, s'associe au RI activé et empêche la phosphorylation de Smad 2 et Smad3^{176,191,192}.

C. Physiopathologie de la PCO en présence d'un implant intraoculaire

1. Incidence de la PCO en fonction des lentilles intraoculaires

Bien que la PCO soit une complication fréquente, certains patients n'en sont jamais atteints^{18,26,172,177}. Les recherches médicales et scientifiques ont tenté tout autant de comprendre le mécanisme de la survenue de la PCO que d'expliquer l'absence de complications pour certains patients.

Les premières observations de protéomique font état d'une variabilité des protéines adsorbées à la surface des lentilles après implantation.

Parmi les différents matériaux proposés pour la conception de lentilles intraoculaires, les acrylates présentent un bon profil d'affinité protéique^{31,114}. Le taux de cellules de cristallin présentes à la surface des lentilles intraoculaires explantées est significativement supérieur pour les implants en acrylates souples comparativement aux implants en PMMA ($p < 0,05$) et silicone ($p < 0,01$)²². L'observation histologique rejoint la clinique en démontrant une plus grande force d'adhésion entre la capsule de cristallin et les lentilles en acrylates²⁰.

2. Physiopathologie protéomique de la PCO

Selon Linnola *et al.*, la part de l'adsorption protéique dans le risque de développement de PCO est primordiale. Selon la théorie du sandwich exposée à la fin des années 1990, la

fibronectine s'adsorbe conjointement à la surface des implants et sur le pôle postérieur de la capsule²⁰. Le pont entre les deux éléments est fait soit directement, soit au travers d'une couche monocellulaire de cellules épithéliales résiduelles de cristallin. Ces observations histologiques et protéiques sont corrélées au taux de survenue de PCO chez l'homme et l'animal. La structure sandwich développée par l'équipe de Linnola est fréquemment observée chez les patients n'ayant pas développés de PCO^{22,193}.

La fibronectine joue un rôle central dans la biocompatibilité des lentilles intraoculaires. Sa présence modifie les propriétés de surface des implants. L'adhésion protéique modifie le profil de biocompatibilité mais également le risque infectieux¹⁹⁴. Sa présence n'est pas physiologique. Elle n'est pas produite au niveau oculaire chez l'adulte à l'exception des patients présentant un traumatisme intraoculaire^{195,196}. L'adhésion de la fibronectine est un phénomène rapide survenant dès les premières heures après l'implantation¹⁹⁷. Le taux de fibronectine en surface des lentilles varie dans le temps. Selon les travaux de Linnola et son équipe, le taux de fibronectine diminue entre J1 et J7 après implantation. Le taux de fibronectine adhérente est également différent entre les lentilles en acrylates de fabricants différents, les lentilles en acrylate de références différentes d'un même fabricant et entre les types de copolymères¹⁹⁸.

D'autres protéines sont impliquées dans la biocompatibilité des lentilles intraoculaires. La laminine, la vitronectine et le collagène de type IV participeraient directement ou indirectement à la biocompatibilité¹⁹³. Les travaux de Olivero *et al.*, indiquent que le collagène de type IV, la laminine et la vitronectine sont également impliqués dans l'adhésion et la migration de cellules épithéliales de cristallin de lapin¹⁹⁵. Le rôle de chacune des trois protéines n'est pas clairement défini dans la biocompatibilité des lentilles intraoculaires.

Selon l'analyse histologique de capsules de cristallin menée par Linnola *et al.*, la présence de la vitronectine et de la laminine est associée à celle de tissus fibreux. Ces deux protéines sont absentes des structures sandwich. La vitronectine est très présente au pôle antérieur de la capsule et à proximité de la capsulorhexie circulaire continue. Ces localisations confirment le rôle de cette protéine dans le processus de cicatrisation¹⁹³. Cependant la vitronectine, tout comme la laminine et le collagène de type IV, peuvent être produits par les cellules de cristallin. Il existe une relation complexe entre l'expression protéique et la biocompatibilité.

La biocompatibilité et la théorie du sandwich nécessitent vraisemblablement la présence des deux protéines. Cependant, l'adhésion de la fibronectine devrait se faire en premier. Dans un second temps, le collagène de type IV et la laminine viennent s'adsorber sur la fibronectine. Ces protéines ne sont toutefois pas indispensables à l'adhésion et la prolifération cellulaire²¹.

La laminine est retrouvée en plus grande quantité avec les implants en acrylates par rapport aux implants en PMMA, silicone ou hydrogel. Linnola *et al.*, ont également observé un taux de laminine plus important pour les capsules les plus adhérentes aux implants. De plus, le collagène de type IV est faiblement présent dans les structures sandwich mais est très abondant sur les implants en silicone ou en hydrogel¹⁹⁸. En outre, selon les résultats de plusieurs observations, la forte capacité de liaison du collagène de type IV ou de la laminine, respectivement sur les silicones et les hydrogels, favoriserait la prolifération cellulaire et donc la PCO par un mécanisme indirect^{21,193,198}.

IV. Prévention de la PCO

L'opacification capsulaire postérieure est une complication commune multifactorielle^{17,172}.

Trois axes majeurs de préventions sont actuellement pris en compte.

A. Patients et situations pathologiques à risque

Deux points majeurs sont associés au risque de développement de la PCO. Le premier est l'âge du patient lors de l'intervention. En effet, la vitesse de prolifération des cellules épithéliales de cristallin chez l'enfant est telle que le taux de PCO est supérieur à celui de l'adulte. Cette tendance se poursuit avec le temps. Il est admis que le risque de PCO est inversement proportionnel à l'âge des patients lors de l'extraction capsulaire^{49,175}.

Le second groupe de facteurs de risque d'opacification capsulaire est la présence de comorbidités. Selon Hashemi *et al.*, le risque de développer une PCO serait supérieur chez la femme¹⁵. Fong *et al.*, ont confirmé cette observation en précisant que les personnes asiatiques possèdent un risque de PCO plus faible que la moyenne¹⁶⁰.

Les patients atteints de diabète n'ont pas de risque supérieur de développer une PCO postopératoire. Au contraire, le taux de prolifération cellulaire *in vitro* est inférieur à celui d'un contrôle sain^{175,199}.

La présence d'une inflammation chronique, telle que l'uvéïte, n'est pas strictement associée à un risque supplémentaire de développement de PCO. La corrélation mise en avant est souvent biaisée par un âge des patients inférieur à celui des patients témoins^{200,201}. De même, les patients atteints de syndromes de pseudoexfoliation ne présenteraient pas de risque supplémentaire de survenue d'une PCO lors d'une extraction capsulaire non compliquée²⁰².

B. Prévention chirurgicale

Deux principaux facteurs sont maîtrisables : la taille de la capsulorhexie et l'exhaustivité d'extraction des cellules de cristallin. Une opération courte, peu traumatique, une capsulorhexie circulaire continue de 6mm de diamètre sont en quelque sorte le *gold standard* chirurgical avec un effet préventif positif sur la PCO. L'élimination la plus poussée des cellules de cristallin résiduelles assure également un risque de prolifération secondaire plus faible. Il existe ici une opposition théorique entre la vitesse d'intervention et le pourcentage d'élimination des cellules résiduelles dans la prévention de la PCO. Aucune étude n'a à ce jour défini la priorité entre vitesse et précision^{107,177,203-205}. Cependant, il est admis qu'il ne sera jamais possible d'aboutir à un polissage exhaustif de la capsule du cristallin après phacoémulsification²⁴.

Parmi les autres facteurs de risque évoqués, la dextérité du chirurgien est souvent mise en avant en particulier la balance entre rapidité d'intervention et qualité du polissage de la capsule¹⁶⁰. La taille de l'aiguille pour la chirurgie est également associée à une diminution du risque de PCO^{96,206}. L'hydrosection, technique consistant à injecter du liquide sous le cristallin pour le soulever avant la phacoémulsification, est associée à un plus faible taux de PCO¹². Par ailleurs, certaines chirurgies compliquées nécessitent une optimisation du protocole. Il est recommandé aux chirurgiens de prévoir une solution alternative en cas d'inadéquation du choix primaire de la lentille intraoculaire et l'anatomie de la capsule. De plus, la rigidité du cristallin pour les personnes âgées et la plasticité de la capsule chez les enfants demandent une adaptation des protocoles. Chez les enfants et les patients jeunes, l'assistance d'un femtolaser lors de la capsulorhexie est vivement recommandée^{104,105}.

La phacoémulsification et le polissage de la capsule ne doivent pas endommager celle-ci. Une rupture du sac capsulaire est associée à une mauvaise biocompatibilité postopératoire. Elle est la conséquence de l'exposition de l'implant à l'humeur vitrée et à l'afflux des cellules immunitaires²⁰⁷.

Lors de la mise en place de la lentille intraoculaire, l'emplacement des haptiques est primordial pour garantir une bonne prévention de la PCO. Le placement de la lentille dans la capsule joue un rôle dans la survenue de la PCO. Le principe du placement des haptiques appelé « *in the bag* » relève du constat qu'un bon placement des haptiques dans le sac capsulaire, au niveau des zonules, permet de stabiliser la lentille et de tendre la capsule. Ce placement diminue le contact du pôle antérieur de la capsule avec la lentille, limite la

formation des vagues capsulaires au niveau postérieur et réduit le risque de rotation de l'implant^{12,95}. Il a été démontré qu'un sac capsulaire tendu assure un meilleur contact entre la capsule et la lentille^{204,208}. En outre, la théorie du sandwich de Linnola *et al.*, met en avant que le contact très proche de l'implant à la capsule permet de bloquer mécaniquement la prolifération cellulaire le long de la capsule²⁰.

C. Prévention pharmacologique

Peu de soins sont connus pour prévenir l'apparition d'une PCO. L'implication de l'inflammation dans les premières étapes de la physiopathologie encourage l'utilisation systématique d'anti-inflammatoires en collyre en postopératoire.

À défaut de soins associés clairement définis, plusieurs principes actifs ont été utilisés en prévention primaire de la PCO : anti-inflammatoires, antinéoplasiques, cytotoxiques, facteurs de croissance. Des essais *in vitro* avec L'erufosine, l'EDTA et des antagonistes du TGF- β 2 ont été publiés^{176,209-213}. Tous sont des pistes de développement d'intérêt pour la prévention de la PCO dans le futur. Meacock *et al.*, ont conduit une évaluation clinique pour déterminer l'effet préventif d'un polypeptide, la ricine A, sur la PCO. À un an de la chirurgie, l'effet préventif est démontré toutefois, la toxine utilisée comporte un risque d'uvéite postopératoire significatif²¹⁴.

D. Prévention de la PCO par le choix de la lentille intraoculaire

Elle concerne tous les patients et tous les types d'implants intraoculaires. Les connaissances scientifiques et médicales actuelles ont permis la publication de conférences consensus. Toutes les méta-analyses publiées concluent sur plusieurs points dont l'importance d'implanter des lentilles intraoculaires 1-pièce, biconvexes ou plano-convexes à bord carrés en acrylates hydrophobes^{12,14,160,203,215-217}.

Nishi *et al.*, ont conclu que seule la forme de l'implant, et non pas le type de copolymère, permettait de réduire le taux de PCO²⁷. Toutefois plusieurs évaluations, *in vitro* et *in vivo*, indiquent que la biocompatibilité cellulaire et l'adhésion protéique varient selon le type de surface (matériau et rugosité)^{31,218-224}.

Peng Q *et al.*, ont démontré que la tension dans la capsule est importante dans la prévention de la PCO. Elle dépend de la taille de la capsule et de sa géométrie. Selon les dimensions

exactes, la tension générée par les haptiques va varier²⁰⁴. Nishi *et al.*, ont conclu que la concordance entre la taille de l'optique et celle de la capsule était importante pour obtenir un effet barrière maximal²²⁵. De la même manière, Leishman *et al.*, ont jugé satisfaisante l'utilisation d'un dispositif médical circulaire fenêtré. Ce système est conçu pour prévenir l'apparition de la PCO par blocage mécanique de la prolifération cellulaire tout en laissant circuler l'humeur aqueuse²²⁶. Floyd *et al.*, ont pour leur part évalué l'effet préventif d'une lentille intraoculaire dont les haptiques occupent toute la place vacante de la capsule afin de maximiser le blocage mécanique de la prolifération cellulaire²²⁷.

Outre la forme des implants, le traitement de surface par pégylation a été utilisé pour prévenir la PCO. Le greffage de PEG aux copolymères d'acrylate et de styrène permet d'accroître l'hydrophilie du copolymère par la formation de liaisons hydrogènes à l'humeur aqueuse. L'hydrophilie du PEG assure un effet préventif de l'adhésion protéique en surface. Les PEG sont liés à des chaînes principales hydrophobes ce qui confère à l'ensemble des propriétés amphiphiles. Les conditions environnantes du copolymère peuvent modifier les groupements fonctionnels et faire varier la balance entre les fonctions hydrophiles et hydrophobes en surface des copolymères. Ces modifications dépendent conjointement de la composition initiale du copolymère et de la température du milieu ainsi que de la longueur du greffage du PEG²²⁸⁻²³⁰. Plusieurs évaluations de l'efficacité de la pégylation ont été réalisées. Toutefois les conclusions divergent^{28,231-234}. D'autres techniques que la pégylation, dont le traitement du copolymère au plasma, ont été testées pour modifier l'hydrophilie de surface des implants²³⁵. Le greffage des surfaces des lentilles intraoculaires par de l'héparine a également été essayé pour prévenir l'inflammation induite par les implants^{121,223,236}.

De l'ensemble des méthodes testées, seule la pégylation de surface semble encore aujourd'hui présenter un intérêt clinique. Ainsi, les implants. enVISTA[®] possèdent de nombreuses chaînes de polyéthylène glycol dont l'objectif est de prévenir la PCO^{120,237}.

Chapitre IV : Evaluation préclinique

I. Contexte réglementaire européen

L'évaluation des dispositifs médicaux est définie par la directive européenne 93/42/CEE, texte fondateur dans l'évaluation du dispositif médical, transposée en droit français et appliquée depuis 1995 en France. Cette directive introduit le principe du marquage CE pour la commercialisation et la libre circulation des dispositifs médicaux au sein de l'Union européenne.

L'obtention du marquage CE est sous la responsabilité des organismes notifiés. Leur rôle est de vérifier la conformité du dispositif médical aux exigences essentielles décrites dans la directive 93/42/CEE. Ces exigences visent à assurer la performance et la sécurité des utilisateurs. Elles sont divisées en exigences générales et en exigences relatives à la conception et à la construction des dispositifs médicaux.

La conformité est fondée sur l'analyse des bénéfices et des risques du dispositif médical associés à son utilisation ainsi qu'à ses mésusages.

La directive européenne 93/42/CE a été amendée par la directive 2007/47/CE. Cette évolution de la réglementation européenne consolide et précise les exigences essentielles. L'évaluation clinique nécessaire à l'obtention du marquage CE s'y trouve fortement renforcée. Cette dernière doit être menée après l'autorisation de commercialisation pour justifier le maintien du marquage CE dans le temps. L'évaluation préclinique n'apparaît pas comme une exigence essentielle à part entière mais reste un élément indispensable pour l'obtention du marquage CE.

Dans le parcours d'obtention du marquage CE l'analyse préclinique est évaluée par les autorités compétentes nationales et les comités éthiques pour autoriser la conduite d'investigations cliniques.

II. Modèle d'évaluation préclinique appliqué aux lentilles intraoculaires

L'analyse préclinique regroupe les évaluations *in vitro* et si besoin des évaluations *in vivo*. Les deux types de tests applicables aux lentilles intraoculaires sont définis par plusieurs normes internationales transcrites en droits européen et national.

Les normes d'intérêts sont issues de l'ensemble des normes ISO (*International organization for standardization*) 10993 et plus particulièrement les normes 10993-1 et 10993-13. Ces normes chapeaux destinées à tous les dispositifs médicaux sont complétées par des normes spécifiques. Celles applicables aux lentilles intraoculaires sont les normes ISO 11979-1 à 11979-10.

Outre les recommandations pour évaluer la performance optique des lentilles intraoculaires, la lecture des normes propose plusieurs méthodes de vieillissement accéléré des ces implants. Les méthodes proposées se fondent sur un vieillissement par thermolyse puis par photo-oxydation. Le premier protocole de vieillissement est réalisé selon le principe de la loi d'Arrhenius. Cette loi est fondée sur le principe de la relation entre la vélocité d'une réaction chimique et l'énergie fournie (sous forme de chaleur). La norme ISO 10993-13 propose de mener le vieillissement à forte température et à une température cohérente avec les conditions d'utilisation de pratique courante du dispositif médical.

Le second protocole de vieillissement est une réaction d'oxydation du polymère par l'action de rayons ultraviolets. La norme ISO 11979-5 propose une formule permettant le calcul du facteur d'accélération (figure 17). Ce calcul est dépendant de l'exposition solaire moyenne subie à la latitude de référence sélectionnée pour l'accélération du vieillissement.

$$T_2 = 365 \times T_1 \times \left[\left(\frac{I_2}{I_1} \right)^n \times \left(\frac{24}{t} \right) \right]^{-1}$$

Figure 17 : Formule de vieillissement par photo-oxydation selon l'ISO 11979-5:2006

$I_1=0,3\text{mW/cm}^2$ est l'intensité du rayonnement UV-A *in vivo* dans la plage 300-400nm, t est la durée moyenne d'exposition journalière à la lumière solaire ($t=3\text{h}$), T_1 est la durée d'exposition *in vivo*, n est le facteur d'intensité=1, I_2 est l'intensité artificielle générée et T_2 le temps de vieillissement accéléré.

Les propriétés optiques et mécaniques des lentilles sont qualifiées par deux normes : l'ISO 11979-2 et l'ISO 11979-3. L'équivalence des propriétés avant ou après vieillissement permet d'assurer le maintien des performances au cours du vieillissement et donc la conformité de l'implant pour l'obtention du marquage CE.

La synthèse, le façonnage, la stérilisation et le vieillissement des dispositifs médicaux à base de polymères entraînent la formation de composés de faible masse moléculaire (CFMM). Ces derniers ont la capacité de diffuser au travers du polymère. Cette mobilité dépend de plusieurs paramètres. Le principal facteur est le coefficient de diffusion de ces entités. Il est directement dépendant de l'arrangement supramoléculaire des chaînes et des propriétés thermodynamiques du polymère. L'évaluation des exsudations en surface de ces composés et le relargage dans le milieu proche sont normés. La quantité totale de composés exsudés doit être mesurée. La perte de masse totale doit être évaluée selon la masse initiale du dispositif pour en définir le risque pour les performances du dispositif et prédire la toxicité globale pour les utilisateurs. Pour autant, aucune spécification n'est proposée pour un taux limite supérieur de perte de masse acceptable.

L'analyse préclinique inclue l'analyse des composés extractibles. Toutefois, aucune exigence quant à la méthodologie n'est formulée. Les recommandations portent sur des méthodes applicables devant être adaptées à la spécificité du dispositif médical développé. Le choix est laissé au fabricant ou à son mandataire qui, en fonction de critères décisionnels, doit approfondir l'investigation des composés extractibles. Celui-ci doit pouvoir répondre du rationnel scientifique justifiant la conduite des essais et l'application des conditions expérimentales choisies.

La norme ISO EN NF 10993-18 :2009 précise dans son 5^{ème} article que les données qualitatives du relargage sont nécessaires à l'inverse des données quantitatives dont la présence est corrélée au risque de toxicité biologique. Cependant, en raison de la méconnaissance totale ou partielle de ces composés, chacun des éléments extraits doit être considéré comme biodisponible et donc comme potentiellement toxique. L'analyse du risque chimique peut se faire directement sur les composés extraits ou par équivalence de toxicité selon des analogies structurales. Le logigramme de décision est précisé dans les annexes de définition de l'équivalence de toxicité de la norme 10993-18 :2009 (figure 18).

Les additifs et des impuretés de synthèses associés au dispositif médical doivent être communiqués pour l'obtention du marquage CE. Le risque global y est directement lié. Ce niveau de risque est identique au risque global du dispositif médical testé, lequel permet de définir la classe. Le risque est fondé sur la durée d'utilisation, l'invasivité et le type de

matériaux utilisés dans la conception. Les informations qualitatives du risque chimique doivent comporter au minimum suffisamment d'informations pour établir une équivalence, si elle existe, à un dispositif médical déjà commercialisé. Si les informations qualitatives ne sont pas suffisantes, l'analyse quantitative doit être menée. L'ISO 10993-18 :2009 fixe cinq étapes pour établir la caractérisation chimique :

- Informations qualitatives ;
- Équivalence du matériau ;
- Informations quantitatives ;
- Évaluation quantitative des risques ;
- Exposition clinique aux substances chimiques présentes, estimée.

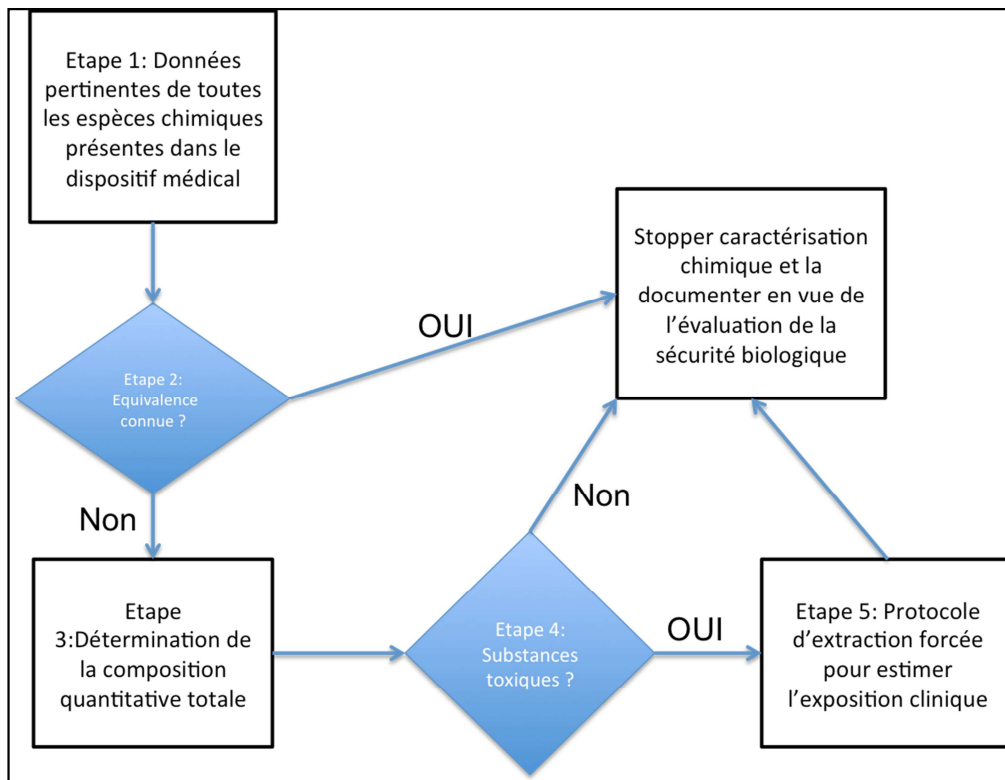


Figure 18 : Logigramme pour l'évaluation chimiques selon l'ISO 10993-18

L'analyse qualitative chimique peut être basée sur les informations du fournisseur de matière première. Si ces informations semblent insuffisantes, une caractérisation doit être menée par le fabricant. L'investigation doit être particulièrement poussée si l'analyse de risque fait ressortir l'exposition du patient à des substances chimiques toxiques spécifiques.

L'investigation préclinique n'est pas uniquement fondée sur la stabilité physico-chimique du dispositif médical. La conduite d'investigation dans des milieux biologiques ou *in vivo* peut être utile pour appréhender au mieux le vieillissement naturel du dispositif.

Les évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* n'ont pas les mêmes objectifs. Toutefois, Les normes ISO indiquent que les tests précliniques menés doivent toujours limiter le recours aux animaux.

La norme ISO EN NF 10993-1 : 2009 liste les tests devant être conduits en fonction de l'invasivité et du risque du dispositif médical. Selon la durée d'utilisation (<24h, <30 jours ou >30 jours), les liquides biologiques et les tissus en contact avec le dispositif, les tests types devant être conduits varient.

Les tests décrits dans les normes ISO 10993 sont des tests généraux devant pouvoir s'appliquer à tous dispositifs médicaux en cours de développement. Ils concernent la cytotoxicité, la sensibilisation, l'irritation, la toxicité systémique aiguë, la génotoxicité, l'hémocompatibilité et l'impact de l'implantation. Ces tests prennent en compte, dans la limite du possible, le dispositif médical entier et les extractions forcées réalisées.

Les lentilles intraoculaires sont des dispositifs médicaux implantés plus de 30 jours. Ils sont en contact direct avec des tissus biologiques. Ainsi, l'ensemble des tests biologiques cités est à réaliser. Seule l'hémocompatibilité n'est pas jugée nécessaire dans l'évaluation du risque biologique. Pour chaque test, les grands principes de rigueur sont précisés dans les différentes normes ISO 10993. Elles renvoient dans de nombreux cas, et particulièrement pour les évaluations *in vivo*, aux documents de l'Organisation de Coopération et de Développement Économique (OCDE). Pour chaque dispositif médical, les règles générales doivent être ajustées à la spécificité du lieu d'utilisation. Pour les lentilles intraoculaires la norme ISO EN NF 11979-5 : 2006, relative aux évaluations de la biocompatibilité, ne précise pas de lignée cellulaire spécifique. Seule les exigences générales s'appliquent ; à savoir une lignée cellulaire de source connue, immortalisée et sans mycoplasme. Idéalement, dans le contexte d'utilisation, et du fait de l'homéostasie perturbée, des cellules épithéliales de cristallin cataracté devraient être utilisées. Les autres tests demandés sont conduits *in vivo*.

La méthodologie *in vivo* n'est pas toujours permise de par la complexité et la taille des dispositifs médicaux. Cette limite est proportionnelle à la taille des dispositifs médicaux ainsi qu'à leur spécificité. Dans le cas des lentilles intraoculaires, deux modèles animaux se sont imposés. Le lapin est le modèle préconisé par l'ISO EN NF 11979-5 : 2006 du fait de l'historique d'utilisation. La souris a également été utilisée dans plusieurs publications scientifiques.

Des avantages et des inconvénients de l'expérimentation animal, il ressort que l'investigation *in vivo* permet la réalisation d'implantation bilatérale. Toutefois, le lapin est un modèle ne

pouvant être suivi que durant six mois. Au-delà la formation de fibrine et la prolifération cellulaire limite la qualité des données obtenues.

Lors de l'investigation *in vivo* chez l'animal, les principaux critères évalués sont : le contact lentille et endothélium cornéen, le collapsus de la chambre antérieure, le saignement de la chambre antérieure, l'endommagement de l'iris, le positionnement des haptiques de la lentille, l'emplacement et le centrage de l'optique, les problèmes chirurgicaux inhabituels.

Au cours des protocoles d'analyse, lors du sacrifice des animaux, une observation biologique est faite sur les explants. La présence de fibrine, le flamboiement, les cellules observées et l'adhésion sont parmi les critères biologiques notés. La recherche de signes de calcifications et les débris cellulaires sont également mis en œuvre.

L'analyse préclinique biologique, ou l'évaluation de la biocompatibilité, est également basée sur la détermination de la cytotoxicité sur une ou plusieurs lignées cellulaires spécifiques. Dans le cas des lentilles intraoculaires, les cellules épithéliales de cristallin sont un modèle essentiel. L'évaluation de la biocompatibilité peut également se faire par évaluation du comportement de fibroblastes au contact du dispositif médical. Cette évaluation permet de proposer une prédiction du risque de réaction inflammatoire au contact de l'implant.

La transposition de l'évaluation préclinique *in vitro* ou *in vivo* fait débat. Pour améliorer les connaissances et permettre une bonne prédictibilité des risques associés aux dispositifs médicaux implantables, autant pour les risques précoces que les complications tardives, plusieurs équipes scientifiques ont proposé de nouveaux milieux de vieillissement et des protocoles d'évaluation des lentilles intraoculaires.

Le choix cellulaire n'est également pas précisé laissant libre l'utilisation de souches cellulaires saines ou cataractées.

Les normes ne sont pas les seules sources de protocole pour l'évaluation préclinique des lentilles intraoculaires. Plusieurs équipes ont proposé différents modèles et schémas d'évaluation.

III. L'évaluation clinique des lentilles intraoculaires

Les bases de la conduite d'une investigation clinique sur les lentilles intraoculaires sont données par la norme ISO EN NF 11979-7 : 2014. Les caractéristiques générales listées sont l'acuité visuelle, la réfraction subjective, la pression intraoculaire, l'état de la cornée, les

signes d'inflammation (cellules de le chambre antérieure, *flare* de la chambre antérieure, œdème maculaire cystoïde, hypopion et endophtalmie), blocage pupillaire, décollement de la rétine, état des capsules postérieure et antérieur, décentrage de la LIO, décoloration de la LIO et enfin l'opacité de la LIO.

L'ISO 11979-7 : 2014 préconise deux durées minimales pour l'investigation clinique. L'investigation clinique peut se limiter à une année si le dispositif implantable ne présente pas de rupture majeure d'innovation au regard des dispositifs médicaux préexistants. Dans le cas d'un dispositif médical intraoculaire présentant une rupture majeure l'investigation clinique ne doit pas être inférieure à trois ans. Ces délais peuvent paraître court au regard du délai d'apparition de certains complications tardives dont la dislocation des implants et la PCO sont des exemples pour les lentilles intraoculaires.

Selon les spécificités des lentilles implantées d'autres éléments d'investigation sont suivis. Pour les lentilles toriques, indiquées pour les patients astigmatiques, une évaluation préalable du risque de rotation de l'implant doit être faite sur des implants non toriques de même géométrie.

Le plan d'évaluation clinique prend en compte le risque d'événement indésirable grave de deux manières. La première est l'inclusion en deux phases des patients. Une première cohorte d'inclusion permet d'établir la sécurité à 6 mois. Si celle-ci est suffisante, la seconde phase d'inclusion débute.

Les effets indésirables attendus sont listés par la norme ISO EN NF 11979-7. A chaque événement indésirable est associé une performance de sécurité (SPE). Au delà du SPE ajusté, le dispositif ne présente plus un profil de performance acceptable aux yeux des incidences connues pour des lentilles intraoculaires déjà autorisées.

IV. Innovation dans l'évaluation préclinique des lentilles intraoculaires

L'investigation préclinique pour les lentilles intraoculaires, telle qu'elle est définie par les normes ISO, ne prend pas en compte l'ensemble des risques connus.

De toutes les complications, l'opacification capsulaire postérieure reste l'une des plus fréquentes. Cependant ce risque n'est pas spécifiquement décrit dans les normes proposant une méthodologie d'investigation clinique des lentilles intraoculaires. De plus, aucun modèle n'est proposé pour évaluer, en lors des essais précliniques, le risque de PCO. Pour autant, de

nombreuses lentilles intraoculaires sont commercialisées avec l'objectif d'apporter une acuité visuelle améliorée et un taux de PCO réduit.

Plusieurs études scientifiques ont proposé des modèles précliniques *in vitro* d'évaluation de la PCO. En outre, la transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse n'est pas spécifique aux cellules épithéliales de cristallin. Cette modification histologique est rencontrée dans d'autres pathologies. Ainsi, la résistance de certaines lignées cellulaires cancéreuses à certains traitements antinéoplasiques s'expliquerait, sur certains aspects, par le même processus biochimique et histologique^{238,239}. Ces informations croisées ont permis de concevoir des nouvelles approches *in vitro* pour évaluer l'efficacité d'outils thérapeutiques dans la prévention de la PCO.

De tous les modèles proposés, les modèles cellulaires sont principalement des monocultures. Trois principales lignées cellulaires sont connues pour les travaux sur la PCO : l'HLEB3, la lignée SRA01/04 et la lignée FHL124. Toutes n'ont pas les mêmes caractéristiques et le même comportement aux différents stimuli. Aucune lignée n'est issue de cellules de cristallin cataracté ce qui constitue un biais important dans la transposition des résultats obtenus¹⁹⁰. Outre ces trois lignées, les études précliniques publiées sont réalisées avec des cellules bovines, humaines ou porcines^{188,224,240-242}.

D'autres équipes ont centré leurs travaux sur certains aspects de la biocompatibilité. Pintawala *et al.*, ont ainsi proposé une coculture cellulaire pour évaluer l'inflammation induite par les lentilles intraoculaires. Cette approche intègre la réaction induite par l'implant sur les macrophages. L'action des macrophages sur les cellules épithéliales de cristallin est vue simultanément. Elle permet d'évaluer la biocompatibilité uvéale des lentilles intraoculaires. Ce modèle présente un intérêt prédictif si le patient est atteint de comorbidités telles que une rupture capsulaire postérieure, une uvéite ou un syndrome de pseudoexfoliation²⁴³.

Plusieurs modèles animaux ont été testés dans l'évaluation *in vivo* préclinique. Des rats ont été utilisés pour des études sur l'incidence de la PCO dans un contexte faiblement inflammatoire²⁴⁴. Des modèles murins, dont des modèles transgéniques, ont été testés pour évaluer l'importance de chaque étape dans la cascade induite par le TGF- β 2 dans la physiopathologie de la PCO^{48,191,245,246}.

Le travail *in vivo* devant être limité à son strict minimum, l'utilisation de modèle *ex-vivo* suscite un grand intérêt. L'utilisation de sacs capsulaires explantés présente plusieurs avantages théoriques : géométriques, biochimiques et histologiques. Les modèles capsulaires permettent dans un même temps de travailler sur le positionnement de l'implant dans la

capsule et sur les voies d'induction de la transdifférenciation cellulaire. Les sacs capsulaires de plusieurs espèces ont été testés : l'Homme, le chien, la poule, le cochon, la vache et le lapin^{190,205,247}.

Lloyd *et al.*, ont proposé une série de tests systématiques pour évaluer la biocompatibilité des lentilles intraoculaires. Leur approche en trois phases inclut des évaluations cellulaires, des évaluations protéiques et une investigation *in vivo*. L'adhésion cellulaire au contact de l'implant est menée avec quatre types de lignées cellulaires : des fibroblastes, des granulocytes, des macrophages et des cellules endothéliales de cornée. L'adhésion bactérienne est, selon leur approche, un facteur utile dans l'évaluation préclinique *in vitro*. Enfin la dernière étape concerne l'évaluation *in vivo* chez des lapins blancs de Nouvelle-Zélande²⁴⁸.

De multiples lignées cellulaires, autre que des lignées épithéliales de cristallin, ont été testées par d'autres équipes sans pour autant apporter un gain majeur dans la transposition des résultats *in vitro* à l'*in vivo*²³⁶.

La PCO a également été évaluée à l'aide de marqueurs cellulaires liés à la physiopathologie de l'EMT. La fibronectine et l' α -SMA sont deux marqueurs biologiques les plus fréquemment rencontrés. Quelle que soit la voie intracellulaire citée dans la physiopathologie de la cataracte, la quantité de fibronectine dans la matrice extracellulaire est augmentée^{172,181}. Par conséquent, plusieurs équipes ont utilisé la fibronectine comme marqueur de l'EMT au même titre que α -SMA, la vitronectine ou d'autres messagers intracellulaires^{49,188,249-251}.

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

I. Echantillons

L'approche expérimentale a été menée sur des lentilles intraoculaires répondant aux recommandations de la FDA et de l'ANSM. Les consensus médicaux préconisent l'utilisation de lentilles intraoculaires à base d'acrylates hydrophobes monofocales 1-pièce à bords carrés pour prévenir la survenue de l'opacification capsulaire postérieure^{12,14}.

Tous les implants utilisés étaient stériles et d'une dioptrie de $+20\delta \pm 0,5\delta$. Ils étaient identiques en tout point aux dispositifs médicaux destinés à être implantés. Tous les implants ont été testés dans les six mois suivant leur production.

A. Implants

Les implants en VISTA[®] MX60 (*Bausch and Lomb[®] Incorporated*, Rochester, NY, USA) ont été commercialisés la fin des années 2000. Ces implants sont biconvexes asphériques sur les deux faces. Tout le bord de l'implant est carré avec un angle de 90° . Ils sont constitués d'un copolymère de deux acrylates hydrophobes ; à savoir l'éthylène glycol phényle éther acrylate (EGPEA) et l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDM), d'un acrylate hydrophile, le 2-hydroxy éthyle méthacrylate (HEMA) et de styrène (*Cf. Annexe 1*)¹⁵⁴. Malgré la composition du copolymère, les implants sont considérés comme hydrophobes. La présence de l'acrylate hydrophile permet une hydratation de l'implant à 4% mais nécessite un conditionnement de l'implant dans une solution saline de NaCl à 0,9%.

Dans le cadre de ce travail, les implants ont été identifiés par leur numéro de série raccourcis précédé des lettres du fabricant (BL pour Bausch & Lomb).

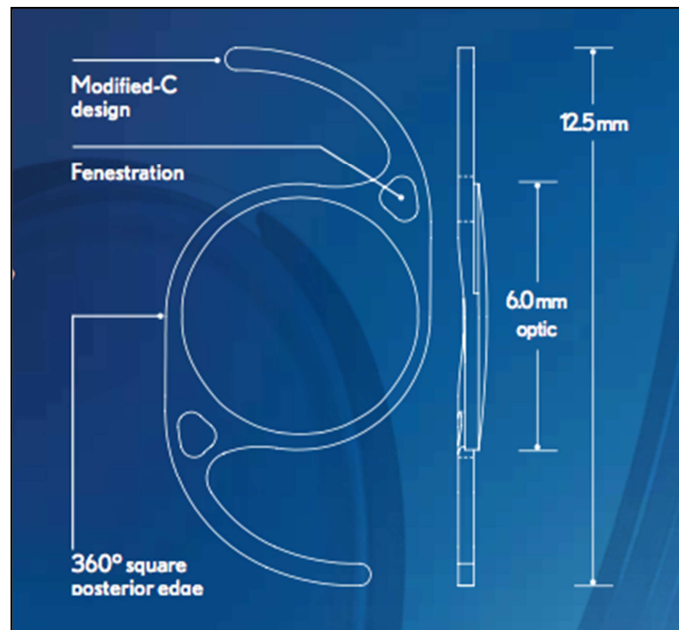


Figure 19 : Implant enVISTA[®] MX60

Source : document commercial Bausch & Lomb.

B. Solutions

1. Solutions de conservation (SC)

Le terme solution de conservation s'applique au liquide dans lequel l'implant est conservé entre sa fabrication et son utilisation.

2. Solutions de vieillissement (SV)

Pour l'ensemble des implants analysés, dès lors qu'une partie de leur vieillissement en laboratoire est réalisée dans un milieu liquide, le terme solution de vieillissement est employé pour qualifier le liquide utilisé.

3. Solutions de rinçage (SR)

Les protocoles de préparation des échantillons incluent des solutions de rinçage des implants pour éliminer tout élément en surface (impureté de synthèse initiale, cristaux de NaCl post vieillissement). Ces solutions sont dénommées solution de rinçage avant vieillissement (SRaV) et solution de rinçage après vieillissement (SRapV). Il s'agit dans les deux cas d'eau déionisée type milliQ[®].

II. Procédures de vieillissement des échantillons

A. Description générale

Sept conditions de vieillissement distinctes ont été testées : une condition de vieillissement naturel et six conditions de vieillissements artificiels (*in vitro*).

1. Préparation des implants pour analyse

Avant leur utilisation, tous les implants sont conservés dans leurs conditionnements primaires et secondaires selon les recommandations des fabricants.

À l'ouverture du conditionnement primaire, la solution de conservation est placée dans un tube à hémolyse (tube en verre 5mL). L'implant est manipulé par les haptiques avec une pince plate atraumatique. L'implant est rincé par trois immersions successives dans 1mL d'eau déionisée (type milliQ®) stérile. Une fois rincé, l'implant est placé dans un flacon en verre transparent dans 1500µL de sérum physiologique stérile (solution saline).

Après avoir subi la procédure de vieillissement, l'implant est récupéré puis rincé par cinq immersions successives dans une solution d'eau déionisée (notée SRapV). Une fois rincé, l'implant est placé dans une boîte en plexiglass® en enceinte close thermostatée à 25°C. Une fois déposé, l'implant est considéré comme polarisé. La face en contact avec le support est potentiellement altérée et ne sera donc pas analysée. Le second côté de l'implant, dont l'état de surface est jugé comme préservé, servira pour l'analyse de surface.

2. Implants neufs

Les implants neufs correspondent à ceux n'ayant subi que les effets du vieillissement naturel dans le conditionnement primaire aux conditions de stockage usuelles.

3. Hydrolyse seule

(a) *Hydrolyse courte*

Cette condition de vieillissement est basée sur les recommandations de l'ISO EN NF 10993-13 (2009).

Après préparation préalable au vieillissement (*cf* partie 1 « Préparation des implants pour l'analyse »), les implants sont immergés dans 1500µL de sérum physiologique.

Les implants sont placés au sein d'une enceinte thermostatée dont la température est fixée à **37°C durant 72 heures** de temps de vieillissement. Une agitation orbitale est utilisée pour reproduire les mouvements browniens induits par le flux d'humeur aqueuse de l'œil.

(b) *Hydrolyse forcée*

Cette deuxième procédure est basée sur les recommandations de l'ISO EN NF 10993-13 : 2009.

Après préparation pour le vieillissement, les implants sont immergés dans une solution de 1500µL de sérum physiologique.

Les implants sont placés dans une enceinte thermostatée dont la température est réglée à **70°C durant 60 jours** de temps de vieillissement sous agitation identique à celle appliquée dans les conditions précédentes.

4. Photo-oxydation

(a) *Principe*

Le spectre solaire est en grande partie filtré par l'atmosphère. Seule une partie du spectre atteint la surface et doit donc être considérée dans la réalisation des études de vieillissement accéléré.

Plusieurs sources lumineuses ont été développées et sont utilisées pour reproduire l'exposition solaire. Depuis quelques années, l'utilisation de lampes fonctionnant par arc au xénon est proposée (Figure 20).



Figure 20 : Représentation schématique d'une enceinte Q-sun

Les lampes (3) émettent le spectre solaire au dessus des échantillons posés sur le plateau (8). Le spectre est coupé aux longueurs d'ondes voulues par un filtre (4), la température est réglée selon la température de l'enceinte (6) ou celle d'un panneau noir (7). Une climatisation permet de compenser la chaleur dégagée par l'arc au xénon (9).

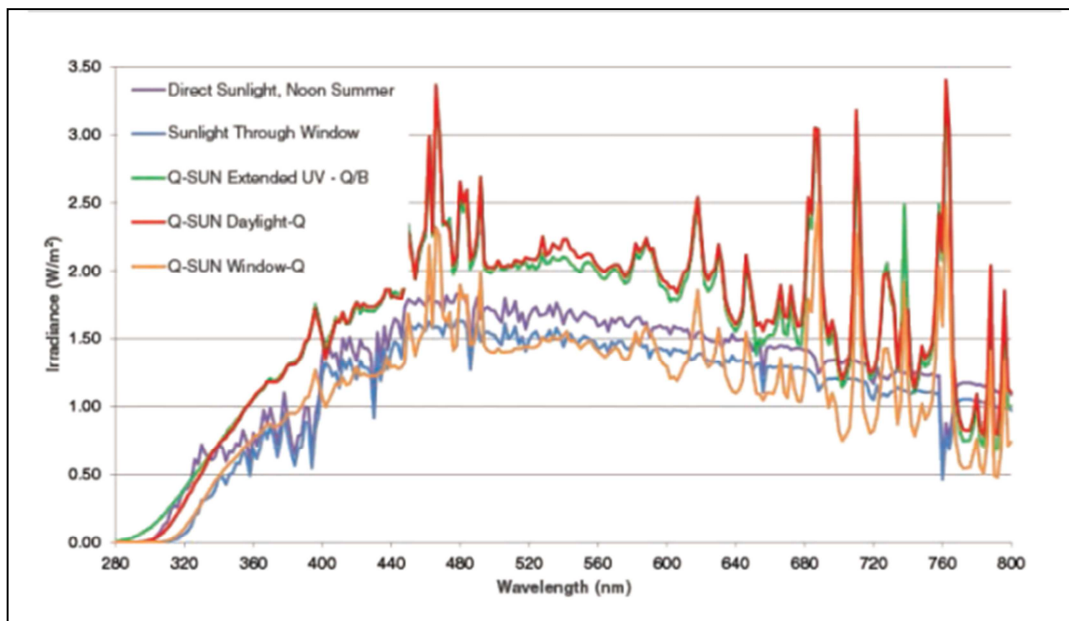


Figure 21 : Spectre solaire vrai et reproduit par arc au xénon

Le choix du filtre a été fait pour obtenir un profil spectral voisin de celui reçu derrière une fenêtre qui s'apparente au spectre filtré par la cornée (figure 21).

(b) *Mise en œuvre*

Le calcul du facteur d'accélération entre l'exposition reproduite par l'arc au xénon et l'exposition naturelle arrivant dans l'œil est proposé par la norme ISO EN NF 11979-5 point 5.5 « Essai de stabilité aux photons », dont le rationnel scientifique est justifié comme tel (Figure 22 : Calcul du facteur d'accélération du vieillissement par photo-oxydation)

$$T_2 = 365 \times T_1 \times \left[\left(\frac{I_2}{I_1} \right)^n \times \left(\frac{24}{t} \right) \right]^{-1}$$

Figure 22 : Calcul du facteur d'accélération du vieillissement, norme ISO EN NF 11979-5

« Les paramètres suivants sont considérés comme pertinents pour une exposition in situ d'une LIO (lentille intraoculaire) au rayonnement UV :

1. L'intensité du rayonnement UV-A in vivo dans la plage comprise entre 300 nm et 400 nm, dans la position de la LIO et dans des conditions de lumière diffuse (I1) : 0,3 mW/cm² ; l'estimation acceptée internationalement pour l'intensité totale de la lumière solaire correspond à une moyenne de 1 kW/m² (100 mW/cm²) dans les zones ensoleillées proches du tropique du Cancer. La portion des longueurs d'onde proches de l'ultraviolet dans la plage comprise entre 300 nm et 400 nm correspond à environ 6,5 % de l'intensité totale, soit environ 6,5 mW/cm². Les lentilles intraoculaires sont exposées à la lumière solaire qui atteint l'arrière de la cornée et l'humeur aqueuse. Dans le spectre de la lumière solaire, la partie proche de l'ultraviolet qui n'est pas absorbée par la cornée et l'humeur aqueuse et qui peut potentiellement endommager les LIO par dégradation photochimique est comprise entre 40 % et 50 % du rayonnement UV-A total. En supposant que la cornée et l'humeur aqueuse absorbent 50 % du rayonnement UV-A, la LIO est exposée à un rayonnement de 3,25 mW/cm² dans la plage comprise entre 300 nm et 400 nm pour une intensité totale de lumière solaire. L'intensité de la lumière diffuse réfléchie est évaluée à un dixième de la valeur mentionnée ci-dessus. L'irradiation d'une lentille intraoculaire in vivo est donc d'environ 0,3 mW/cm².
2. La durée d'exposition journalière à la lumière solaire (t) : 3 h ;
3. La durée d'exposition in vivo (T1) : 20 ans ;
4. Le facteur d'intensité (n) : 1 (c'est-à-dire l'intensité maximale observée dans des régions ensoleillées) ;
5. la période d'essai in vitro (T2, en jours) peut être calculée à l'aide de l'équation suivante (voir Référence [1]), avec (I2) étant l'intensité in vitro de la source de rayonnement dans la plage comprise entre 300 nm et 400 nm.
Exemple : Si I2 = 10mW/cm², T2 = 27,4 j. »

Une fois préparés, les échantillons ont été placés au niveau du plateau central. La hauteur du plateau ne peut être changée, la hauteur des échantillons non plus. L'intensité délivrée par la lampe est calibrée au niveau du plateau.

La température de l'enceinte est fixée sur la température de la plaque et non de l'enceinte pour limiter la montée excessive en température de l'ensemble.

Les échantillons sont placés de manière aléatoire dans l'enceinte et régulièrement déplacés pour limiter le risque de biais du niveau d'exposition entre le centre et les coins de l'enceinte (Figure 23).

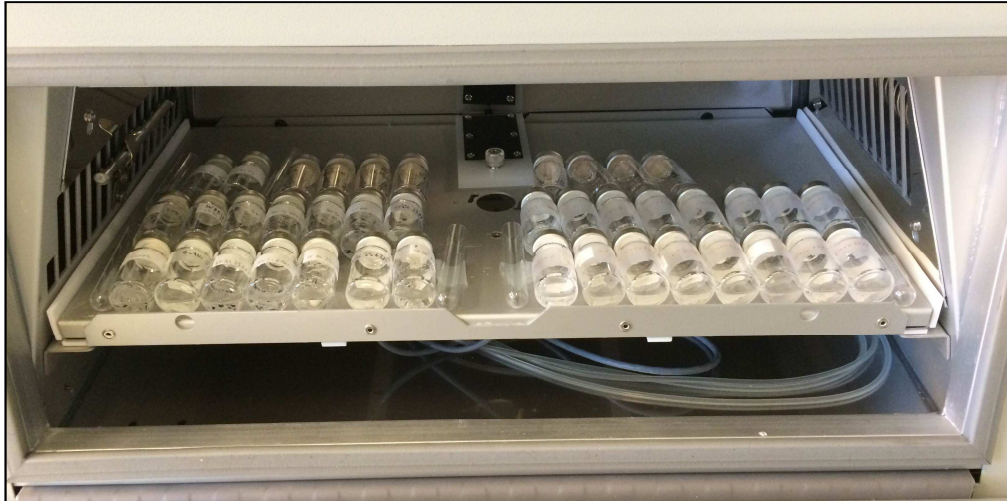


Figure 23 : Intérieur de l'enceinte Qsun-Xe1 lors du vieillissement de lentilles intraoculaires

La lampe est réglée à une intensité de 1.5W/m^2 calibrée à 420 nm. Cette intensité permet de réaliser deux ans de vieillissement naturel en 96 heures (Cf. tableau III). L'enceinte est réglée à 34°C , soit la température physiologique de l'humeur aqueuse.

Pour assurer une température optimale dans l'enceinte avant d'initier l'exposition à l'arc au xénon, un pré-cycle de 30 minutes à 34°C sans source lumineuse est réalisé.

Tableau III : Equivalence entre exposition naturelle et accélérée par arc au xénon réglé à $1,5\text{W/m}^2$

Durée d'exposition naturelle	Durée du vieillissement accéléré
<i>2 mois</i>	<i>9 heures</i>
<i>2 ans</i>	<i>96 heures</i>
<i>20 ans</i>	<i>960 heures</i>

(c) *Photo-oxydation simple*

Après leur déconditionnement et leur rinçage, les implants sont placés hors milieu aqueux dans l'enceinte de vieillissement à l'arc au xénon.

Les implants sont alors exposés au protocole mimant le vieillissement solaire naturel. Deux temps ont été testés : 2 mois (dit « court ») et 2 ans (dit « long ») de vieillissement accéléré.

(d) *Photo-oxydation combinée à l'hydrolyse*

Après déconditionnement et préparation pour le vieillissement, les implants sont placés dans $1500\mu\text{L}$ de sérum physiologique stérile dans un flacon en verre serti. L'ensemble est placé dans l'enceinte de vieillissement à l'arc au xénon puis exposé aux protocoles mimant l'exposition solaire naturelle de 2 mois (soit 9 heures) et 2 ans (soit 96 heures) Cf. tableau III.

Dans ce groupe de vieillissement, pour prendre en compte le paramètre de température lié à l'enceinte de vieillissement à l'arc au xénon, un groupe d'implants témoins est réalisé. Ce groupe témoin correspond à des implants de la même référence, de la même série de production industrielle, placés dans l'enceinte mais protégés de l'exposition lumineuse par un revêtement en aluminium autour du flacon serti.

Les intitulés, les échantillons et les conditions appliquées sont résumés dans le tableau IV.

Tableau IV : Conditions de vieillissement

Intitulé	Conditions
Implant neuf	Sans lumière
	Sérum physiologique
	8-20°C
	< 6mois
Hydrolyse courte	Sans lumière
	Sérum physiologique
	37°C
	72 heures
Hydrolyse forcée	Sans lumière
	Sérum physiologique
	70°C
	60 jours
Photo-oxydation courte	1,5W/m ² à 420nm
	Sans solvant
	34°C
	9 heures
Photo-oxydation longue	1,5W/m ² à 420nm
	Sans solvant
	34°C
	96 heures
Photo-oxydation courte combinée à hydrolyse	1,5W/m ² à 420nm
	Sérum physiologique
	34°C
	9 heures
Photo-oxydation longue combinée à hydrolyse	1,5W/m ² à 420nm
	Sérum physiologique
	34°C
	96 heures
Témoins	Sans lumière
	Sérum physiologique
	34°C
	96 heures

III. Evaluation analytique post-vieillessement

L'évaluation analytique préclinique des lentilles intraoculaires comporte deux limites majeures. La première est liée à la taille de chaque dispositif médical. La lentille possède un diamètre de 6 mm soit une surface exploitable recto-verso de 60mm². La masse d'un implant, haptiques compris, est voisine de 15 mg. La seconde limite est le coût d'acquisition des dispositifs médicaux (supérieur à 150€ par implant)

Ces deux limites demandent d'optimiser au mieux la procédure d'évaluation post-veillessement.

Dans l'ensemble des travaux menés et des résultats présentés ci-dessous, les hypothèses de l'homogénéité et de la répétabilité des propriétés initiales des lentilles intraoculaires ont été faites. Selon ces hypothèses, un implant neuf est considéré comme un bon témoin pour mesurer les évolutions relevées au cours du vieillissement.

Afin de ne pas altérer la surface des lentilles intraoculaires, les analyses biologiques réalisées l'ont été sur des implants dédiés. Ces implants ont toutefois été vieillis en même temps que les implants destinés à l'analyse physique et chimique.

A. Analyses physiques et chimiques

Pour tous les groupes, une fois le vieillissement terminé, les lentilles intraoculaires ont été conservées dans une enceinte noire thermostatée à 20°C. Cette température permet de stopper le vieillissement artificiel réalisé en amont.

1. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Le principe de l'ATG est basé sur l'utilisation d'une thermobalance. La balance reliée à un système de mesure et de chauffage permet d'évaluer la perte de masse de l'échantillon en fonction de la température. La mesure est permise par comparaison avec un contrepois de masse connue. L'analyse thermogravimétrique permet de caractériser la stabilité du matériau sous l'effet de l'élévation de la température à l'aide d'une thermobalance. L'information obtenue permet de renseigner les phénomènes telles que les ruptures de chaînes, la carbonisation, la déshydratation ou encore l'oxydation. L'analyse permet également de déterminer indirectement la présence et l'efficacité d'additifs protecteurs de thermolyse dans un polymère.

L'ATG peut être reliée à un système de mesure analytique séparative telle que la chromatographie en phase gazeuse ou encore une spectrométrie de masse.

L'analyse thermogravimétrique est réalisée à l'aide d'un appareil TGA Q500 de TA instrument® (Guyancourt, France) équipée d'un passeur d'échantillons automatique.

L'analyse est faite à progression de 20°C/minute sous flux d'azote de 30°C à 600°C. Cette température permet d'atteindre la dégradation totale du polymère (au voisinage 500°C).

La température et l'humidité du laboratoire lors de la réalisation des analyses sont constantes.

Les échantillons analysés sont des demi-implants (une moitié de lentille et un haptique).

L'autre moitié d'implant est analysée en DSC (*Differential scanning calorimetry*). Tous les implants neufs et vieillis, à l'exception de ceux utilisés pour les analyses protéiques et cellulaires, ont été analysés en ATG (figures 24 et 25) et DSC.

Les tracés ont été analysés à l'aide du logiciel *Universal Analysis 2000* v4.5 de TA instrument®.



Figure 24 : TGA Q500

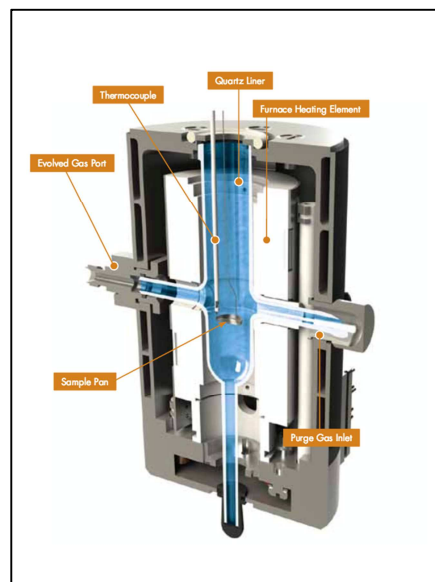


Figure 25 : TGA Q500 vue schématique du four

2. Analyse par DSC

L'analyse calorimétrique différentielle (DSC) permet de mesurer l'ensemble des transitions thermiques d'un échantillon. Cette méthode permet de déterminer l'état de la matière notamment en fonction de la température. L'une des températures d'intérêt dans l'évaluation des lentilles intraoculaires est la température de transition vitreuse. Cette température indique le passage du copolymère amorphe de son état vitrifié (rigide) à son état caoutchouteux (souple). La DSC permet également d'identifier les températures de fusion et de cristallisation

(figure 26). La DSC mesure la puissance P à fournir à un échantillon en le chauffant à une vitesse constante. La puissance est normalisée par la vitesse de chauffe et la masse de l'échantillon analysé.

Deux cupules identiques sont placées sur des supports stables dans un four sous un seul et même flux de chaleur. L'énergie délivrée à chaque cupule est calculée précisément par ordinateur pour que celles-ci conservent exactement la même température tout au long de l'analyse. Les variations d'énergie nécessaires au cours du temps, ou capacité énergétique, sont liées aux propriétés thermodynamiques de l'échantillon analysé. Les modifications de la capacité énergétique sont déterminées par la différence entre la cupule vide et la cupule contenant l'échantillon.

Trois comportements des états de la matière peuvent être vus en DSC : la transition vitreuse visible par une légère inflexion du tracé, la température de cristallisation pour laquelle un pic inversé vient casser le tracé et la température de fusion visible par un pic endothermique. Ce dernier point caractéristique est suivi de la température de décomposition. Au-delà de ce point, le flux de chaleur s'accroît à mesure que la température du four continue d'augmenter (figure 26).

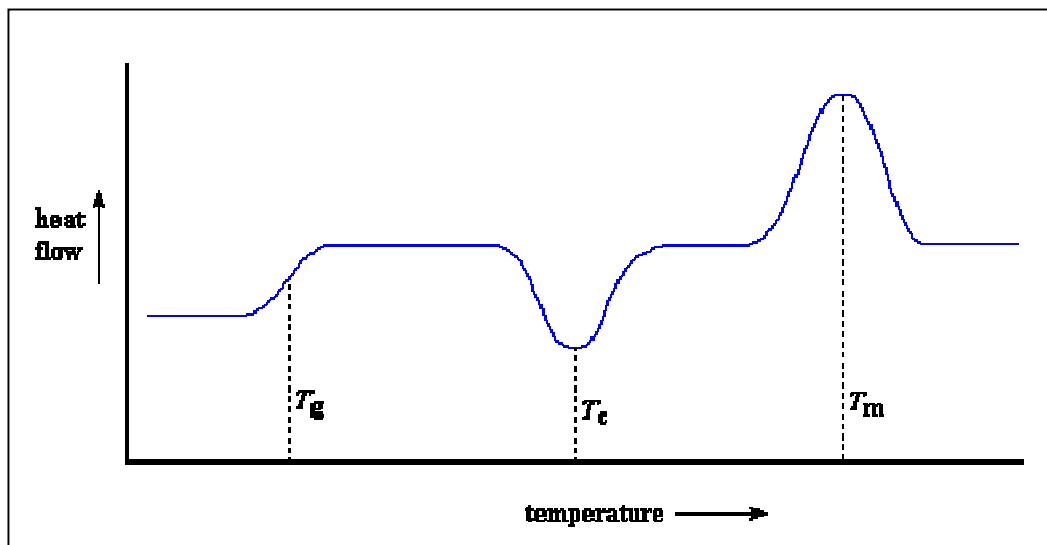


Figure 26 : Schéma théorique des caractéristiques visibles en DSC

T_g : transition vitreuse ; T_c : cristallisation ; T_m : fusion T_m

L'analyse DSC sur les implants intraoculaires est réalisée à l'aide d'une DSC TA Q1000[®] (TA instrument, Guyancourt, France). La prise d'essai correspond à un demi-implant (l'autre moitié étant utilisée pour l'analyse en ATG). Le flux de chaleur progresse de 10°C/min de -40°C à +240°C sous azote. La mesure est faite sur trois cycles de montée en température et

de retour à la température initiale. Les tracés sont analysés à l'aide du logiciel *Universal Analysis 2000* v4.5 (TA instrument, Guyancourt, France).

3. Evaluation du relargage à partir des implants

(a) Principe

La synthèse des polymères n'est jamais totale. Au terme de la polymérisation peuvent persister des monomères n'ayant pas réagi, ou d'autres entités chimiques qui interviennent dans la procédure de synthèse. Ces composés sont piégés dans l'enchevêtrement des chaînes macromoléculaires et peuvent être relargués en fonction des conditions de vieillissement^{134,252,253}.

Le mécanisme de vieillissement que subit le polymère est également à l'origine de l'apparition de produits de dégradation dont l'origine peut être la dépolymérisation en bout de chaînes alkyles et/ou la scission des chaînes principales. En outre, ces phénomènes de vieillissement concernent également les additifs et les catalyseurs qui peuvent se dégrader ou se recombinaison. Ce mélange complexe constitue alors l'ensemble des extractibles du polymère. Il s'agit principalement de composés de faible masse moléculaire (CFMM) de polarité variable.

Leur apparition est liée aux conditions de vieillissement du polymère (hydrolyse, oxydation, thermolyse, dégradation enzymatique). Ces composés de faible masse moléculaire ont la capacité de migrer au travers du polymère. Leur coefficient de diffusion dans le matériau, puis leur migration, sont corrélés à leurs propriétés physiques et chimiques (masse moléculaire, encombrement stérique, polarité). L'arrangement supramoléculaire des chaînes de polymères et les propriétés thermodynamiques définissent également la mobilité de ces CFMM.

Pour les lentilles intraoculaires, l'exposition aux rayonnements ultraviolets et la température d'utilisation supérieure à la température de transition vitreuse, qui caractérise les matériaux, sont deux conditions propices à la genèse des CFMM et à la survenue de leur relargage^{33,34,36,143}.

(b) Matériel et méthodes

La recherche des composés de faible masse moléculaire et des monomères pouvant être relargués est menée sur chromatographie liquide à polarité de phases inversée (RP-HPLC) utilisant une chaîne UH3000[®] (Dionex, France) couplée à un détecteur UV-visible à barrette de diodes. La colonne utilisée est une colonne de silice greffée C18 Kinetex[®] de 250mm de

longueur et de porosité 5 μ m (Phenomenex[®]). La phase mobile utilisée est un mélange eau/acétonitrile/ tétrahydrofurane et le mode d'élution est un gradient s'étendant sur 80 minutes d'acquisition à un débit de 1mL/min. La mise au point et la validation de la méthode pour le dosage des monomères constitutifs des lentilles intraoculaires est développée dans l'annexe 2. Les échantillons analysés sont ceux décrits dans le chapitre I partie I. Chaque échantillon est analysé à trois reprises (n=3). Les données sont acquises à l'aide du logiciel Chromelion[®] v6.80 (Dionex, France).

L'analyse qualitative a été réalisée au moyen des profils tridimensionnels des échantillons analysés. L'analyse quantitative a été menée spécifiquement sur chaque composé au moyen de la détermination des aires sous courbes pour l'ensemble des composés élués, puis de façon isolée pour chaque composé.

Plusieurs analyses statistiques sont conduites :

- La comparaison de l'aire totale moyenne pour chaque condition de vieillissement entre les différents échantillons (analyse de variance) ;
- La comparaison de l'aire totale moyenne de l'ensemble des échantillons d'une condition en fonction des conditions de vieillissement (analyse de variance) ;
- La comparaison de la distribution de chacun des composés élués par échantillon au sein d'un même groupe de vieillissement (test du Chi2) ;
- La comparaison de la distribution moyenne de chacun des composés élués dans un même groupe de vieillissement comparés aux autres groupes de vieillissement (test du Chi2).

4. Cinétique de relargage des CFMM

Trois implants enVISTA[®], d'un même lot, ont été vieillis simultanément selon le protocole de photo-oxydation combinée à l'hydrolyse de longue durée.

Une analyse par RP-HPLC de la solution de vieillissement a été faite aux temps suivants :

30 min ; 60 min ; 90 min ; 120 min ; 240 min ; 360 min ; 420 min ; 720 min ; 960 min ; 1800 min ; 2280 min ; 3600 min et 4620 min.

Le volume total de solution de vieillissement devant rester fixe, à chaque temps d'analyse, le volume prélevé a été remplacé par un volume équivalent de solvant. Chaque mesure de cinétique prend en compte le facteur de dilution et la perte de matière liée au prélèvement du temps d'analyse précédant.

Pour comprendre le devenir des composés relargués lors de photo-oxydation, à la 4^{ème} heure de vieillissement, les implants ont été transférés dans de nouvelles SV. Les anciennes solutions ont été maintenues dans l'enceinte afin de suivre leur stabilité à la photo-oxydation. Des prélèvements ont été réalisés toutes les 24 heures puis analysés par RP-HPLC selon la méthode décrite en annexe 2. Le volume prélevé n'a pas été renouvelé car l'implant, la source d'apparition des CFMM, n'était plus présent.

5. Mesure de l'angle de contact

L'analyse de la surface est faite conjointement par l'analyse de la mouillabilité et de la rugosité de surface.

La mouillabilité est réalisée par mesure de l'angle de contact à l'aide d'un goniomètre G40 (Krüss, Allemagne) couplée au logiciel Digidrop[®] (GBX, Dublin Irlande). Pour l'implant en VISTA[®] dont la surface est hydrophile, une goutte de 1µL de glycérol a été déposée sur la surface.

6. Mesure de la rugosité de surface

Sur la base des travaux de Lombardo *et al.*, la rugosité de surface des implants a été menée par microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy* ou AFM)²⁵⁴. Les mesures sont faites à l'aide d'un AFM Innova[®] (Brücker, France). Pour limiter la dégradation de la surface, le mode *tapping* dans l'air a été préféré au mode continu. La fréquence de résonance du cantilever était de 320 kHz pour une pointe en silicone dotée d'une constante de raideur de 42N/m (modèle NCHV-A, Brücker, France). Pour chaque image, la rugosité est mesurée sur le trajet aller-retour de la pointe. L'analyse de l'état de surface est la somme de plusieurs observations. La première est la rugosité de surface. Les valeurs Ra et Rq de rugosité sont calculées par la hauteur et la profondeur des aspérités présentes en surface (figure 27).

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N r_j^2}$$

Figure 27 : Formule de calcul de la rugosité quadratique moyenne

Rq est la rugosité moyenne quadratique, N est le nombre d'écart de valeur r_j relevée.

L'évaluation de la rugosité est associée à une analyse qualitative de la surface. Le contraste de phase et la friction de la pointe lors de son déplacement sont des indications sur l'homogénéité de la surface analysée.

La méthode a été mise au point pour l'analyse de six zones non contiguës réparties dans deux régions de l'implant. La partie centrale de la lentille et la partie périphérique sont analysées chacune en trois zones. Chacune des six zones est analysée en six sous-zones continues. Lors du développement de la méthode d'analyse, les sous-zones ont été imagées à $1\mu\text{m}^2$; $3\mu\text{m}^2$; $5\mu\text{m}^2$; $10\mu\text{m}^2$ et $20\mu\text{m}^2$. Seule la zone de $10\mu\text{m}^2$, représentative de l'état de surface, a été conservée pour les analyses statistiques des données.

La stéréographie des zones et sous-zones est résumée dans la figure 28.

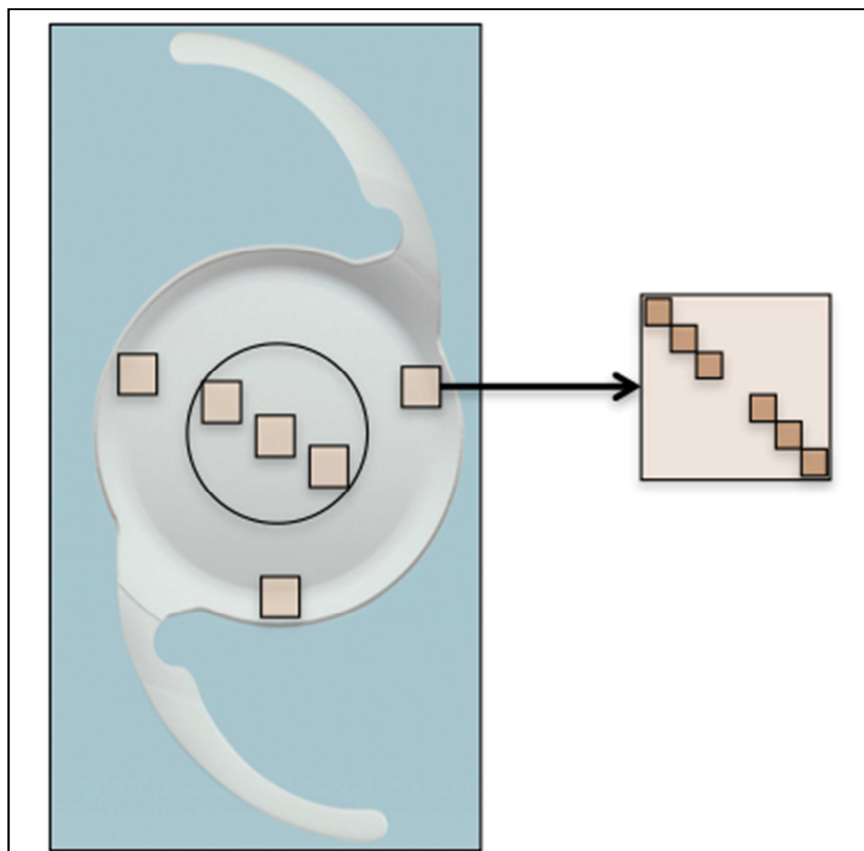


Figure 28 : Représentation schématique du protocole d'imagerie des surfaces par AFM

Dans le cercle, les trois zones centrales en périphérie du cercle les trois zones proches du bord de l'implant. Chaque zone est imagée en six sous-zones (carrés marron représentés dans le détail à droite de la figure).

Les paramètres caractéristiques de la rugosité et de la texture de la surface ont été évalués à l'aide du logiciel Gwyddion[®] v2.35 (Czech Metrology Institute, République Tchèque).

Le principal paramètre retenu est la rugosité de surface ou R_q . L'équation figure 27 détermine la hauteur moyenne des pics et des creux à partir de la hauteur médiane définie comme plan 0 de l'image.

Les valeurs de rugosité maximale positives (R_{max}) et négatives (R_{min}), évaluant l'amplitude maximale des hauteurs, ont été relevées pour chaque surface analysée.

La texture est analysée par contraste de phase. La représentation graphique d'une coupe transversale de la surface est également utilisée pour définir l'évolution globale de la texture.

L'analyse statistique des données de rugosité est faite par analyse des variances (test de Kruskal-Wallis ou ANOVA en fonction de la taille des lots) ou des tests de comparaison de moyenne paramétrique (test t de student) à l'aide du logiciel PRISM® (GraphPad v5.01, États-Unis).

L'état de surface est évalué pour chaque implant en son centre et sur les bords. Les implants d'un même groupe sont comparés entre eux pour déterminer l'homogénéité. Les implants sont comparés selon les procédés de vieillissement : hydrolyse, photo-oxydation ou vieillissement combiné. Chaque résultat est comparé aux caractéristiques de surface initiale déterminées sur des implants neufs.

B. Analyses biologiques

1. Dosage immunologique

L'analyse de l'adhésion des protéines impliquées dans la prévention de la PCO a été mesurée par méthode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) directe. La méthode a été développée et validée pour la quantification de la fibronectine humaine adhérente à la surface des implants intraoculaires (Cf. annexe 3 et annexe 4).

2. Analyse de la morphologie cellulaire

L'impact des lentilles intraoculaires sur la prolifération et la morphologie cellulaire a été testé par mise en contact direct de cellules épithéliales de cristallin humain avec les implants. Ces cellules ne sont pas cataractées (ATCC n° CRL-11421). La culture cellulaire est faite dans un milieu de culture Dubelcco Modified Eagle's Medium® (DMEM, Sigma, Allemagne) auquel 20% de sérum de veau fœtal (Sigma, Allemagne) est ajouté ainsi que 1% d'antibiotiques

(pénicilline 10 000U/mL, streptomcyine 10mg/mL). Les cellules sont conservées dans une enceinte à 37°C et 5% de CO₂.

A J0, 50 000 cellules sont déposées dans des plaques pour culture cellulaire de 24 puits. Après 24 heures de croissance cellulaire, les échantillons testés sont placés sur le tapis cellulaire. Après 48 heures de croissance cellulaire supplémentaire, à J3, l'aspect cellulaire est observé au microscope binoculaire XDS-2 (Optika, Ponteranica, Italie) avec un grossissement x10. Les images sont acquises sur le logiciel Optika Version Pro 2.7 à l'aide d'une caméra Optikam pro 5.

Les implants neufs et les implants vieillis ont été testés. Les monomères constitutifs du copolymère ont été testés à trois concentrations différentes : non cytotoxique, cytotoxique et à la concentration définie comme générant 30% de cytotoxicité (arbitraire).

3. Cytotoxicité des composés relargués et des monomères

L'évaluation de la cytotoxicité des différents échantillons est réalisée sur les principes de la norme ISO EN NF 10993-5 relative à l'évaluation biologique des dispositifs médicaux. La cytotoxicité est réalisée avec le test de viabilité cellulaire au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium ou MTT (Carl Roth, Allemagne). Ce test permet de déterminer la viabilité cellulaire en mesurant l'activité de la déshydrogénase mitochondriale. A J0, 10 000 cellules épithéliales humaines de cristallin ont été déposées dans des plaques pour culture cellulaire à 96 puits. Après 24 heures de croissance cellulaire, les échantillons sont mis en contact. Après 48 heures de contact direct, les milieux sont changés et 20µL d'une solution de MTT à 5mg/mL sont ajoutés. Après 2 heures d'incubation à 37°C, le milieu est retiré puis les cristaux de formazan obtenus par métabolisation du MTT sont dissouts en ajoutant 100µL de diméthyle sulfoxyde (DMSO) (Fisher chemicals, Waltham, Massachusetts, États-Unis). L'absorbance est lue à 570nm à l'aide d'un lecteur de plaques (ELx800 Biotek Instrument Inc Winooski, Vermont, Etats-Unis). La viabilité cellulaire est calculée en faisant le rapport de la valeur lue pour l'échantillon sur celle du blanc (différence d'absorbance). Chaque échantillon est réparti dans huit puits pour l'analyse.

Les monomères testés sont ceux constitutifs du copolymère. Des concentrations de 10 000 à 100 000 ppm (particules par million) dans du DMSO ont été préparées pour chaque monomère. Une seconde dilution dans du milieu de culture a été faite pour obtenir une concentration finale sur les cellules de 10 à 100 ppm. Le DMSO seul a été utilisé dans les mêmes conditions pour réaliser un blanc.

Quatre monomères ont été achetés à Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri Etats-Unis) : l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDM), l'éthylène glycol phényle éther acrylate (EGPEA), le styrène et le 2-hydroxyéthyle méthacrylate (HEMA) (Cf. annexe 1).

L'évaluation de la cytotoxicité des solutions de conservation et des solutions de vieillissement a été réalisée au moyen d'une mesure de la viabilité cellulaire au MTT selon les mêmes conditions expérimentales que pour les monomères. Les échantillons ont eux été traités différemment. Les solutions contenant les composés extraits des lentilles intraoculaires ont été diluées au demi dans du milieu de culture. Pour chaque échantillon, un blanc a été utilisé pour déterminer la cytotoxicité relative. Pour les solutions de vieillissement, le blanc était du sérum physiologique placé dans les mêmes conditions expérimentales au sein de l'enceinte à arc au xénon. Pour les solutions de conservation, le blanc était du sérum physiologique stérile.

Enfin, l'évaluation de la cytotoxicité directe induite par les implants neufs et vieillis a été réalisée au moyen d'un test au MTT selon les mêmes principes. Les plaques utilisées étaient des plaques pour culture cellulaire à 24 puits, la quantité de cellules déposées à J0 50 000 par puit et le volume de MTT ajouté à J3 était de 100µL par puit.

La viabilité cellulaire relative a été déterminée par le calcul des rapports d'absorbance entre les puits vides (considérés comme 100% de viabilité) et les puits contenant les implants neufs ou vieillis.

4. Induction de la voie de transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse.

Selon les principes scientifiques actuellement admis, le TGF-β2 (*tissular growth factor*) est le médiateur cellulaire principal impliqué dans la physiopathologie de la transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse. L'une des expressions biochimiques de la transdifférenciation est l'expression accrue de la fibronectine.

L'induction de la transdifférenciation par les composés relargués au cours du vieillissement a été testée selon le protocole suivant inspiré des travaux de Kurosaka *et al.*,¹⁸⁸ :

- À J0 10 000 cellules sont déposées dans les puits de plaque de culture cellulaires à 24 puits ;
- Après 24 heures de croissance, les échantillons testés et des témoins positifs de TGF-β2 à trois concentrations (1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL) sont ajoutés ;
- Après 3 jours de contact, le milieu de culture est remplacé par du milieu de culture frais contenant les échantillons et les contrôles aux mêmes concentrations ;

- Après 3 jours supplémentaires de contact, les milieux sont récupérés ;
- Une quantification de la fibronectine exprimée est effectuée par méthode ELISA sur les surnageants à J3 et J7 selon le protocole décrit en annexe 3.

Chapitre 2 : Etude des phénomènes de vieillissement des copolymères d'acryliques

I. Analyse thermodynamique du polymère

A. Analyse thermogravimétrique

1. Analyse globale de la perte de masse

Le comportement thermique des implants se manifeste par une perte de masse en deux paliers. Les courbes dérivées des thermogrammes ont permis de mieux appréhender et quantifier les phénomènes de début et de fin de processus de dégradation. Ainsi, les tracés de la figure 29 révèlent deux pics de dégradation correspondant respectivement à la première et la seconde perte de masse. Six températures ont été relevées pour caractériser et comparer les pertes de masse en fonction des conditions de vieillissement.

(a) *Perte de masse du copolymère neuf*

La perte de masse se déroule en trois phases^{136,137} (figure 29):

- La première perte est en moyenne égale à 0,78% de la masse totale de l'échantillon. Elle survient avant 150°C et possède trois origines : la perte de l'eau libre présente en surface, les impuretés de synthèse et les produits de dégradation liés au stockage de l'implant ;
- Un plateau entre 150°C et 250°C. La perte de masse moyenne est de 0,03%. Celle-ci est intermédiaire entre la fin de perte des composés de faible masse moléculaire et le début de ruptures de liaisons hydrogène du copolymère ;
- La seconde perte de masse au-delà de 250°C est la pyrolyse du copolymère.

L'analyse de la perte totale des implants neufs n'est pas de 100%. La différence est le fait de la minéralisation du copolymère lors de sa combustion. Pour les implants neufs, la perte totale est de 98,6%. Les résultats sont résumés dans le tableau V.

La variation de 1^{ère} perte de masse est liée à la distribution des chaînes macromoléculaires et plus particulièrement les chaînes hydrophiles de poly-(éthylène glycol) et de poly-HEMA¹⁵¹.

L'analyse ATG a été réalisée sur une fraction de l'implant. L'écart entre la perte d'eau attendue (4% de la masse totale) et la perte de masse mesurée (0,78% en moyenne) est le reflet de l'hétérogénéité de distribution des chaînes au sein du copolymère. Le procédé industriel d'hydratation du copolymère consiste en un chauffage par palier allant de la température ambiante jusqu'à environ 90°C. Ceci implique une localisation différente de l'eau d'hydratation et de ce fait sa faible libération aux alentours de 100°C. L'eau qui ne se volatilise pas à faible température est donc liée aux chaînes du copolymère. Elle assure le rôle de plastifiant ce qui permet au polymère son repliement et le positionnement de la lentille dans la capsule lors de la chirurgie.

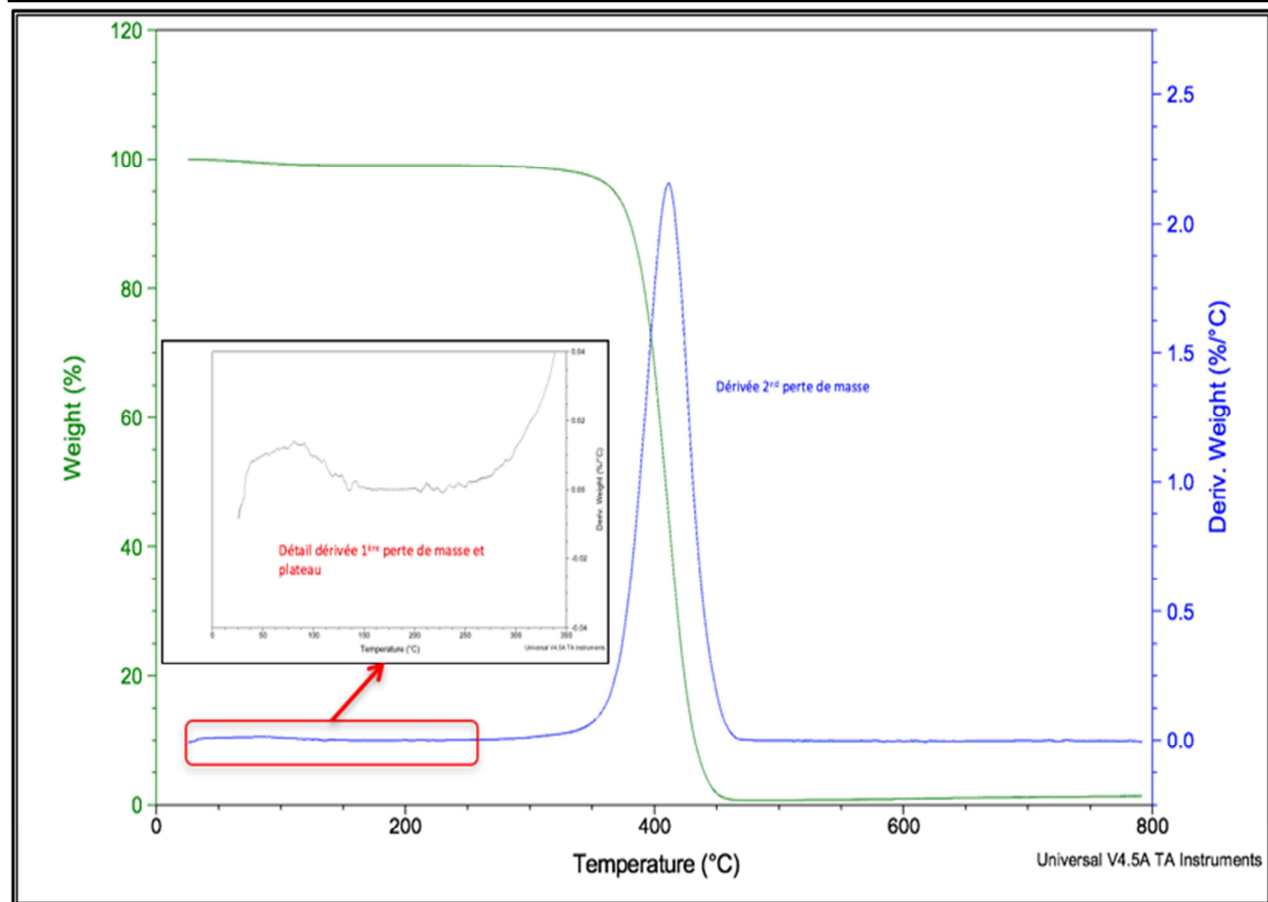
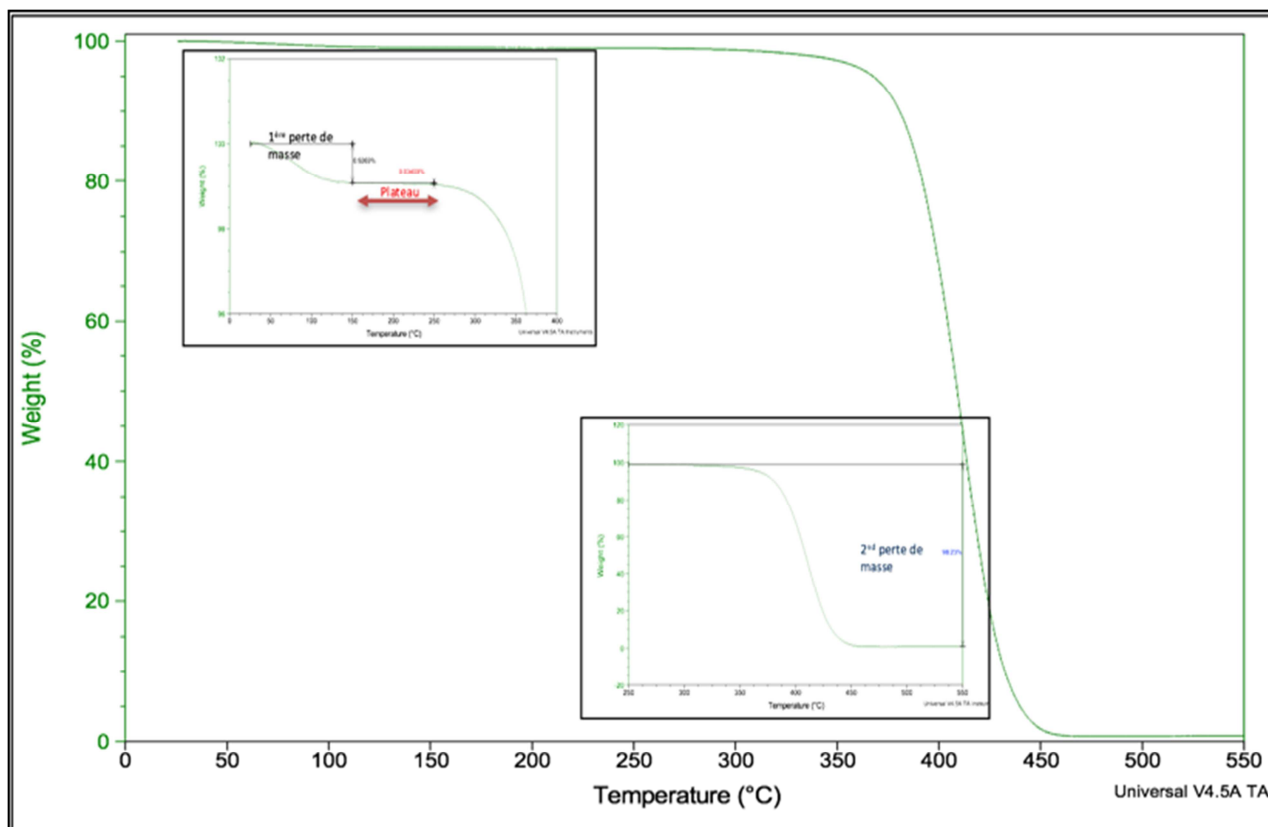


Figure 29 : Détails de l'analyse des pertes de masses en ATG et des dérivations du poids en fonction de la température

(b) Perte de masse en fonction du vieillissement de l'implant

Les valeurs des pertes de masse moyenne, pour chacune des 3 étapes et en fonction des conditions de vieillissement sont résumées dans le tableau V.

Tableau V : Pertes de masse en fonction du vieillissement mesurée par ATG

	1 ^{ère} perte (%)		Plateau (%)		2 nd perte (%)		Total (%)	
	0°C - 150°C		150°C - 250°C		250°C - 600°C		0°C - 600°C	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
Neuf	0,786	0,191	0,028	0,024	97,898	0,629	98,608	0,583
hydrolyse courte	0,727	0,114	0,017	0,021	97,820	0,141	98,495	0,177
hydrolyse forcée	0,838	0,249	0,113	0,097	98,170	0,071	98,985	0,233
Photo-oxydation courte	0,940	0,228	0,033	0,018	97,655	0,079	98,583	0,118
Photo-oxydation combinée courte	0,859	0,255	0,009	0,009	97,910	0,368	98,645	0,276
Photo-oxydation combinée longue	0,977	0,244	0,288	0,052	97,803	0,382	99,003	0,340
Témoins	1,141	0,551	1,410	0,035	97,800	0,494	98,877	0,275

Globalement, quel que soit le protocole de vieillissement, la perte de masse initiale ne varie pas significativement entre les groupes (test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha=0,05$; $p=0,477$).

La perte initiale liée à la déshydratation varie d'un échantillon à l'autre. Il est possible de séparer les implants en deux groupes : un groupe à faible perte de masse ($<0,78\%$) et un groupe à perte de masse importante ($>0,78\%$). La majorité des implants ont une première perte de masse supérieure à $0,78\%$ (Cf. tableau VI).

Tableau VI : Répartition des échantillons selon leur 1^{ère} perte de masse mesurée en ATG

Condition de vieillissement	Nombre d'implants selon la valeur relative de 1 ^{ère} perte de masse	
	$<0,78\%$	$>0,78\%$
<i>Neufs</i>	2	2
<i>Hydrolyse courte & témoins</i>	2	3
<i>Hydrolyse forcée</i>	1	1
<i>Photo-oxydation courte</i>	1	3
<i>Photo-oxydation combinée courte</i>	1	1
<i>Photo-oxydation combinée longue</i>	1	4

L'analyse de la distribution montre l'existence d'une différence significative de répartition des implants, selon leurs conditions de vieillissement, au sein des deux groupes ($n= 22$ implants ; Test du Chi² au risque $\alpha=0,05$; $p<0,001$). La photo-oxydation induit des modifications, du copolymère, visibles par l'augmentation de la 1^{ère} perte de masse au regard de celle des implants vieillis uniquement par hydrolyse.

Le délai de traitement de l'échantillon, de la fin du vieillissement jusqu'au passage en ATG, et la température de la pièce ont été considérés comme pouvant être des biais de confusion.

L'analyse des variances par Kruskal-Wallis confirme que la variation de première perte de masse est uniquement le fait du vieillissement de l'implant.

Le taux maximal de perte de masse n'excède pas 1,5% de la masse totale alors que le copolymère est hydraté à 4%. L'écart provient de la distribution de l'eau libre et de l'eau liée au sein du copolymère. Le résultat confirme l'hétérogénéité observée pour les implants neufs et indique qu'au cours du vieillissement une grande partie de l'eau reste liée au copolymère.

La première perte de masse est également la conséquence des produits de dégradation de faible masse moléculaire et de forte volatilité. Ces CFMM sont liés au copolymère par liaisons faibles. Celles-ci se rompent à des températures inférieures à 200°C¹³⁷. Les CFMM apparaissent de fait dans la première perte de masse et dans la perte de masse au cours du plateau.

Après vieillissement par hydrolyse courte, la première perte de masse et la perte durant le plateau diminuent au regard des valeurs moyennes relevées pour les implants neufs (Cf. tableau V). Cela peut être attribué au relargage de CFMM et aux impuretés de synthèse. Une fois l'implant placé à 37°C, température supérieure à la T_g, la mobilité des chaînes du copolymère doit permettre le relargage des CFMM vers le milieu de vieillissement. Les conditions du vieillissement artificiel ne permettent pas de générer de nouveaux produits de dégradation en quantité suffisante pour compenser la disparition des CFMM. Ainsi, la première perte de masse semble en grande partie liée aux CFMM^{120,155,255}.

Lors de l'hydrolyse forcée, les pertes de masses augmentent du fait de l'apparition de nouveaux CFMM, en quantité relativement importante. Ces CFMM ont une masse moléculaire et une polarité relatives qui ne leur permet pas d'être relargués lors du phénomène de vieillissement. Une partie de l'eau initialement liée au copolymère se libère suite aux scissions des chaînes et à la migration des CFMM, toutes deux induites par l'hydrolyse forcée.

Le vieillissement par la photo-oxydation seule est également caractérisé par l'augmentation des premières pertes de masses. Il peut s'agir de l'apparition de CFMM liés à la photo-dégradation. Ce résultat indique une nouvelle fois la part importante des produits de dégradation du copolymère dans les premières pertes de masse.

Après vieillissement par photo-oxydation combinée à l'hydrolyse sur une courte durée, les pertes de masse diminuent. La première perte de masse est légèrement supérieure à celle des

implants neufs. Il s'agit là d'espèces libres (eau ou CFMM). La perte de masse lors du plateau est fortement diminuée en comparaison avec les implants neufs ou ceux vieillis uniquement par hydrolyse courte. Cela indique que le copolymère contient très peu de liaisons faibles. Ce comportement est la somme de l'effet de l'hydrolyse qui diminue les pertes de masse, et de l'action de la photo-oxydation qui elle augmente conjointement la première perte de masse et celle du plateau. Les CFMM générés par photo-oxydation n'ont pas pu se lier par des liaisons faibles aux chaînes du copolymère. Les chaînes de poly(éthylène glycol) du polyEGPEA et les chaînes de PHEMA ont une plus forte affinité pour les molécules d'eau que pour les CFMM de polarité plus faible ce qui expliquerait le peu de formation de liaisons faibles caractéristiques de la perte de masse du plateau^{151,256,257}.

La photo-oxydation combinée à l'hydrolyse sur une longue durée modifie les propriétés thermodynamiques des implants. En ATG cela se traduit par une augmentation des valeurs de 1^{ère} perte de masse et de perte de masse durant le plateau au regard des valeurs des implants neufs d'une part et celles des implants vieillis par photo-oxydation combinée de courte durée d'autre part. Ces valeurs sont à comparer à celles des implants témoins, placés dans un contenant opaque au sein dans l'enceinte de vieillissement par arc au xénon, pour lesquels l'apparition de CFMM est également présente. Le cumul des deux pertes de charge est identique entre les implants témoins et ceux photo-oxydés. Seule la répartition entre la première et la seconde perte de masse diffère. Les CFMM du groupe témoin se volatilisent plus rapidement que ceux du groupe photo-oxydation combinée (première perte de masse supérieure). Les CFMM générés lors de la photo-oxydation sont donc majoritairement des composés thermostables, peu volatiles, de faible polarité et dont la masse moléculaire est relativement importante. Ces composés sont le fait des réarrangements moléculaires par la formation de liaisons faibles avec les chaînes du copolymère.

La comparaison des deux durées de photo-oxydation combinée montre qu'en fonction de l'irradiance cumulée, l'apparition de CFMM néoformés par photo-oxydation est plus rapide que la perte de composés par hydrolyse, diffusion et relargage. Ainsi ces CFMM peuvent se réarranger avec les chaînes de copolymères selon leur affinité (polarité et hydrophobicité).

Il n'y a pas de différence significative sur la valeur de seconde perte de masse. Toutefois, les pertes de masse totale des implants, vieillis par hydrolyse forcée et photo-oxydation combinée longue, sont supérieures à celle obtenue pour les implants des autres conditions de vieillissement. Cet écart indique que le résidu de la combustion est plus faible signifiant une

différence dans les mécanismes de vieillissement du copolymère selon les conditions appliquées.

2. Dérivation de la perte de masse en fonction de la température

Sur le tracé initial d'ATG, aucune différence significative n'est identifiée entre implants vieillis selon les différentes conditions. L'analyse de la dérivation de la masse en fonction de la température permet de mieux appréhender l'allure de la perte de masse.

Pour ce faire, quatre températures sont relevées dont trois concernant uniquement la seconde perte de masse liée à la pyrolyse (figure 30) :

- T1 : Température de fin de première perte de masse ;
- T2 : Inflexion du début de seconde perte de masse ;
- T3 : Maximum de la seconde perte de masse ;
- T4 : Fin de la seconde perte de masse déterminée par la tangente de la pente descendante du pic de la seconde perte de charge.

Le tableau VII et la figure 31 résument les valeurs moyennes relevées en fonction des conditions de vieillissement.

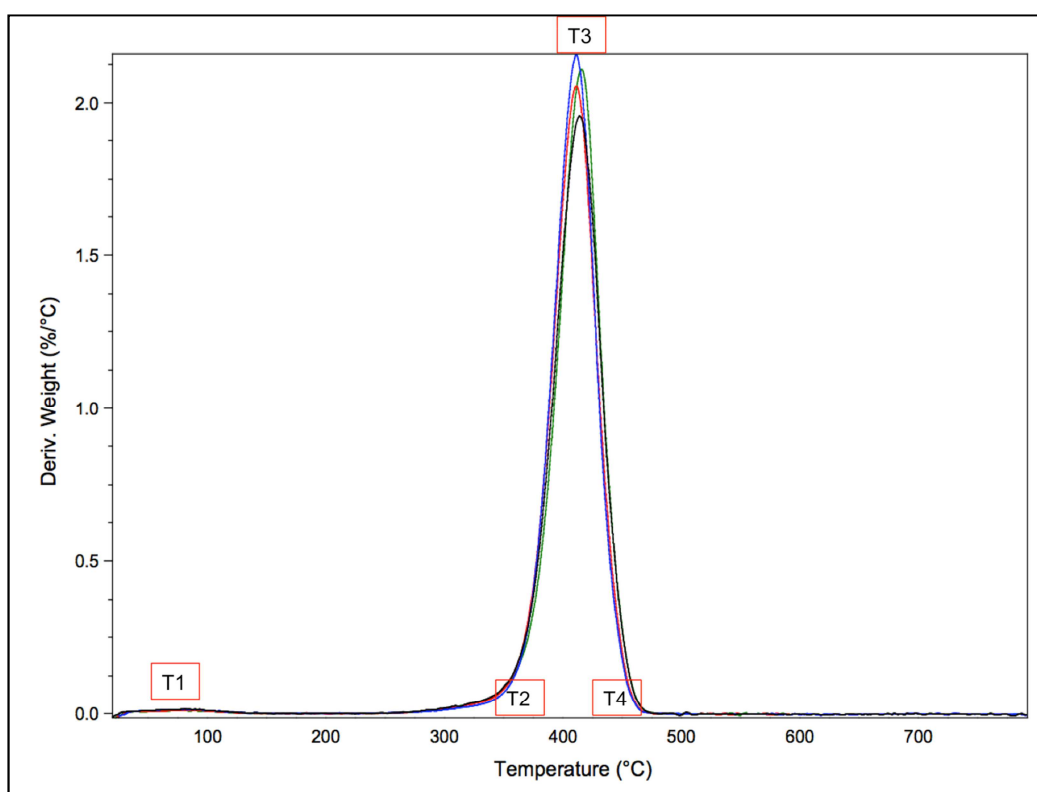


Figure 30 : Dérivée de la courbe ATG de la perte de masse

Tableau VII : Relevés de températures des dérivés des courbes ATG des pertes de masse

Condition de vieillissement		Températures relevées (°C)						
		1 ^{ère} perte de masse	2 nd perte de masse			Calculs		
		T1	T2	T3	T4	T2-T1	T4-T2	M(T4 + T2)
Neuf	\bar{x}	81,55	355,88	412,85	466,21	274,33	110,34	411,04
	σ	2,44	2,73	1,83	1,90	1,96	4,30	0,96
Hydrolyse courte	\bar{x}	86,52	352,81	410,37	463,81	266,29	111,00	408,31
	σ	0,86	0,51	1,65	1,19	1,37	0,68	0,85
Hydrolyse forcée	\bar{x}	86,01	358,48	414,12	464,87	272,48	106,39	411,68
	σ	0,46	3,45	2,21	0,98	3,91	4,43	1,24
Photo-oxydation courte	\bar{x}	81,48	362,01	413,80	463,64	280,53	101,63	412,83
	σ	2,68	1,05	1,67	0,48	3,63	1,06	0,61
Photo-oxydation combinée courte	\bar{x}	81,38	367,17	414,18	462,95	285,79	95,78	415,06
	σ	5,27	0,11	0,66	0,83	5,37	0,93	0,36
Photo-oxydation combinée longue	\bar{x}	85,32	366,25	416,30	455,54	280,93	89,29	410,89
	σ	2,63	7,69	2,77	2,73	6,23	5,12	5,17
Témoins	\bar{x}	84,11	364,30	410,91	458,07	280,19	93,77	411,18
	σ	1,85	3,20	0,78	0,65	1,36	3,43	1,54

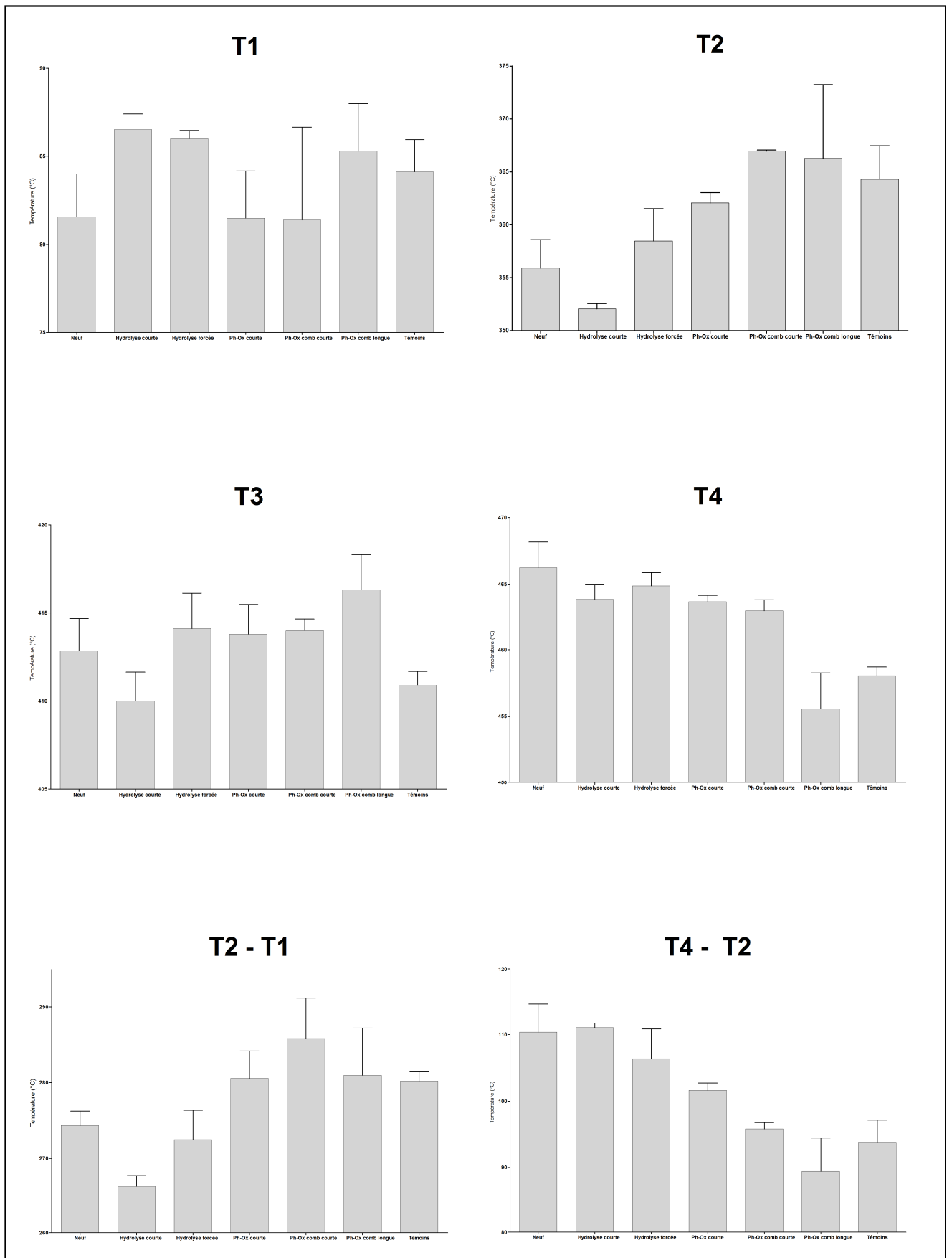


Figure 31 : Comparaison des températures moyennes caractéristiques des pertes de masse

(a) *Action du vieillissement par hydrolyse sur le copolymère*

Les quatre conditions de vieillissement par hydrolyse sont :

- L'hydrolyse liée au stockage dans une solution de NaCl 0,9% dans le conditionnement primaire (SC) ;
- L'hydrolyse courte ;
- L'hydrolyse forcée ;
- Les implants du groupe témoin de la photo-oxydation.

Les quatre conditions d'hydrolyse sont caractérisées par une seconde perte de masse équivalent pour les quatre températures relevées (T1 à T4) (figure 31).

La valeur T1 confirme l'observation faite sur la première perte de masse. Cette valeur est le reflet de la perte d'eau libre superficielle et de la formation des CFMM.

Les implants neufs ont une température T1 inférieure à celle des implants vieillis par hydrolyse courte. Toutefois, dans les deux cas le pourcentage de perte de masse est identique. L'origine de la première perte de masse est de fait différente. La température de vieillissement de l'hydrolyse courte permet la mobilité des chaînes et la diffusion des CFMM vers le milieu extérieur. Les conditions de l'hydrolyse courte ne permettent cependant pas de générer une quantité importante de CFMM. Les CFMM relargués sont remplacés par de l'eau libre qui se volatilise à une température T1 supérieure.

L'hydrolyse forcée, pour laquelle la température T1 est proche de celle de l'hydrolyse courte mais dont la perte de masse est supérieure, indique que T1 est principalement définie par des CFMM libres ne diffusant que peu vers le milieu de vieillissement et une quantité importante d'eau libre. Cette observation est cohérente avec celles du gonflement des implants hydrophobes en milieu aqueux^{119,155}. Ainsi, la perte de CFMM lors du relargage dépend de leur polarité et de la diffusion du milieu de vieillissement au sein des couches superficielles de l'implant. Il existe donc un état d'équilibre entre la perte des CFMM et le comblement des espaces par l'eau libre. L'équilibre se déplace selon les conditions de vieillissement.

Cet équilibre inclut également un réarrangement des chaînes supramoléculaires selon les affinités. Le 2-HEMA, monomère hydrophile, est présent à 26% dans le copolymère. Sa présence et l'homogénéité de sa répartition en surface des implants régissent directement la capacité de diffusion de l'eau dans le copolymère¹⁵¹.

La différence entre les températures T1 et T2 semble inférieure dans le cas de l'hydrolyse courte. Cette différence est due à la diminution de la température T2. Ce déplacement indique un début de pyrolyse plus précoce en lien avec l'action de l'hydrolyse sur le copolymère. Cette tendance n'est pas retrouvée dans l'hydrolyse forcée pour laquelle la température lors du vieillissement permet la réticulation du copolymère et le réarrangement des chaînes avec des CFMM. La réticulation réduit la diffusion de l'eau dans le copolymère et donc limite son hydrolyse¹⁵¹.

Lors de l'hydrolyse courte, la diminution de la température T3 confirme la perte de stabilité thermique du copolymère. A l'inverse, lors de l'hydrolyse forcée l'augmentation de T3 confirme la réticulation du copolymère. Celle-ci est liée à la perte de CFMM, principalement des chaînes alkyles peu polaires, autorisant un rapprochement des chaînes principales d'acrylates et leur réticulation.

La température T4 est plus faible que pour les implants neufs. Cela est lié à une plus grande proportion de matière dotée d'une grande stabilité thermique au sein du copolymère due à la réticulation des chaînes et une diminution de la distribution des masses.

En résumé, l'hydrolyse courte à une température de 37°C, donc supérieure à la Tg (28°C), se caractérise par une diminution des premières pertes de masse. Elle est en lien avec un relargage très précoce dans le milieu de CFMM piégés par l'immobilité des chaînes à la température de stockage de l'implant. Ces CFMM, tout comme l'étalement du pic de seconde perte de masse, sont le fait de l'hydrolyse. Celle-ci se produit lors du stockage et lors du vieillissement de l'implant qui modifie sa stabilité thermique. L'ajout d'une forte température lors de l'hydrolyse forcée accentue l'action de l'hydrolyse mais s'accompagne également d'une réticulation dont la finalité est la formation de sous-unités thermiquement plus stables. En parallèle, la diffusion du milieu dans l'implant, qui est permise par la température de vieillissement, accélère les échanges.

(b) Action de la photo-oxydation sur le copolymère

Après vieillissement par photo-oxydation courte, qu'elle soit combinée ou non à l'hydrolyse, la température T1 n'est pas différente de celle des implants neufs. Au regard des pertes de masses et du comportement des implants vieillis uniquement par hydrolyse, il apparaît que la photo-oxydation courte génère des CFMM ayant les mêmes comportements thermiques que ceux générés lors du stockage du copolymère (implant neuf). Cependant, la durée d'hydrolyse

étant inférieure, l'action de l'eau sur la formation des CFMM est limitée. Lors de la photo-oxydation combinée longue, la température T1 est voisine de celle des implants vieillis par hydrolyse courte. La perte de masse suit la même répartition que pour les implants vieillis par hydrolyse forcée. L'hydrolyse des chaînes macromoléculaires a lieu en parallèle du réarrangement et de la réticulation des chaînes du copolymère. La réaction est permise, non pas par la température de vieillissement (34°C) mais, par les radicaux libres produits lors de l'exposition aux UV de l'arc au xénon.

L'action de la photo-oxydation seule et combinée à l'hydrolyse sur la seconde perte de masse est présentée figure 32.

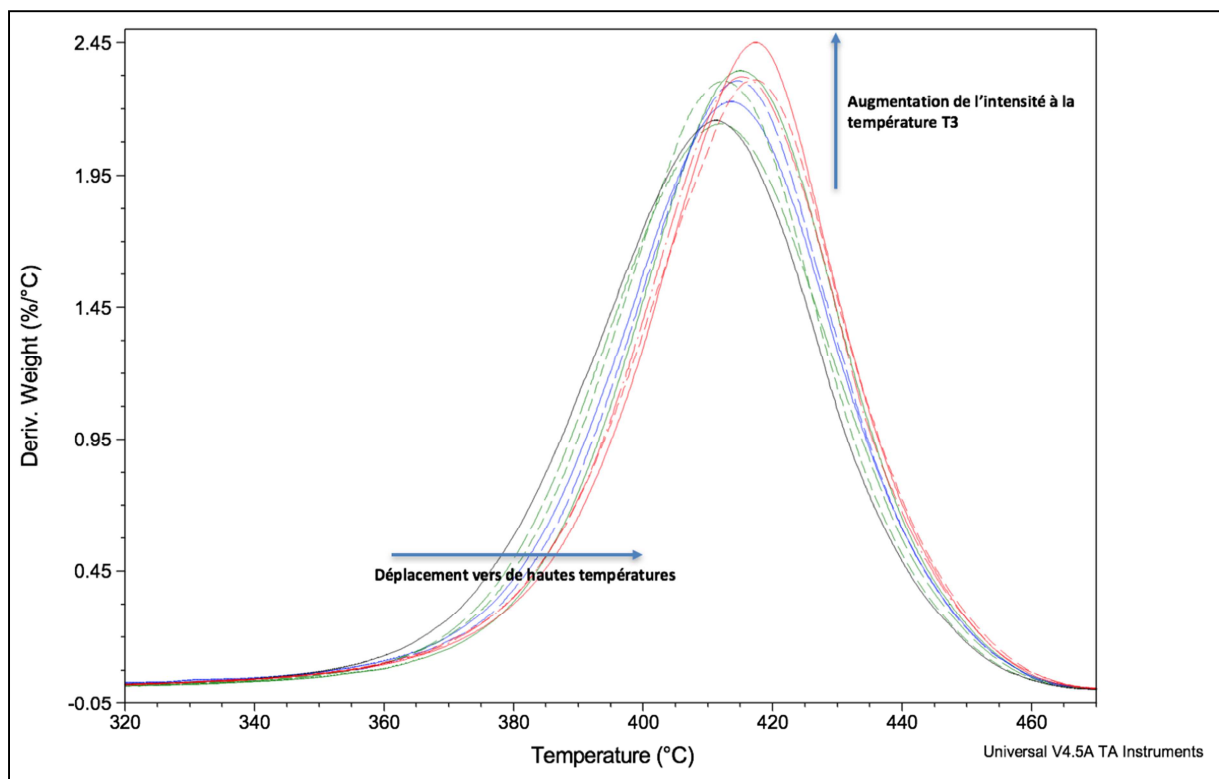


Figure 32 : Comparaison des dérivées de la masse par la température pour les implants vieillis avec photo-oxydation

En noir : implant neuf sans photo-oxydation, en vert : photo-oxydation seule, en bleu : photo-oxydation combinée à l'hydrolyse courte durée, en rouge : photo-oxydation combinée à l'hydrolyse longue durée.

La photo-oxydation conduit à des modifications des propriétés thermiques de l'implant. Les courbes ATG obtenues montrent un déplacement du tracé vers des températures plus importantes. Ce résultat indique la présence d'espèces caractérisées par une plus grande stabilité thermique. Cela confirme les observations liées aux premières pertes de masse. La

perte de CFMM lors du vieillissement permet, après leur diffusion au sein de la matrice du polymère, un rapprochement des chaînes supramoléculaires facilitant ainsi leur réticulation.

Le décalage des courbes en fonction du temps de photo-oxydation s'explique en plusieurs points en fonction de la durée de photo-oxydation :

- La température T2 se déplace vers des températures plus importantes. Cela confirme la présence de chaînes supramoléculaires d'une plus grande stabilité thermique.
- La température T1 reste stable augmentant *de facto* la différence de températures entre T1 et T2. Cela s'accompagne d'une première perte de masse et d'une variation de masse au plateau plus importante correspondant à la volatilisation des CFMM produits lors du vieillissement ;
- La température T3 est décalée en fonction de l'irradiance cumulée. De plus, la hauteur du pic de seconde perte de masse augmente à mesure qu'il se décale vers des températures supérieures ;
- La température T4 est plus faible pour les implants subissant la photo-oxydation la plus poussée.

Tout comme pour les implants vieillis par hydrolyse forcée, la réticulation du copolymère est déterminée par l'évolution des températures T2 et T3. Au cours de la photo-oxydation, le copolymère se transforme en une entité homogène plus stable aux fortes températures.

L'analyse comparative montre que la réticulation s'accroît en présence du milieu aqueux. L'eau diffuse dans l'implant lors d'un vieillissement réalisé à une température supérieure à celle de la Tg du copolymère. Cela permet la diffusion des CFMM en fonction de leur polarité et de leur poids moléculaire. La diffusion diminue l'encombrement stérique entre les chaînes leur permettant de se rapprocher et de réticuler. Le phénomène s'amplifie par la mobilité de l'eau. Aux températures de vieillissement l'eau liée peut se libérer en fonction du réarrangement des chaînes et de leur hydrophobicité. La migration vers le milieu extérieur concentre les produits néoformés en surface de l'implant. Cette accumulation explique la forte première perte de masse ainsi que la perte de masse observée durant le plateau entre 150°C et 250°C. Trois raisons principales expliquent que toutes les entités migrant vers la surface ne puissent pas toutes être relarguées :

- La température proche de la Tg limite la mobilité des chaînes et donc la migration et l'exsudation ;
- La forte quantité de produit de dégradation, se formant en fonction de la durée de photo-oxydation, génère un encombrement et par extension un gradient des différents CFMM du cœur de l'implant vers la surface ;

- La réaction de toutes ces espèces concentrées en surface. Le réarrangement des chaînes hydrophiles avec les CFMM hydrophobes est possible et d'autant plus facilité en milieu salin tels que l'humeur aqueuse ou le milieu de vieillissement artificiel utilisé²⁵⁷. Ainsi, une réorganisation majeure en surface de l'implant doit se produire au cours du vieillissement. Celle-ci est le fait d'un équilibre entre diffusion du milieu de vieillissement dans l'implant et relargage des CFMM polaire mobiles vers le milieu de vieillissement.

En résumé, la réticulation est corrélée à l'irradiance totale reçue par l'implant. L'hydrolyse des chaînes et les radicaux libres produits par les rayons UV sont les deux facteurs principaux de la réticulation des copolymères au cours de leur vieillissement.

B. Analyse calorimétrique différentielle (DSC)

1. Caractéristiques thermodynamiques basales

La transition vitreuse T_g du copolymère, indiquant son passage de l'état vitreux vers l'état caoutchouteux, se situe entre 15°C et 40°C (Cf. tableau VIII). La capacité calorifique de cette T_g est faible. Une seconde transition vitreuse est présente vers 70°C. Toutes deux sont très étirées ce qui est le signe d'une grande plasticité du copolymère (figures 33 & 34). Celle-ci est due à la présence de l'eau liée et probablement à la présence des chaînes de polyéthylène glycol et de styrène.

Il n'existe pas de cristallisation. De plus, l'absence de fusion confirme le caractère amorphe du copolymère.

2. Action du vieillissement

Les valeurs de la première T_g et de la capacité calorifique mesurées sont résumées dans le tableau VIII. L'analyse statistique met en évidence une différence significative du ΔC_p en fonction du vieillissement (test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha=0,05$; $p=0,014$). Celle-ci est liée aux valeurs de ΔC_p des implants vieillis par photo-oxydation combinée.

Tableau VIII : Valeurs des Tg et des ΔC_p moyennes selon les conditions de vieillissement

	Tg°C (Midpoint)		Delta Cp (J/(g.°C))	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
Neuf	33,34	0,17	0,38	0,01
Hydrolyse courte	33,69	0,09	0,37	0,02
Hydrolyse forcée	32,60	0,91	0,37	0,06
Photo-oxydation courte	34,79	0,73	0,49	0,07
Photo-oxydation combinée courte	34,60	0,59	0,62	0,08
Photo-oxydation combinée longue	35,27	0,51	0,55	0,09

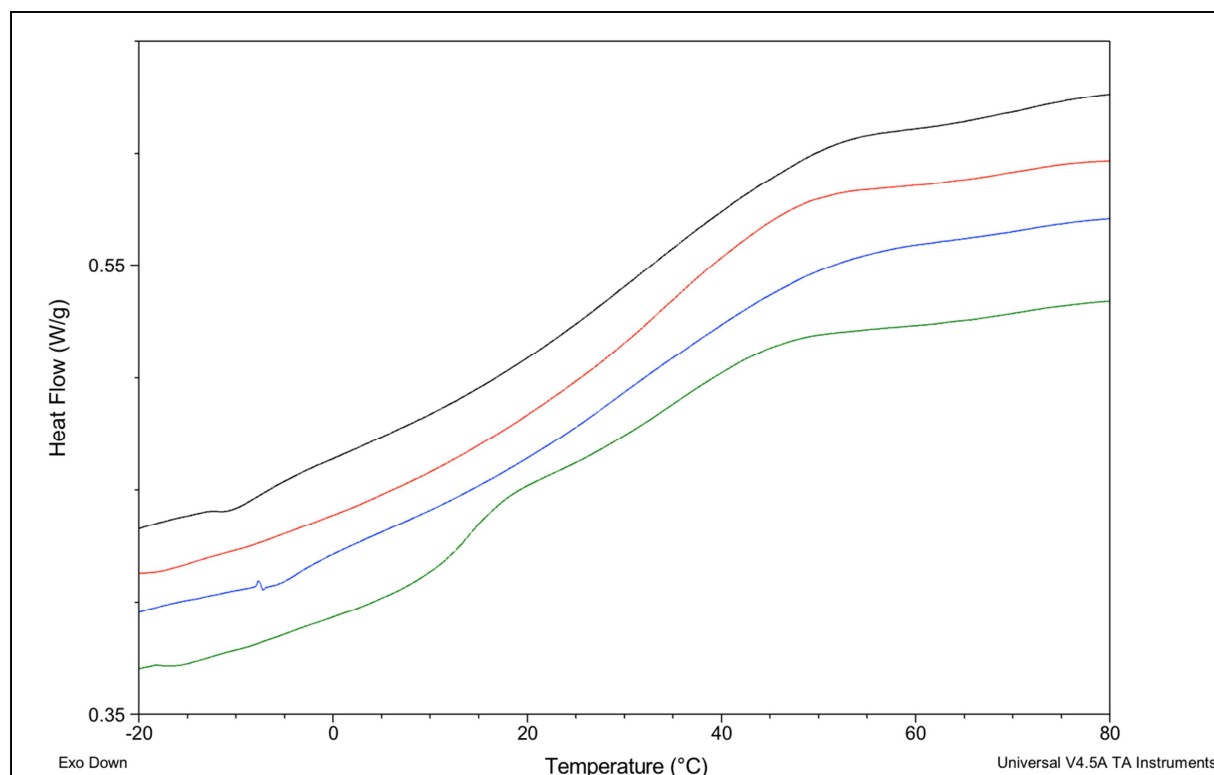


Figure 33 : Tracé DSC des implants uniquement vieillis par hydrolyse

En noir implant neuf, en bleu hydrolyse courte, en vert hydrolyse forcée, en rouge implant témoin.

L'action de l'hydrolyse courte ne modifie pas l'aspect des deux transitions vitreuses. Lors de l'hydrolyse forcée, la première transition vitreuse est scindée en deux nouvelles transitions vitreuses. La première Tg est à une température voisine de 15-17°C et semble plus marquée que la Tg située à 30°C. L'apparition de la seconde transition vitreuse illustre un mécanisme de restructuration du copolymère générant une seconde zone amorphe au sein du copolymère.

La transition vitreuse à 70°C apparaît également comme étant plus marquée que pour les implants neufs ce qui rejoint les observations faites en ATG signalant un phénomène de réticulation du copolymère (figure 33).

3. Action de la photo-oxydation sur les propriétés thermodynamiques du copolymère

La photo-oxydation de courte durée, seule ou combinée, n'a pas d'action suffisante pour modifier l'aspect de la transition vitreuse du copolymère. Il n'y a pas d'apparition d'une seconde zone amorphe ou d'un quelconque réarrangement supramoléculaire au sein du copolymère.

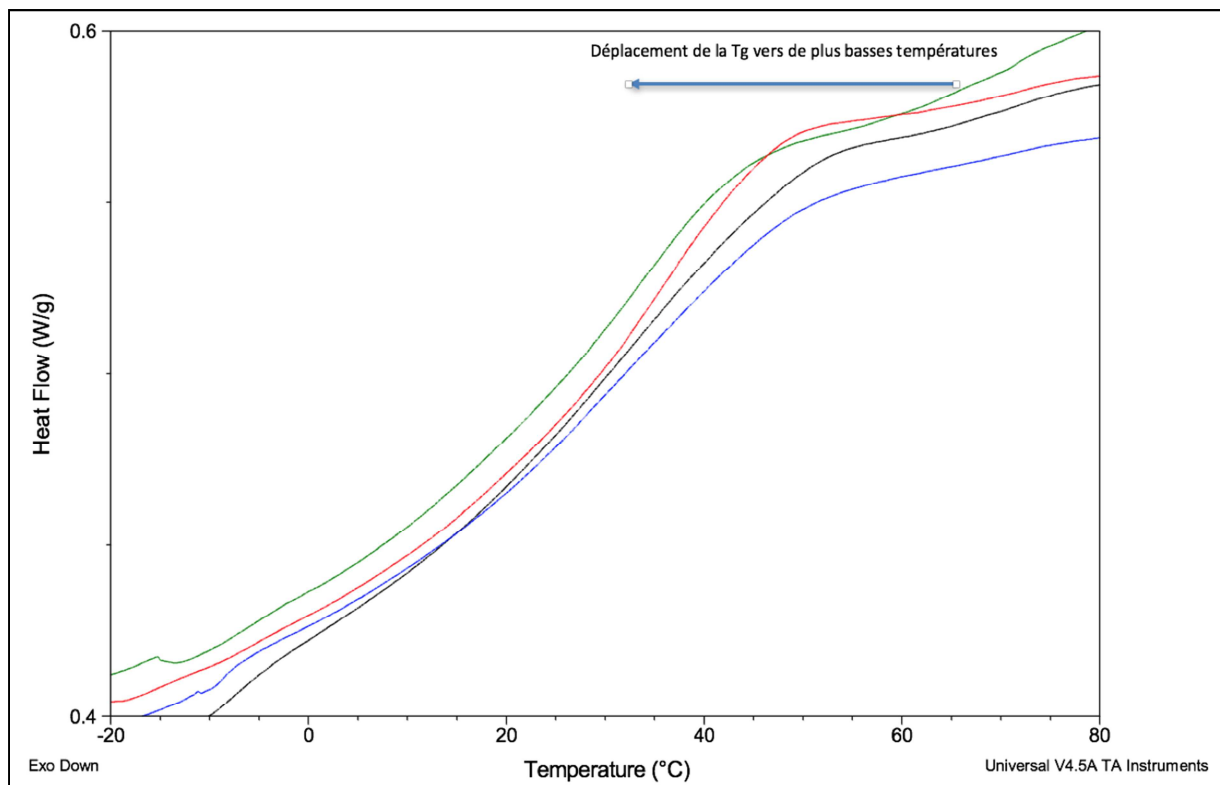


Figure 34 : Tracé DSC des implants vieillis par photo-oxydation

En noir implants neufs, en bleu photo-oxydation seule, en vert photo-oxydation combinée à l'hydrolyse courte durée, en rouge photo-oxydation combinée à l'hydrolyse longue.

Les thermogrammes obtenus par DSC des implants vieillis par photo-oxydation combinée à l'hydrolyse montrent une modification de la première transition vitreuse (figure 34). La modification de la transition vitreuse est également perçue par l'élévation du ΔC_p des implants vieillis par photo-oxydation (test t de student au risque $\alpha=0,05$; $p<0,05$). La seconde transition vitreuse à 70°C est également plus marquée. Celle-ci se décale sensiblement vers de

plus faibles températures ce qui peut être la conséquence d'une diminution des liaisons PEG-styrène²²⁸. Le même décalage est observé lors de l'hydrolyse forcée (tracé vert figure 33). L'absence de modificateurs majeures pour les transitions vitreuses des implants vieillissés par photo-oxydation seule confirme la nécessité de l'hydrolyse conjointe à la photo-oxydation dans le réarrangement supramoléculaire du copolymère.

Ces deux résultats confirment ceux obtenus en ATG. Le copolymère réticule progressivement par rapprochement des chaînes d'acrylates. Le rapprochement des chaînes du copolymère est permis par la rupture des chaînes alkyles latérales et le déplacement de l'eau liée.

II. Relargage des composés de faible masse moléculaire

A. Analyse qualitative

L'analyse qualitative est réalisée sur les solutions de conservation (SC). Les composés détectables dans ces solutions sont le reflet d'un processus de relargage qui intervient au cours d'un vieillissement naturel de l'implant lors du stockage dans son conditionnement primaire. Ce premier résultat conforte les résultats et les conclusions de l'analyse thermodynamique selon lesquels l'implant subit une perte de CFMM par migration vers le milieu extérieur en contact direct avec la surface.

Ce vieillissement se produit à l'abri de la lumière et à température ambiante ; c'est à dire inférieure à la température de l'humeur aqueuse. Les SC analysées sont celles des implants dont la date de fabrication est estimée inférieure à un semestre.

Les chromatogrammes, obtenus par l'analyse RP-HPLC des SC, montrent deux séries de composés de CFMM (figures 35 et 36). Ces deux groupes se distinguent par leur ordre d'élution et leurs caractéristiques spectrales.

1. CFMM du groupe I

Le premier groupe, élué entre 0 et 8 minutes, comporte des composés dont les λ_{max} sont peu caractéristiques. Trois composés majoritaires ont une intensité supérieure à la limite de détection, qui correspond au bruit de fond de la ligne de base. Leurs temps de rétention (TR) sont : TR1= 3,3 minutes ; TR2= 5,3 minutes et TR3= 6,5 minutes.

Le composé à 3,3 minutes présente sur le chromatogramme tridimensionnel un λ_{\max} à 240nm. Cette caractéristique spectrale ne correspond à aucun des monomères connus du copolymère.

Les autres composés n'absorbent que très peu aux faibles longueurs d'ondes mais présentent sur le chromatogramme 3D un maximum autour de 250-260 nm. Ce λ_{\max} est caractéristique des groupes styréniques. Le composé correspondrait à un dérivé du styrène, qui est l'un des monomères constitutifs de l'implant. Cependant, le styrène est élué à 27 minutes dans ces conditions.

L'origine de ces deux composés, très polaires, dont le λ_{\max} évoque la présence d'un cycle aromatique, pourrait provenir de la dégradation du styrène et de l'éthylène glycol phényle éther acrylate (EGPEA) suivi d'une recombinaison avec des groupements polaires. L'EGPEA est un des constituants majeurs du copolymère. Les deux composés pourraient également être des produits de la dégradation et de la recombinaison d'impuretés de synthèse ou des dérivés d'anti-UV de la famille des Tinuvin[®]. Ces additifs sont utilisés pour limiter les dégradations induites par la photo-oxydation des copolymères¹³. Une analyse de surface en spectrométrie photoélectrique X a permis de mettre en évidence la présence d'atomes d'azote inclus dans des cycles aromatiques. Ce résultat est le seul appuyant l'hypothèse de la présence d'un anti-UV dans l'implant en VISTA[®] et son potentiel de relargage dans la solution de conservation des implants.

2. CFMM du groupe II

Le second groupe de composés est élué entre 8 et 15 minutes. Les composés principaux relargués diffèrent de ceux du premier groupe par la régularité des intervalles entre leurs temps de rétention et par les λ_{\max} relevées sur le chromatogramme tridimensionnel (figure 36). Le premier λ_{\max} vers 218nm ne correspond pas à un groupement chimique caractéristique. Le second λ_{\max} vers 270nm, est caractéristique d'un noyau aromatique associé à un hétéroatome possédant un doublet non liant conduisant à une transition électronique $n \rightarrow \pi^*$. Celle-ci qui entraîne un effet bathochrome par rapport au λ_{\max} du noyau aromatique. Ce motif explique l'absorbance à 270nm de l'EGPEA monomère, constitutif du copolymère (Cf. annexe 2). Toutefois, dans ces conditions chromatographiques, l'EGPEA est élué à 24 minutes alors que l'ensemble des composés relargués est élué avant 15 minutes. De plus, la SC analysée ne comporte aucun composé élué à 24 minutes. Les CFMM du groupe II seraient des produits de scission des chaînes d'EGPEA. De plus, l'évolution de leur temps de

rétenion impliquerait une recombinaison avec des motifs récurrents formant une chaîne alkyle. La longueur de cette chaîne expliquerait la progression régulière des temps de rétenion.

L'analyse en chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse (LC/MS) n'a pas permis l'évaluation des masses de chacun des composés. La faible ionisation de l'EGPEA et des composés relargués de l'implant, quel que soit le mode d'ionisation, à laquelle s'ajoute la modification de la structure moléculaire dans la source de la spectrométrie de masse, ne permettent que de confirmer la parenté structurale entre les différents composés relargués et l'EGPEA.

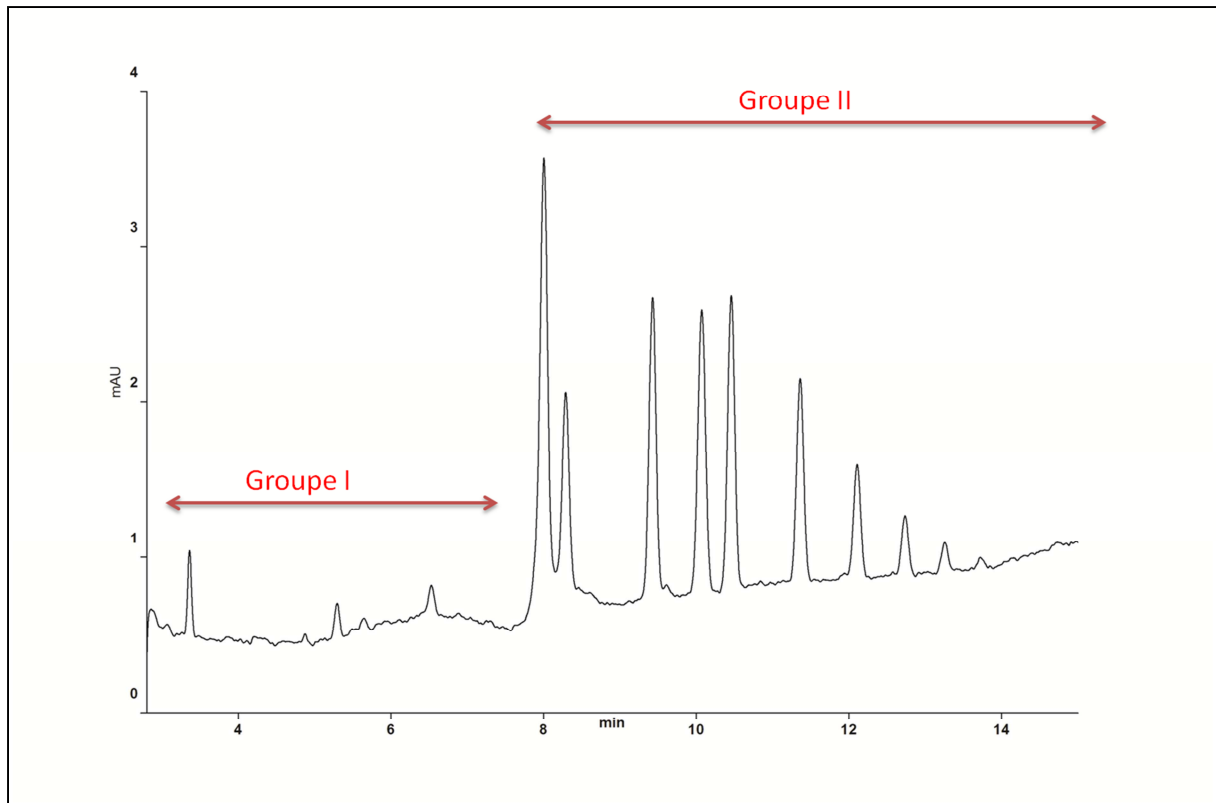


Figure 35 : Spectrogramme bidimensionnel des CFMM relargués dans la solution de conservation ($\lambda 218\text{nm}$)

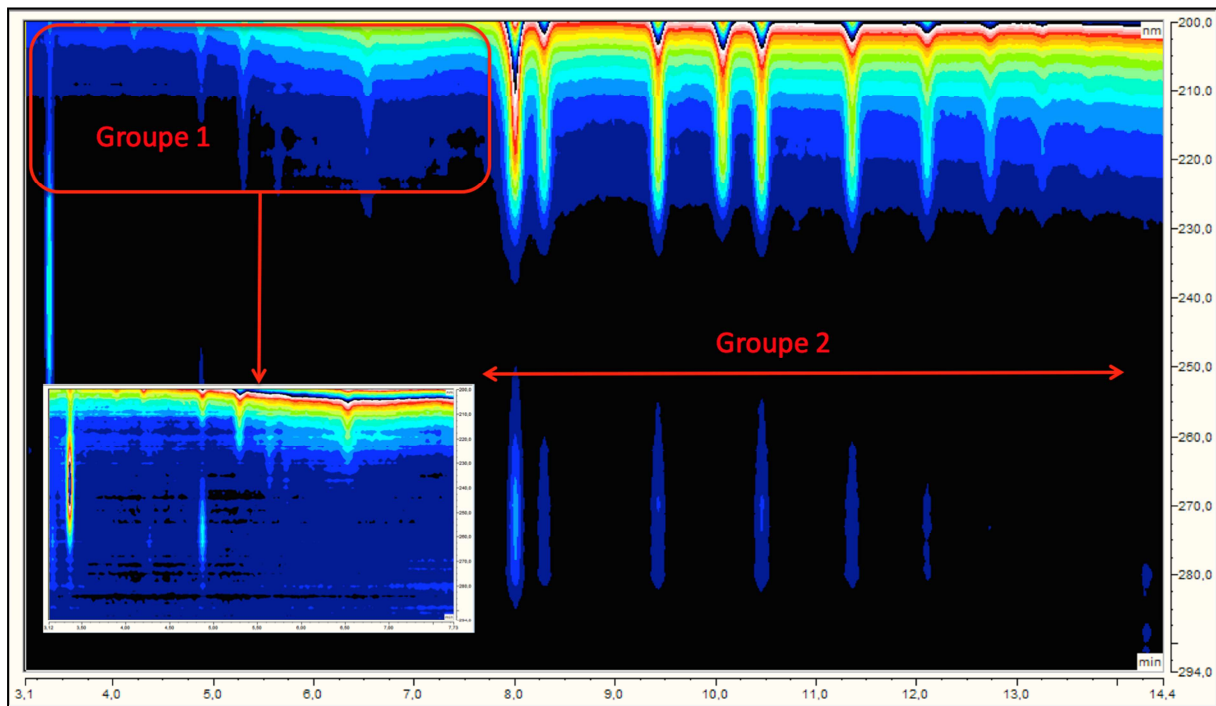


Figure 36 : Chromatogramme tridimensionnel des CFMM relargués dans SV photo-oxydation combinée longue

B. Analyse quantitative

L'analyse quantitative et statistique des composés relargués dans la SC a été réalisée sur six échantillons (figure 37).

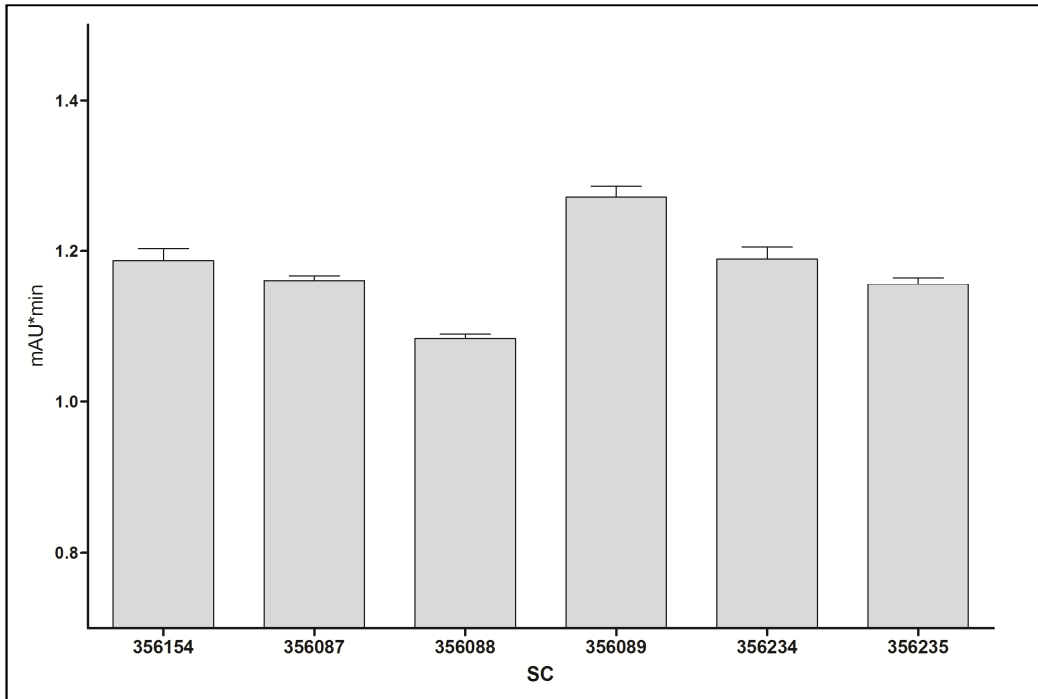


Figure 37 : AUC totales des CFMM du groupe II des solutions de conservation (λ 218nm)

L'AUC moyenne des CFMM du groupe II pour les six SC est de 1,18mAU*min ($\pm 0,12$) avec une variance faible. L'AUC totale entre les diffère significativement entre les six SC analysées (test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha=0,05$; $p<0,001$). Les variances au sein d'un même lot ne sont donc pas homogènes malgré une provenance identique (lot identique, numéros de série qui se suivent). L'hétérogénéité observée sur le relargage des CFMM du groupe II signe la variabilité intra-lot et inter-implant.

L'histogramme de la figure 38 permet de révéler que l'ordre de grandeur relative des composés, les uns par rapport aux autres, reste identique pour les six SC. L'AUC relative du composé à 8 minutes est l'AUC majeure dans tous les échantillons.

De plus, l'analyse permet de révéler une variation des proportions relative de chacun des composés. Cette variation se retrouve dans les valeurs absolues d'AUC pour les six échantillons (figure 39). Toutefois, l'analyse de la distribution du profil de relargage des CFMM du groupe II des SC ne permet pas de conclure à l'existence d'une différence significative (test du Chi2 au risque $\alpha=0,05$).

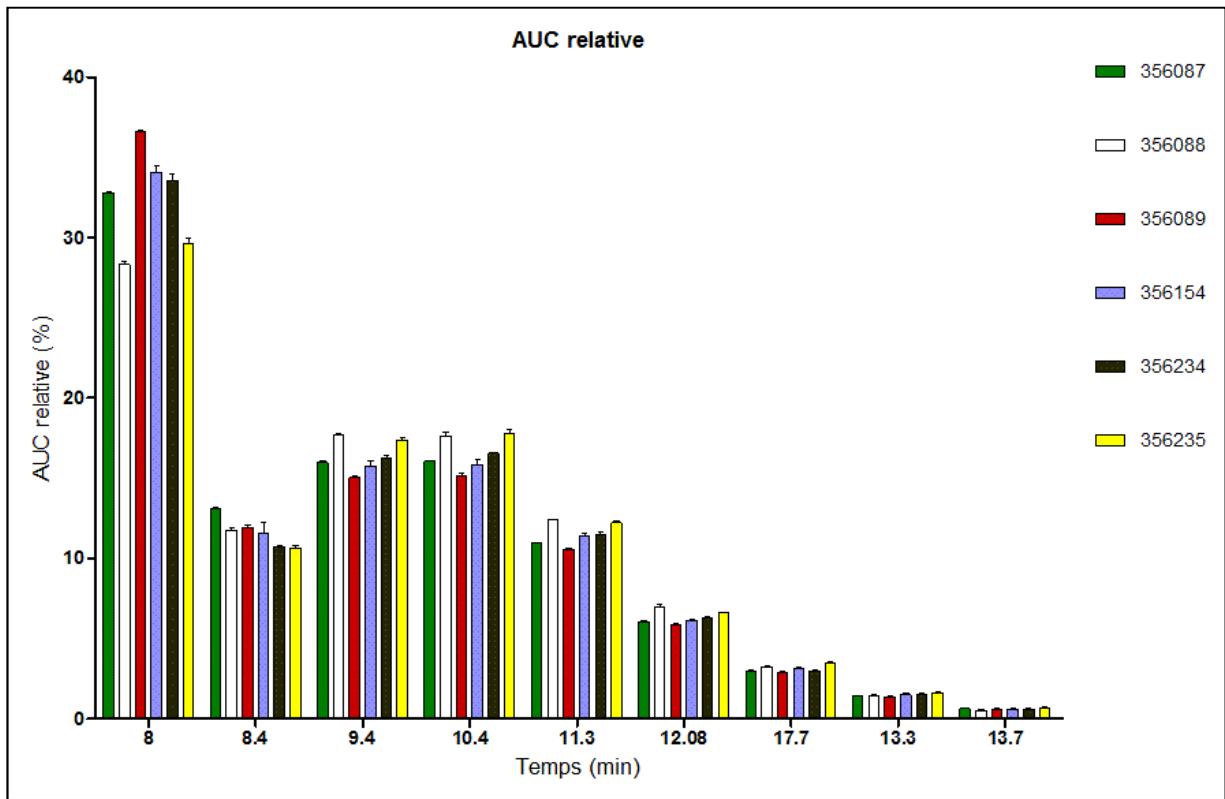


Figure 38 : AUC relatives des CFMM du groupe II des solutions de conservation (λ 218nm)

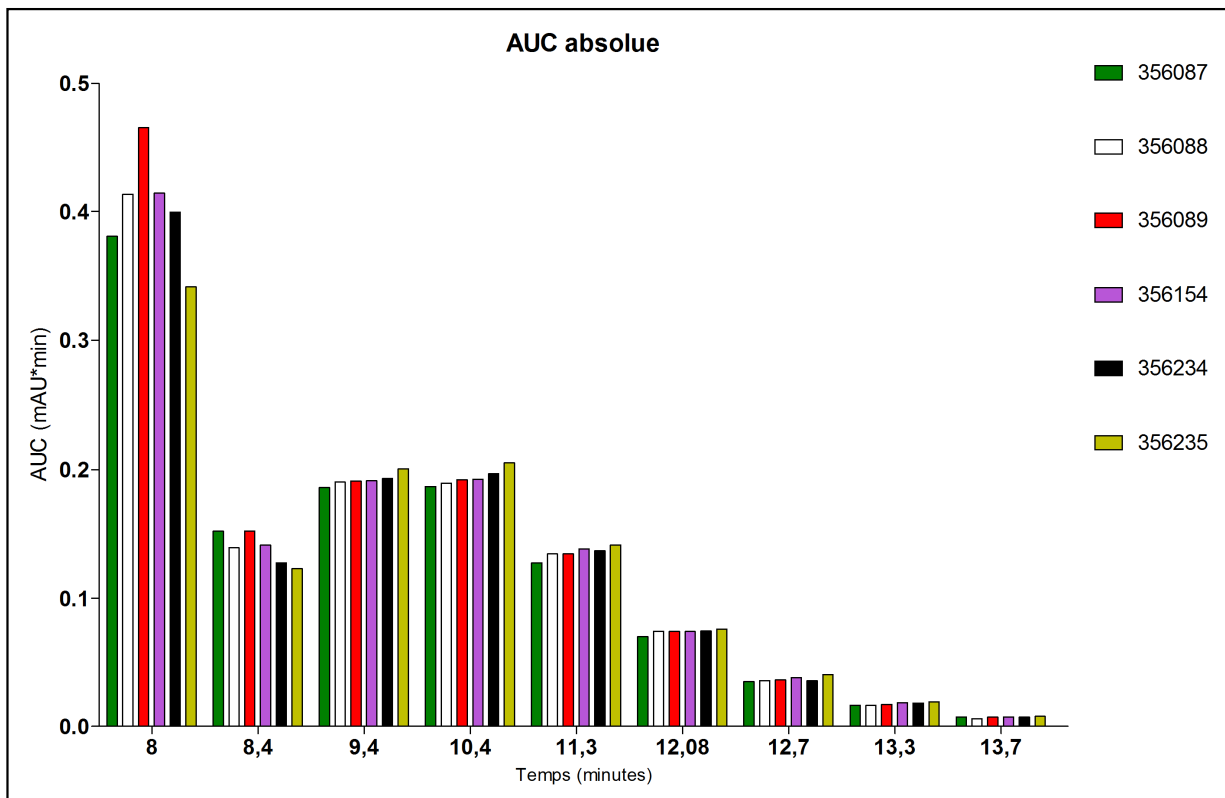


Figure 39 : AUC absolue des CFMM du groupe II des solutions de conservation (λ 218nm)

Cette variation est à mettre au regard de la variation globale de l'AUC totale mesurée pour les composés du groupe II. L'hétérogénéité observée sur le relargage concerne l'ensemble des CFMM. Le relargage reste qualitativement le même mais ne semble pas se produire à la même vitesse pour tous les implants au sein d'un même lot de production.

C. Action de l'hydrolyse sur le relargage

1. Hydrolyse courte

L'hydrolyse courte est reproduite par un vieillissement artificiel des implants. Deux implants issus du même lot de production ont été placés dans du sérum physiologique à 37°C durant 72 heures à l'obscurité.

(a) *Comparaison entre implants vieillis*

Ce procédé de vieillissement, très court et peu agressif, conduit toutefois à un relargage de CFMM dans la solution d'hydrolyse (figures 40 et 41). Tout comme pour le relargage observé dans les solutions de conservation, il existe une différence entre les AUC totales des deux implants (test t de Student au risque $\alpha=0,05$; $p<0,001$). La comparaison des profils ne permet pas de mettre en évidence une différence significative (test du Chi2 au risque $\alpha=0,05$ 6ddl ; $p=0,067$). Le relargage concerne principalement des CFMM du groupe II (figures 39 et 40). En effet, très peu de CFMM sont élués avant 8 minutes et après 15 minutes (figure 40).

Les AUC moyennes relatives de chaque composé diffèrent significativement, à l'exception des composés élués à 9,5 minutes, 10,8 minutes et 11,7 minutes (test t de student au risque $\alpha=0,05$). La différence majeure concerne le composé élué à 8,1 minutes pour lequel le ratio des AUC pour les deux implants est proche de 10.

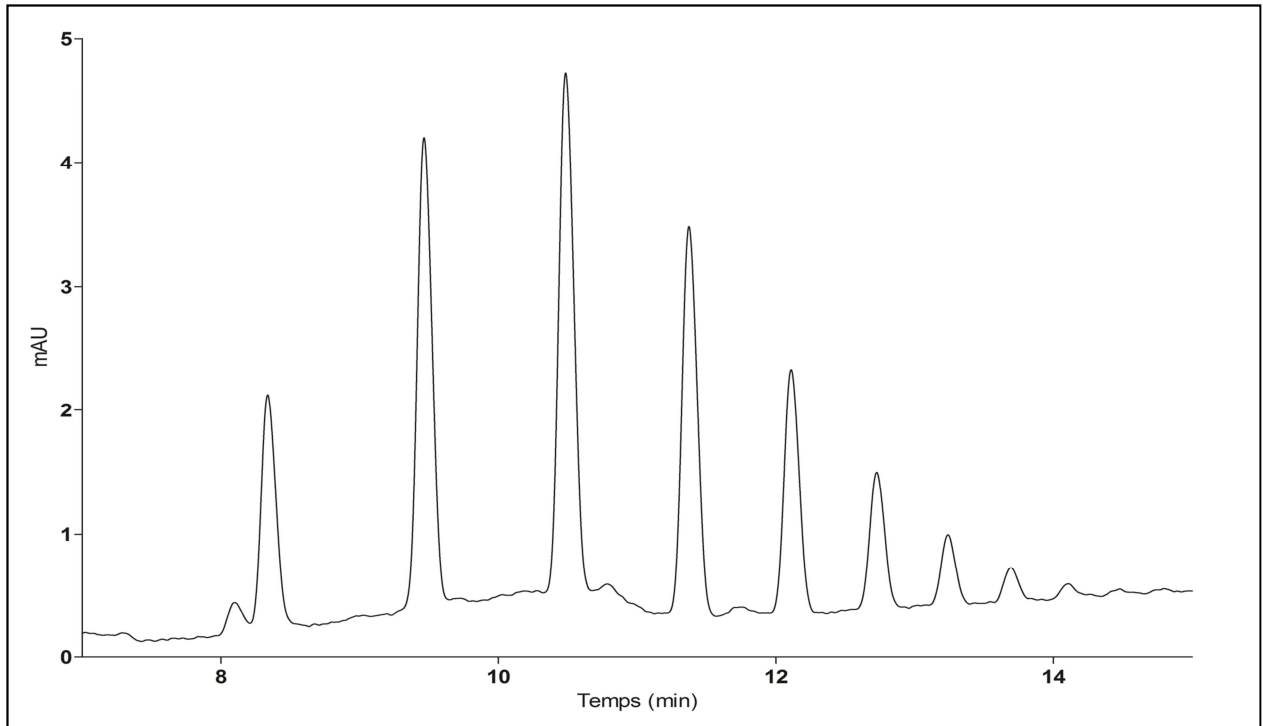


Figure 40 : Spectrogramme bidimensionnel des CFMM du groupe II des SV hydrolyse courte ($\lambda 218\text{nm}$)

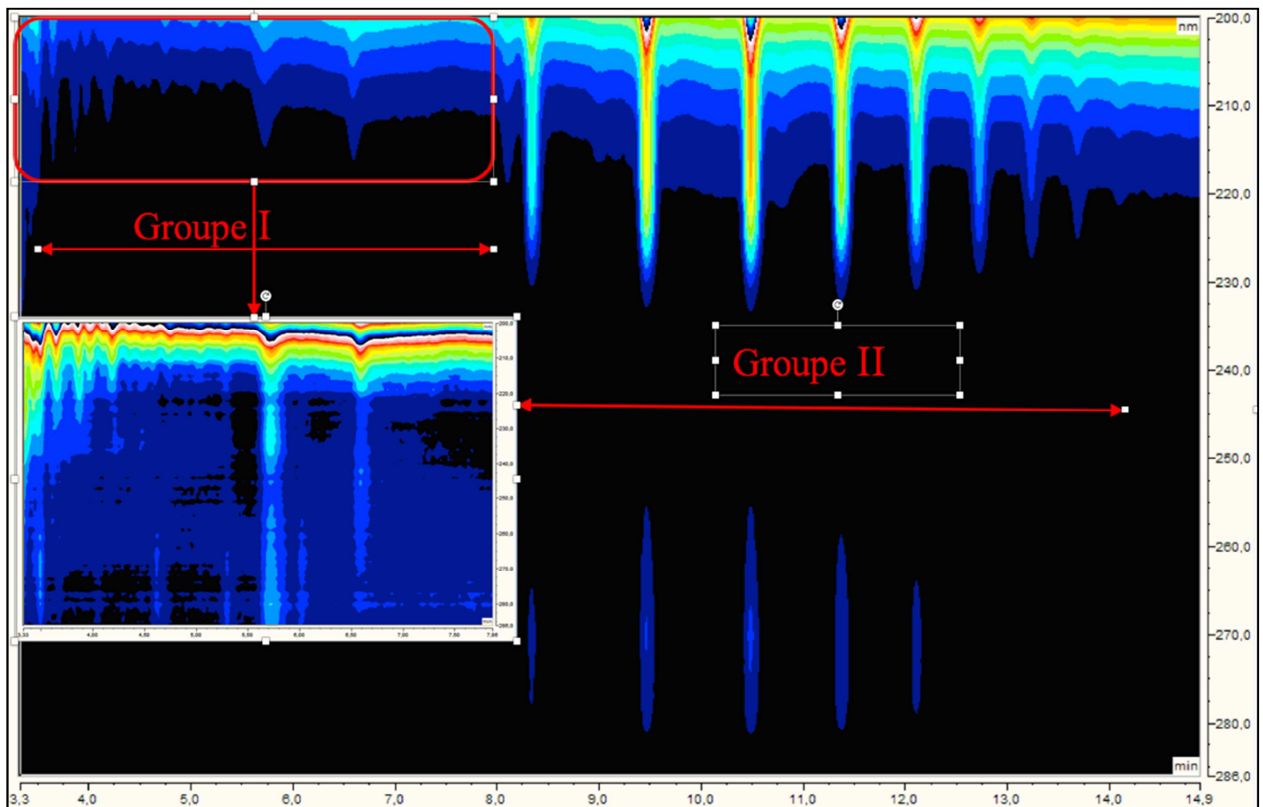


Figure 41 : Chromatogramme tridimensionnel des CFMM relargués dans les SV hydrolyse courte

(b) Comparaison SC versus SV hydrolyse courte

Les conditions de vieillissement par l'hydrolyse courte sont proches de celles du vieillissement naturel de l'implant lors du stockage dans la solution de conservation.

L'analyse des profils de la SV hydrolyse courte *versus* SC en proportion relative de chaque composé confirme qu'il s'agit des mêmes CFMM. Cependant l'analyse met également en évidence un profil de distribution des CFMM qui diffère fortement, principalement pour le composé élué à 8,4 minutes (test du Chi2 au risque $\alpha=0,05$; 8ddl ; $p<0,001$).

La différence de distribution s'explique également par le CFMM élué à 10,8 minutes dans la SV mais absent de la SC (figure 42).

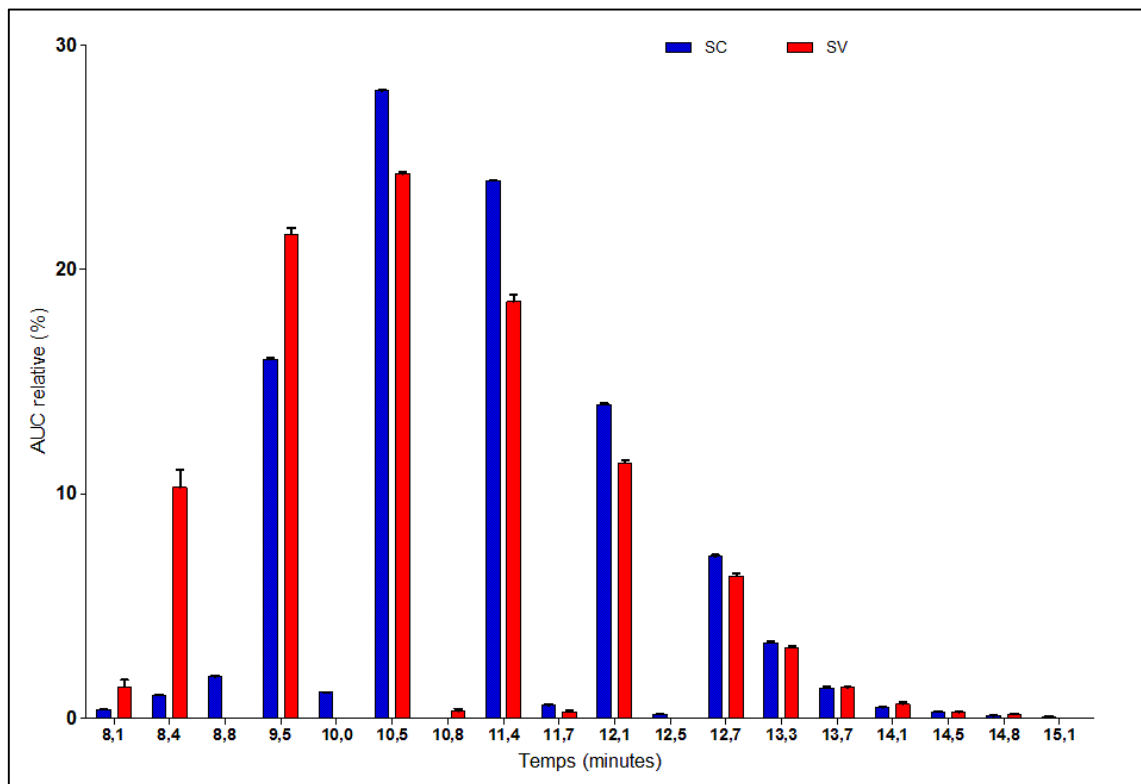


Figure 42 : AUC relative des CFMM du groupe II relargués dans SC et SV hydrolyse courte d'un même implant

Ces résultats permettent de confirmer le phénomène de relargage à partir de l'implant vers le milieu. Les observations faites dans les SC ne concernent donc pas un relargage du conditionnement primaire vers le milieu ou la présence d'additifs. Le temps de contact lors de l'hydrolyse courte, en comparaison avec celle dans la SC, permet d'expliquer la quasi absence de composés élués avant 8 minutes et après 15 minutes.

L'analyse quantitative des CFMM du groupe II révèle une variation importante de l'AUC totale. Elle est significativement inférieure dans les SV de l'hydrolyse courte par rapport à la SC confirmant que l'absence de CFMM, en dehors de ceux du groupe II, est liée à un temps de contact milieu-implant trop court (test *t* de Student au risque $\alpha=0,05$; $p<0,001$). Ainsi la genèse, et par conséquent la migration des CFMM dans le milieu de contact, apparaît comme corrélée au temps.

2. Hydrolyse forcée

Le protocole d'hydrolyse forcée évalue simultanément le phénomène de relargage lié à l'hydrolyse et celui lié à la température.

Les solutions de vieillissement analysées par RP-HPLC montrent un relargage qualitativement identique à celui de l'hydrolyse courte et du vieillissement naturel dans les SC autant pour les CFMM du groupe I que ceux du groupe II (figures 43 et 44).

Les CFMM du groupe I présentent des intensités d'absorbances supérieures que pour les SV hydrolyse courte ou les SC. Les composés dont le signal est supérieur à la limite de détection ont, pour quelques-uns, des caractéristiques spectrales propres.

Deux composés très polaires, élués à 3,2 minutes et 3,4 minutes présentent un maximum d'absorbance proche de 260nm. Deux autres composés, élués à 4,0 et 5,3 minutes présentent des λ_{\max} à 270nm et 280nm.

L'AUC totale des CFMM du groupe II relargués lors de l'hydrolyse forcée est de 8,30 mAU*min. En y ajoutant les CFMM du groupe I, peu présents dans la SC, l'AUC totale est de 8,75 mAU*min. L'AUC totale de tous les CFMM est quatre à cinq fois supérieure à celle mesurée dans les SV hydrolyse courte ou dans les SC.

L'analyse statistique de distribution des CFMM du groupe II (figure 45) permet de conclure la présence d'une différence significative entre SV hydrolyse forcée et SC ainsi qu'entre les deux SV par hydrolyse (test du Chi2 au risque $\alpha=0,05$; $p<0,001$).

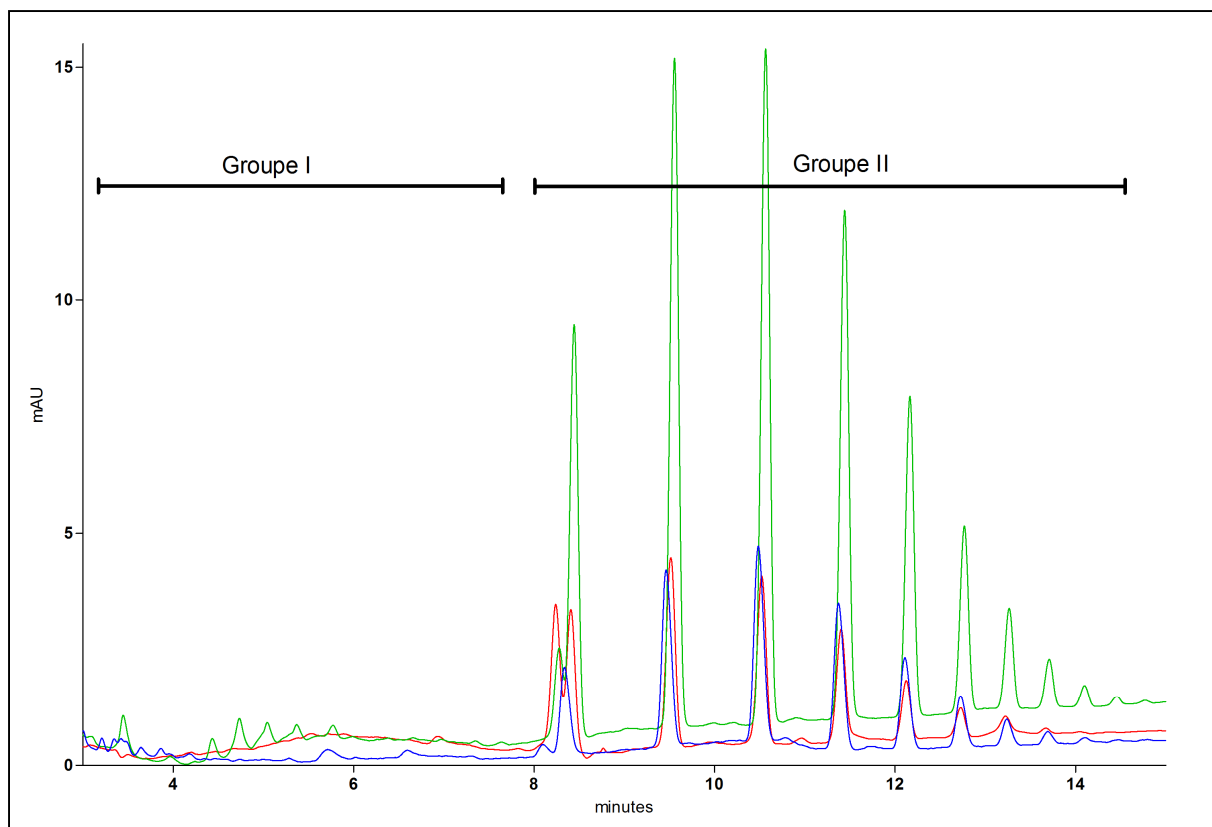


Figure 43 : Spectrogrammes bidimensionnels à 218nm des CFMM en fonction du type d'hydrolyse

SC en rouge, SV hydrolyse courte en bleu et SV hydrolyse forcée en vert.

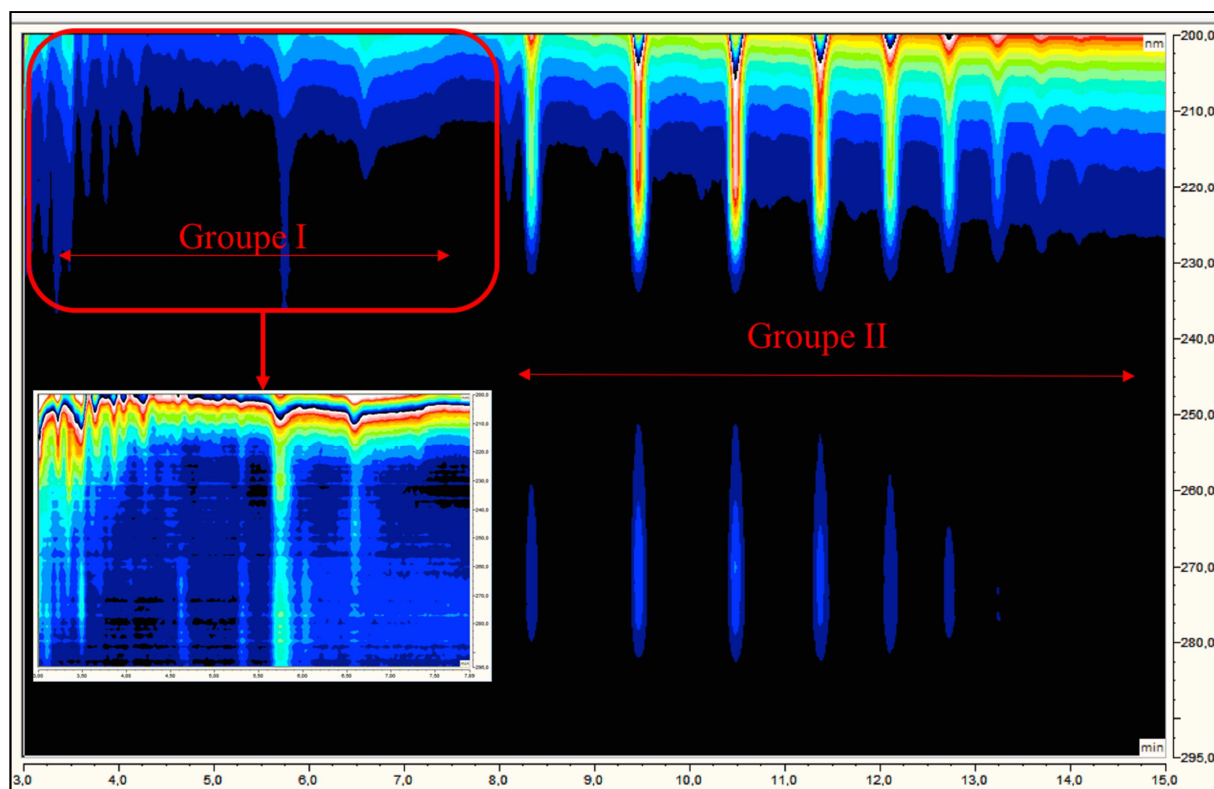


Figure 44 : Chromatogramme tridimensionnel des CFMM de SV hydrolyse forcée

3. Comparaison des différentes conditions d'hydrolyse sur le relargage

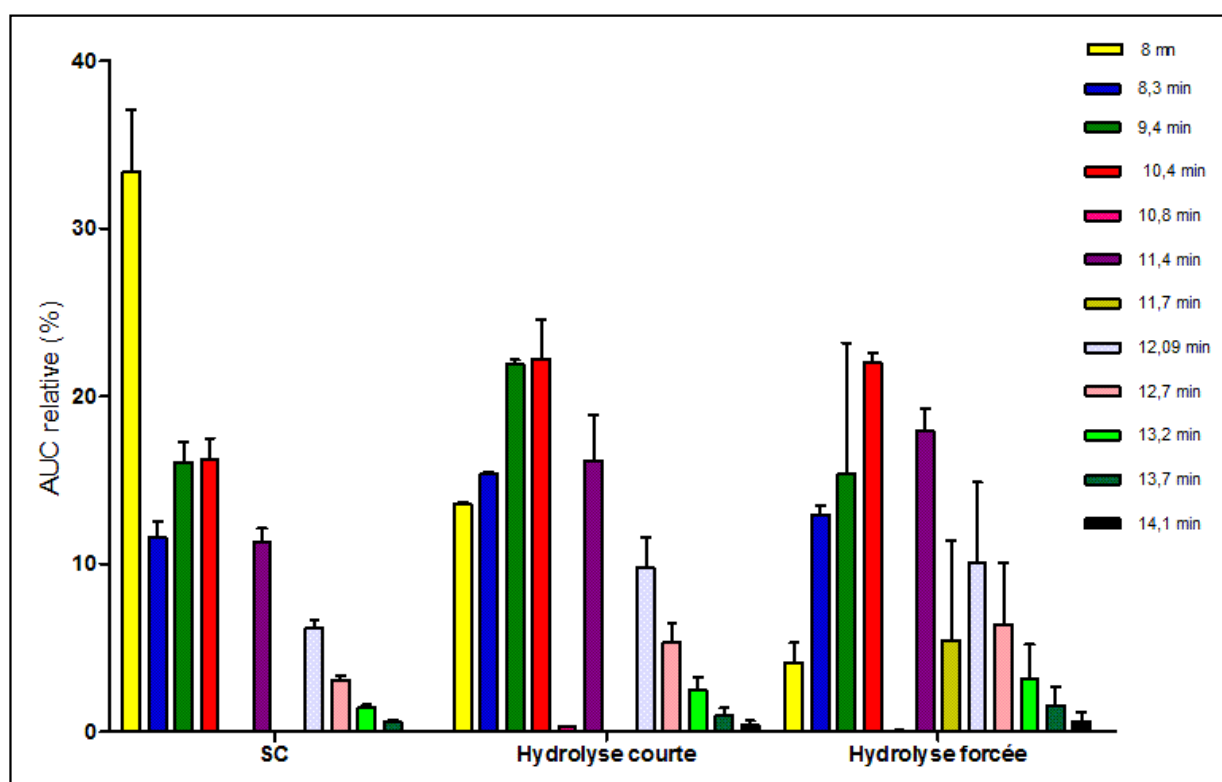


Figure 45 : AUC relative de chaque composé du groupe 2 pour les SV hydrolyse et SC

La figure 45 illustre les proportions relatives des CFMM du groupe II ubiquitaires des trois conditions de vieillissement. Cependant, plusieurs différences sont à relever. Celles-ci permettent de comprendre le mécanisme d'hydrolyse du copolymère. Deux paramètres expliquent les différences observées : le temps d'hydrolyse et la température à laquelle l'hydrolyse est réalisée.

Du point de vue quantitatif, le relargage lié à l'hydrolyse du copolymère est une diffusion temps-dépendante. En effet, le relargage est plus important dans les SC que les SV dans les conditions d'hydrolyse courte. De plus, le relargage durant l'hydrolyse est accéléré par l'énergie fournie au système par la température du vieillissement. Dans le cas de l'hydrolyse forcée la température fixée à 70°C intensifie le relargage. L'aire sous courbe totale en unité arbitraire des composés entre 8 et 15 minutes, mais également ceux avant 8 minutes, est supérieure à celle de la SC. Le temps de l'hydrolyse forcée est inférieur à celui du stockage. En effet, le stockage avant analyse des lentilles est estimé entre 90 et 120 jours à température ambiante contre 60 jours à 70°C pour l'hydrolyse forcée.

Le temps et l'énergie fournie au système n'ont pas le même effet sur tous les composés auquel cas, les profils en AUC relative seraient équivalents quelles que soient les conditions d'hydrolyse appliquées. La figure 45 permet de constater que la proportion de chaque composé évolue différemment selon les conditions de vieillissement.

À l'exception du composé à 8 minutes, dont l'intensité est supérieure dans la SC que dans les SV, et le pic à 11,7 minutes, uniquement présent dans SV hydrolyse forcée, la tendance qualitative des profils est la même. Seule l'intensité fluctue selon les conditions.

La première approche globale montre que les CFMM les plus polaires et/ou de masse moléculaire plus faible, dont les temps de rétention sont courts, sont très présents dans les SC. À l'inverse, l'hydrolyse courte ou forcée est caractérisée par une proportion plus importante des CFMM élués au-delà de 9,4 minutes. Pour l'hydrolyse forcée, les CFMM élués à partir de 11 minutes sont proportionnellement très présents au regard des deux autres conditions.

La comparaison des moyennes des AUC relatives pour les deux SV issues de l'hydrolyse montre qu'il n'existe de différence significative que pour deux CFMM : le premier élué à 10,8 minutes et le second à 13,7 minutes et présentent une moyenne d'AUC relative significativement différente (test *t* de student au risque $\alpha=0,05$; avec pour TR 10,8 min ; $p<0,005$ et pour TR 13,7 min ; $p<0,05$).

Le composé le plus polaire, élué à 8 minutes, présente une forte variation selon les conditions de vieillissement et de stockage (écart-type de 7%). À l'inverse, le composé élué à 9,4 minutes semble uniformément présent dans tous les échantillons quelle que soit la condition d'hydrolyse (écart-type de 0,29%).

Le composé à 8 minutes présente un profil d'apparition temps-dépendant (proportion supérieure dans SC par rapport à SV courte). Toutefois, trois arguments prouvent que ce CFMM est également thermolabile :

- Sa proportion apparaît d'autant plus faible que la température de vieillissement est importante ;
- L'AUC absolue du composé dans SV hydrolyse forcée est très inférieure à celle de SC (pour des temps de vieillissement peu différents) ;
- L'AUC absolue des deux SV hydrolyse sont équivalentes et non dépendantes du temps de contact.

Le CFMM du groupe II élué à la 14,1^{ème} minute est prépondérant à mesure que les conditions de vieillissement s'intensifient. L'élément est absent des solutions de conservation mais apparaît dans les deux conditions d'hydrolyse. La proportion la plus importante est retrouvée dans l'hydrolyse forcée.

Un autre CFMM élué à 11,7 minutes est uniquement présent dans la SV forcée. Ce composé serait spécifiquement lié à l'action combinée de l'hydrolyse et de la température.

Les autres CFMM ont une cinétique de relargage qui semble être temps-dépendante. En valeur absolue, les AUC sont toujours supérieures pour les SC en comparaison aux SV forcées. Ces dernières sont elles-mêmes supérieures aux AUC des SV courtes.

L'analyse des proportions montre un relargage très lié aux conditions de stockage. L'hydrolyse forcée s'accompagne d'une proportion plus importante des CFMM élués tardivement au regard des composés plus polaires. Ces derniers sont principalement présents dans la SC des implants.

La grande variation de la proportion du composé élué à 8 minutes n'explique pas à elle seule cette tendance. En effet, l'analyse des proportions relatives, en excluant le composé élué à 8 minutes de temps d'analyse, « lisse » et tend à confirmer la tendance globale (figure 46). L'augmentation de la température induit un relargage de CFMM parmi les moins polaires et/ou de masses moléculaires plus importantes.

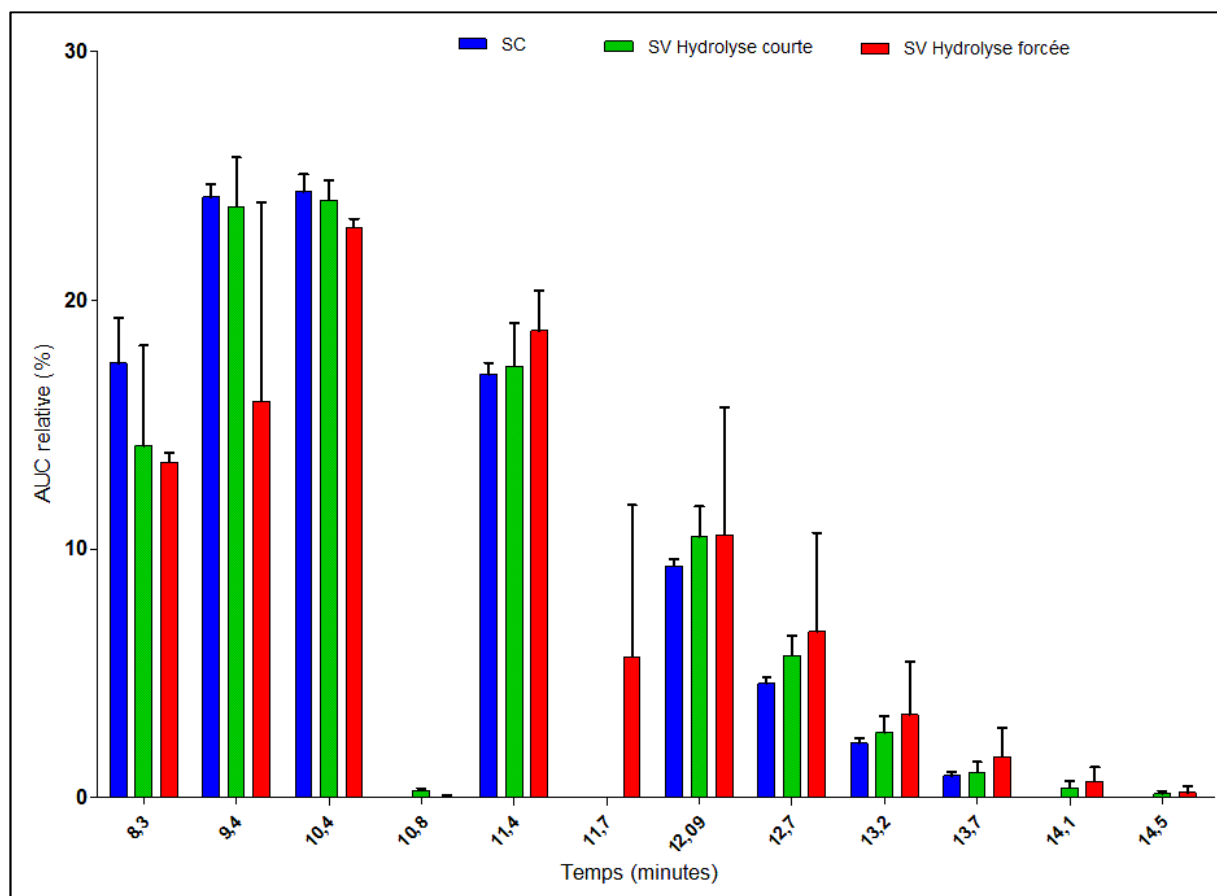


Figure 46 : AUC relatives des SV selon les conditions d'hydrolyse excluant le CFMM 8min

Cette modification substantielle du profil de relargage trouve plusieurs explications. Le copolymère constitutif de l'implant étudié possède, comme tous les copolymères d'implants

en acrylates souples, une transition vitreuse voisine de 28°C. Le copolymère possède également la particularité d'être hydraté à 4% de sa masse totale¹²⁰. L'eau joue le rôle de plastifiant dans ce copolymère. En effet, la présence de 2-HEMA, acrylate hydrophile, nécessite d'être hydraté pour conserver ses propriétés thermodynamiques et mécaniques¹⁵¹. Le fait d'augmenter la température de vieillissement de l'implant, au-dessus de la température de transition vitreuse, induit par conséquent une mobilité plus importante des chaînes de polymères. La température de 70°C sélectionnée pour les conditions de vieillissement est également proche de la température de transition vitreuse du polystyrène qui est un des composants du copolymère.

De fait, la température joue le rôle de catalyseur de l'hydrolyse en augmentant la diffusion du milieu dans l'implant et la migration des CFMM formés. Le profil spectral obtenu indique que l'hydrolyse concerne principalement les chaînes d'éthylène glycol.

De plus, comme le supposaient déjà les résultats obtenus en ATG, les impuretés de synthèse et les CFMM peuvent polymériser à la température de 70°C en présence d'un milieu salin. Ce réassemblage explique la forte proportion relative de CFMM du groupe II, de plus haute masse moléculaire et de plus faible polarité, observée en RP-HPLC

D. Relargage liée à la photo-oxydation combinée à l'hydrolyse

1. Photo-oxydation combinée de courte durée

Les caractéristiques rétentives et spectrales des CFMM observés pour la SV photo-oxydation combinée courte sont similaires à celles observées des SV par hydrolyse courte.

Les composés élués à partir des milieux de migration sont également divisés en deux groupes. Peu de CFMM du groupe I ont une intensité supérieure à la limite de détection.

Toutefois, un des CFMM élués présente un λ_{\max} à 290nm. Sa présence constitue une différence de comportement du copolymère soumis à l'action combinée de l'hydrolyse et de la photo-oxydation. Ce CFMM est élué à la 5^{ème} minute. Il présente la même caractéristique de rétention qu'un CFMM de SV hydrolyse forcée mais des propriétés spectrales différentes.

Un deuxième CFMM, élué à 3,5 minutes, présente un λ_{\max} à 254nm similaire à celle du styrène.

Un dernier CFMM élué à 6,5 minutes présente également un λ_{\max} proche de 280nm correspondant à un noyau phénolique. Ces CFMM sont proches de ceux observés pour la SV de l'hydrolyse forcée alors qu'ils sont quasi absents dans la SV de l'hydrolyse courte.

Les CFMM du groupe II ne présentent aucune différence qualitative de profil spectral. Seules les intensités et les proportions relatives de chaque composé diffèrent au regard de ceux obtenus par l'hydrolyse seule (courte ou forcée). L'aire sous courbe totale moyenne des composés du groupe II est inférieure à celle obtenue pour les SV d'hydrolyse courte, forcée et les SC.

Ces informations relatives aux 2 groupes de CFMM renseignent sur l'action supplémentaire de la photo-oxydation sur le vieillissement de l'implant. Le relargage apparaît très rapidement, puisqu'il s'agit ici d'un vieillissement de seulement neuf heures à 34°C. Cependant, le relargage diffère de celui d'une hydrolyse seule. En effet, la distribution des AUC relative de chaque CFMM du groupe II apparaît comme étant significativement différente (test du Chi2 au risque $\alpha=0,05$; $p<0,001$).

Seuls les CFMM élués à 8 minutes, à 12,4 minutes et à 12,7 minutes ne montrent pas de différence significative entre l'hydrolyse courte et la photo-oxydation combinée courte (test t de student au risque $\alpha = 0,05$).

2. Photo-oxydation combinée de longue durée

L'intensité des CFMM du groupe I, obtenue dans ces conditions de RP-HPLC, est augmentée ce qui permet d'apporter des informations complémentaires quant à leurs structures chimiques. En effet, ces composés sont caractérisés par des masses moléculaires faibles mais également par l'existence, dans leur structure, de groupements polaires, tels que des groupements phénoliques et styréniques, lesquels expliquent les λ_{\max} à 290 et 254nm. Le chromatogramme montre également d'autres entités dont les absorbances se situent à 230nm et dont les temps de rétention sont de 3 minutes et 4,3 minutes (figure 47).

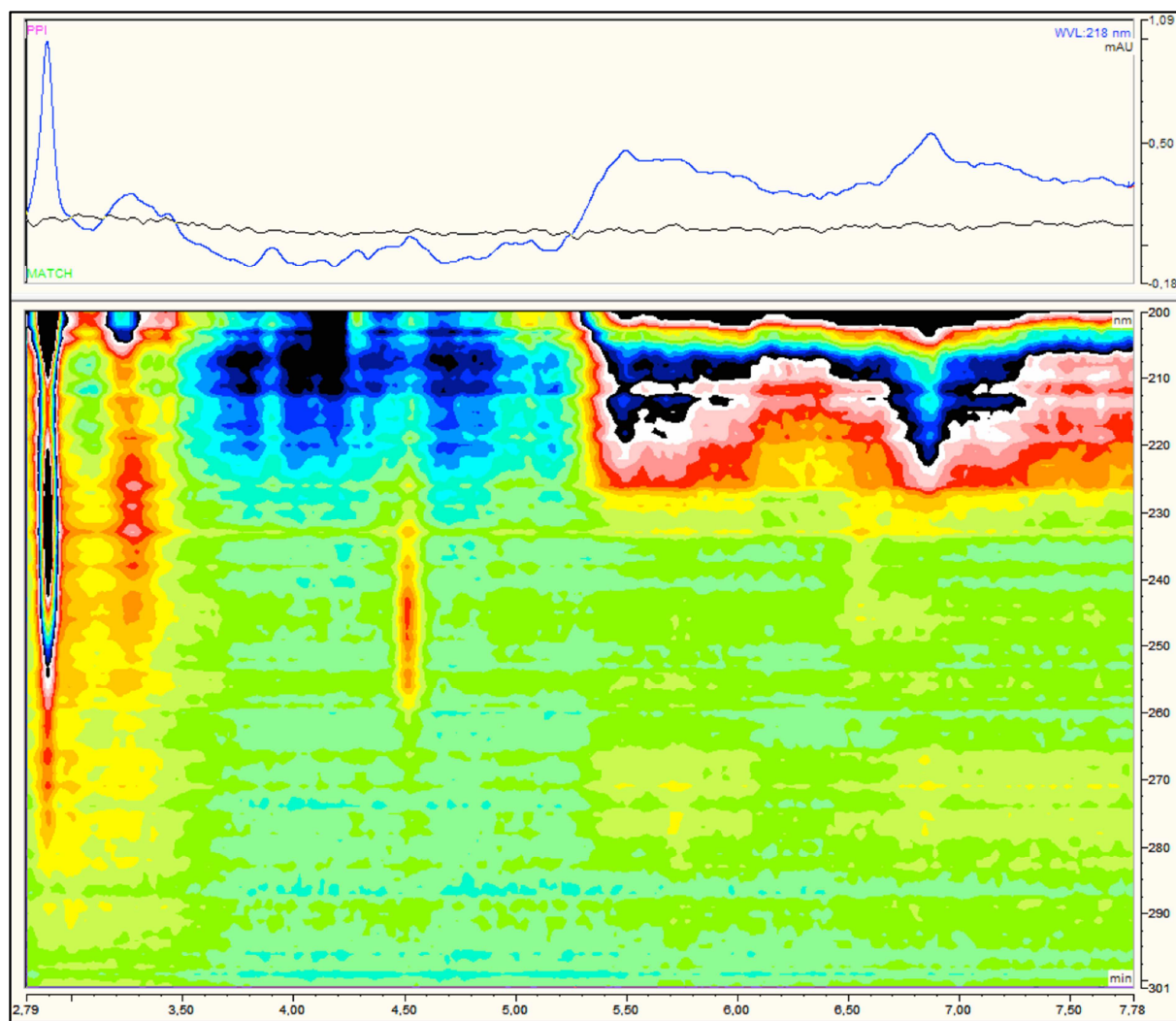


Figure 47 : Chromatogramme en 3D des CFMM du groupe I de la SV photo-oxydation combinée longue

Le spectrogramme bidimensionnel à 218nm (partie haute de la figure 47) montre la faible résolution de la méthode pour les CFMM du groupe I.

L'intensité supérieure améliore la résolution du chromatogramme tridimensionnel des CFMM du groupe II. Celui-ci permet de révéler la présence de trois λ_{\max} . Les deux premières sont à 212nm et 218nm, la troisième entre 268 et 272 nm (Cf. figure 48 et tableau IX).

Les variations du 3^{ème} λ_{\max} peuvent être attribuées à la présence d'un hétéroatome du groupement latéral greffé sur le noyau aromatique. Les CFMM dont le 3^{ème} λ_{\max} est proche de 271-272nm seraient la conséquence d'un hétéroatome, l'oxygène, dont le doublet d'électron libre expliquerait l'effet bathochrome. À l'inverse, les composés dont le maximum est à 268-269nm possèderaient un hétéroatome, l'oxygène également, dont les électrons seraient moins mobiles révélant ainsi un léger effet hypsochrome. Les autres hétéroatomes, le fluor et le soufre, ne sont pas supposés être présents dans les CFMM. La présence d'azote dans les CFMM n'a pas pu être prouvée mais demeure une hypothèse peu probable. En effet,

l'analyse complémentaire des surfaces par XPS ne montre pas de variation de la proportion d'atome d'azote au cours du vieillissement.

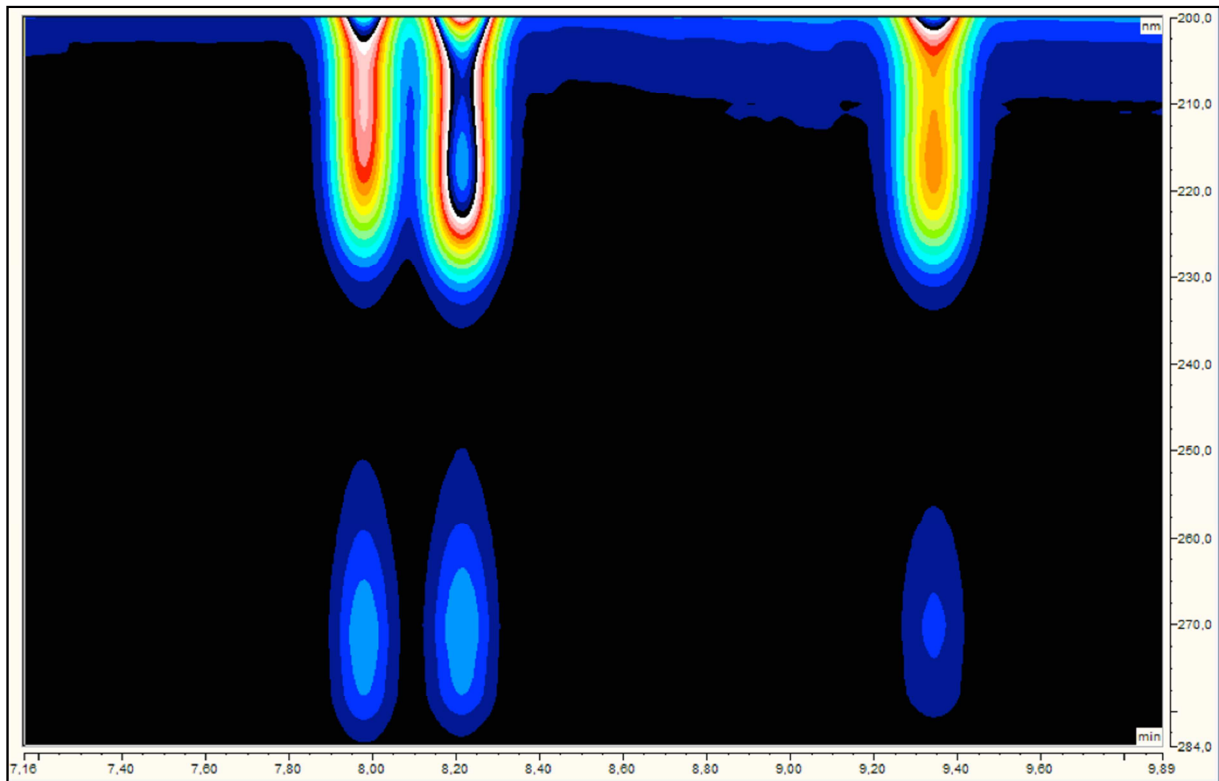


Figure 48 : Chromatogramme tridimensionnel des CFMM du groupe II de SV Ph-Ox combinée longue (détail)

Tableau IX : valeur de la 3^{ème} λ_{max} de chaque CFMM du groupe II

Temps de rétention	λ_{max}
8 min	271 nm
8,4 min	269 nm
9,7 min	269 nm
10,4 min	269 nm
11,4 min	269 nm
12,1 min	271 nm
12,7 min	272 nm
13,2 min	272 nm

Au-delà des observations qualitatives, l'AUC totale de ces CFMM du groupe II varie significativement d'un implant à l'autre (test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha=0,05$; $p<0,001$). Ce résultat confirme la variabilité intra lot de production mise en évidence lors de l'analyse des premières pertes de masse en ATG. Comme le montre la figure 49, il existe un rapport de un à trois entre l'AUC totale la plus importante (SV BL 356234) et la plus faible (SV BL 356088).

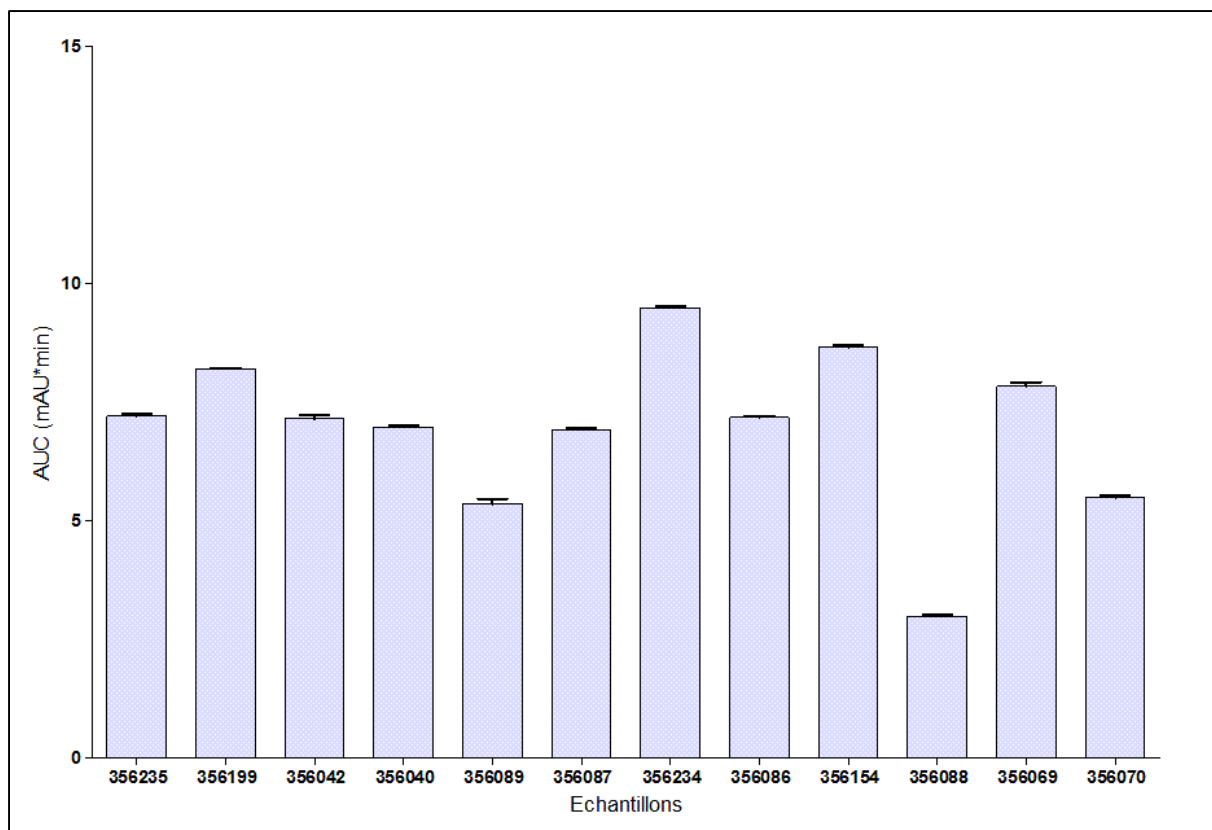


Figure 49 : AUC totale des CFMM du groupe II relargués dans les SV photo-oxydation combinée longue

L'analyse du profil de distribution des AUC relative de chaque CFMM du groupe II ne montre aucune différence significative entre implants (test du Chi2 au risque $\alpha=0,05$; $p<0,001$).

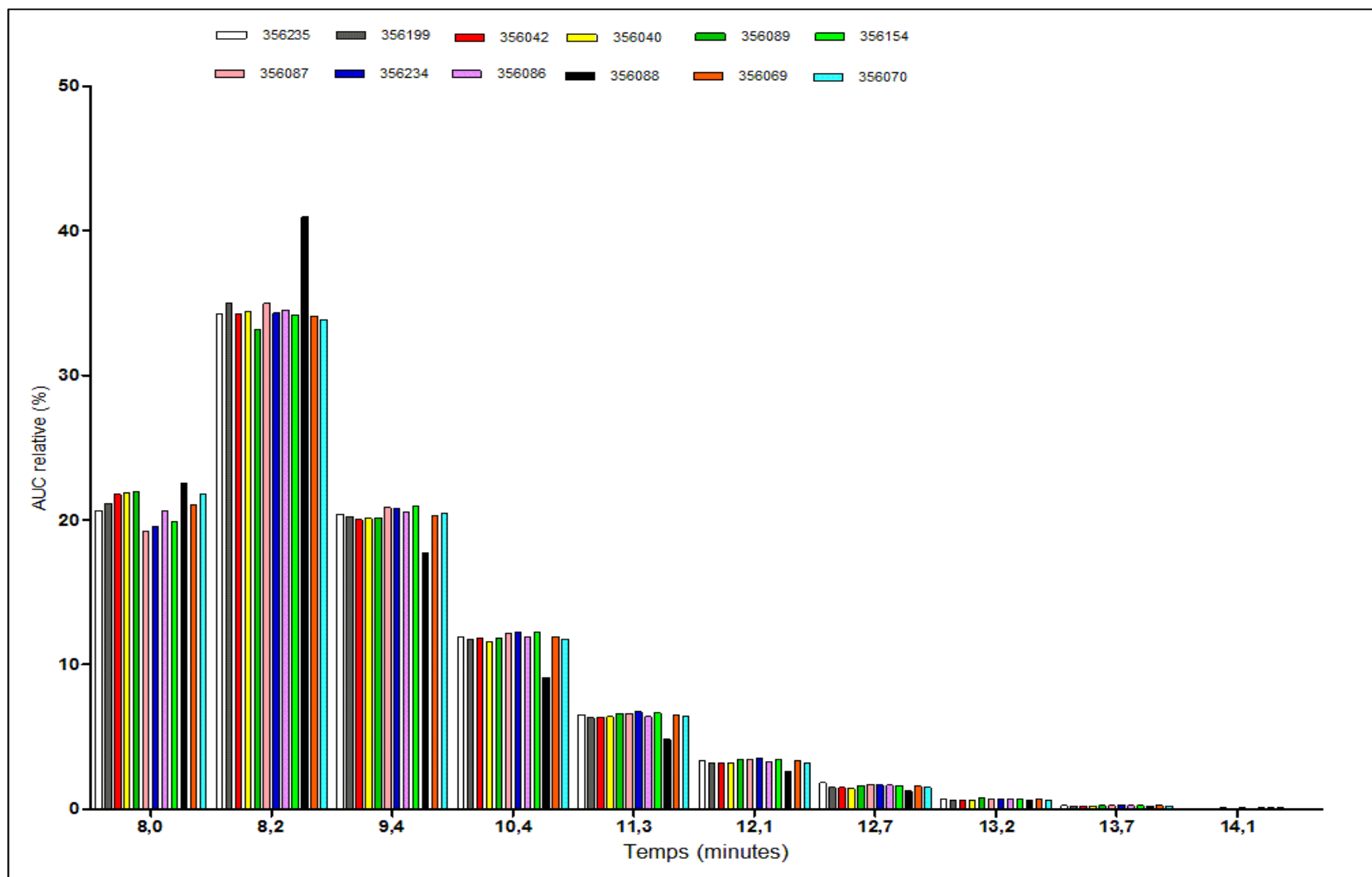


Figure 50 : AUC relatives moyennes des CFMM du groupe II relargués dans SV photo-oxydation combinée de longue durée

3. Action de l'irradiance cumulée sur le relargage de composés de faible masse moléculaire

L'irradiance cumulée apporte une modification du profil de l'ensemble des CFMM.

(a) CFMM du groupe I

Concernant les CFMM du groupe I, l'augmentation de la durée de photo-oxydation permet d'augmenter l'intensité au-dessus de la limite de détection (figure 51). Malgré la mauvaise résolution de la méthode, les CFMM ont une similarité structurale et rétentive aux deux durées de vieillissement. Les CFMM du groupe I sont principalement des chaînes carbonées de structures proches, générés par les scissions de chaînes du copolymère sous l'effet de l'hydrolyse et l'exposition aux UV.

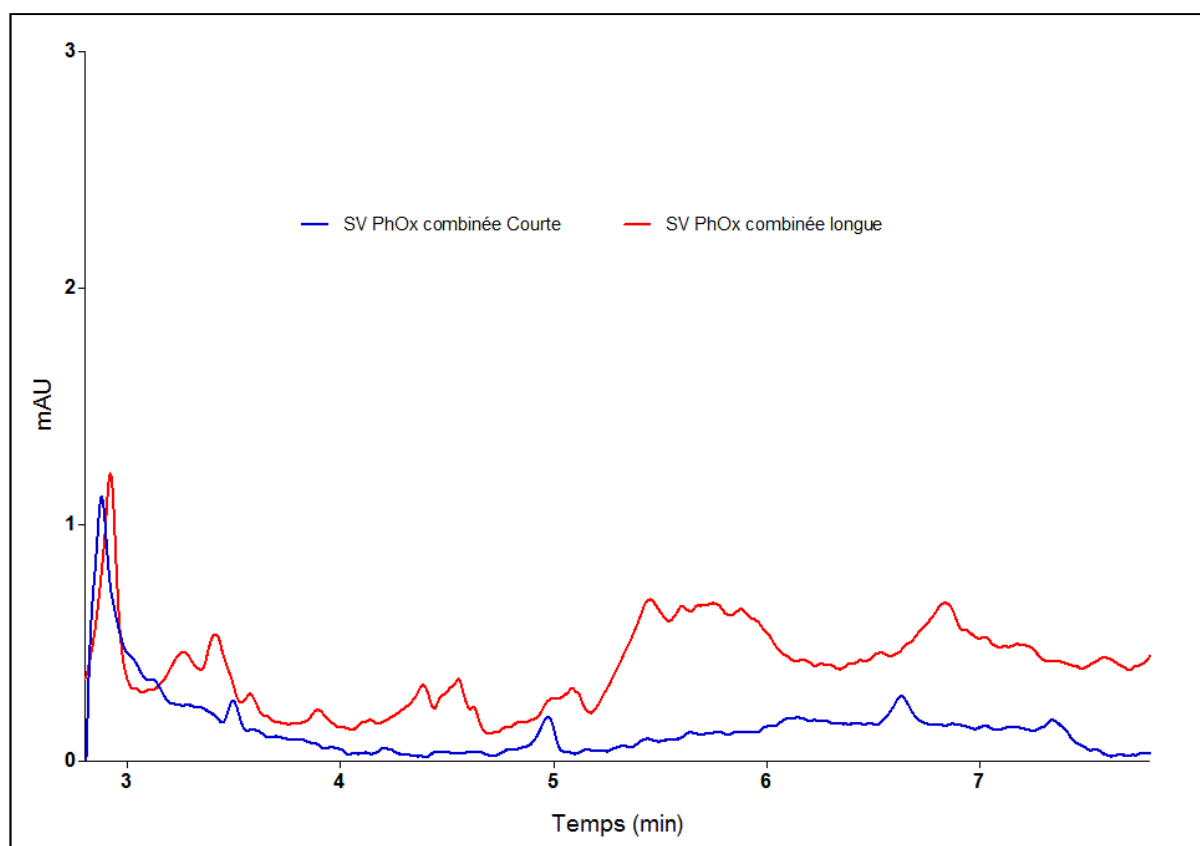


Figure 51 : Spectrogrammes des CFMM du groupe I en fonction de la durée de photo-oxydation combinée

(b) CFMM du groupe II

La durée de photo-oxydation correspond *in fine* à une quantité d'irradiance cumulée reçue par l'implant. La comparaison des profils de distribution des AUC relatives des CFMM du groupe II, présentée figure 52, montre la présence d'une différence significative (test du Chi2 au risque $\alpha=0,05$; $p<0,001$).

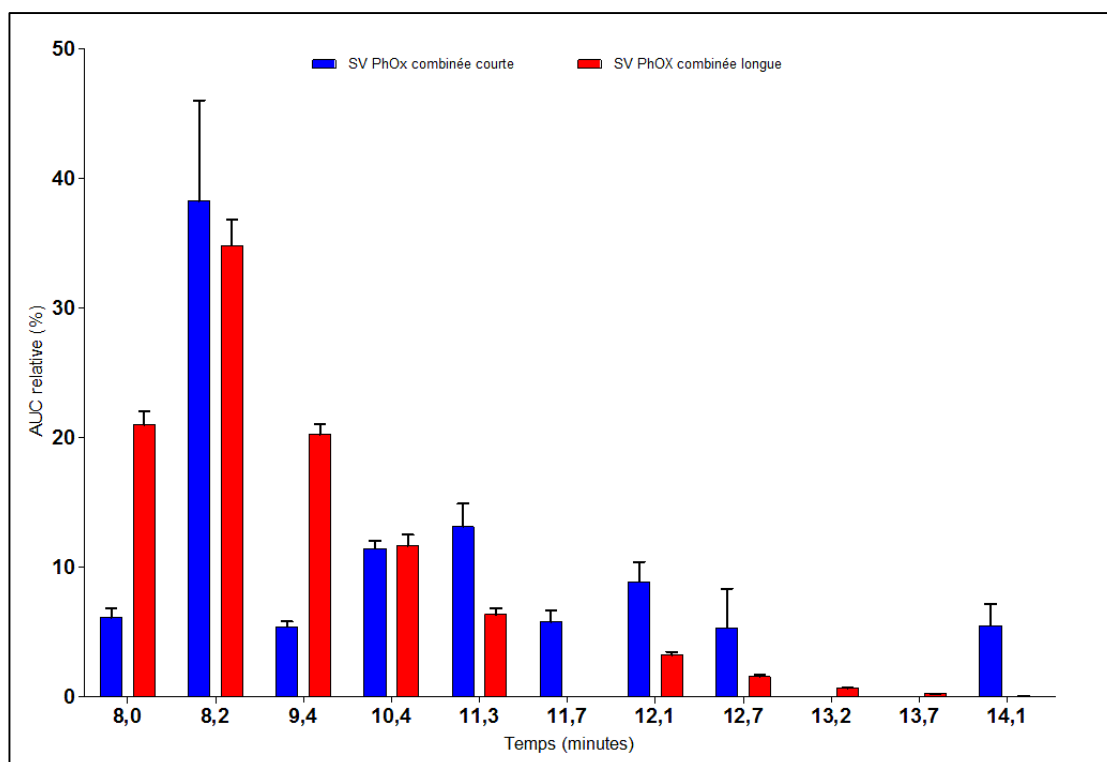


Figure 52 : AUC relatives des CFMM du groupe II selon la durée de photo-oxydation combinée

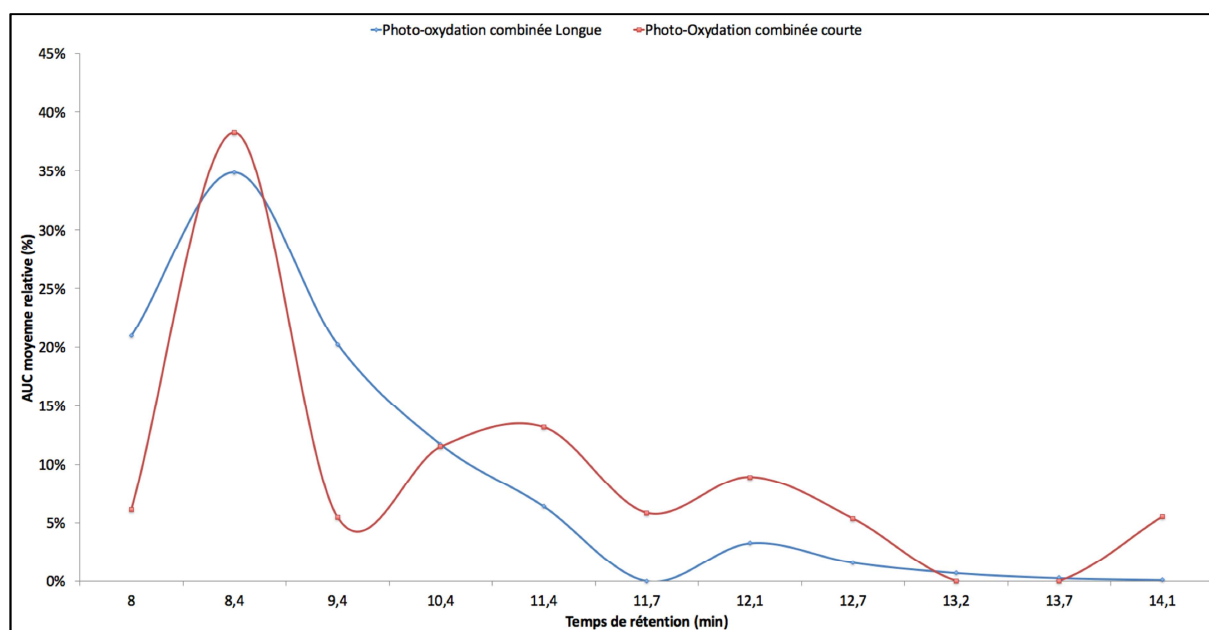


Figure 53 : Distribution du profil de relargage des CFMM du groupe II selon la durée de photo-oxydation combinée

La durée de photo-oxydation fait tendre le profil de relargage tend vers des composés de polarité supérieure et/ou de masse moléculaire plus faible.

La différence s'explique par deux phénomènes :

- L'inversion des proportions relatives. Les CFMM élués avant 10,4 minutes sont proportionnellement supérieures pour la longue durée de photo-oxydation combinée à l'hydrolyse. Le rapport s'inverse après 10,4 minutes (figure 53) ;

- L'absence de CFMM pour une des deux durées de vieillissement. C'est le cas des composés élués à 11,7 minutes et 14,1 minutes uniquement présents pour la photo-oxxydation combinée à l'hydrolyse combinée de courte durée ;
- L'existence de cinétique d'apparition différente selon les CFMM (Cf. tableau X).

Tableau X : Ratio 2ans/ 2 mois relargage photo-oxxydation combinée de 8 à 15 minutes

Temps de rétention (min)	AUC Ph-Ox longue (mAU*min)	AUC Ph-Ox courte (mAU*min)	Ratio (longue / courte)
8	107,84	0,67	160,9
8,4	179,24	4,235	42,3
9,4	105,8	0,5775	183,2
10,4	61,475	1,225	50,2
10,8	0	0	/
11,4	33,567	1,39	24,2
11,7	0	0,62	0
12,1	17,165	0,935	18,4
12,7	8,346	0,565	14,8
13,2	3,6	0	/
13,7	1,345	0	/
14,1	0,438	0,565	0,8

i. CFMM 8 minutes

Le premier CFMM à 8 minutes est 160 fois plus abondant dans la photo-oxxydation combinée de longue durée que dans la photo-oxxydation combinée de courte durée alors que l'AUC relative de la photo-oxxydation combinée de longue durée n'est que 3 fois plus importante (figure 52).

Trois éléments expliquent cet écart :

- Le relargage de ce CFMM n'est pas uniquement lié à la photo-oxxydation ;
- D'autres CFMM ont une vitesse de relargage supérieure en fonction de l'irradiance cumulée ce qui diminue de fait la proportion du CFMM 8 minutes ;
- La thermolabilité du CFMM 8 minutes mise en évidence lors de l'analyse de SV hydrolyse forcée.

Concernant ce dernier point, lors de la photo-oxxydation, la température est maintenue à 34°C. Celle-ci ne peut donc pas expliquer la faible proportion relative évaluée dans la SV photo-oxxydation combinée de longue durée. Ce résultat est confirmé par la SV des implants témoins de la photo-oxxydation combinée longue (SV témoins).

L'effet de la photo-oxydation sur la cinétique du CFMM 8 minutes est mis en évidence par l'analyse croisée des SV témoins, SV hydrolyse courte et SV photo-oxydation combinée courte.

D'une part, les SV témoins contiennent une quantité absolue du composé 8 minutes identique à celle de la SV hydrolyse courte. Cela confirme qu'au sein de l'enceinte à arc au xénon, l'hydrolyse sur l'implant est identique à celle observée lors de l'hydrolyse courte.

D'autre part, pour une durée de vieillissement 10 fois supérieure dans SV témoin, l'AUC du composé 8 minutes n'est que 2 fois supérieure à celle observée dans SV photo-oxydation combinée courte. De même, l'AUC de la SV photo-oxydation combinée longue est 30 fois celle des SV du groupe témoin pour une même durée de vieillissement.

Ces résultats prouvent l'effet catalyseur de la photo-oxydation sur le relargage du CFMM 8 minutes initié par hydrolyse.

ii. Autres CFMM

L'accélération du relargage de CFMM élué à 8 minutes lors de la photo-oxydation est inférieure à celle des autres composés. En effet, l'AUC relative diminue en fonction de l'irradiance cumulée signifiant ainsi l'augmentation plus importante du taux des autres CFMM.

L'AUC absolue du CFMM 8,4 minutes est 44 fois plus importante dans les SV photo-oxydation combinée de longue durée que pour la SV photo-oxydation combinée à l'hydrolyse de courte durée. Cependant, en valeur relative, cet élément est légèrement plus prépondérant dans la SV photo-oxydation combinée courte que longue (38% *versus* 34%). Ce composé est donc très rapidement détectable et reste majoritaire lors de la photo-oxydation combinée quelle que soit la durée. Dans les SV d'hydrolyse seule (courte ou forcée), la proportion relative du composé 8,4 minutes est de 15-20% contre 35-40% pour les groupe Photo-oxydation combinée. Cette tendance est confirmée par l'analyse des SV obtenues des implants du groupe témoin pour lesquelles l'AUC du CFMM élué à 8,4 minutes est de 20%.

La stabilité de la proportion du composé 8,4 minutes et l'augmentation de l'AUC relative du CFMM 8 minutes sont le reflet d'un mécanisme plus global d'évolution du profil de relargage entre 8 et 15 minutes. Les composés relargués au sein du groupe II sont majoritairement des entités de polarité plus importante et/ou de masse moléculaire faible en fonction de l'irradiance cumulée (figure 52).

Ainsi, la distribution du profil des AUC de chaque CFMM relargué change en fonction de l'irradiance cumulée (figure 53). Plus celle-ci augmente, plus le profil de relargage tend vers des composés de polarité supérieure et/ou de masse moléculaire plus faible.

Dans cette observation du déplacement du profil de relargage, le CFMM élué à 14,1 minutes est l'exemple le plus explicite. L'élément est très présent pour des vieillissements de courte durée alors qu'il est non détectable dans les SV des Photo-oxydation combinée longue. Ce résultat peut s'expliquer par la sensibilité à la photo-oxydation des composés relargués élués à des temps de rétention supérieurs à 8,4 minutes.

Trois scénarii expliquent la diminution de l'AUC du composé 14,1 minutes :

- Une libération importante mais éphémère du composé, lequel se dégraderait par photo-oxydation ;
- Une vitesse d'apparition très faible laquelle serait liée à un équilibre entre la vitesse d'apparition du composé dans le milieu de vieillissement et la vitesse de dégradation ;
- Un ralentissement du relargage par réaction des CFMM néoformés avec les chaînes libres du copolymère sous l'action croisée de la photo-oxydation et du milieu salin.

Ces deux dernières explications paraissent les plus vraisemblables. En effet, en AUC absolue l'intensité mesurée du composé 14,1 minutes est significativement plus faible dans la SV photo-oxydation combinée longue que la courte (0,44 mAU*min *versus* 0,57mAU*min ; test *t* de student au risque $\alpha=0,05$; $p=0,002$). Cette explication rejoint également les observations faites en ATG notamment l'augmentation de la perte de masse au plateau pour les échantillons ayant subi la photo-oxydation combinée de longue durée.

L'équilibre entre la formation et la dégradation de chaque CFMM peut être évalué par le calcul des ratios de chaque composé entre l'AUC mesurée au temps court *versus* temps long de photo-oxydation combinée à l'hydrolyse (tableau X).

Les ratios les plus importants peuvent être associés à un mécanisme d'apparition photo-oxydation dépendant. Ainsi, le CFMM élué à 9,4 minutes (ratio des photo-oxydations combinées longue/courte =183) présente une cinétique d'apparition exponentielle lors d'une photo-oxydation.

Les CFMM détectés après 10,4 minutes, tout comme le CFMM élué à 8,4 minutes, présentent un taux quasi similaire dans les deux groupes de vieillissement par photo-oxydation. Le ratio tend vers 1 à mesure que le temps de rétention s'allonge.

(c) CFMM élués au-delà de 15 minutes

Des CFMM élués après 15 minutes sont uniquement détectés dans SV photo-oxydation combinée longue. Aucun des CFMM ne présente de propriétés spectrales particulières ou voisines des propriétés de l'EGPEA ou du styrène. Ces composés élués sont caractérisés par une polarité plus faible et/ou une masse moléculaire importante au regard des CFMM des groupes I et II. Il peut s'agir de composés de masse moléculaire supérieure à celle des CFMM ou d'oligomères issus de la dépolymérisation et de la recombinaison d'entités chimiques générées. Ces composés ne présentent pas de second λ_{\max} au-delà de 250nm confirmant l'absence de groupement chromophores caractéristiques tel qu'un noyau aromatique dans leur structure chimique.

E. Comparaison globale

1. Photo-oxydation combinée longue – hydrolyse forcée

Ces deux conditions de vieillissement accéléré permettent selon les normes ISO 10993 de mimer deux ans de vieillissement naturel.

La figure 54 montre l'existence d'une différence majeure des profils de relargage des CFMM du groupe II (test du Chi2 au risque $\alpha=0,05$; $p<0,001$). L'hydrolyse forcée génère des CFMM principalement élués au-delà de 10,4 minutes alors que la photo-oxydation longue est caractérisée par des CFMM plus polaires élués avant 10,4 minutes (figure 55).

Les deux conditions de vieillissement apportent une quantité d'énergie importante au système. Cette énergie n'induit pas les mêmes modifications et par conséquent ne génère pas les mêmes CFMM. Dans le cas de la photo-oxydation l'énergie et le stress oxydant appliqués induisent la genèse de CFMM caractérisés par une faible masse moléculaire et une polarité importante. La température de l'hydrolyse forcée favorise la mobilité des chaînes du copolymère permettant ainsi la genèse et la libération de composés moins polaires et/ou de masses moléculaires plus importantes. Dans ce second cas, il s'agit de composés plus difficilement extractibles.

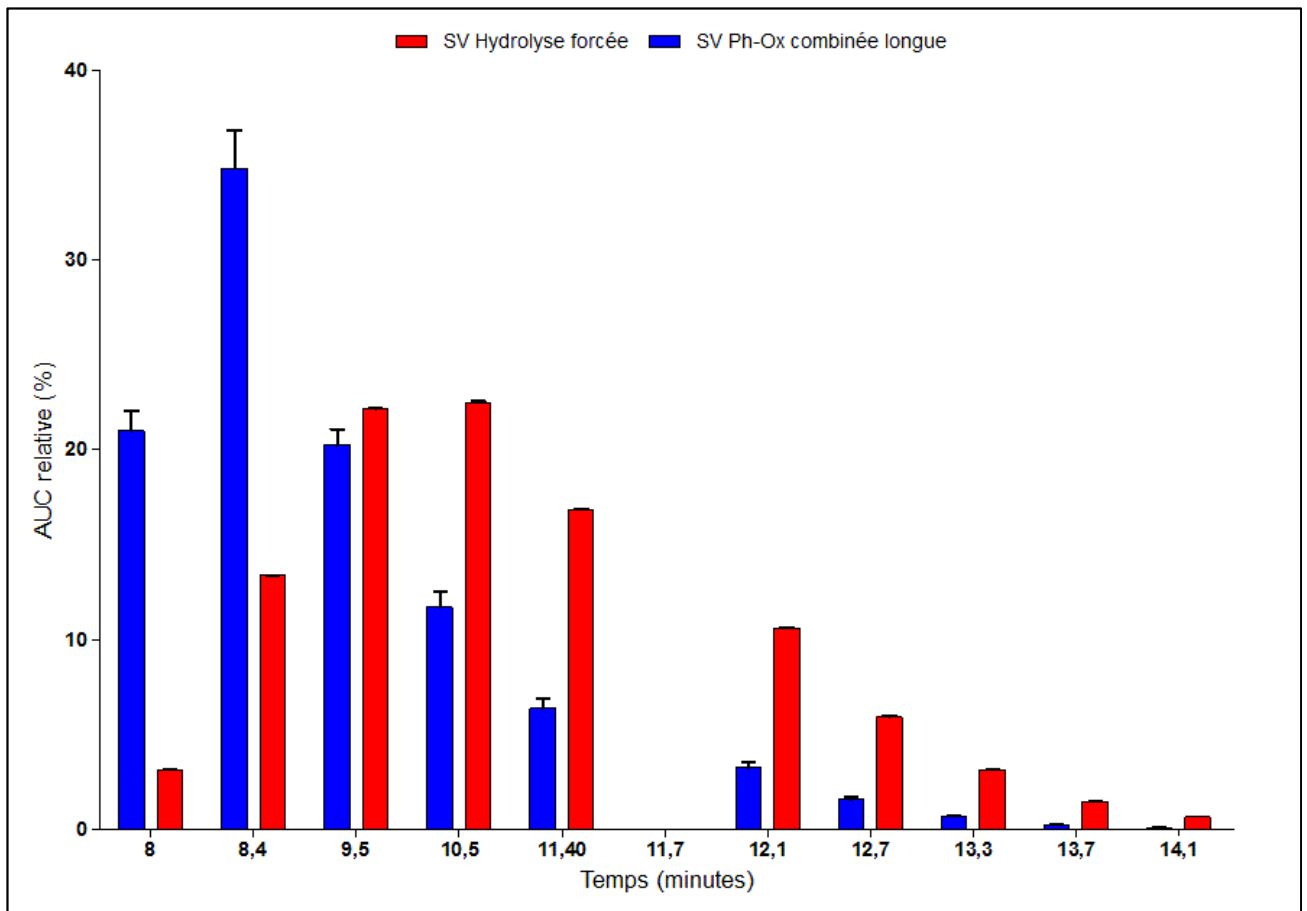


Figure 54 : AUC relative des CFMM du groupe II relargués par hydrolyse forcée et photo-oxydation combinée longue

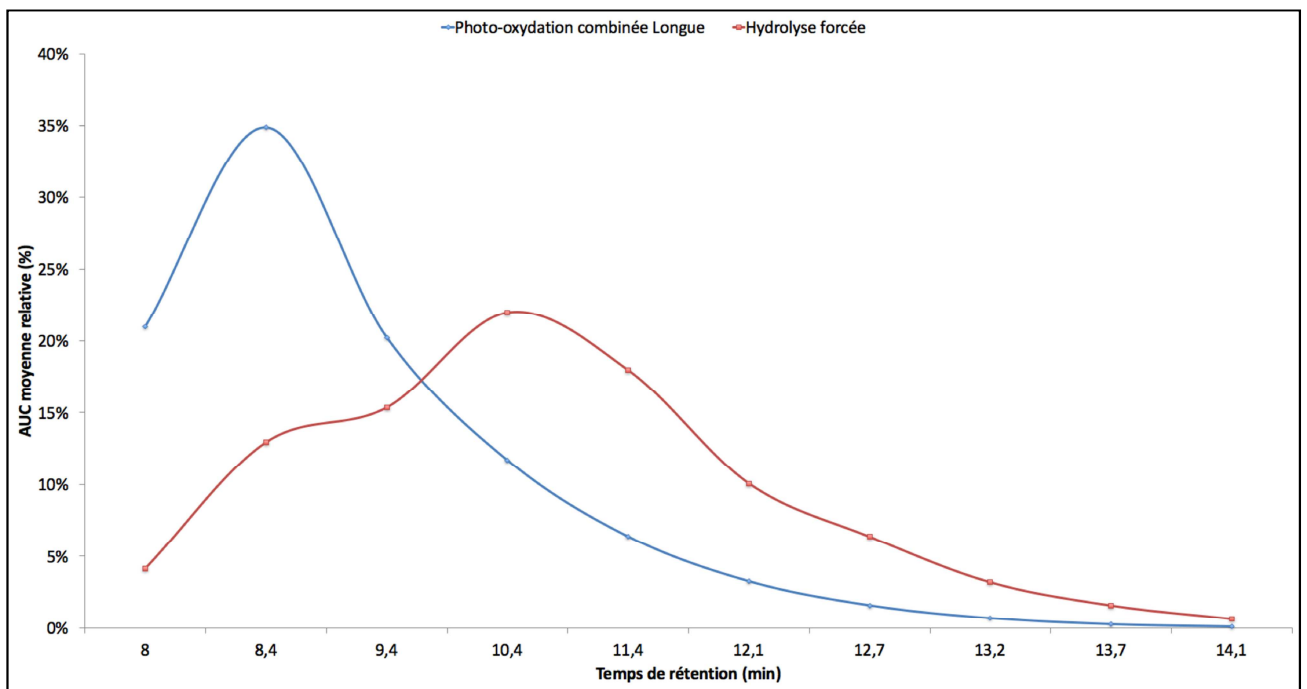


Figure 55 : Profil des CFMM du groupe II relargués par hydrolyse forcée et photo-oxydation combinée longue

2. Photo-oxydation combinée longue – hydrolyse courte

La comparaison des profils entre l'hydrolyse courte et la photo-oxydation longue apporte davantage d'informations sur l'origine et le devenir de chaque CFMM. Dans ces deux situations, le temps d'hydrolyse et la température sont semblables ; seule la photo-oxydation intervient. Pour tous les composés, les AUC sont supérieures lors de l'ajout de la photo-oxydation.

Il apparaît que le CFMM élué à 8,4 minutes est principalement généré par la photo-oxydation. Les proportions des CFMM élués après 10,4 minutes diminuent. Il peut s'agir d'une dégradation post-relargage dans la SV ou bien d'une disparition par réaction de recombinaison avec un autre composé relargué ou au sein du copolymère.

Cette diminution relative est liée à l'augmentation de la proportion du composé à 8,4 minutes. Ce CFMM pourrait être le produit de la dégradation des autres composés relargués dans un premier temps. Selon cette théorie, le composé élué à 9,4 minutes, dont la proportion est stable entre l'hydrolyse courte et la photo-oxydation combinée longue, ne serait que le produit d'un relargage du copolymère et non lié à la dégradation des autres composés relargués. De plus, selon l'hypothèse d'une modification des composés relargués, la scission des CFMM pourrait également expliquer la grande quantité de composés élués avant 8 minutes.

Enfin, l'analyse par RP-HPLC ne permet de détecter que les composés d'une certaine masse moléculaire et polarité. L'origine des différents CFMM élués pourrait être le relargage direct depuis l'implant vers le milieu mais également être liée à un relargage préalable d'oligomères dont le poids moléculaire et la polarité ne permettent pas leur élution dans les conditions chromatographiques retenues. En effet, ceux-ci resteraient adsorbés sur la phase stationnaire.

III. Cinétique des composés de faibles masses moléculaires

A. Cinétique de relargage

La cinétique de relargage des CFMM du groupe II entre 0 et 240 minutes lors d'une photo-oxydation combinée à l'hydrolyse montre un relargage très rapide (figure 56). Le signal mesuré en RP-HPLC est supérieur à la limite de détection (bruit de fond de la ligne de base) dès la 90^{ème} minute. Plusieurs CFMM apparaissent simultanément mais tous n'ont pas la même cinétique.

Le composé à 8 minutes est ici majoritaire en quantité absolue ce qui confirme l'observation faite dans les conditions de photo-oxydation courte. Toutefois, la cinétique du composé 8,4 minutes semble plus rapide expliquant la raison de l'inversion des prépondérances en fonction de l'irradiance cumulée observées dans les SV des différentes conditions de vieillissement testées. Les composés à 11,4 minutes et 12,1 minutes confirment également les observations précédentes. Leur très faible cinétique d'apparition conforte l'idée qu'avec la durée de photo-oxydation les quantités absolues n'évoluent que très peu, alors que leurs proportions relatives chutent.

Un composé élué à 16,5 minutes, absent des observations précédentes, présente une cinétique décroissante. Son absence à T0 semble indiquer qu'il ne s'agit pas d'un élément préexistant mais qu'il est relargué de l'implant. Toutefois, sa cinétique, rapidement décroissante, indique qu'il est très rapidement dégradé. Sa vitesse de dégradation est supérieure à celle de son relargage. L'autre explication serait celle d'un phénomène de relargage massif, rapide et éphémère suivi d'une dégradation dans le milieu de vieillissement.

Au-delà de 240 minutes, le suivi des AUC de chacun des CFMM du groupe II confirme la différence de cinétique (figure 57). Le CFMM élué à 16,5 minutes n'est plus détecté indiquant que sa dégradation est supérieure à son relargage. Il apparaît également que la cinétique d'apparition de tous les CFMM n'est pas linéaire mais se fait par paliers. Les paliers ont lieu aux mêmes temps de photo-oxydation pour tous les CFMM détectés. Ce profil de cinétique peut être la conséquence de l'équilibre entre le relargage des CFMM et leur dégradation. L'allure des tracés peut également être liée au vieillissement du copolymère et à la conséquence d'un phénomène de scission –migration puis relargage des CFMM lesquels ne serait pas continu mais intervient par vague.

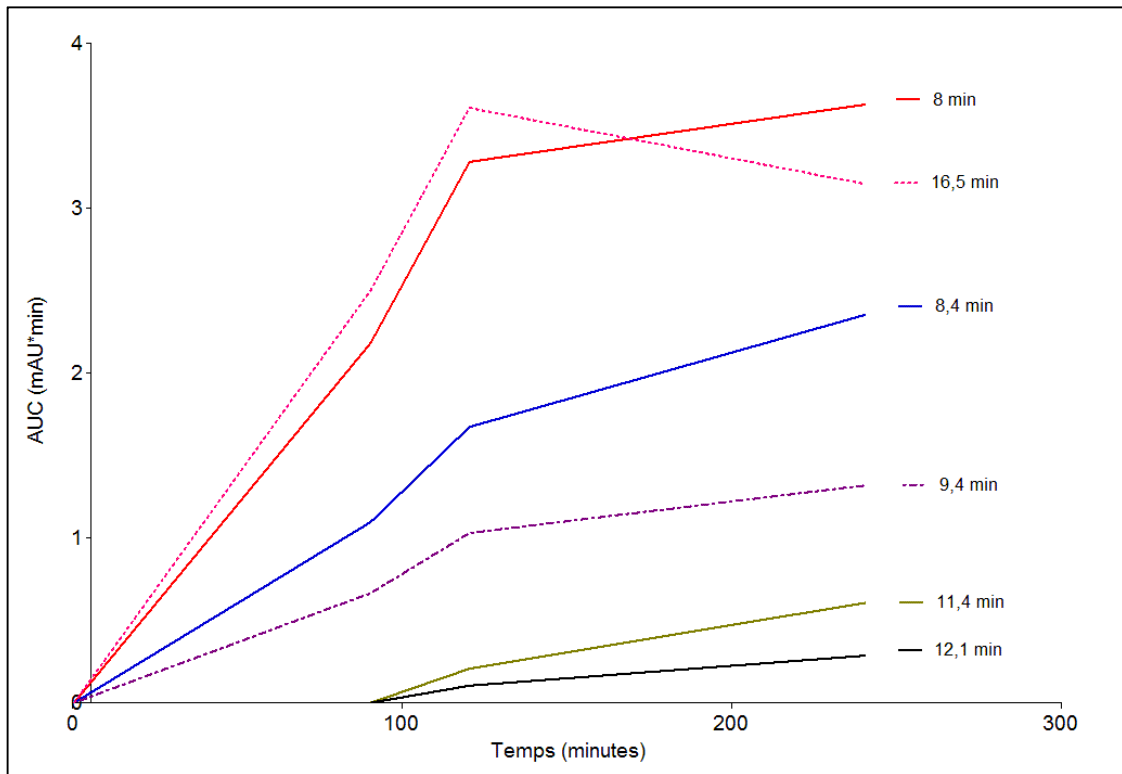


Figure 56 : Cinétique précoce du relargage des CFMM du groupe II en fonction de la durée de photo-oxydation combinée à l'hydrolyse

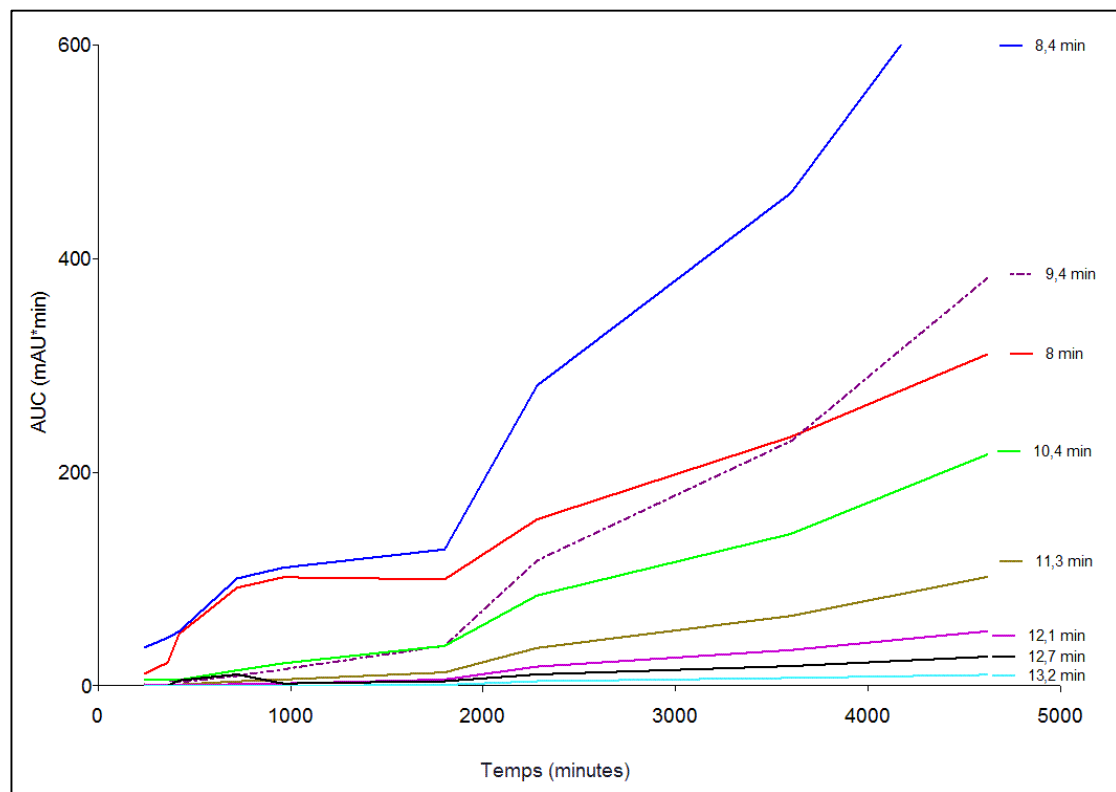


Figure 57: Cinétique du relargage des CFMM du groupe II en fonction de la durée de photo-oxydation combinée à l'hydrolyse

Ces résultats confirmeraient ainsi ceux précédemment obtenus en ATG indiquant l'existence d'un gradient de concentration de CFMM au sein du copolymère ; ce gradient serait lié aux propriétés de chaque CFMM (masse moléculaire et polarité).

B. Cinétique des CFMM après relargage

La cinétique des CFMM seuls soumis aux paramètres de la photo-oxydation combinée est présentée figure 58.

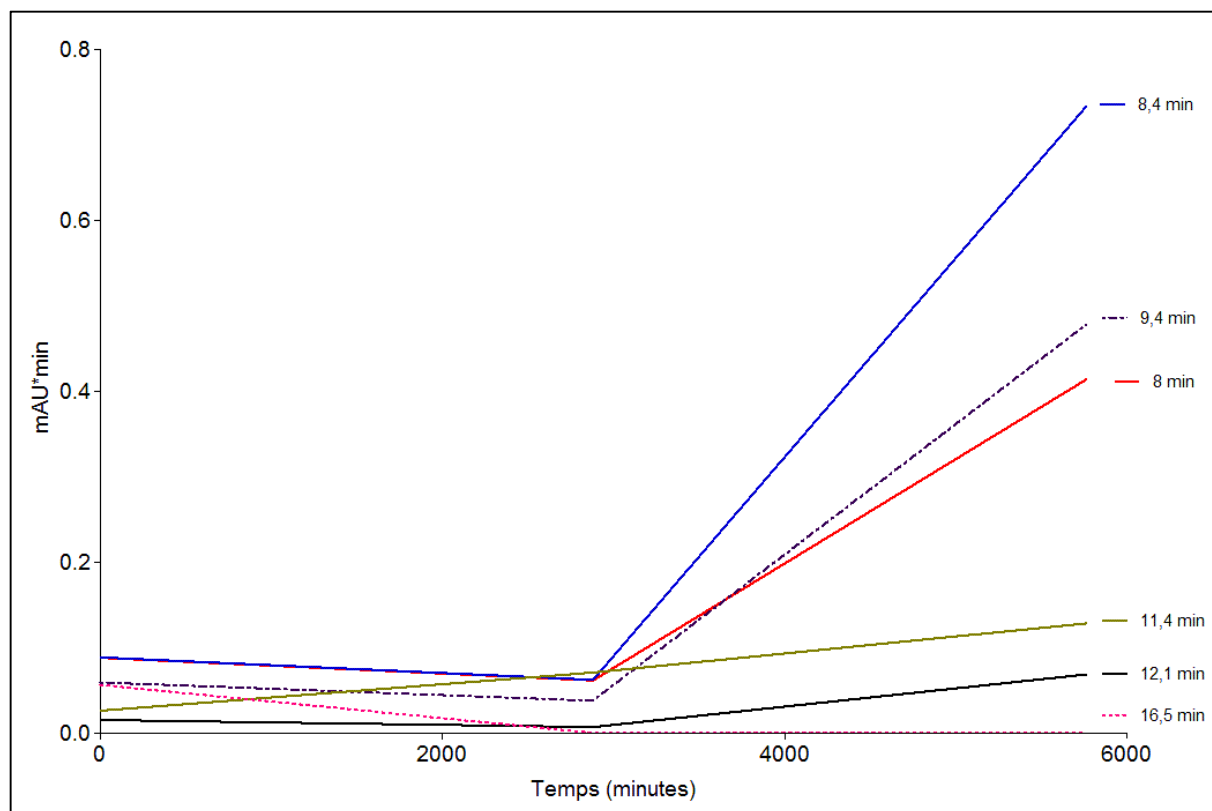


Figure 58 : Cinétique des CFMM du groupe II sous l'effet de la photo-oxydation combinée à l'hydrolyse

Malgré l'absence de l'implant les composés initialement relargués ne disparaissent pas sous l'effet de la photo-oxydation ou de l'hydrolyse. Au contraire, leur concentration croît avec une cinétique toutefois plus lente que celle observée lors du relargage des implants. En effet, en 96 heures d'exposition à la photo-oxydation, la solution de vieillissement contient une quantité équivalente à une intensité de $0,41 \text{ mAU} \cdot \text{min} / 20 \mu\text{L}$ alors que la SV contenant encore l'implant a un signal de $4,1 \text{ mAU} \cdot \text{min} / 20 \mu\text{L}$.

L'apparition des composés ne peut provenir que de fragments relargables à partir du copolymère précédemment relargués. Ces composés de masse moléculaire relativement plus importante se dépolymériseraient à leur tour sous l'effet de la photo-oxydation formant ainsi

des composés de faible masse moléculaire similaires à ceux analysés par RP-HPLC dans les SV d'implants. Ces éléments de masses moléculaires et de polarités différentes peuvent alors être élués dans ces conditions chromatographiques. Cette cinétique d'apparition des CFMM en deux temps permet d'expliquer le délai d'apparition des premiers CFMM à la 90^{ème} minute (figure 56) ainsi que la cinétique par palier présentée figure 57.

Chapitre 3 : Analyse de la surface par AFM

I. Caractéristiques de surface des implants neufs

Les implants neufs sont caractérisés par un profil composé des multiples pics et vallées mais d'une rugosité faible et homogène sur l'ensemble des zones mesurées. En contraste de phase, la surface est également homogène sans présence de dépôts amorphes ou cristallins (figure 59). La rugosité a été mesurée pour chaque implant en séparant dans un premier temps le centre des bords. Les rugosités des différents implants analysés ont été comparées pour déterminer la variabilité entre les implants neufs.

La rugosité entre le centre et le bord de l'implant neuf n'est pas significativement différente (test t de student au risque $\alpha=0,05$; $p=0,152$). Ce résultat, illustré figure 59 pour l'implant BL-001, est confirmé pour l'ensemble des implants neufs analysés. La rugosité est semblable entre le centre et le bord de chaque implant et ne varie pas significativement pour les implants d'un même lot. Il est possible de considérer la valeur moyenne de rugosité calculée comme la valeur de base des implants.

De même, les rugosités entre les différents implants neufs ne sont pas significativement différentes (analyse de variance par Kruskal-Wallis $\alpha=0,05$ $p=0,172$).

Un implant d'un lot différent, dont la date limite d'utilisation était proche, a été analysé par AFM. La rugosité R_a mesurée est sensiblement inférieure à la moyenne de rugosité des autres implants. L'écart de rugosité pourrait également être lié à un phénomène de lissage de la surface par hydrolyse en fonction du temps survenu dans le conditionnement primaire de l'implant. La différence peut également provenir d'une différence inter lots.

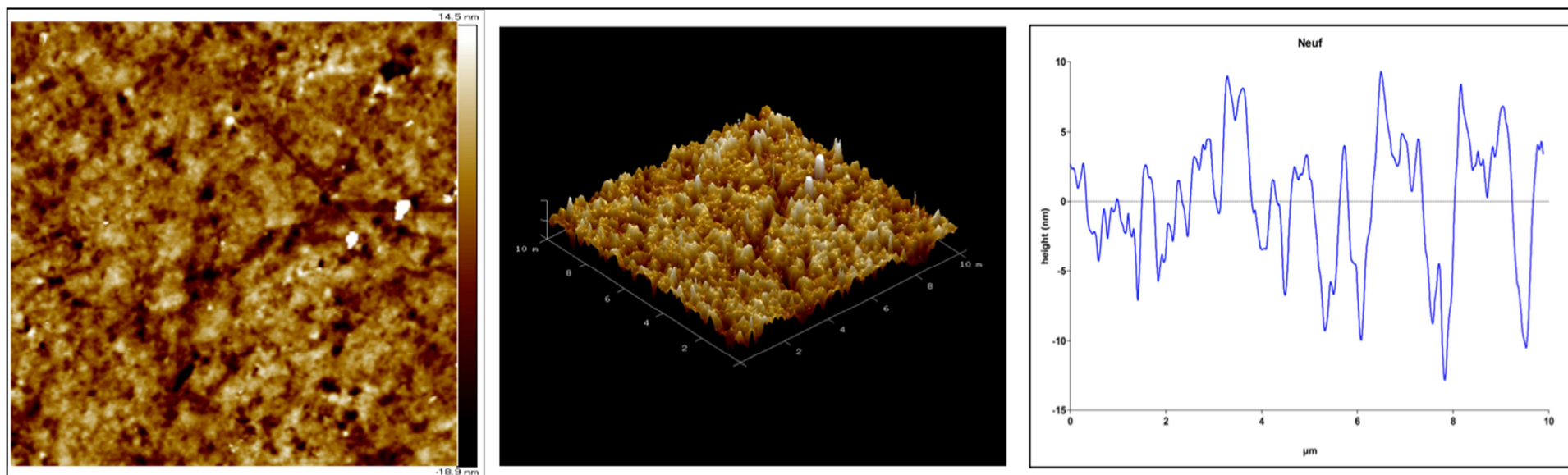


Figure 59 : Surface de l'implant BL001. Vue en 2D, vue en 3D et profil de rugosité

La rugosité moyenne d'un implant neuf est la suivante : $R_a=3,02\text{nm}$ – $R_q=4,19\text{nm}^2$ – $R_{\text{max}}=66,98\text{nm}$ – $R_{\text{min}}=-34,69\text{nm}$.

II. Action du vieillissement par hydrolyse sur la surface des implants

L'hydrolyse courte et l'hydrolyse forcée modifient uniformément la rugosité de surface des implants. Aucune différence significative n'est mise en évidence pour les quatre paramètres mesurés (R_a , R_q , R_{max} et R_{min}) entre les centres et les bords des implants. De même, la rugosité est homogène entre tous les implants vieillis selon les mêmes conditions d'hydrolyses.

L'analyse comparative montre qu'il existe une différence peu significative de la rugosité R_a selon l'hydrolyse réalisée (test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha=0,05$; $p=0,039$). La différence n'est pas confirmée avec le paramètre R_q (test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha=0,05$; $p=0,11$). R_{max} diminuent lors de l'hydrolyse courte et forcée (test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha=0,05$; $p=0,0073$). De même, la rugosité minimale s'accroît après hydrolyse forcée (test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha=0,05$; $p=0,0009$). Lors de l'hydrolyse courte, R_{max} et R_{min} diminue (figure 60).

Les valeurs de rugosités obtenues indiquent l'existence d'un phénomène de lissage de la surface de l'implant durant l'hydrolyse lorsque les températures sont supérieures à celle de la transition vitreuse du copolymère.

Le lissage de la surface peut être expliqué par la ségrégation des CFMM à la surface de l'implant dans ces conditions de vieillissement. En effet, les CFMM générés par l'hydrolyse forcée, mis en évidence par RP-HPLC, diffusent dans la matrice polymère puis s'agrègent en surface avant d'être, pour certains, relargués dans le milieu de contact. Les résultats d'AFM confirment ceux obtenus en ATG et en RP-HPLC.

Les paramètres de rugosité relevés évoluent dans le même sens que l'intensité du relargage observé en dans les SV en RP-HPLC. Les valeurs de R_a , R_q , R_{max} et R_{min} augmentent tout comme l'AUC totale des CFMM. De plus, lors du réarrangement des chaînes supramoléculaires au cours de l'hydrolyse forcée, la température génère l'apparition de craquelures de quelques nanomètres à la surface de l'implant. Celles-ci sont mises en évidence par l'augmentation de la valeur R_{min} . Toutefois, l'analyse qualitative de la surface montre que l'hydrolyse, quelles que soient les conditions testées, ne provoque pas de modification majeures du contraste de phase et des valeurs de rugosité (figure 61).

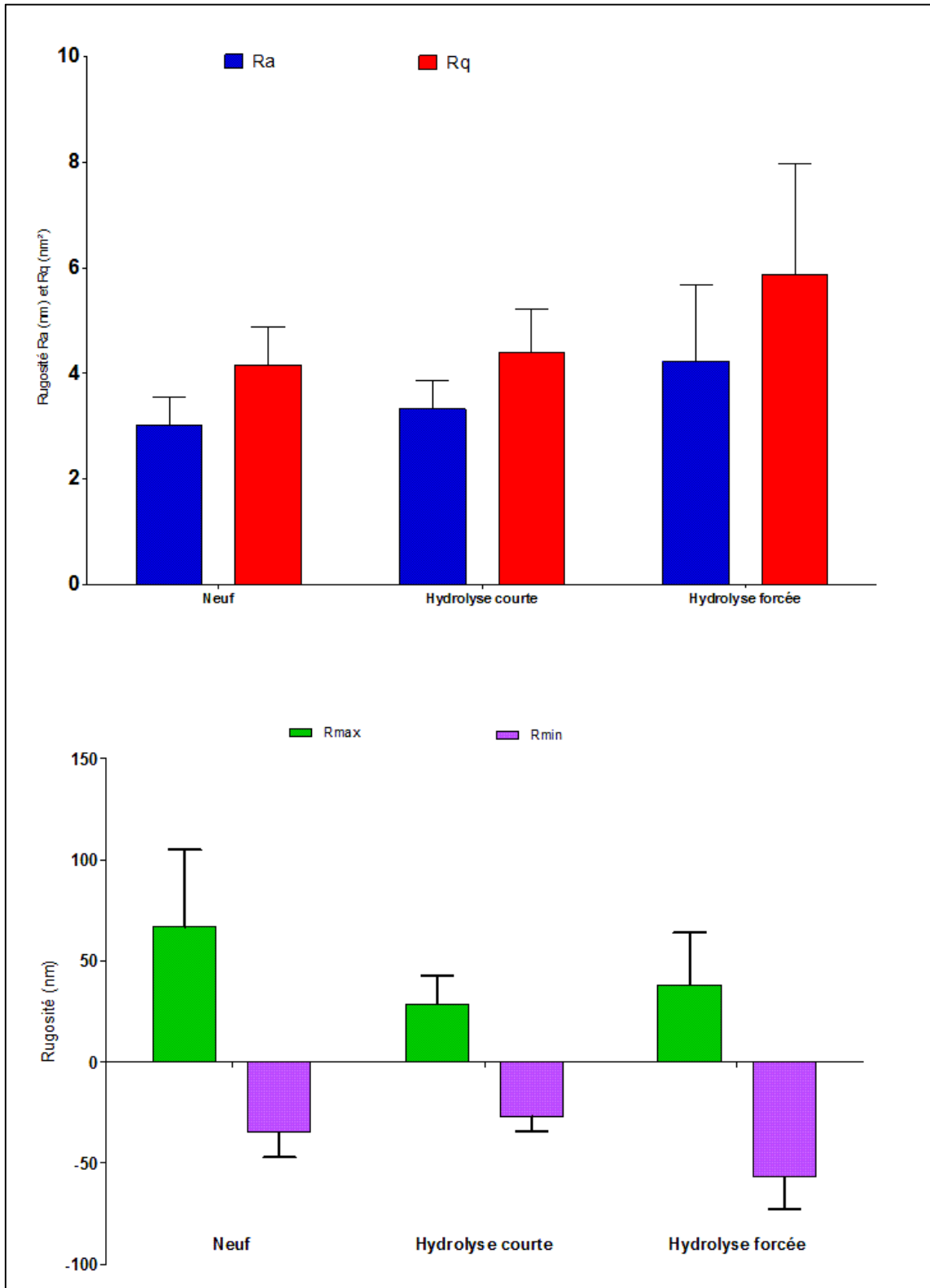


Figure 60 : Rugosité des implants vieillis par hydrolyse seule

Les valeurs moyennes obtenues lors de l'hydrolyse courte sont : Ra = 3,33nm – Rq =4,39nm² – Rmax = 28,69nm – Rmin=-26,80nm. Les valeurs moyennes des implants vieillis par hydrolyse forcée sont : Ra = 4,22 – Rq=5,86 – Rmax=38,26 – Rmin=-56,79nm.

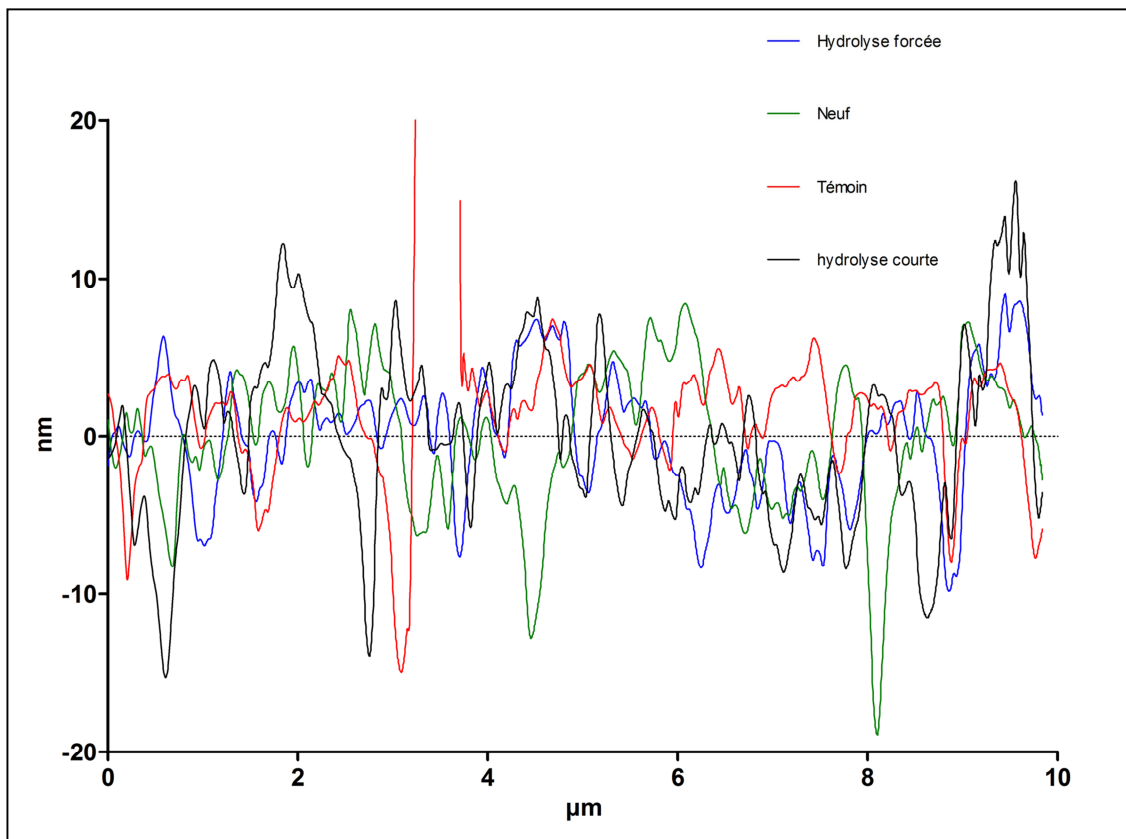


Figure 61 : Comparaison de profils de surface de chaque groupe d'hydrolyse (détails)

Malgré l'homogénéité des profils de rugosité, les surfaces présentent quelques différences ponctuelles notables. Des structures nommées par la suite « rainure circulaire » ont été découvertes sur la surface des implants (figure 62). Chaque implant n'étant pas son propre témoin, il est impossible de déterminer si l'aspérité est liée au procédé de fabrication et de conservation ou si celle-ci est le fait du vieillissement. La régularité de la structure circulaire laisse à penser qu'il s'agit d'un élément lié au procédé de fabrication et/ou polissage.

Malgré un protocole standardisé pour l'acquisition d'image, l'implant n'est pas polarisé et ne permet pas d'imager strictement les mêmes zones d'un échantillon à l'autre. De plus, la surface totale imagée est de $3,6\text{mm}^2$ pour une surface totale d'implant voisine de 60mm^2 . Il est de fait impossible de certifier l'imputabilité des observations au vieillissement des surfaces.

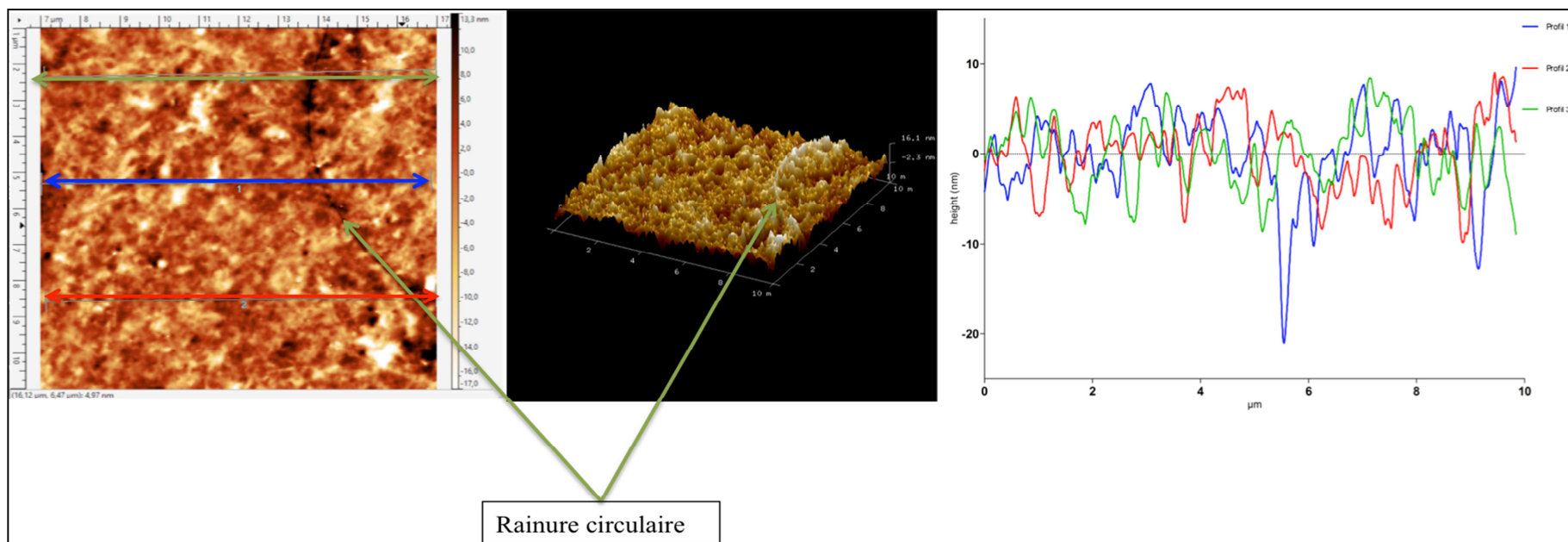
D'autres types de structures, des pics hauts et fins, sont imagés en surface des implants (figure 63). L'origine précise de ces pics, et des rainures circulaires, sur la surface des implants n'est pas établie. Le NaCl présent dans la solution de vieillissement peut cristalliser lors de l'imagerie par AFM si le rinçage est insuffisant. Toutefois, dans l'exemple de la figure 63, l'aspect est différent de celui de cristaux de NaCl. La présence d'une rainure dans le

prolongement du pic laisse penser que les deux observations sont liées. De plus, l'observation de ces artefacts est quasi exclusivement faite pour des implants vieilliss artificiellement.

L'origine de ces phénomènes pourrait être une altération de la surface lors de son polissage ou lors du passage de la pointe en mode tapping. Cette altération indiquerait une fragilité de la surface de l'implant à l'abrasion d'une pointe. Il est peu probable, aux vues de la géométrie des impuretés (pic et rainure), que ces images soient directement le fait d'un relargage d'oligomères dans le milieu de l'implant.

La dernière hypothèse serait l'altération de la surface par le repliement et l'injection de l'implant au travers du stylo injecteur. Lors de l'utilisation, dans le procédé de vieillissement, aucun stylo ou système de repliement n'a été utilisé. Une vigilance accrue a été portée à préserver les surfaces en manipulant les implants par les haptiques à l'aide de pinces atraumatiques.

Des résultats publiés dans la littérature, seules les surfaces des implants en hydrogels présentent le même type de structures associant des pics fins et hauts avec des sillons fins²⁹. Cela laisse à penser que les pics observés sur les implants correspondent à des hydrogels, les chaînes de PHEMA dans le copolymère, qui apparaissent en surface lors du vieillissement. La présence de ces structures ne modifie pas la tendance des résultats de Ra et Rq pour chaque implant. Seules les valeurs des Rmax et Rmin s'en trouvent modifiées.



Rainure circulaire

Figure 62 : Caractéristiques de surface après hydrolyse forcée (BL008)

Une rainure circulaire est visible sur la vue tridimensionnelle et bidimensionnelle de la surface. L'analyse des profils de surface (tracés vert, bleu et rouge) ne montre pas de différence notable sur la surface malgré la présence de la rainure.

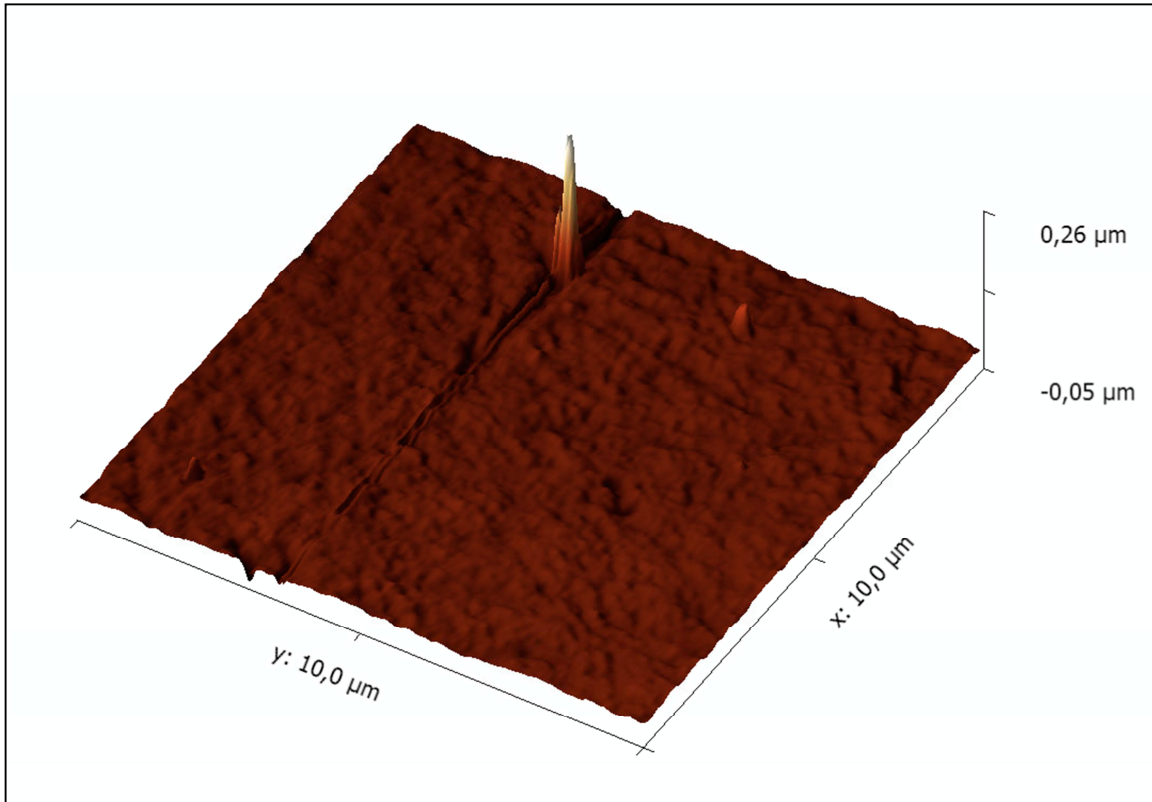


Figure 63 : Vue tridimensionnelle de la surface comportant un pic de PHEMA

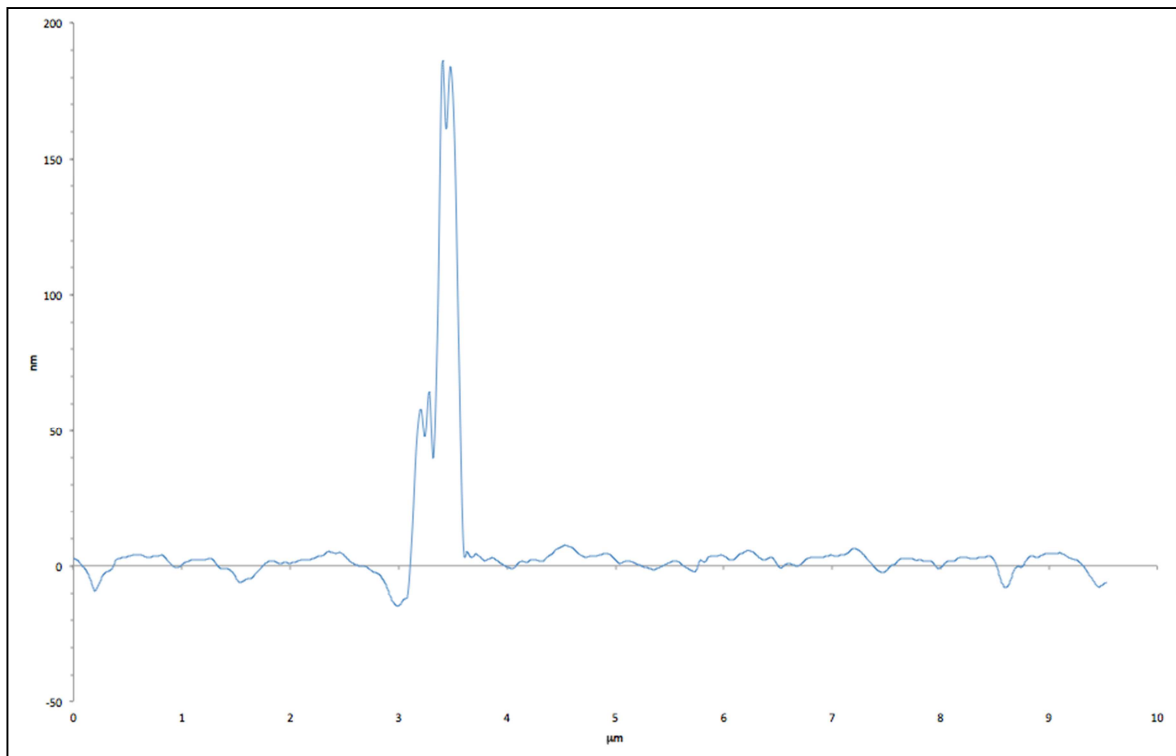


Figure 64 : Profil de la rugosité de surface présentant un pic de PHEMA

III. Action de la photo-oxydation sur la rugosité de surface

Des différences significatives des valeurs de rugosité de surface apparaissent lors de la photo-oxydation (figure 65). Le contraste de phase et les profils de rugosités ne montrent pas de modification significative lors du vieillissement par photo-oxydation seule.

La première observation concerne l'homogénéité de rugosité entre le centre et les bords des implants. Au sein du groupe photo-oxydation longue, les bords de l'implant ont une rugosité significativement supérieure à celle du centre (test *t* de student - α 5% - $p=0,00017$).

La rugosité mesurée entre les groupes ne diffère pas significativement (test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha=0,05$: Ra $p=0,94$; Rq $p=0,54$; Rmin $p=0,17$). De même aucune différence n'est mise en évidence en fonction du temps de photo-oxydation (test *t* de Student au risque $\alpha=0,05$; Ra $p=0,33$; Rq $p=0,26$; Rmax $p=0,77$).

À l'inverse, Rmax diminue significativement entre les implants neufs et ceux vieillis par photo-oxydation (test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha=0,05$; $p=0,0041$). Le paramètre Rmin ne suit pas de tendance en fonction de la photo-oxydation. La photo-oxydation sans hydrolyse associée modifie la rugosité de surface en fonction de la durée d'exposition donc de l'irradiance totale délivrée à l'échantillon. La diminution de Rmax ne pouvant pas être le fait d'un relargage, d'un gonflement de l'implant ou de l'action de l'hydrolyse, la tendance observée serait la conséquence d'un réarrangement des structures supramoléculaires en surface. Sous l'action de la photo-oxydation l'énergie de l'irradiance, qui est le seul paramètre responsable du vieillissement, conduit à des réactions de scission et de recombinaisons de chaînes. De même, la température de vieillissement, supérieure à la Tg, conduit à une mobilité des chaînes macromoléculaires facilitant le réarrangement supramoléculaire. Ces phénomènes sont confirmés par l'évolution de Rmax et de Rmin. L'ensemble aboutit à un lissage de la surface mis en évidence par la mesure de Ra et Rq.

La différence de Rmax mesurée entre le centre et les bords de l'implant montre que le mécanisme de réarrangement des chaînes de polymères n'est pas homogène sur toute la surface. Cela peut être lié à la différence d'épaisseur de l'implant entre le bord et le centre. La différence de Rmax peut également être le reflet de l'hétérogénéité de répartition des monomères dans le copolymère. Cette hétérogénéité confirme les résultats observés en ATG et RP-HPLC. Elle trouve son origine dans le procédé de polymérisation ou dans le réarrangement des chaînes macromoléculaires lors du vieillissement.

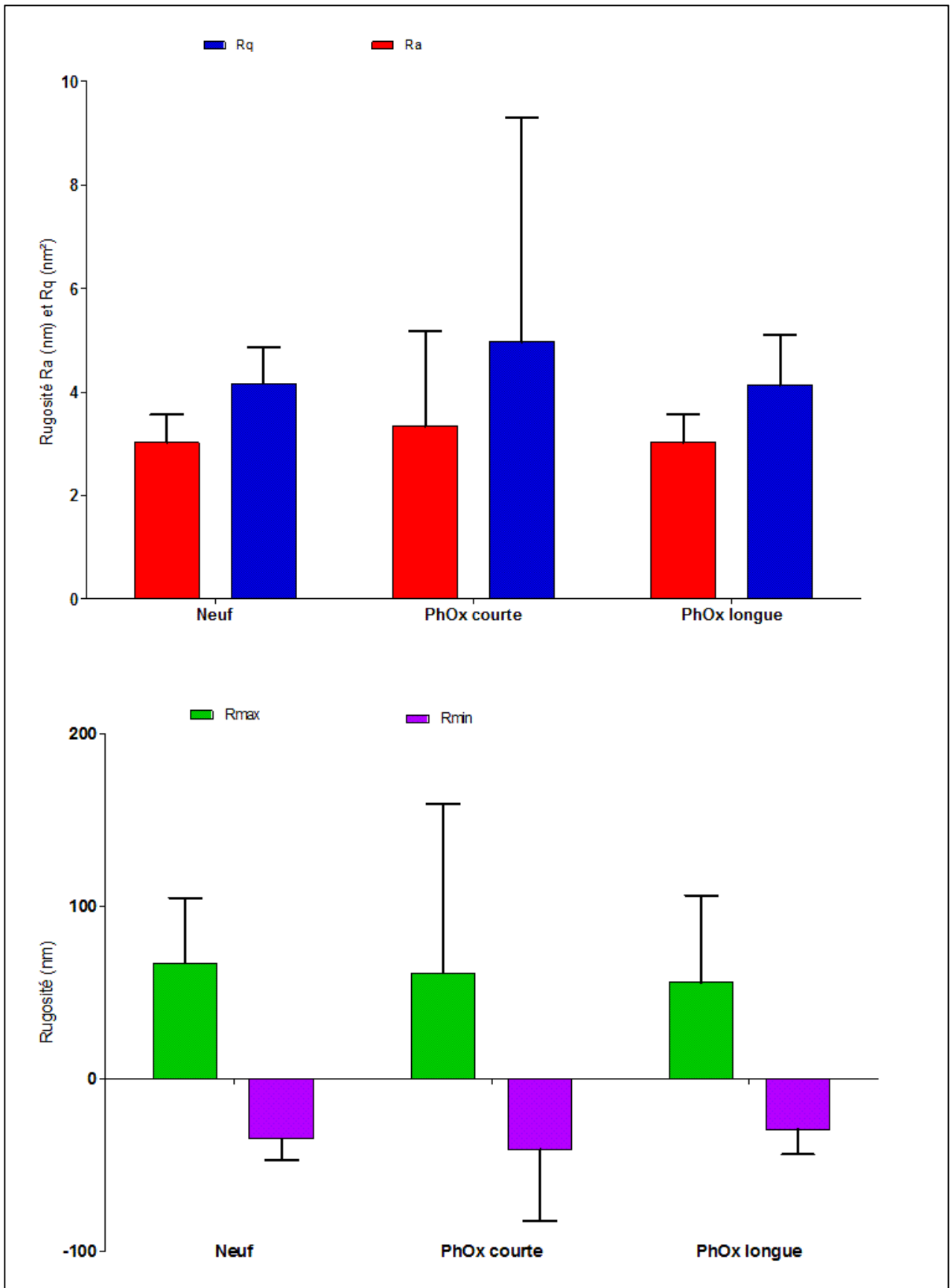


Figure 65 : Rugosité des implants vieilliss par photo-oxydation seule

Les résultats de rugosité et de profil de surface, obtenus après photo-oxydation sans hydrolyse, confirment l'existence d'une différence de la vitesse de vieillissement entre implants d'un même lot ainsi qu'au sein d'un même implant selon l'épaisseur et l'organisation des chaînes du copolymère.

IV. Action de la photo-oxydation combinée à l'hydrolyse sur l'état de surface

L'action simultanée de la photo-oxydation et de l'hydrolyse n'apporte pas de modifications majeures sur la surface des implants. Les profils sont similaires de même que le contraste de phase. Le nombre d'artefacts en surface paraît toutefois plus important sans qu'il soit possible de les quantifier (figure 66).

L'analyse globale montre que la rugosité augmente sensiblement lors du vieillissement par photo-oxydation combinée à l'hydrolyse. La tendance n'est pas confirmée statistiquement (test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha=0,05$: Ra $p=0,18$; Rq $p=0,14$). De même, le temps de photo-oxydation ne modifie pas significativement la rugosité (test t de student au risque $\alpha=0,05$: Ra $p=0,76$; Rq $p=0,60$). Comme pour la photo-oxydation seule, un des implants du groupe « photo-oxydation combinée longue durée » présente une différence significative de Ra et Rq entre ses bords et son centre (test t de student au risque $\alpha=0,05$; $p=0,016$). Toutefois, à l'inverse du cas précédent, cette différence ne concerne pas tous les implants de cette condition de vieillissement.

Lors du vieillissement Rmax diminue alors que Rmin augmente. Cela prouve l'altération de la surface dans des conditions de vieillissement proche des conditions réelles intraoculaires. Des deux critères de vieillissement, l'évolution du Rmax et de Rmin montre que les phénomènes liés à l'hydrolyse semblent prépondérants. La surface se creuse (augmentation de Rmin) et se lisse (baisse de Rmax) avec pour résultante une augmentation, sensible mais non significative de la rugosité moyenne. Les écarts de rugosité entre les bords et le centre confirment l'existence d'une cinétique de vieillissement dépendante de l'épaisseur et variable entre implants.

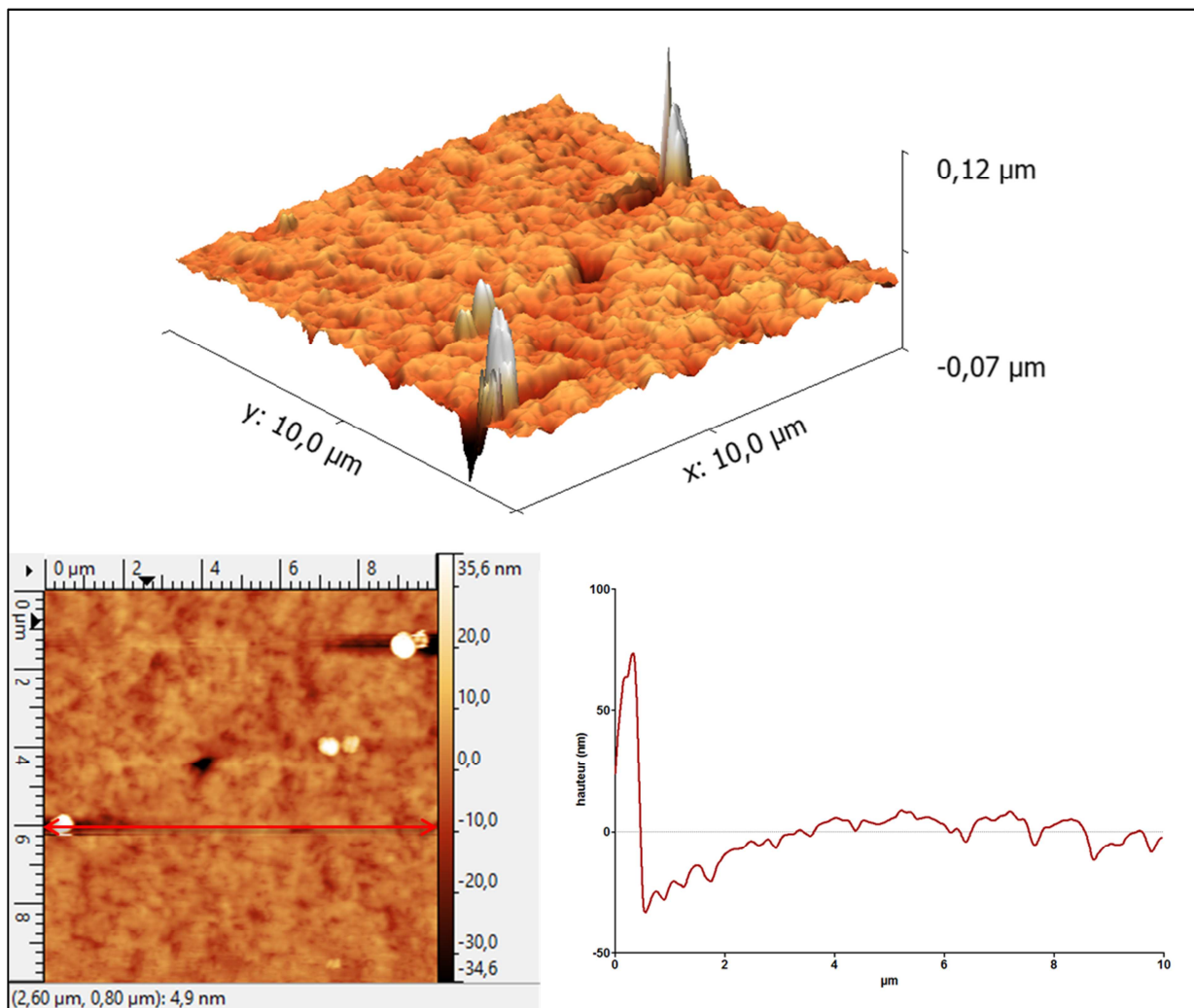


Figure 66 : Caractéristique de surface après photo-oxydation combinée à l'hydrolyse pour une longue durée

Présence de pics de PHEMA visibles sur la vue tridimensionnelle (en haut) d'une hauteur d'environ 75 à 120μm comme l'indique le profil de rugosité (en bas à droite).

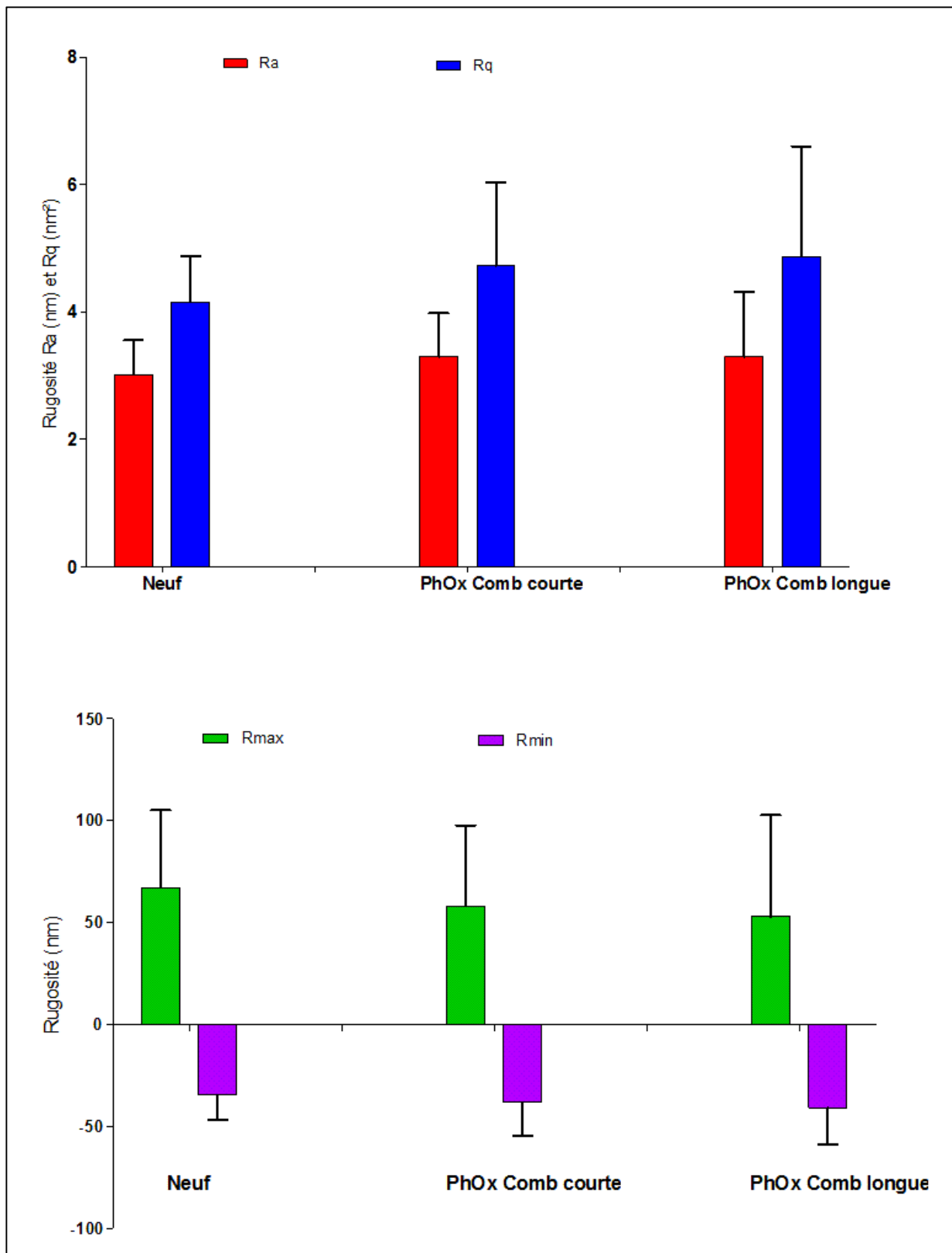


Figure 67 : Rugosité des implants vieillis par photo-oxydation combinée à l'hydrolyse

V. Analyse croisée état de surface et relargage

L'état de surface est à mettre au regard du relargage observé en RP-HPLC. La vitesse de relargage de CFMM et la vitesse du réassemblage de ces espèces réactives sont en équilibre. L'équilibre est dépendant de la photo-oxydation et de l'hydrolyse. Selon le déplacement de l'équilibre, le relargage s'intensifie et les valeurs de la rugosité se modifient.

De l'ensemble des implants vieillissés par photo-oxydation, l'AUC totale de l'implant BL340027 est inférieure aux autres AUC totales. La rugosité de l'implant BL340027 est elle aussi inférieure à la rugosité moyenne des autres implants. Cette concordance confirme l'existence d'une relation entre rugosité de surface et le relargage de CFMM.

L'écart observé entre le centre et le bord serait le reflet de la chronologie du relargage, lequel débiterait par le bord de l'implant. En effet, la forme biconvexe induit une différence d'épaisseur entre le centre et les bords pouvant générer deux cinétiques de vieillissement de l'implant.

L'écart entre les données de rugosité de surface et de relargage de l'implant BL340027 peut trouver deux origines :

- L'homogénéité de distribution des monomères et de l'anti-UV. Les profils ATG et DSC indiquent qu'il n'existe pas différentes sous-unités amorphes dans le copolymère de l'implant BL340027 ;
- L'irradiance perçue par les échantillons peut varier selon l'emplacement dans l'enceinte de vieillissement. Les implants ont régulièrement été changés de place au sein de l'enceinte pour limiter ce biais.

L'épaisseur de l'échantillon et l'hétérogénéité de distribution des chaînes dans le copolymère semble les deux facteurs justifiant les écarts observés. Ce résultat se rapproche d'observations cliniques réalisées indiquant que la survenue de PCO tardives pourrait être liée à la dépolymérisation des bords carrés des implants²³.

En considérant que le relargage, donc le vieillissement de l'implant, s'initie par les bords, une longue exposition à la photo-oxydation pourrait modifier l'angle droit des bords carrés de l'implant par dépolymérisation progressive. Cette modification structurelle pourrait réduire l'efficacité des bords carrés dans la prévention de la PCO. La conséquence clinique serait une diminution de l'effet barrière et donc une augmentation du risque de PCO d'incidence tardive^{116,118,215}.

Chapitre 4 : Evaluation de la biocompatibilité

Les modifications de la surface des implants observées au cours de leur vieillissement ainsi que le relargage continu de CFMM nécessite d'évaluer la biocompatibilité à deux niveaux. D'une part le profil de toxicité des CFMM relargués et d'autre part l'interaction avec le milieu biologique lors du contact direct entre l'implant et les cellules épithéliales de cristallin mais également les protéines de la matrice extracellulaire impliquée dans la prévention de la PCO.

I. Cytotoxicité

Les CFMM relargués sont un mélange complexe non identifié. Ainsi, l'étude de la cytotoxicité a été menée sur les SC, les SV mais également sur les monomères constitutifs de l'implant étudié. Seule les SV de la photo-oxydation combinée à l'hydrolyse ont été testées. Ce procédé de vieillissement mime au plus près les conditions auxquelles l'implant est exposé et conduit au relargage le plus intense des CFMM.

Tous les monomères n'ont pas le même profil de cytotoxicité (figure 68). L'EGPEA est le seul à faire apparaître une cytotoxicité sur les cellules épithéliales de cristalline dès la concentration de 20 ppm. Les trois autres monomères ne montrent pas d'impact sur la viabilité cellulaire. Le 2-HEMA, dont la cytotoxicité est documentée pour d'autres lignées cellulaires, n'est pas cytotoxique aux concentrations testées²⁵⁸⁻²⁶⁰.

La viabilité des cellules épithéliales de cristallin humain, en contact direct avec les implants, les SC ou SV est supérieure à 70% de la viabilité des contrôles négatif (figure 69). Aucun des échantillons testés n'est donc cytotoxique. Les CFMM ne contiennent pas de groupement fonctionnel d'acrylate à des concentrations cytoxiqes^{260,261}.

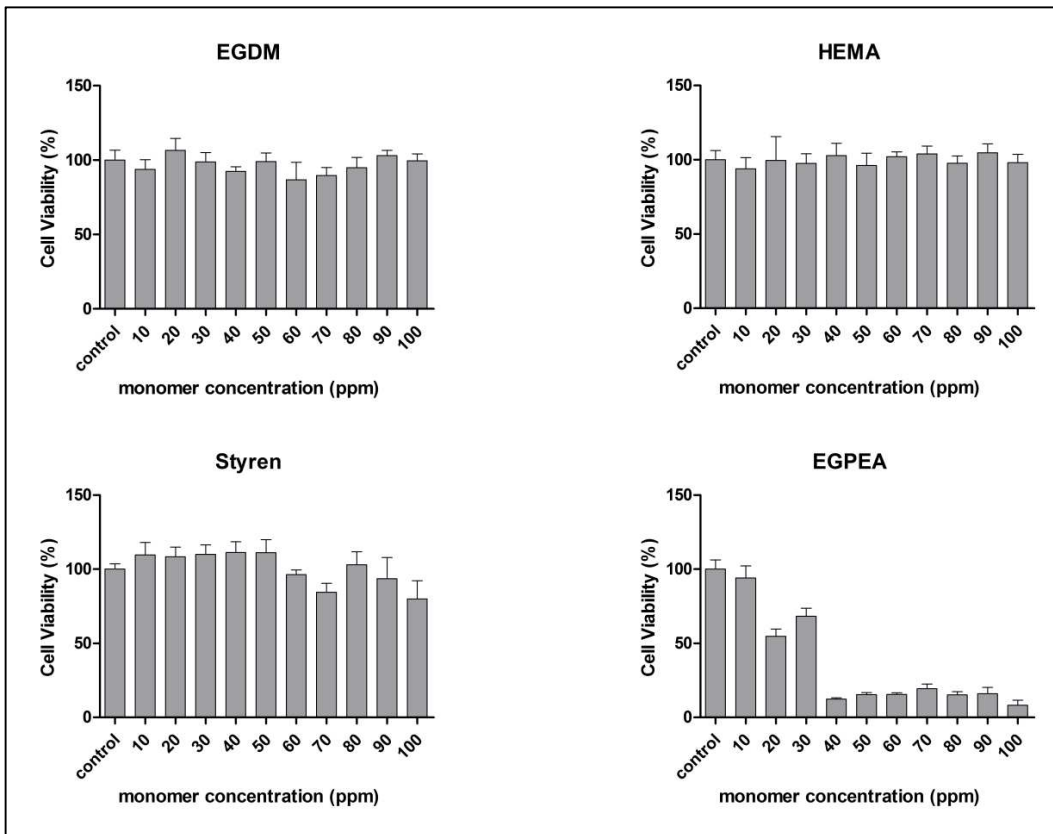


Figure 68 : Viabilité cellulaire sur hLECs après contact direct des monomères à différentes concentrations

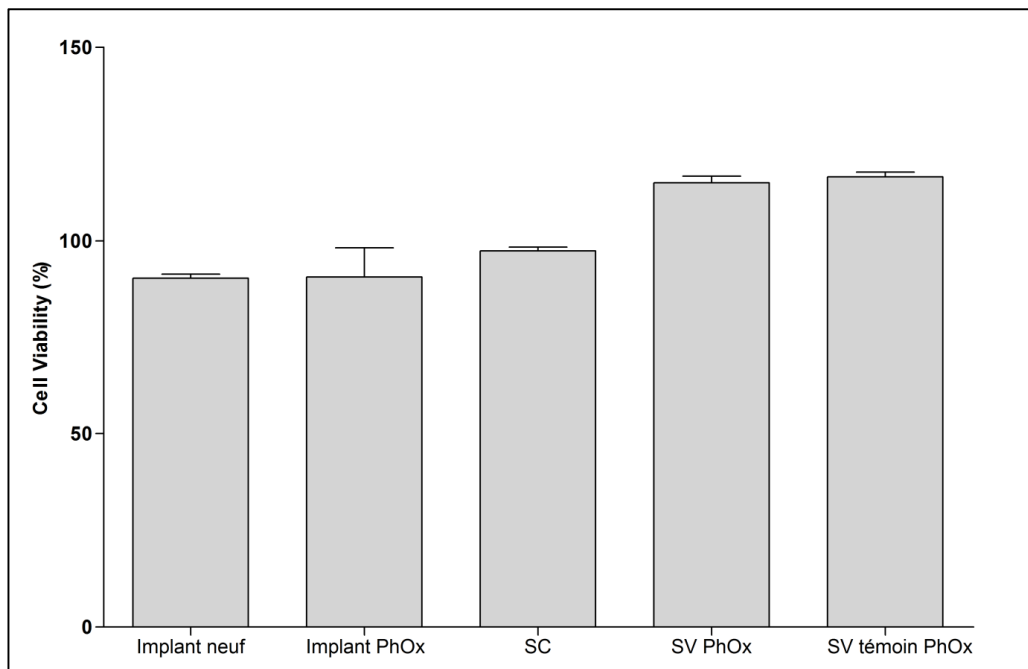


Figure 69 : Viabilité cellulaire au MTT après contact direct des implants et des solutions de vieillissement

Toutefois, les résultats apportent d'autres renseignements sur la biocompatibilité des lentilles intraoculaires et des CFMM. Il existe une différence significative de la viabilité cellulaire

entre les SC et les SV de la photo-oxydation combinée (test t de student au risque $\alpha = 0,05$; $p < 0,001$). Celle-ci qui peut être expliquée par la différence du profil des CFMM relargués, notamment sur le premier CFMM élué à 8 minutes. L'absence de différence significative entre les SV photo-oxydation combinée et les SV témoins, présentant des profils de relargage proches, indiquent que la quantité des CFMM ne diminue pas la viabilité cellulaire. La légère augmentation de viabilité cellulaire peut être la conséquence d'une action intracellulaire des CFMM. Les travaux de Yamanaka *et al.*, pointent l'effet inducteur des acrylates sur la réplication cellulaire et l'inflammation²⁶¹

Les résultats obtenus sur les SC et SV confirme toutefois l'absence de l'EGPEA à des concentrations élevées ce qui est en accord avec les observations faites en RP-HPLC.

II. Morphologie cellulaire

La morphologie cellulaire observée après contact direct des implants et des SC ou SV confirme la cytotoxicité induite par l'EGPEA. La présence de corps apoptotiques après contact direct avec l'EGPEA confirme qu'il s'agit d'une mort cellulaire programmée et non pas d'une diminution de la vitesse de réplication cellulaire (figure 70). Les témoins négatifs ainsi que les cellules en contact direct avec des monomères non cytotoxiques ne montrent pas de corps apoptotiques (figure 71).

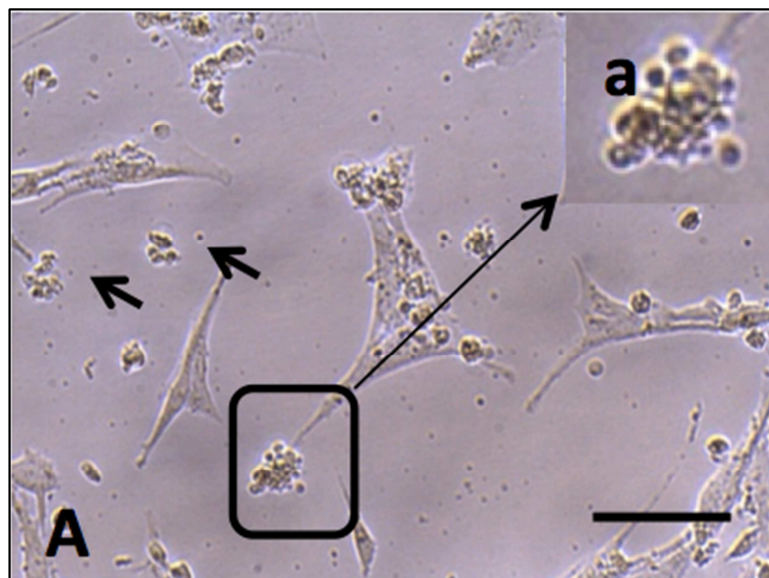


Figure 70 : Morphologie cellulaire sur hLECs en contact direct avec de l'EGPEA à 40ppm

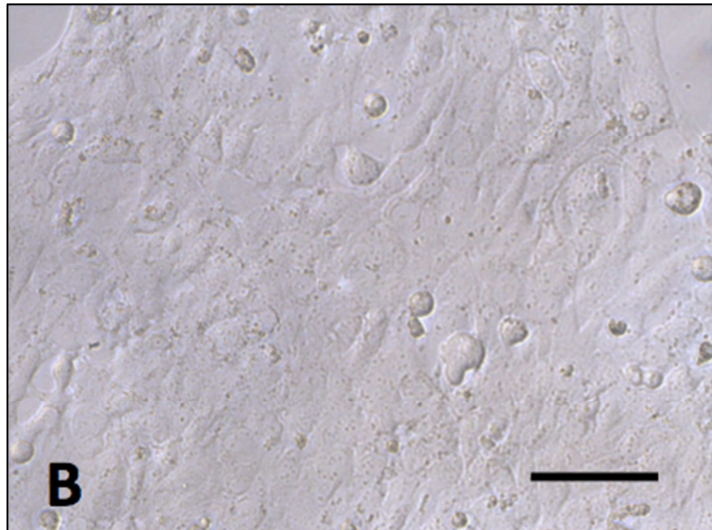


Figure 71 : Morphologie cellulaire sur hLECs en contact direct avec de l'HEMA 40ppm

De même, aucun corps apoptotique ou marqueur morphologique d'une souffrance cellulaire ne sont mis en évidence après contact direct avec les implants neufs et vieillis (figure 72).

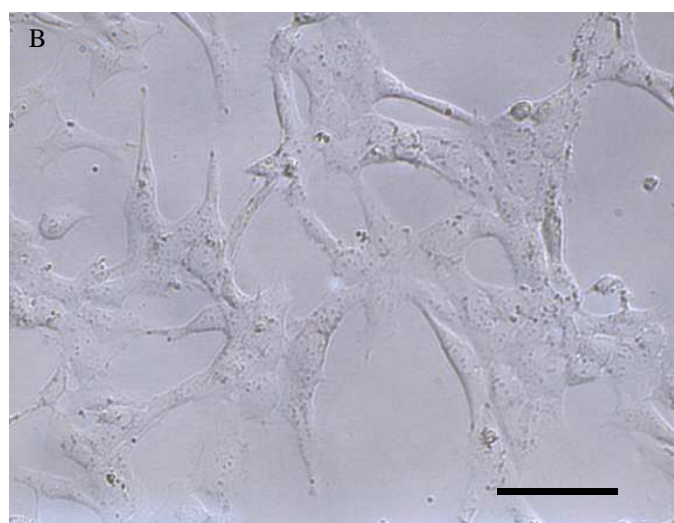
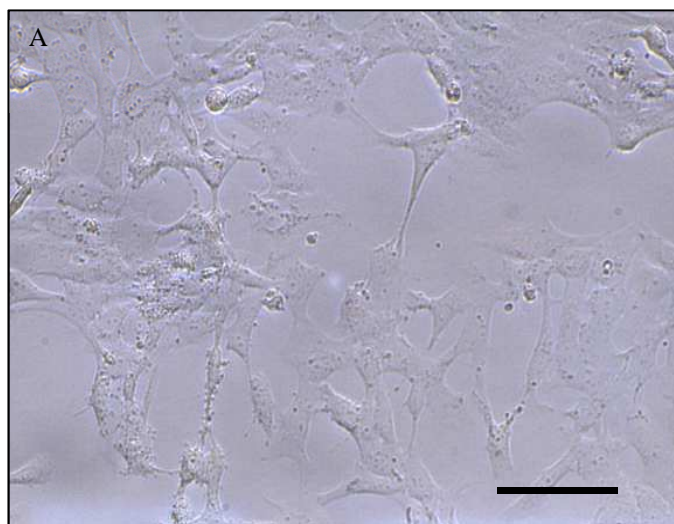


Figure 72 : Morphologie cellulaire de hLECs après contact direct avec implant neuf (A) et photo-oxydé (B)

III. Interaction protéique

L'adhésion de la fibronectine sur les implants est présentée figure 73. Aucune différence statistiquement significative n'est mise en évidence entre les implants neufs et vieillis par photo-oxydation (test t de student au risque $\alpha = 0,05$). Toutefois, à niveau d'irradiance égale, la fibronectine adhère moins sur les implants vieillis hors milieux aqueux. A l'inverse, en milieu aqueux la quantité de fibronectine adhérente augmente sensiblement. Ces résultats confirment l'existence de modifications de la chimie de surface faisant varier l'affinité de l'implant pour la fibronectine^{31,115,218,222,234}. La différence peut trouver son origine dans l'absence de relargage des CFMM généré au cours de la photo-oxydation sans hydrolyse. Cet élément conforte les résultats d'ATG et de relargage lesquels prouvent qu'au cours du vieillissement un gradient de CFMM se met en place dans la partie superficielle de l'implant. Ce gradient modifie en conséquence la chimie et la rugosité de surface ainsi que la biocompatibilité.

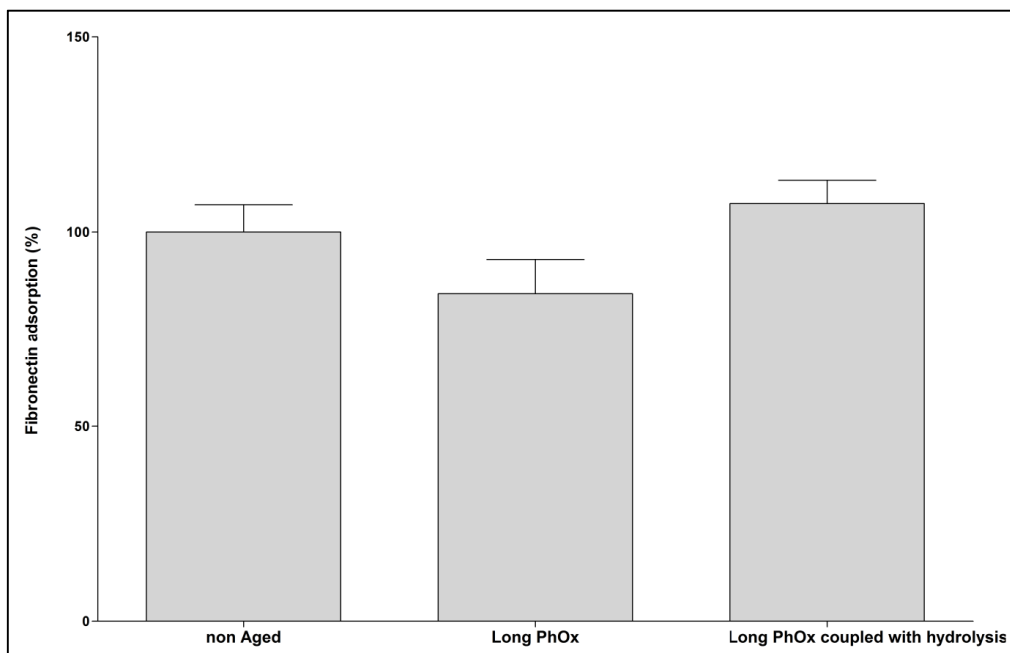


Figure 73 : Quantité relative de fibronectine adsorbant sur la surface totale des implants en fonction du vieillissement

La quantité de fibronectine adsorbée à la surface des implants dépend directement des propriétés de surface. L'analyse par AFM a montré l'absence de modification du contraste de phase au cours du vieillissement mais l'apparition de structures caractéristiques du PHEMA en surface. La rugosité R_a reste stable lors d'une photo-oxydation seule mais augmente lors du vieillissement par photo-oxydation combinée à l'hydrolyse. La rugosité peut être évaluée selon la surface projetée, ou surface réelle disponible pour l'adhésion protéique (figure 74). Il

n'existe pas d'association entre la surface projetée moyenne et l'adhésion de fibronectine en surface des implants.

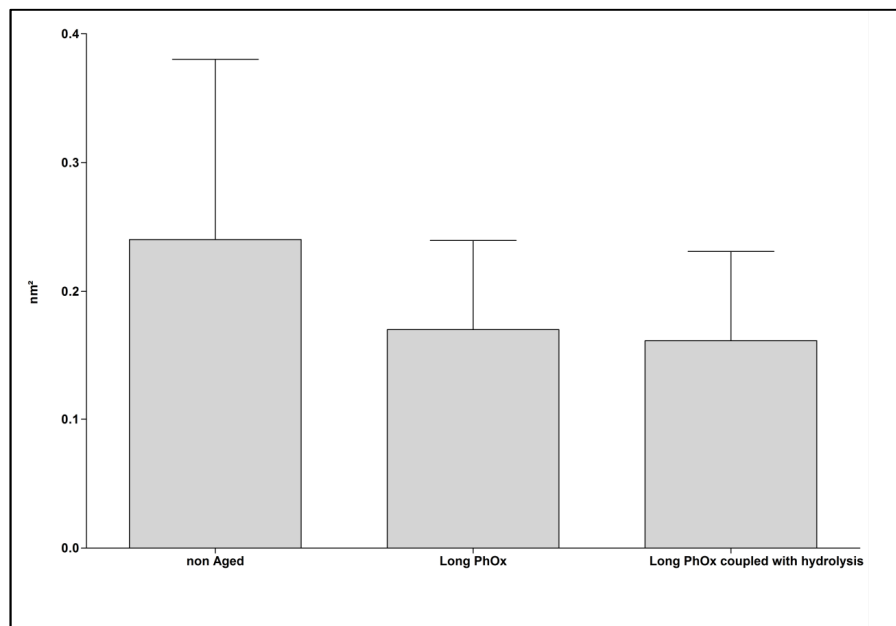


Figure 74 : Taille de surfaces projetées en fonction des conditions de vieillissement

D'autres paramètres sont connus pour intervenir dans l'interaction entre les copolymères et les protéines. La charge de surface et l'hydrophobicité sont les principales. Des essais complémentaires d'analyse de surface par spectroscopie photoélectronique à rayons X ont montré que la photo-oxydation modifie les propriétés atomiques des liaisons carbonées. Cette transformation moléculaire n'est cependant pas homogène sur la surface mais révèle l'existence de deux types de structures. Cette transformation, liée au vieillissement, pourrait expliquer la modification de densité d'adsorption de la fibronectine. Elle apporte un argument supplémentaire prouvant les différences du vieillissement des implants, issus de lots identiques ou non, exposés à des conditions identiques. Les changements de la structure moléculaire de surface sont liés au relargage progressif de CFMM plus ou moins polaires. À mesure que la photo-oxydation génère des CFMM polaires, la surface acquiert une polarité différente expliquant la diminution d'adsorption protéique. L'hydrolyse combinée permet le relargage des structures polaires diminuant *de facto* l'hydrophilie de la surface et améliore ainsi l'affinité pour les protéines dont la fibronectine^{31,197,233,234,262}.

Malgré l'altération de la surface et le changement de profil de rugosité, le paramètre prépondérant dans l'adsorption protéique reste d'hydrophobicité et non la surface totale disponible pour l'adsorption.

Une évaluation complémentaire de l'hydrophobicité de surface a été réalisée par mesure de l'angle de contact. Selon ces mesures, le vieillissement n'est pas un paramètre modifiant significativement l'hydrophobicité de surface.

IV. Induction de l'EMT

Une fois relargués dans l'humeur aqueuse, le devenir des CFMM n'est pas connu. Ils peuvent être rapidement éliminés par le canal de Schlemm ou bien avoir une action biologique. En effet, les monomères d'acrylates sont connus pour avoir une action intracellulaire, notamment dans l'activation du gène *Gsta1*^{239,258,261,263,264}.

Selon ce second scénario, les résultats de la figure 75 montrent l'action de l'EGPEA à différentes concentrations, cytotoxiques ou non, sur la cascade biochimique connue du développement de la PCO.

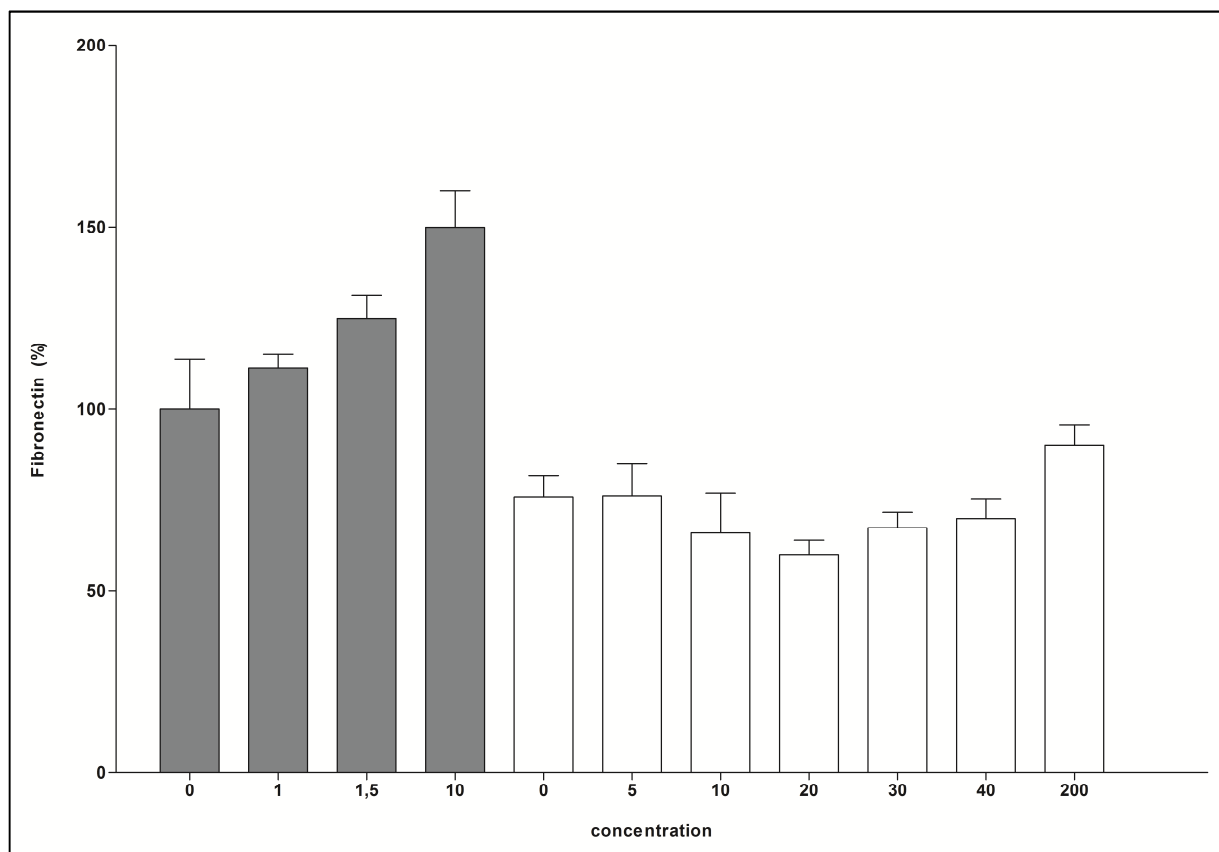


Figure 75 : Taux relatif d'expression de fibronectine par les hLECs

TGFβ2 de 1 à 10 ng/ml (noir) ou EGPEA de 0 à 200 µg/ml (blanc).

Le facteur de croissance TGF-β2 induit une production de fibronectine, sécrétée par les cellules épithéliales du cristallin, concentration dépendante. La viabilité cellulaire mesurée par

MTT ne montre pas de différence significative avec le contrôle négatif fixé comme la valeur relative 100% dans le modèle d'étude.

L'EGPEA a un effet inverse sur le taux de sécrétion de fibronectine. Entre les concentrations 0 et 20µg/mL, la quantité relative de fibronectine diminue significativement (test *t* de student au risque $\alpha=0,05$; $p<0,05$). Celle-ci augmente de nouveau à partir de 30µg/mL. Cette fluctuation suit l'apparition de la cytotoxicité entre 30 et 40 ppm (figure 68). À 200ppm d'EGPEA, le taux de fibronectine produit est supérieur à celui de blanc. Ce résultat est dû à l'apoptose cellulaire.

L'augmentation de production de fibronectine indique que la lignée cellulaire utilisée est sensible aux stimuli du TGF-β2. Cependant, l'identification de la voie intracellulaire et l'effet de la production supplémentaire de fibronectine sur la cellule m'ont pas pu être établis. Selon le principe qui implique une corrélation entre le TGF-β2 et la production de fibronectine, l'effet de l'EGPEA sur le taux de fibronectine indiquerait un effet biochimique du monomère par une action intracellulaire. Ainsi, la diminution de production de fibronectine pourrait avoir une conséquence sur la prévention de la PCO selon la théorie du sandwich en diminuant la force d'adhésion entre la capsule et l'implant²⁰. L'implication du TGF-β2 dans la cascade de transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse pose la question d'un effet potentiel, direct ou indirect, de l'EGPEA, et par extension des CFMM de l'implant, dans la physiopathologie biochimique^{30,190,239}.

Les analyses de la morphologie cellulaire ne permettent pas dans mettre en avant de différence dans les groupes TGF-β2, EGPEA aux concentrations non cytotoxiques et dans les contrôles négatifs.

Les premiers essais d'induction de l'EMT ont été réalisés avec l'EGPEA pour pallier aux faibles quantités de CFMM relargués lors du vieillissement. Les concentrations et l'instabilité des CFMM n'ont pas permis de concentrer les échantillons afin de les utiliser sans risquer une mort cellulaire liée au facteur de dilution du milieu de culture. Les essais réels d'induction de la synthèse de fibronectine pourront être réalisés dans des solutions de vieillissement après une plus longue photo-oxydation.

Les effets obtenus par le TGF-β2 et l'EGPEA sont à prendre avec précaution. En effet, il existe de multiples voies de signalisation intracellulaires modifiant la production de fibronectine des cellules épithéliales de cristallin. De même, l'ensemble des travaux conduits pour expliquer la physiopathologie de la transdifférenciation ne donne pas la même importance ou le même rôle à la fibronectine^{30,176}.

Le choix de la lignée cellulaire est important dans l'évaluation des conséquences histologiques et biochimiques que peuvent avoir les composés relargués en cours de vieillissement. En effet, la lignée cellulaire utilisée n'est pas une lignée cataractée. Chaque lignée possède ses propriétés biochimiques propres pouvant faire varier la pertinence d'un modèle et l'effet obtenu pour les mêmes stimuli²⁴⁸.

Les résultats obtenus pour de fortes concentrations d'EGPEA montrent que l'évaluation de la viabilité cellulaire, ainsi que la mesure de l'apoptose, doivent être prise en compte. Ces résultats complémentaires doivent limiter le risque de conclure à tort d'un effet des échantillons sur la production et la libération de la fibronectine.

Globalement, l'action intracellulaire supposée des CFMM, combinée à la variation d'adhésion de la fibronectine en surface de la lentille, ainsi que la dépolymérisation partielle de l'implant débutant par les bords, prouvent l'évolution de la biocompatibilité en fonction des phénomènes de vieillissement. De l'ensemble des connaissances scientifiques actuelles, cette modification de la biocompatibilité constitue un risque de développement de PCO tardives.

Discussion

Les travaux que nous avons conduits sur les implants en VISTA[®] confirment l'existence de modifications de leurs propriétés thermodynamiques, de leur surface et de leur biocompatibilité en fonction des conditions de vieillissement.

Notre approche confondante transversale et multiparamétrique n'a, à notre connaissance, jamais été employée dans l'évaluation des implants intraoculaires. L'ensemble des travaux publiés, relatifs à l'évaluation préclinique des lentilles intraoculaires, ne concerne que certains points de la performance optique et de la biocompatibilité de ces implants.

Fujita *et al.*, ont évalué la corrélation entre le glistening, la rugosité de surface et l'adhésion cellulaire. Le vieillissement a été réalisé par 24 heures d'hydrolyse. Leurs conclusions indiquent qu'un copolymère PHEMA-co-polyméthacrylate, proche de celui d'en VISTA[®], est adapté pour garantir une bonne adhérence cellulaire et, par extension, une bonne biocompatibilité. Ce copolymère est, selon leurs travaux, le compromis idéal pour les implants futurs. Nos résultats ne confirment pas les leurs. Cependant, les conditions de vieillissement que les auteurs ont mis en œuvre ne leur permettraient pas d'atteindre les modifications de surface que nous avons observées en AFM après photo-oxydation combinée ou pour des temps d'hydrolyse supérieurs²⁶⁵.

Kawai *et al.*, ont proposé une évaluation d'implants en acrylates hydrophobes vieillis par hydrolyse forcée à 100°C durant 115 jours dans 50 millilitres d'eau ultra pure. Leurs travaux ont porté sur l'évaluation globale des implants après vieillissement. Les auteurs rapportent l'apparition d'un jaunissement du copolymère, la formation de glistening et de craquelures ainsi que le blanchiment de surface de certains implants. Leur évaluation n'a pas porté sur les propriétés thermodynamiques et le relargage de CFMM au cours du vieillissement²⁶⁶.

Yang *et al.*, ont évalué l'impact sur des lentilles intraoculaires artificiellement vieilles de 50 ans par exposition aux UV hors milieu aqueux. Leur investigation, ainsi que celles similaires menées par d'autres équipes, ne s'est portée que sur le maintien des performances optiques d'implants en silicone. Selon leurs travaux, l'implant ne subit aucune modification notable outre une diminution de sa résistance à la traction^{267,268}.

Francese *et al.*, ont évalué l'effet de l'hydrolyse et du vieillissement aux rayons UV, sur la morphologie de surface d'implants en silicone d'une part ainsi que sur la transmission visuelle d'autre part. Seule la performance optique a été évaluée, les autres modifications n'ont pas été étudiées ou discutées²⁶⁹. Les autres études portant sur le vieillissement se focalisent majoritairement sur l'évolution de l'accommodation des patients porteurs d'implants intraoculaires et ne discutent pas de l'influence du vieillissement des matériaux dans la perte de qualité visuelle²⁷⁰.

Werner. *et al.*, ont évalué le vieillissement artificiel des lentilles intraoculaires implantées chez le lapin. Les implants testés sont des implants hydrophobes autres que l'implant enVISTA[®] dont l'hydratation résiduelle n'excède pas 0,5%. Les animaux ont été exposés à une source reproduisant le spectre solaire à irradiance constante. Après un délai suffisant pour simuler 20 ans de vieillissement naturel, l'analyse des implants et des tissus n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les implants non vieillis artificiellement et ceux vieillis. Seul un jaunissement des implants est rapporté par les auteurs. Malgré le changement de couleur, la performance optique des implants reste conforme aux exigences des normes ISO 11979. Dans notre étude, par photo-oxydation ou lors de l'hydrolyse forcée de l'implant enVISTA[®], aucun changement de couleur ou blanchiment n'a été relevé. Des travaux similaires de l'équipe de Werner ont évalué le vieillissement par spectrométrie pour observer une perte de fragments de polymères ou de composés relargués. Selon leurs travaux, aucun relargage n'est mis en évidence lors du vieillissement des implants²⁷¹.

Malgré le manque relatif d'évaluations précliniques publiées concernant le vieillissement des implants intraoculaires, la démarche présente un intérêt certains. En effet, les polymères d'acrylates sont utilisés depuis plusieurs décennies dans de nombreuses applications médicales et industrielles. De nombreuses publications relatent leur vieillissement dans des conditions de photo-oxydation, sous l'effet de la température ou après implantation. Ainsi, Chiantore *et al.*, ont démontré la variabilité de la stabilité des polymères d'acrylates selon les conditions de vieillissement. Exposés à la photo-oxydation, les acrylates et les méthacrylates se dépolymérisent plus qu'ils ne réticulent si les chaînes alkyles sont courtes. La stabilité des copolymères d'acrylates dépend directement de la proportion de chacun des composants^{36,147}. De plus, ces auteurs ont indiqué que l'équilibre entre les phénomènes de scission et de réticulation des chaînes alkyles, lors de la photo-oxydation, était liés au nombre de carbones des chaînes alkyles latérales. Selon leurs travaux, les méthyle acrylates ont tendance à se rompre de même que les éthyle acrylates alors que les butyles acrylates subissent plus de

réticulation. Toutefois, ces derniers ne sont pas protégés des scissions de chaînes dues à la thermodégradation. Ils démontrent également de l'existence simultanée d'une scission et d'un réassemblage des chaînes alkyles lors de la photo-oxydation³³. Ainsi, le vieillissement des résines acryliques, contenant des éthyles et des méthyles esters, se manifeste par un équilibre entre la dégradation et le réarrangement chimique. Cela confère à ces polymères une bonne stabilité aux conditions de vieillissement¹⁴³

Konaganti *et al.*, ont été les premiers à prouver et documenter l'existence d'une cinétique de dépolymérisation des copolymères de poly(méthyle méthacrylate-co-alkyles acrylates) (PMMA-PEA). Leurs travaux démontrent l'existence d'un comportement différent des matériaux selon la longueur des chaînes alkyles et la proportion de l'alkyle acrylate dans la composition totale. Tous les alkyles acrylates n'ont pas le même comportement à l'oxydation et à la température. Ainsi l'éthyle acrylate (EA) ne subit pas de dommage par oxydation. Sa dégradation est uniquement liée à des scissions aléatoires des chaînes. L'effet se répercute sur la stabilité du copolymère PMMA-PEA à la photo-oxydation. La dépolymérisation, par scission aléatoire des chaînes et l'oxydation, est inversement proportionnelle au pourcentage d'EA. Ces travaux confirment l'intérêt des longues chaînes alkyles dans la stabilité des polymères à la photo-oxydation (méthyle acrylate (MA) < EA < butyle acrylate (BA)). Cet ordre est immuable quelle que soit la proportion de l'alkyle acrylate. La longueur des chaînes carbonées et l'encombrement stérique évoluent de paire avec la résistance à la photo-oxydation³⁶. La stabilité des copolymères de méthyle méthacrylate-co-alkyles acrylates suit la même tendance quel que soit l'alkyle acrylate (BA, EA ou MA). Plus la chaîne alkyle est longue, plus celle-ci est stable à la photo-dégradation mais instable à la thermolyse³⁴.

La réticulation d'un copolymère modifie également le comportement aux phénomènes de vieillissement. La réticulation d'un copolymère réduit sa vitesse de photo-dégradation¹⁴⁴. De plus, la photo-oxydation favorise la réticulation d'autant plus que la teneur initiale de diméthacrylate est importante²⁷². Pintus *et al.*, ont notamment démontré que la réticulation des acrylates se produit plus facilement lorsque la température imposée, dans les conditions de vieillissement, est supérieure à la température de Tg¹⁴⁶

La grande variabilité des conditions de vieillissement sur les modifications des copolymères d'acrylates nous ont conduit à utiliser un milieu de vieillissement le plus proche possible des conditions physiologiques intraoculaires. De fait, il a été établi que la photo-oxydation accélère la dépolymérisation des polymères, dont celle du PMMA, en comparaison avec l'effet de la température ou des photons seuls³⁶. La dégradation des polymères est

principalement due aux rayonnements UV (290nm – 400 nm). A ces longueurs d'onde, l'énergie fournie est suffisante pour casser les liaisons covalentes (C-C) et induire la formation d'éthers, d'aldéhydes, de formates. Le proche UV (280-390nm), émis par les rayons solaires, apporte une énergie suffisante pour cliver les liaisons (C-C) et les liaisons (C-hétéroatomes)¹³⁴. L'utilisation d'un arc au xénon plutôt qu'une lampe UV nous a semblée plus pertinente dans la mesure où il est proposé dans les normes ISO des lentilles intraoculaires et qu'il permet de s'approcher des conditions physiologiques intraoculaires.

La conception de l'humeur aqueuse artificielle est complexe à entreprendre. Aux conditions d'exposition aux UV et de température physiologique les antioxydants ne sont pas stables. De plus, les ions précipitent sous forme de sels. En outre, une matrice complexe mimant l'humeur aqueuse nous est apparue inutilisable pour de longue période de vieillissement artificiel. Le renouvellement continu du milieu, pour assurer un équilibre ionique et redox optimal, réduit la capacité de détection des phénomènes de relargages observés dans le cas des implants en VISTA[®]. En effet, le volume total nécessaire diluerait les CFMM relargués.

Nous avons également limité notre évaluation aux lentilles commerciales sans inclure de copolymères polymérisés en laboratoire. En outre, selon Schnabel *et al.*, l'origine du vieillissement des acrylates est double et doit être conduit sur le dispositif médical stérilisé final tel qu'il l'est avant implantation. D'une part, les impuretés internes ; à savoir les hydroperoxydes, les carbonyles, les liaisons insaturées, les résidus de catalyse et les transferts de charge médiés par l'oxygène et d'autre part, les impuretés incluant les traces de solvants, les contaminations externes, les additifs et les traces de métaux (Fer, nickel, Chrome contribuent également au vieillissement du polymère²⁷³.

De même, la photo-oxydation et la photo-dégradation peuvent être catalysées par la présence d'impuretés de synthèses, de produits de dégradations ou de sels métalliques tels que le TiO₂. L'humeur aqueuse est riche en ions métalliques dont les concentrations augmentent dans l'œil cataracté⁵³⁻⁵⁵.

L'implant en VISTA[®] ayant fait l'objet de nos travaux est constitué de styrène, d'un diméthacrylate (l'EGDM), d'un acrylate hydrophile le 2-HEMA et d'EGPEA. Le mécanisme de vieillissement par photo-oxydation à température physiologique, que nous avons mis en évidence, est lié à des scissions de chaînes qui interviennent en parallèle d'une réticulation permise par la température de transition vitreuse (28°C). La présence d'un diacrylate et de chaînes alkyles de faible longueur expliquent également à la dégradation du copolymère que nous avons observé^{120,154,274}.

L'analyse chromatographique des solutions de conservation et de vieillissement de ces implants montre la présence de CFMM issus notamment de la scission des chaînes alkyles. Une fois créés, ces composés diffusent au travers du copolymère puis migrent en surface jusqu'à leur relargage dans le milieu environnant. La présence des CFMM dans la solution de conservation prouvent qu'il s'agit d'un phénomène de vieillissement ayant lieu naturellement lors du stockage de l'implant. Deux des constituants de l'implant, le poly-HEMA (PHEMA) et les polyéthylène glycol, sont connus pour s'hydrolyser en éthylène glycol et diéthylène glycol. L'hydrolyse est proportionnelle au temps et semble expliquer une partie du phénomène de vieillissement que nous avons observé¹⁵⁰.

La chaîne latérale du poly-EGPEA est l'éthylène glycol phényle éther dont la formule brute est $C_6H_9O_2$. Cette chaîne latérale comporte une chaîne alkyle dont le nombre de carbones varie et un encombrement stérique lié au cycle aromatique. Le relargage observé en milieu aqueux, lors du vieillissement artificiel ou naturel est lié à l'hydrolyse des chaînes d'éthylène glycol contenues dans l'EGPEA et l'EGDM. La présence du noyau aromatique sur la chaîne alkyle de l'EGPEA rend ces CFMM néoformés facilement identifiables en RP-HPLC de par leur λ_{max} à 270nm. Les CFMM provenant de l'EGDM possèdent eux nécessairement une fonction acrylate. Celle ci peut, sous l'effet de l'exposition UV et la présence d'un milieu salin, réagir avec les chaînes libres du copolymère, lors de la diffusion et migration du CFMM. La fonction acrylate peut également réagir avec d'autres CFMM²⁵⁷. La perte des chaînes PEG de l'EGPEA se voit également en DSC. Neugebauer *et al.*, ont mis en évidence l'effet du greffage de polyéthylène oxyde sur la température de transition vitreuse du polystyrène. Celle ci est déplacée vers des valeurs plus importantes avec le greffage ce qui pourrait expliquer l'effet inverse sur le déplacement que nous avons observé²²⁸. En effet, la Tg de l'implant passe d'environ 70°C vers des températures plus faibles.

Le vieillissement initié par hydrolyse s'accroît par la photo-oxydation de l'arc au xénon.

Konaganti *et al.*, ayant démontré que la sensibilité à la photo-oxydation augmente à mesure que la proportion de l'alkyle acrylate diminue, la scission progressive des chaînes alkyles augmenterait ainsi la sensibilité de l'implant à la photo-oxydation³⁶.

La scission des chaînes et le relargage que nous avons observé interrogent quant à la toxicité des CFMM sur l'environnement biologique. La présence de résidus de synthèse dans les polymères d'acrylates a été décrite de longue date et reste encore aujourd'hui un élément commun à tous les implants en acrylate. Ces impuretés présentent un risque toxique pour l'organisme^{252,253,275-277}.

À ce jour, aucune étude n'a permis de caractériser les relargables à partir d'implants intraoculaires en acrylates ainsi que leurs échanges avec l'humeur aqueuse. Toutefois, la présence d'impuretés a été évoquée dans les travaux de Liliana Werner portant sur les causes d'opacification et de changement des couleurs d'implants intraoculaires. Ce travail a mis en évidence des structures terpéniques et cétoniques présentes sur les implants. Ces impuretés ont été attribuées à des impuretés de fabrication. En outre, en fin de polymérisation, des solvants sont utilisés pour extraire le maximum d'impuretés de synthèse et de monomères résiduels. L'auteure n'a cependant pas mis en évidence de phénomènes de dégradation du copolymère pour justifier l'apparition des composés chimiques identifiés²⁷⁸.

Seiss *et al.*, ont évalué le métabolisme de plusieurs monomères d'acrylate dont l'HEMA. Les acrylates subissent principalement deux voies de métabolisation. La première est la voie des valines transformant le méthacrylate en pyruvate et en CO₂. La seconde voie permet de métaboliser le méthacrylate en époxyde. Plusieurs voies secondaires de métabolisation sont décrites dont certaines liées aux cytochromes P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6)^{279,280}. Le cytochrome P450 2E1 posséderait également un rôle pivot dans le métabolisme des époxydes issus de la métabolisation des acrylate²⁸¹. Les premiers travaux concernant la toxicité des acrylates ont montrés que les produits de dégradation de méthacrylates possèdent un effet mutagène sur les brins d'ADN²⁶⁴. Il existe une relation entre la structure des acrylates et leur toxicité. La toxicité dépend également de l'électronégativité de la molécule. En effet, les acrylates sont plus électronégatifs que les méthacrylates ce qui leur confère une toxicité supérieure. En outre, il existe une corrélation entre la réactivité des monomères avec les groupes sulfhydryle du glutathion et la toxicité²⁶⁰.

De plus, il a été démontré que l'HEMA, le MA et d'autres acrylates possèdent une action d'inducteur sur l'expression du gène Gsta1. L'effet est supérieur pour l'HEMA qu'il ne l'est pour le MA, ce qui est corrélé à leur cytotoxicité. La différence semble être explicable par les structures chimiques et l'électronégativité propres à monomères^{258,260}

Yoshii E a montré l'importance de la toxicité des acrylates au regard de celle des méthacrylates pour des chaînes alkyles équivalentes. Le groupement hydroxyle et la lipophilie des composés augmentent la toxicité de l'acrylate. La pénétration cellulaire diminue avec la longueur des chaînes alkyles alors que la toxicité augmente. Cet auteur a également démontré le lien direct entre la cytotoxicité et la longueur des chaînes alkyles des acrylates. A l'inverse, les chaînes alkyles courtes des méthacrylates sont les plus toxiques²⁶³. Les produits de dégradation relargués à partir du PMMA, utilisé dans les prothèses osseuses, ont démontré un effet pro-inflammatoire dû à l'activation de voies intracellulaires dont celle de la NFκB et des

MAP kinases. Ces résultats indiquent qu'un passage intracellulaire des CFMM relargués des implants est possible de même qu'un effet sur l'activation de voies de signalisation intracellulaires. Ce mécanisme est d'autant plus vraisemblable que les CFMM comportent des carbones asymétriques impliqués dans la toxicité des acrylates^{260,261}. Les résultats de Yamanaka *et al.*, indiquent que la réponse cellulaire aux particules de PMMA n'est pas destructive mais qu'elle implique une activation de la réponse cellulaire par ubiquitination²⁶¹. Ce résultat pourrait expliquer l'absence de cytotoxicité des CFMM et l'augmentation sensible de la viabilité cellulaire en contact avec les solutions de vieillissement que nous avons testées. Les résultats obtenus en RP-HPLC indiquent qu'une grande partie des CFMM relargués sont des fragments de chaînes alkyles de l'EGPEA associés à un noyau aromatique. La présence de fonction carboxyle sur la structure des CFMM n'a pas pu être prouvée mais reste plausible aux vues des mécanismes de scission de chaînes latérales de copolymères en acrylates notamment pour l'EGPEA. Ni la toxicocinétique des acrylates ni celle des CFMM n'ont, à ce jour, été décrites dans la littérature scientifique. Les CFMM peuvent être éliminés par le renouvellement de l'humeur aqueuse, pénétrer dans les cellules épithéliales résiduelles ou encore franchir la capsule du cristallin pour passer dans l'humeur vitrée. La polarité ainsi que la faible masse présumée des CFMM, aux vues des propriétés rétentives obtenues par RP-HPLC, suggèrent leur capacité à pénétrer dans le noyau des cellules épithéliales A et E de cristallin.

L'action intracellulaire potentielle des CFMM a été évaluée au travers de l'impact de l'EGPEA sur la production de fibronectine. Selon Eldred *et al.*, la survenue de la PCO, et plus généralement la transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse, modifie la matrice extracellulaire²³⁹. Quelque soit la voie intracellulaire citée dans la physiopathologie de la cataracte, la fibronectine est exprimée en quantité supérieure dans la matrice extracellulaire. Plusieurs équipes ont utilisé la fibronectine comme marqueur de l'EMT au même titre que α -SMA, la vitronectine ou d'autres messagers intracellulaires^{49,51,188,190,239,249-251}

La lignée cellulaire, que nous avons sélectionnée, réagit au stimulus du TGF- β 2 qui est connu pour induire la voie de transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse²⁵⁰.

L'effet observé, par l'ajout croissant d'EGPEA, suggère une diminution de la production de fibronectine pour des concentrations non cytotoxiques. L'action sur la production de fibronectine serait liée à une action intracellulaire. L'action de l'EGPEA ne peut toutefois pas être directement transposée aux CFMM. Il est en effet impossible de déterminer l'effet potentiel des CFMM dont la cinétique de libération et d'élimination ne sont pas connues. De plus, les CFMM n'ont pas pu être quantifiés. L'absence de cette information complique

d'autant la transposition des résultats de l'EGPEA aux CFMM. Cependant, il est impossible à ce stade d'exclure une toxicité intracellulaire des CFMM, laquelle se manifesterait par une action directe ou indirecte sur les voies de signalisation.

La biocompatibilité des implants intraoculaires est également définie par leur interaction avec les cellules épithéliales résiduelles de cristallin et avec la capsule du cristallin. Cette seconde interaction joue notamment un rôle central dans la prévention de la PCO. De nombreuses publications scientifiques étudient cette interaction. Yamakawa *et al.*, ont conclu que les implants intraoculaires avec une surface lisse présentaient une meilleure biocompatibilité. De fait, l'adhésion cellulaire est réduite sur les surfaces lisses. Cependant, la morphologie cellulaire n'est pas différente entre les surfaces lisses et les surfaces rugueuses²²¹.

L'adhésion cellulaire sur l'implant est corrélée à deux facteurs principaux de l'état de surface :

- D'une part les propriétés chimiques. L'adhésion et la prolifération cellulaire sont plus importantes sur la surface des implants en acrylates hydrophobes qu'elle ne le sont sur celle des implants en silicone²⁸². Cette relation entre l'état de surface et l'adhésion cellulaire a été confirmée *in vivo* par la mesure de l'incidence de la PCO. Elle est plus faible pour les acrylates hydrophobes que les silicones⁹⁴.
- D'autre part, la rugosité Ra obtenue après polissage du matériau brut limite l'adhésion cellulaire^{219,221}.

Comme l'ont démontré les travaux de Linnola *et al.*, l'adhésion des cellules sur l'implant est facilitée par l'adhésion protéique, notamment la fibronectine^{20-22,193,195,198}. L'adhésion protéique, quantitativement et qualitativement, est liée aux propriétés chimiques de surface¹¹⁵. Par exemple, l'hydrophilie du polyéthylène oxyde limite, selon la longueur des chaînes de polyéthylène, l'adhésion protéique²²⁸.

Les différences de biocompatibilité observées entre certains implants peuvent s'expliquer autant par les propriétés chimiques de surface que par la rugosité. Plusieurs travaux scientifiques ont décrit les différences de rugosités initiales des implants. Les écarts observés sont expliqués par les procédés de fabrication (moulage, rugosité). Les écarts de rugosité sur les implants explantés sont imputés aux séquelles générées lors de l'injection de l'implant dans l'œil ainsi qu'aux phénomènes de vieillissements naturels^{29,154,254,283,284}.

Selon nos travaux, les implants en VISTA[®] neufs ont une rugosité faible et homogène au sein d'un même lot d'implants. Il apparaît que la rugosité et le profil de surface varient en fonction des conditions de vieillissement. L'analyse par AFM d'un implant proche de sa date limite d'utilisation a démontré une diminution de la rugosité Ra. Cet implant n'avait subi que

l'action de l'hydrolyse dans son conditionnement primaire. Toutefois, n'ayant pu conduire l'analyse sur plusieurs implants du même lot, il n'a pas été possible de déterminer l'origine de la différence.

Les modifications observées lors du vieillissement artificiel des implant enVISTA[®] s'apparentent à une restructuration de la surface visible par l'apparition de pics fins et hauts, de sillons et de dépressions plus profondes.

Dogru *et al.*, ont analysé la surface d'implants en acrylates hydrophobes Acrysof[®] après leur explantation. Leurs travaux confirment l'augmentation de la rugosité moyenne accompagnées de dépressions sur l'ensemble de la surface lors du vieillissement naturel²⁸⁵. Leurs observations concordent avec les nôtres, notamment l'augmentation du paramètre Rmin faites sur les implants enVISTA[®] après vieillissement *in vitro* par photo-oxydation combinée à l'hydrolyse. L'étude de Dogru *et al.*, ne fait toutefois pas de lien entre l'apparition des dépressions de surface et le vieillissement du polymère. De même l'adhésion protéique de surface n'est pas étudiée.

Mukherjee *et al.*, ont évalué la rugosité de surface de plusieurs implants explantés au cours de quatre années en y corrélant le taux de PCO. Leurs travaux ont démontré qu'il existe des différences de profil de rugosité entre les implants selon le copolymère constitutif. Les implants strictement hydrophobes ont un profil de rugosité fait de cratères sans présence de pics. Les implants hydrophiles en PHEMA sont les seuls à présenter une surface parsemée de pics importants suivis de dépressions. Cette structure est semblable à celles que nous avons imagées sur la surface des implants enVISTA[®] au cours de la photo-oxydation combinée à l'hydrolyse. Cette similitude prouve la présence de PHEMA en surface des implants enVISTA[®] ainsi que la modification de son expression au regard des implants neufs.

Des modifications de la surface de copolymères, selon les conditions de vieillissement et selon le milieu de contact, ont déjà été décrites. D Neugebauer a démontré que les copolymères de polyacrylates-co-polystyrènes et de polyacrylates-co-PEO placés en milieu aqueux forment des micelles orientant les molécules hydrophobes, à savoir les chaînes acrylates et styréniques, vers le centre. Les chaînes de PEO sont orientées vers la phase aqueuse²²⁸. De même, les travaux de Ishizone *et al.*, démontrent que la surface du copolymère de styrène-co-polyEGDM évolue également selon les propriétés du milieu environnant. A l'air, les chaînes de polystyrène occupent la quasi totalité de la surface. Lors de l'immersion en milieu aqueux, les chaînes se réarrangent pour externaliser les chaînes des Poly-EGDM hydrophiles²⁸⁶.

Selon les travaux de Cole *et al.*, le PHEMA associé aux chaînes de polyéthylène glycol confère aux surfaces des propriétés de biocompatibilité spécifique^{233,234}. En outre, le PHEMA et le greffage de PEG à la surface de matériaux hydrophobes limitent l'adhésion protéique et cellulaire selon la valeur de la température de dissolution critique (*lower critical solution temperature* ou LCST). Aux températures inférieures à la LCST, l'adhésion protéique et cellulaire est limitée. L'effet s'inverse lorsque la température du milieu dépasse celle du LCST. Le PEG diminue l'hydrophobicité. L'ajout de groupement hydrophobe en surface diminue l'effet du PEG par déplacement de la LCST vers des températures inférieures. Par conséquent, les auteurs ont démontré que la LCST est directement corrélée au taux de PEG greffé en surface des matériaux²³⁴.

Dans le cas des implants intraoculaires en VISTA[®], la légère augmentation de l'adhésion de fibronectine en surface, observée lors du vieillissement par photo-oxydation combinée à l'hydrolyse, peut être reliée à ce phénomène. Quelles que soient les conditions de vieillissement, nous avons constaté que les chaînes latérales de l'EGPEA se scindent au niveau des groupements d'éthylène glycol. La perte de PEG induit de fait une diminution de l'hydrophilie de surface et un déplacement de la valeur de LCST. Cette modification de la chimie de surface permet une adhésion plus importante des protéines. Toutefois, la différence d'adhésion de fibronectine en surface des implants vieillis n'apparaît pas comme étant statistiquement significative. Ce résultat peut avoir différentes explications.

D'une part, Cheong *et al.*, ont démontré que les CFMM peuvent se lier aux chaînes alkyles du copolymère par la formation de liaisons faibles. Le réassemblage de chaînes hydrophiles avec des CFMM hydrophobes est facilité dans des milieux salins tels que le milieu de vieillissement artificiel que nous avons sélectionné²⁵⁷. L'hydrophobie de la surface n'est toutefois pas compatible avec le milieu de contact. La mobilité des chaînes de polymère, permise par la température du milieu, facilite l'externalisation des groupements hydrophiles^{228,229,234}. Cela corrobore les résultats que nous avons obtenus en AFM, selon lesquels le PHEMA est externalisé au cours de la photo-oxydation combinée à l'hydrolyse. Selon le même principe, les chaînes de polyéthylène glycol doivent également être orientées vers le milieu aqueux. Ce réarrangement de surface, au cours du vieillissement, expliquerait d'une part la faible variation du taux d'adhésion de la fibronectine mais également l'allure des cinétiques de relargage des CFMM. Le réarrangement des chaînes, après photo-oxydation des chaînes orientées vers l'extérieur, faciliterait le relargage des CFMM piégés dans les couches superficielles de l'implant et offrirait de nouveaux substrats à la photo-oxydation. Ces deux mécanismes expliqueraient l'alternance de paliers et de libération rapide de CFMM mis en

évidence lors de la photo-oxydation combinée à l'hydrolyse. Selon les travaux de D'sa *et al.*, l'adsorption protéique sur une surface de polystyrène est améliorée par le greffage de PEG. Le vieillissement de ces chaînes pourrait expliquer les variations du taux de fibronectine observées. Cependant, il apparaît peu vraisemblable que le vieillissement en milieu aqueux aboutisse à une proportion supérieure de motifs styréniques exprimés en surface de l'implant^{235,286}.

De plus, selon les travaux de Tai *et al.*, qui ont porté sur le comportement d'un copolymère de PEGMEMA-PPGMEA-EGDM, les hydrogels, dont le PHEMA, subissent une réticulation à 37°C en fonction de l'irradiance totale perçue. L'importance de la réticulation dépend du taux de PEGMEMA et d'EGDM²⁵⁶. Or, plus le PHEMA est réticulé, plus sa capacité de gonflement par hydratation est faible. Cette modification diminue sa capacité à lier des protéines telle que la fibronectine¹⁵¹.

Les résultats des premières pertes de masse, obtenus en ATG, nous ont permis de démontrer que la répartition des polymères, dont le PHEMA, n'est pas homogène au sein du copolymère.

Ainsi, l'importance de la modification de la surface, et la capacité de réarrangement dépendent directement de la disponibilité de chaînes PHEMA et PEG présentes.

Par conséquent, la variation du taux de fibronectine adhérente en surface des implants est la résultante d'un mécanisme complexe de réarrangements et de scissions de chaînes. Les structures PEG scindées permettraient une externalisation des chaînes de PHEMA. La vitesse de réarrangement des chaînes en surface varierait en fonction de la répartition du PHEMA et de l'encombrement stérique. Ainsi, au cours du vieillissement, l'hétérogénéité de surface s'amplifierait alternant des zones plus hydrophiles et d'autres plus hydrophobes. Ces différences de cinétiques du réarrangement de la surface expliqueraient également, en partie, l'hétérogénéité de l'intensité du relargage que nous avons observée en RP-HPLC pour des implants, d'un même lot, exposés aux mêmes conditions de vieillissement.

La théorie du sandwich développée par Linnola place la fibronectine au centre entre la capsule et l'implant. L'affinité entre l'implant, la fibronectine et les cellules résiduelles de cristallin est donc très importante dans la physiopathologie de la PCO. Le motif RDG (arginine – glycine – acide aspartique) est celui par lequel les cellules épithéliales de cristallin se fixent, via les intégrines $\beta 1$, à la matrice extracellulaire. Il est d'ailleurs démontré que l'inhibition de cette liaison réduit l'incidence de la PCO^{214,287}.

Briz *et al.*, ont établi le lien entre les groupements fonctionnels exprimés en surface et l'adhésion de la fibronectine. Selon leurs travaux, la mobilité du groupe carboxyle des

acrylates influence l'adhésion protéique. Dans les méthacrylates, le groupe carboxyle est moins mobile du fait du méthyle ce qui diminue l'adhésion de la fibronectine. L'effet est avéré pour les groupements RGD et « FNIII 7-10 » de la fibronectine dont l'adsorption augmentent en fonction du taux d'alkyles acrylates exprimés en surface³¹. Ainsi, l'augmentation de l'adhésion de la fibronectine en surface n'est pas liée aux pics de PHEMA que nous avons observés en AFM. Le méthyle du PHEMA n'améliore pas l'adhésion protéique. De même, le maintien de la fonction méthyle au cours de la réticulation du PHEMA fait que sa capacité à lier la fibronectine ne varierait pas. Ainsi, l'augmentation faible de l'adhésion de fibronectine que nous avons observée ne peut être due qu'aux motifs alkyles présents en surface. Ces chaînes alkyles sont celles de l'EGPEA et de l'EGDM. Lors des phénomènes de vieillissement, les chaînes latérales de ces polymères se scindent et perdent de leur hydrophilie, ce qui par conséquent augmente leur capacité à lier la fibronectine. Selon Eldred *et al.*, la survenue de la PCO, et plus généralement l'EMT, modifie la matrice extracellulaire. La fibronectine et la vitronectine sont exprimées en quantité supérieure. Le nombre de domaine RDG de la fibronectine est directement lié au risque de PCO. En effet, l'adhésion des cellules épithéliales de cristallin par le motif RDG induit une augmentation de l'expression de α -SMA. Cette protéine est impliquée dans la physiopathologie de l'EMT^{239,250,288,289}

La quantification de l'adhésion cellulaire n'a pas pu être réalisée au cours de ce travail. Cependant, selon les observations de D'sa *et al.*, du fait de l'existence d'une relation entre les PEG, l'hydrophilie des surfaces et l'adhésion cellulaire sur des surfaces en PMMA, l'adhésion des cellules épithéliales de cristallin devrait également augmenter en fonction de la photo-oxydation combinée à l'hydrolyse^{233,235,290,291}. En effet, les travaux de Bozukova *et al.*, ainsi que ceux de Yen *et al.*, démontrent que l'adhésion cellulaire est facilitée pour les matériaux présentant des propriétés de surface amphiphiles au regard de ceux strictement hydrophobes ou hydrophiles. Leurs travaux ne précisent cependant pas le degré d'importance de l'homogénéité des copolymères mixte dans la biocompatibilité^{28,94}.

Selon les travaux de Folkman *et al.*, la concentration de PHEMA modifie les caractéristiques morphologiques des cellules adhérentes à la surface²⁹². Lombello *et al.*, ont confirmé ce résultat pour des cellules Vero dont l'adhésion est réduite sur des surfaces en PHEMA ou PHEMA-poly(MMA-co-AA). Cependant, ces auteurs ont observé que quelques cellules parviennent à adhérer. Leur morphologie diffère de celle habituellement observée pour des

cellules Vero adhérentes^{293,294}. De plus, selon les mêmes auteurs, l'adhésion des fibroblastes est directement associée à la densité de charge négative exprimée en surface des substrats²⁹⁴.

Versura *et al.*, ont démontré que l'adhésion cellulaire en surface de lentilles intraoculaires évoluent dans le temps. L'adhésion augmente avec le temps de contact pour les implants en PMMA alors qu'elle diminue pour ceux en PHEMA, silicone ou PMMA-Héparine. La cinétique réalisée par ces auteurs montre que les cellules ayant adhérees au PHEMA à la 24^{ème} heure prennent une morphologie ronde à la 72^{ème}. Celles dont la morphologie étaient étirée à la 24^{ème} heure semblent ne pas survivre à un contact plus long²⁹⁵.

Pintwala *et al.*, ont évalué la biocompatibilité uvéale du PHEMA en comparaison de celle du PMMA dans un modèle in vitro de cocultures de cellules épithéliales de cristallin (HLE-B3) et de macrophages THP-1. Leurs observations permettent de conclure que la coculture modifie significativement le comportement cellulaire sur le copolymère en comparaison de la monoculture de cellules de cristallin. L'adhésion des macrophages sur le copolymère diffère. L'adhésion au PHEMA est rapide dès la mise en contact. Cependant, dès le 2^{ème} jour de culture les macrophages ne sont plus présents en surface du polymère. A l'inverse, l'adhésion des macrophages sur le PMMA augmente avec le temps. Dans le cas du PHEMA, malgré l'absence d'adhérence, les macrophages sont activés et des microparticules marquées de CD45 et CD54 apparaissent. Ces marqueurs sont impliqués dans l'adhésion cellulaire. Ces résultats montrent d'une part l'effet répulsif du PHEMA vis à vis de l'adhésion cellulaire et d'autre part la modification de la biocompatibilité après contact avec les éléments biologiques. Au contact du PHEMA, les macrophages conservent leur capacité d'adhésion aux autres surfaces proches, dépourvues de PHEMA, dont celles couvertes de fibronectine. Les macrophages activés induisent alors la production de facteurs oxydants (ROS/RNS) lesquels agissent sur les cellules épithéliales de cristallin en augmentant leur expression d' α -SMA²⁴³. Ainsi, selon les observations de Pintwala *et al.*, les modifications de surface des implants en VISTA[®], que nous avons mises en évidence au cours de la photo-oxydation, en particulier les pics de PHEMA, constitueraient un risque de PCO particulièrement en cas d'uvéite. En effet, lors d'une inflammation intraoculaire, les pics PHEMA constitueraient des zones de la surface de l'implant propices à l'activation des macrophages. Les macrophages activés, à défaut de pouvoir adhérer aux « zones PHEMA » de la surface, pourraient se lier aux surfaces acrylates hydrophobes voisines dont les propriétés sont proches de celles du PMMA. L'activation des macrophages en surface par l'action du PHEMA voisin induirait alors un risque de transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales de cristallin présentes en surface et aux abords de l'implant.

L'ensemble de nos résultats ainsi que les observations des travaux scientifiques décrits sont liés à des études *in vitro*. La transposition des résultats de *l'in vitro* à *l'in vivo* est délicate notamment dans le contexte intraoculaire. En effet, en considérant les variations interindividuelles de l'effet filtre anti-UV de l'oeil, de la composition de l'humeur aqueuse, notamment des ions métalliques et du taux d'oxygène de l'œil, les polyacrylates peuvent vieillir différemment selon les patients¹⁴⁴. Cette multiplicité de schémas de vieillissement s'élargit encore en ajoutant les différences d'hygiène de vie et les comorbidités des patients²⁹⁶. Cependant, un grand nombre de phénomènes observés *in vivo* en clinique sont attribuables au vieillissement des copolymères et permettent de confirmer la pertinence de nos observations *in vitro* dans la prédiction du vieillissement *in vivo*.

Bozukova *et al.*, ont démontré l'effet bénéfique du greffage de chaînes de polyéthylène glycol, sur la surface d'implants en PMMA et en PHEMA, pour réguler l'adhésion protéique et la prolifération cellulaire^{297,298}. Cependant, l'effet sur la PCO ne semble être que transitoire. En effet, l'évaluation *in vivo* menée chez le lapin par Lee *et al.*, montre que le taux de PCO n'est plus différent après 6 semaines d'implantation. Au regard des résultats obtenus et de la stabilité des PEG à l'hydrolyse combinée à la photo-oxydation, la perte de l'effet du greffage, observée par Lee *et al.*, pourrait être la conséquence d'une perte du greffage similaire à la scission des chaînes de PEG de l'EGPEA que nous observons *in vitro* pour le copolymère d'enVISTA^{®232}.

Il existe peu d'études évaluant des lentilles intraoculaires explantées prouvant le vieillissement des copolymères. Cependant, le glistening, observé *in vivo*, est une conséquence du vieillissement des copolymères. Le phénomène a été décrit pour la première fois en 1985, les vacuoles sont retrouvées pour tous les implants dans la première année post-implantation. Les implants en acrylates hydrophobes du fabricant Alcon[®] sont associés à une incidence plus forte. Le type de copolymère et le procédé de fabrication sont directement associés au vieillissement de l'implant^{154,156,299}

Au cours du vieillissement, le réarrangement des polymères permet la formation de cavités ellipsoïdes. Elles sont également observées lors de l'hydrolyse de résines acryliques^{119,155}. Historiquement le glistening était attribué aux variations de température de l'implant et de l'humeur aqueuse. Saylor *et al.*, ont proposé la théorie selon laquelle le glistening se produirait également à température constante. Selon leurs travaux, les impuretés hydrophiles, les produits de dégradation de l'implant ainsi que les éléments du milieu de contact s'équilibrent au cours du temps par effet osmotique. La diffusion du milieu de contact dans

l'implant et l'apparition des cavités osmotiques sont constantes pour tous les implants. Selon les auteurs, l'échange est lent à température physiologique mais il apparaît que la diffusion du milieu dans l'implant est plus rapide que la vitesse de relargage des impuretés hydrophiles^{155,255}. Le phénomène de cavités osmotique confirme nos observations relatives au relargage de CFMM. Le relargage est donc la somme des caractéristiques physiques et chimiques des CFMM et de la sorption du milieu environnant, dans le copolymère. L'observation de ce phénomène en clinique appuie nos conclusions selon lesquelles un gradient de CFMM se forme dans les couches superficielles de l'implant en fonction des conditions de vieillissement. De fait, il est très probable que l'ensemble des phénomènes de relargage que nous avons identifiés, ainsi que les modifications du copolymère autant dans sa masse qu'en surface, se produisent *in vivo* dans des conditions réelles de vieillissement. Les observations de Saylor *et al.*, confirment également l'intérêt d'utiliser une solution saline isotonique comme milieu de vieillissement. Au cours de nos évaluations, aucune vacuole de glistening n'a été observée. L'implant étant hydraté à 4%, il nous a paru normal de ne pas observer de vacuoles hydrophiles. Nos résultats démontrent que malgré l'absence de vacuoles, les phénomènes de diffusion, dont elles proviennent, existent. Nos résultats confirment ceux déjà publiés et démontrant l'absence de vacuoles de glistening dans l'implant en VISTA^{®120,274,300}.

Outre les publications relatives au glistening, d'autres interactions entre le milieu de contact et l'implant intraoculaire ont été décrites dans la littérature.

Le cas le plus fréquemment publié est celui de la présence d'un dépôt huileux en surface dont l'origine est liée au procédé de fabrication et de stockage²⁷⁸. Des interactions de type diffusion entre les implants et les huiles de silicone ou l'amiodarone ont été rapportées^{111,112,301}. Apple *et al.*, ont conclu leurs travaux sur l'interaction entre l'huile de silicone et les implants en recommandant de limiter l'utilisation des matériaux incompatibles pour les patients atteints de pathologies de la rétine ou de l'humeur vitrée. En effet, l'intervention chirurgicale pour traiter ces pathologies peut nécessiter l'utilisation d'huiles de silicone¹¹¹.

Ong *et al.*, ont analysé des explants de lentilles à base d'acrylates hydrophobes pour déterminer l'origine des phénomènes de diffusion parasite de la lumière. Ce phénomène apparaît lors du vieillissement. Leurs travaux concluent à l'existence d'un nanoglistening dans la zone superficielle du copolymère. L'hydrolyse du copolymère hydrophobe provoque, après diffusion de l'humeur aqueuse, des aberrations lumineuses¹⁶¹. L'analyse faite par Matsuhima

et al., de lentilles intraoculaires disloquées a mis en évidence l'existence d'un blanchiment dans la zone superficielle dont l'origine n'est pas biologique. Le blanchiment est, selon les auteurs, lié à la pénétration de l'humeur aqueuse dans l'implant lors de son vieillissement naturel³⁰².

Morris *et al.*, ont analysé 49 implants récupérés après explantation. Leurs observations démontrent que le phénomène de nanoglistening (également dénommé *light scattering*) concerne tous les types d'implants et s'intensifie avec le temps. Le taux de nanoglistening varie selon les copolymères. D'après les auteurs, ceux en acrylates hydrophobes y sont le plus sujet^{162,303}.

Toutes ces études confirment l'existence de phénomènes d'échanges entre le copolymère et l'humeur aqueuse. Ces échanges semblent être liés aux conditions de vieillissement dans l'œil. En soit, les observations de diffusions, et la formation des phénomènes tels que le glistening et le nanoglistening, nous permettent de conclure que nos résultats sont en grande partie transposables *in vivo*. Au cours de leur vieillissement naturel, les implants en VISTA[®] sont sujets au vieillissement par hydrolyse et photo-oxydation dont la conséquence *in fine* est un relargage de CFMM. En outre, les modifications des propriétés thermiques et de la surface, toutes deux associées au mécanisme de relargage de CFMM, doivent se produire *in vivo*.

A ce jour, le manque de recul clinique chez l'Homme des implants en VISTA[®] justifie la faible production scientifique se rapportant aux études de performance sur la prévention de la PCO, notamment la PCO tardive avec ce type d'implant. Toutefois, les quelques investigations publiées confirment la prévention *in vivo* de la PCO à court terme. Ollerton *et al.*, ont notamment confirmé chez le lapin la diminution globale de l'envahissement cellulaire responsable de la PCO^{274,304}

Par conséquent, la transposition de nos observations *in vitro* vers l'*in vivo* ne peut pas être directement discutée. Toutefois, le glistening existe pour tous les implants, il est donc possible d'anticiper les risques de PCO dues aux modifications des propriétés des implants par l'analyse de la littérature.

Leydolt *et al.*, ont étudié la relation entre le glistening et la PCO au travers un suivi clinique de patients porteurs d'implants intraoculaires en acrylates hydrophobes. Tous les implants sont de forme identique (1 pièce à bords carrés). Chaque patient est implanté dans les deux yeux, selon le principe du témoin controlatéral, pour éliminer le biais des comorbidités du patient. Les deux implants testés sont produits par les fabricants Alcon[®] et Hoya[®]. Leurs travaux mettent en évidence une différence significative du taux de PCO entre les deux types d'implants laquelle ne peut être associée qu'au type de copolymère. Le taux de PCO est plus

important pour les implants Hoya[®]. A l'inverse, le taux de glistening est significativement supérieur pour les implants Alcon[®] (97% vs 0%)³⁰⁵. Selon les auteurs, les modifications visibles dans la structure de l'implant (glistening), ou leur absence, ne sont pas directement corrélées à la survenue de PCO. Toutefois, ces travaux ne prennent pas en compte la structure exacte du polymère et sa stabilité à la photo-oxydation. De plus, l'évaluation n'est faite que pour une durée de trois ans. Or, plusieurs auteurs soutiennent que l'évaluation *in vivo* des implants intraoculaires doit être faite sur une longue période. En effet, selon Mukherjee *et al.*, les implants en hydrogel de PHEMA présentent un taux de PCO supérieur à celui des implants en acrylate hydrophobe. La différence ne devient toutefois marquée que quatre ans après l'implantation. Cette différence tardive s'explique par l'existence d'une cinétique de biocompatibilité²⁹.

L'équipe de L. Vock a suivi une cohorte de patients porteurs d'implants en acrylates hydrophobes sur une longue période. Leurs conclusions indiquent qu'au delà de 10 ans d'implantation, l'effet protecteur de l'implant, dû à la nature du copolymère et à ses bords carrés, a disparu. Le taux de PCO à 10 ans est identique à celui dû aux implants en silicone à bord ronds³⁰⁶. Ces travaux sont une preuve clinique de l'évolution du copolymère lors de son implantation et de la modification de sa biocompatibilité sur le point spécifique de la cohésion avec la capsule.

De la même manière, Lundqvist *et al.*, ont conclu à la perte de l'effet barrière des implants en acrylate deux ans et demi après l'implantation. L'incidence de la PCO s'accélère entre deux et six ans après l'implantation puis ralentie de nouveau³⁰⁷

De même, Rønbeck *et al.*, ont établi, au cours d'un suivi clinique de 12 ans, qu'une accélération de l'incidence de la PCO survenait entre quatre et cinq ans après la chirurgie. Leurs observations font également état d'une cinétique d'incidence différente selon l'implant étudié. Les auteurs ont montré que, la PCO dépend de la nature des matériaux et non de la forme de l'implant après plusieurs années d'implantations. Toujours selon les auteurs, l'usure des bords carrés pourrait être l'explication majeure aux cas de PCO tardives²³

Ces travaux démontrent tous que les propriétés de géométrie initiale de l'implant permettent de prévenir la PCO uniquement durant les premières années post-implantation. Au delà, seule l'interface entre l'implant et la capsule assure la prévention tardive de la PCO. Il apparaît donc pleinement justifié de mener des travaux d'investigations précliniques pour définir *a priori* les modifications physiques chimiques et géométriques des implants.

Il apparaît également que les évolutions de la PCO à court, moyen et long terme peuvent être le reflet des variations de propriétés de surface en lien avec le vieillissement *in situ* du copolymère^{183,184}.

Aujourd'hui la prévention primaire de la PCO se fait grâce à l'effet barrière du bord carré des implants sur la progression des cellules épithéliales résiduelles de cristallin le long de la capsule^{49,116,118}. Nishi O *et al.*, ont démontré que la forme de l'implant était l'élément prépondérant dans la prévention de la PCO²⁷. Cette étude menée *in vivo* chez le lapin n'a cependant portée que sur des implants neufs. Or, nos travaux et les observations cliniques publiées démontrent que le vieillissement du copolymère survient sur une plus longue période. L'effet barrière est fortement dépendant de la liaison entre la capsule et l'implant. Celle-ci peut varier en fonction des modifications des propriétés de surface lors de la restructuration des chaînes du copolymère.

Chaque copolymère ne présente pas le même effet protecteur vis à vis de la PCO. Les travaux de Morgan-Warren P. ont comparé l'incidence de la PCO à deux ans pour trois implants de forme identique mais de copolymères différents. Les résultats confirment l'influence du copolymère et de la géométrie exacte du bord carré dans la survenue de la PCO²⁵.

La prévention de la PCO varie également selon les caractéristiques individuelles des patients. Les caractéristiques biochimiques et de prolifération des cellules épithéliales résiduelles sont propres à chaque patient^{49,175}. Ainsi, les propriétés de l'implant et la biologie exacte de la capsule du cristallin des patients vont fortement influencer le risque de formation de la PCO. Le facteur majeur est la capacité d'adhésion de l'implant à la capsule et des cellules à l'implant³². La théorie du sandwich développée par Linnola *et al.*, place l'adhésion de l'implant à la capsule au centre de la prévention de la PCO. Zhu X *et al.*, ont démontré que l'adhésion n'est pas systématique pour tous les patients. L'inadhésion concerne 41% des patients à J1 et encore 7% des patients deux mois après la chirurgie. L'inadhésion initiale perdure et s'accroît pour certains patients. Les auteurs ont conclu que, pour prévenir la PCO, l'affinité entre l'implant et la capsule semblerait plus importante que ne le serait l'adéquation entre la forme de la capsule du cristallin et celle de l'implant³⁰⁸. Ces travaux mettent en avant l'importance des caractéristiques physiologiques du patient, notamment la composition de la matrice extracellulaire de l'œil, dans la biocompatibilité des lentilles intraoculaires. Les variations de surface des implants, liées à la variabilité du procédé de polymérisation, peuvent également expliquer le délai plus ou moins long d'interaction entre la capsule et l'implant. Aux variabilités individuelles décrites par ces auteurs, nos travaux démontrent que les implants neufs possèdent des variabilités notables. Les écarts initiaux

entre chaque implant s'amplifient en fonction des conditions de vieillissement. L'association de tous ces facteurs de variabilité peut en partie expliquer les cas de PCO très précoces, les cas tardifs mais également l'absence de PCO pour certains patients plusieurs années après la chirurgie^{176,308}.

Outre les variations intrinsèques et extrinsèques dues vieillissement des implants, les comorbidités des patients, notamment l'inflammation, jouent un rôle majeur dans la biocompatibilité. Plusieurs études ont démontré que l'incidence de la PCO est corrélée à l'inflammation intraoculaire sous toutes ses formes (postopératoires, uvéites, syndrome de pseudoexfoliation)⁷. L'inflammation oculaire et la composition de l'humeur aqueuse augmentent la prévalence et l'intensité du glistening^{309,310}. Au regard des mécanismes intrinsèques corrélant les phénomènes de vieillissement des implants et le glistening, il est supposable que l'inflammation accélère le vieillissement des copolymères d'acrylates.

Outre le taux de glistening, l'adhésion cellulaire en surface des implants en acrylates hydrophobes est également supérieure chez les patients atteints d'uvéites chroniques²²¹. Cependant, de toutes les inflammations chroniques étudiées, le syndrome de pseudoexfoliation est la pathologie inflammatoire la plus souvent associée aux complications sur les lentilles intraoculaires (glistening, dislocation et PCO)³¹¹.

Les dislocations d'implants intraoculaires sont très liées à la présence d'une inflammation chronique et à un antécédent de vitrectomie. Elles surviennent en moyenne huit à dix ans après l'implantation^{153,167,168}. En outre, ces travaux scientifiques suggèrent que l'inflammation et le stress oxydant accélèrent le vieillissement du copolymère avec une augmentation de toutes les complications dont la dislocation du copolymère. L'action du stress oxydant sur la cinétique de vieillissement de l'implant n'a pas été évaluée. Toutefois, plusieurs de nos observations indiquent que l'effet de l'inflammation serait synergique avec celui de la photo-oxydation. En effet, toute réaction inflammatoire augmente la température des tissus touchés. L'hydrolyse des chaînes alkyles et éthylène glycols en serait accrue tout comme lors d'une surexposition de l'implant à la température lors de l'hydrolyse forcée. Le lien observé entre l'inflammation chronique, le glistening et la dislocation suggère que l'inflammation chronique accélérerait le vieillissement de l'implant en VISTA[®]. De plus, les segments PHEMA, qui s'extériorisent lors des mécanismes de vieillissement de l'implant, sont connus pour induire une réaction inflammatoire ainsi qu'une augmentation du taux de PCO. De fait, il existe un risque que, au cours de l'implantation, les patients atteints d'inflammations chroniques puissent présenter un taux de PCO supérieur ou *in fine* une dislocation de l'implant. Par conséquent, d'ici à l'obtention d'un recul clinique suffisant ces implants ne

devraient pas être implantés chez des patients atteints de comorbidités inflammatoires. Le recul clinique des implants en VISTA[®] n'est à ce jour que de cinq ans. Il n'est donc pas possible de déterminer la tolérance des implants chez les patients atteints d'inflammations chroniques.

Selon les normes ISO, les conditions de vieillissement par photo-oxydation permettent de mimer deux ans de vieillissement naturel. De fait, la confirmation de nos résultats, par l'observation du vieillissement intraoculaire naturel chez l'Homme, ne pourra être effectuée qu'en 2017. En effet, les implants utilisés ont, pour la plupart, été produits en 2014 et vraisemblablement implantés en 2015. De plus, l'effet du vieillissement réel, sur l'incidence des PCO tardives, ne pourra pas être évalué avant 2019 soit cinq ans après l'implantation.

Actuellement peu d'études ont discuté l'intérêt de limiter l'utilisation des implants intraoculaires en fonction des comorbidités de patients. Apple *et al.*, ont proposé de limiter l'utilisation d'implants en silicone chez les patients sujets à une intervention pour vitrectomie. Braga-Mele *et al.*, ont proposé de recenser les situations pathologiques pour lesquels les implants multifocaux sont indiqués et les situations pathologiques pour lesquelles ils ne le sont pas^{111,113}. Il s'agit là des très rares publications discutant l'indication d'un implant en fonction du patient.

Conclusions

Ce travail a permis de définir une nouvelle stratégie d'analyse confondante, transversale et multiparamétrique permettant de mettre en évidence les mécanismes de vieillissement des lentilles intraoculaires.

Nous avons démontré la sensibilité des implants enVISTA[®] à l'hydrolyse et à la photo-oxydation. Les modifications s'observent au niveau des propriétés thermodynamiques et de la biocompatibilité des implants. Les conditions de vieillissement induisent une scission rapide des chaînes latérales du copolymère. Les entités créées diffusent au travers du polymère. Les moins polaires, et celles de masses moléculaires les plus grandes, réagissent entre elles ou avec le polymère. Ces phénomènes forment progressivement un gradient de composés néoformés dans la partie superficielle de l'implant. Les composés de faible masse moléculaire relargués dans le milieu sont stables à la photo-oxydation. L'absence de toxicité de ces composés n'est pas démontrée d'autant que les monomères, dont ils dérivent, possèdent un profil de toxicité intracellulaire agissant sur les propriétés biochimiques des cellules épithéliales de cristallin. Le gradient de concentration des CFMM modifie également l'état de surface. Par une succession de phénomènes de scission de chaînes et de réarrangements moléculaires, des structures hydrophiles s'expriment de manière hétérogène à la surface des implants. Parmi elles, les chaînes de poly-HEMA apparaissent comme les plus à risque dans la modification de la biocompatibilité. Le risque apparaît d'autant plus important que la modification de la surface semble commencer par les parties les plus fines des implants, à savoir les bords carrés dont le rôle dans la prévention de l'opacification capsulaire postérieure fait consensus. Les surfaces de poly-HEMA sont connues pour induire un risque supplémentaire d'opacification capsulaire postérieure. De plus, le poly-HEMA présente un caractère pro-inflammatoire et un effet répulsif vis à vis de l'adhésion protéique, lesquels augmentent le risque d'opacification capsulaire. Ces dernières observations interrogent sur le risque de l'utilisation des implants enVISTA[®] chez des patients atteints de comorbidités inflammatoires chroniques telle que l'uvéïte.

Notre travail a également mis en évidence la variabilité des propriétés initiales des implants intraoculaires qui implique une variabilité de la cinétique de leur processus de vieillissement. Le copolymère utilisé dans l'implant enVISTA[®] subit d'avantage de restructuration de chaînes lors d'une hydrolyse forcée au regard de l'hydrolyse combinée à la photo-oxydation. L'alternance entre l'exposition UV et l'absence d'exposition (alternance jour/nuit) va pondérer la vitesse du mécanisme de vieillissement de l'implant et pourra, à terme, expliquer la survenue de complications chez certains patients, en fonction de leur hygiène de vie.

D'une manière plus générale, les résultats de notre travail confirment la nécessité de développer une approche préclinique transversale multiparamétrique et confondante dans l'évaluation des dispositifs médicaux implantables. Celle-ci doit porter sur des éléments spécifiques de sécurité et de biocompatibilité pour prévenir la survenue de complications lors de leur utilisation en phase clinique chez des patients atteints de comorbidités. Cependant, l'évaluation scientifique de dispositifs médicaux se heurte à de nombreuses limites.

La première concerne le milieu de vieillissement artificielle pour l'évaluation *in vitro*. Comme l'ont montré nos travaux, l'utilisation d'un milieu physiologique s'avère indispensable pour respecter les mécanismes d'échanges entre le milieu et l'implant par effet osmotique. Toutefois, tous les composants biologiques d'intérêts ne peuvent pas y figurer en raison de leur manque de stabilité nécessaire pour couvrir l'intégralité du temps de vieillissement. Dans l'exemple des lentilles intraoculaires, l'utilisation de l'acide ascorbique n'a pas pu être mise en œuvre du fait de sa vitesse d'oxydation élevée. Nous avons priorisé un volume de solution de vieillissement faible qui nous a permis de détecter le phénomène de relargage de CFMM. La photolabilité de l'acide ascorbique aurait nécessité un renouvellement continu de la solution de vieillissement. Cette démarche aurait nécessité un volume totale important, ce qui n'était pas envisageable dans la mesure où les composés de faible masse moléculaire relargués sont de structure et de stabilité inconnue. En outre, les éléments composants un milieu de vieillissement artificiel doivent être basés sur un compromis entre leur rôle dans les mécanismes de vieillissement et leur stabilité.

Outre les conditions de vieillissement, l'étude d'un dispositif médical démarre elle-même par la sélection de méthodes discriminantes pour la mise en évidence des propriétés et de leurs évolutions au cours du vieillissement. Dans le cas des implants intraoculaires enVISTA[®], les méthodes analytiques de détermination des propriétés thermodynamiques ont conduit à des informations complémentaires. L'ATG a été plus pertinente pour cerner au mieux l'ensemble des restructurations de CFMM et les variations de l'eau de plastification. Les signes de

vieillessement des matériaux, notamment la détermination de la genèse des CFMM, nécessitent le choix d'une méthode analytique sensible et résolutive. La méthode RP-HPLC couplée à un détecteur à barrette de diodes que nous avons développée est, à notre connaissance, la première ayant permis le dosage concomitant de monomères constitutifs d'un implant et la détection de leurs produits de dégradation.

Le choix du milieu de vieillissement, et des outils analytiques les plus adaptés, peut-être biaisé par le manque de connaissance de la composition exacte du dispositif médical. En effet, la composition qualitative en monomères et en additifs n'est pas toujours accessible. Quand bien même celle-ci est connue, les propriétés intrinsèques d'un copolymère vont fortement varier selon les protocoles de synthèse et de fabrication. De fait, en l'absence de la composition exacte d'un dispositif médical, toute évaluation doit débiter par la caractérisation du matériel neuf pour en déterminer les performances et notamment les variabilités inter lots de ses propriétés physico-chimiques. Celle-ci peut ne pas être suffisante et doit quelque fois inclure l'étude de polymères expérimentaux représentatifs. Dans nos travaux, la caractérisation des modifications de surface a pu être établie grâce aux études publiées sur des gels de PHEMA. De même, l'identification des CFMM issus des matériaux n'est que partiellement possible. Dans l'exemple des implants en VISTA[®], le profil spectral des CFMM a permis d'orienter le raisonnement vers la scission des chaînes de PEG de l'EGPEA. Sans cette caractéristique, les origines des CFMM auraient été aussi nombreuses que le nombre de composants du copolymère.

La caractérisation des dispositifs médicaux neufs, et de leurs mécanismes de vieillissement, peut également être limitée par la taille des échantillons. Les lentilles intraoculaires ont un diamètre moyen de 6mm² et pèsent environ 15mg. Ces contraintes, auxquelles s'ajoute le coût d'acquisition de ces dispositifs médicaux implantables (150 à 200 euros par implant intraoculaire), demandent une optimisation des investigations scientifiques. Dans notre étude, chaque implant a été utilisé à de multiples étapes pour minimiser les pertes. L'inconvénient majeur de cette démarche est d'une part, la conservation des implants entre deux étapes analytiques et d'autre part, la nécessité de valider les résultats de chaque analyse avant de passer à la suivante. La taille et le coût compliquent également la prise en compte de la variabilité intra et inter lots de production des implants. Ce dernier point explique la nécessité d'avoir une investigation scientifique multiparamétrique confondante pour identifier les mécanismes de vieillissement. De plus, l'acquisition des dispositifs médicaux pour l'évaluation ne doit se faire, selon nous, que par l'achat de références destinées à l'utilisation en clinique et non pas d'échantillons spécifiques. Ce principe de précaution permet d'avoir

une vision réelle de la variabilité des propriétés des dispositifs médicaux. Cela limite également le risque de travailler sur des dispositifs médicaux de qualité supérieure à celle acceptée par le fabricant en routine de production industrielle.

La composition exacte des dispositifs médicaux à base de matériaux plastiques est également indispensable aux utilisateurs pour juger de la sécurité qui leur est associée. La composition qualitative et quantitative peut également avoir son importance, notamment dans le choix de dispositifs médicaux contenant des substances toxiques telles que les phtalates. Dans la volonté de la commission européenne d'interdire l'utilisation des phtalates dans les dispositifs médicaux de pédiatrie et de perfusion, mais devant l'absence d'alternatives ou de détermination des taux exacts acceptables, un amendement à la loi du 24 décembre 2012 du code de santé publique propose d'utiliser les tubulures contenant une concentration en phtalate de bis (2-éthylhexyle) ou DEHP la plus faible possible. L'évaluation des taux de relargage au cours de l'utilisation présente donc un intérêt majeur de santé publique ainsi que pour les utilisateurs dans leur choix de référencement de dispositifs médicaux de perfusion. À l'exception de ce cas, aucun cadre réglementaire oblige le fabricant à communiquer aux utilisateurs la composition de ses dispositifs médicaux. L'information peut être quelque fois difficile à obtenir devant le secret industriel et les brevets associés.

Enfin, de nos jours, le nombre de signalements de cas de matériovigilances et de retours cliniques compliqués d'évènements indésirables plus ou moins graves augmente. Ces incidents peuvent être liés, comme dans le cas des dislocations d'implants intraoculaires, aux modifications du dispositif médical induites par les phénomènes de vieillissement. Les particularités du marché des dispositifs médicaux et la durée d'implantation de certains dispositifs nécessitent de renforcer les investigations précliniques. En effet, certaines complications directement liées au vieillissement du dispositif médical, telle que la dislocation, ne surviennent qu'après cinq ou dix ans d'implantation. Le délai entre l'implantation et la complication ne permet pas de juger l'incidence réelle lors des phases d'études cliniques. Celles-ci pouvant ne pas dépasser 1 année. Cependant, le recul sur les matériaux utilisés dans d'autres applications, ainsi que la connaissance des mécanismes de vieillissement et de la physiopathologie des complications permettent de renforcer la pertinence de l'évaluation préclinique pour repérer des situations à risque pour le patient. Cela paraît d'autant plus important que certains dispositifs médicaux ont un temps de commercialisation très court, lequel ne permet pas aux fabricants de financer de longues investigations cliniques. La courte durée de commercialisation de certains dispositifs

médicaux, liée à leur amélioration continue, rend caduque les retours cliniques faits dès leur publication.

L'utilisation des implants enVISTA[®] est un exemple transposable à l'ensemble des dispositifs médicaux implantables. Au regard des constats que nous avons fait sur les implants enVISTA[®], tout nouvel implant devrait avoir un déploiement clinique progressif, par étape, afin de minimiser les risques de complications graves liées au vieillissement du copolymère.

L'évaluation préclinique de la sécurité du dispositif devrait être établie sur des recommandations scientifiques actualisées régulièrement. Celles-ci devraient prendre en compte d'une part la notion du risque telle qu'elle est développée dans les normes ISO et d'autre part des tests *in vitro* proposés par consensus scientifique, ciblant les complications spécifiques. Ces tests devraient être en lien avec la biocompatibilité, associées à l'indication et le lien d'implantation du dispositif médical. La PCO et la dislocation des implants intraoculaires ainsi que la contracture capsulaire pour les prothèses mammaires en gel de silicone sont deux exemples parmi les dispositifs médicaux implantables les plus fréquemment utilisés.

Une fois les preuves de la sécurité préclinique apportées, les implants devraient alors être utilisés en phase clinique en deux temps. Chaque temps correspondant à une population cible. Dans un premier temps, tout implant nouvellement commercialisé, dont l'indication concerne une pathologie pour laquelle le diagnostic vital n'est pas engagé et dont les implants déjà utilisés assurent de bons résultats de performance et de sécurité, devrait voir son utilisation limitée aux patients sans comorbidités.

En effet, les patients atteints de comorbidités, telles qu'une inflammation chronique, ne devraient disposer que de dispositifs médicaux implantables pour lesquels le recul clinique réel est suffisant pour garantir leur sécurité à long terme. La précaution devrait être appliquée jusqu'à l'obtention des données fiables des complications en utilisation réelle. La mise en place de registres de suivi devrait permettre d'obtenir des données fiables et des signes d'alertes rapidement indentifiables. Après l'obtention de données cliniques rassurantes en utilisation réelle, non inférieures aux données des autres dispositifs médicaux, les implants pourraient alors avoir une indication étendue aux patients atteints de comorbidités.

Cette dernière étape serait permise sous couvert de résultats de tests précliniques spécifiquement développés pour observer les effets de conditions extrêmes sur les copolymères. Cette évaluation spécifique devrait prendre en compte les conditions physiopathologiques ainsi qu'une analyse transversale multiparamétrique et confondante comme celle décrite ici pour les implants enVISTA[®]. La définition des critères d'acceptabilité

devrait également faire l'objet d'un consensus pour améliorer l'identification du risque dès la phase préclinique.

Afin de répondre à l'obligation de moyens à laquelle sont soumis les chirurgiens, ce principe de déploiement progressif des dispositifs médicaux ne serait toutefois applicable que pour les références n'apportant pas d'innovation thérapeutique majeure.

Une telle démarche serait en principe compatible avec le marché des dispositifs médicaux et l'obtention du marquage CE, lors de la première demande, n'en serait de fait pas retardée.

Annexe 1 : Structure chimique des monomères d'enVISTA®

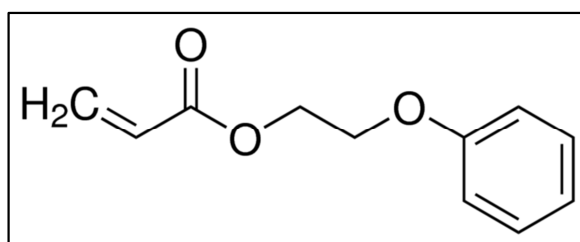


Figure 1 : Ethylene glycol phenyl ether acrylate

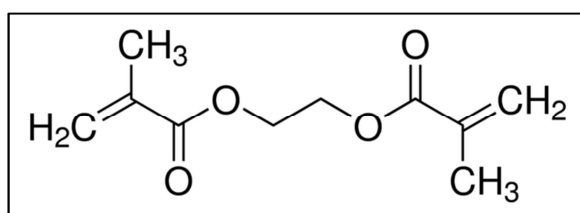


Figure 2 : Ethylene glycol diméthacrylate

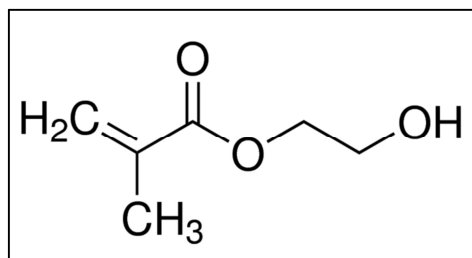


Figure 3 : 2-hydroxyméthyl méthacrylate

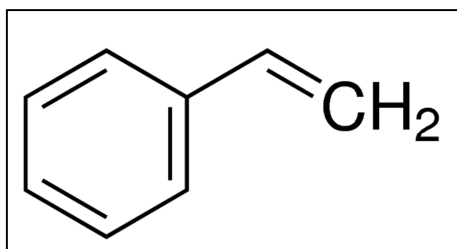


Figure 4 : Styrene

Annexe 2 : Validation de la méthode de dosage des acrylates en RP-CLHP

RP-HPLC DETECTION AND DOSAGE METHOD FOR ACRYLICS AND DEGRADATION PRODUCTS RELEASED FROM IMPLANTED MEDICAL DEVICES

Introduction

Acrylic monomers have physical and chemical properties which explain their use in the development of paintings, drug formulation¹ and medical devices²⁻⁵. Acrylics are commonly used for dental resins⁶ and intraocular lenses⁷. Research and development on acrylics is still very important and leads to frequent scientific publications⁸. Reticulated degrees, monomers proportions and additives are known to impact on acrylics' physical and chemical properties⁹.¹⁰. Stability depends on some aging conditions. Chiantore *et al.*, described modifications on acrylic polymers under photo-oxidation¹¹.

The acrylics' aging is commonly described in publications about acrylics' made medical devices' aging. Dental resins aging is characterized by color, roughness modification and acrylic release^{6,12,13}. From the few data available about IOLs aging, roughness modification, surface calcification or glistening are frequently quoted¹⁴. Lenses dislocations are described but the mechanism remains unidentified. According to Kato *et al.*, glistening could result from polymer's restructuration which indirectly confirms the presence of an aging process in the copolymer during time¹⁵. Those changes could lead to dislocations. Today, intraocular lenses' dislocations are correlated to comorbidity factors such as auto-immune diseases^{16,17}.

FDA and European agencies recently authorized a new type of IOL. EnVISTA[®] lenses (Bausch & Lomb, USA) contain a copolymer of 3 acrylics (two are hydrophobic and one is hydrophilic) mixed with styrene⁴. This new copolymer is unique. It is not part of any of the previously authorized intraocular lenses medical devices¹⁸. It combined both hydrophobic and hydrophilic monomers. Those chemical properties are supposed to decrease adverse events like glistening and posterior capsular opacification while limiting aging¹⁹. However, many previous studies have demonstrated the instability of styrene and polystyrene under ultra-

violet exposure²⁰⁻²². Some acrylics show anti-UV properties but can also depolymerize under solar exposure^{23,24}. The stability of this copolymer is unknown. A release of monomers, oligomers or depolymerized compounds could be possible. As proven before, acrylic are toxic. As a result, it is essential to avoid of the release of monomers and oligomers from medical devices^{25,26}. Infrared methods (Raman or IRTF) and separating technics (RP-HPLC, SEC or Mass spectrometry) are listed in scientific publications as quality controls but none of them is validated for routine quantification of monomers and degradation products²⁷⁻³². The goal of the present study is to develop a robust RP-HPLC method could be used to analysis of acrylics, styrene monomers and low-mass released compounds.

Materials and methods

Chemicals:

Mobil phase gradient is made of three HPLC-grade solvents: Acetonitrile (ACN), Water and Tetrahydrofurane (THF) all purchased from Fisher.

Seven acrylics were analyzed: Phenyl ether acrylate (PEA), phenyl ether methacrylate (PEMA) and 2 butanediol dimethacrylate (BD) were obtained from Polysciences (Germany): Ethylene glycol phenyl ether acrylate (EGPEA), 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA), Ethylene glycol dimethacrylate (EGDM), and styrene. All monomers were purchased from Sigma Aldrich Germany.

Chromatographic system:

The method is a classic Dionex HPLC by reverse phase paired with a diode array detector. All spectrums are registered with chromeleon software.

Separations are performed with an inverse phase column Kinetex 5µm for 250mm (Phenomenex United Kingdom).

Chromatographic conditions:

The mobile phase is a gradient of acetonitrile, water and tetrahydrofurane detailed in table 1. Twenty microliters of each sample are injected and analyzed at 30°C for 80 minutes of a 1ml/min flow gradient. All monomers are identified by their retention time and their 3D UV spectrum.

Table 1: gradient profile

Time min	H2O	ACN	THF
0	80%	20%	
45	25 %	75 %	
65		90 %	10 %
80	80%	20%	

Calibration procedure:

All monomers are weighted at 25°C and diluted in a mix of ACN and saline solution (NaCl 0.9% water). After preparation each sample is filtered before injection. All samples are injected 3 times. Calibration curves are obtained by plotting average pick area versus concentration using linear regression analysis. Each monomer is analyzed from 0 to 10 ppm.

Synthesized copolymers:

The EnVISTA® copolymer is made of 2-HEMA 30 %, EGPEA 40%, styrene 26%, EGDM 4%.

The copolymers are synthesized by radical polymerization using AIBN as initiator under nitrogen flow for 12 hours at 60°C. Then polymers are cooked for 12 hours at 95°C. Three methanol precipitations and three deionized water washes were done before aging the aging process.

Aging process:

Copolymers and monomers undergo an aging process by artificial sunlight full spectrum exposure in a xenon arc chamber (Qsun Xe-1, Labomat). Conditions are 48 hours irradiation with a power of 6.8mW/cm² from 300 to 400 nm at 20°C. A negative control is made at the same time in the xenon arc chamber but with a light protection made of aluminum.

Statistic:

ANOVA and t-test are performed on PRISM 5.0 software.

Results:

RP-HPLC method:

The present liquid chromatographic method is designed to separate and quantify all EnVISTA®'s monomers. It allows the identification of hydrophobic and hydrophilic acrylates and styrene. Each of them has a maximum absorbance at 218 nm and a specific retention time. Two monomers have a second maximum absorbance. EGPEA has its second maximum

at 270nm and styrene at 254 nm²². The retention parameters and the wavelength maximums are summarized in table 2.

Table 2: wavelength maximums

	RT min	λ max (nm)	K factor
2-HEMA	4,6	224	>2
EGDM	23	218	>2
EGPEA	24,5	270	>2
Styrene	27	254	>2

The RP-HPLC method developed shows the efficiency to separate all these monomers, with the separation coefficient K' higher than 2.

Table 3: method efficiency

	r²	Equation of calibration	Linearity α = 0.01	LO D	LOQ	Recovery
2-HEMA	0,999	Y= 6,2538 x + 0,117	0.23 -10ppm	0,07 ppm	0,23 ppm	99,6%
EGDM	1,000	Y= 15,464 x + 0,369	0.09 - 10ppm	0,01 ppm	0,09 ppm	99,8%
EGPEA	1,000	Y= 2,0526x + 0,123	0.11 - 10ppm	0,01 ppm	0,11 ppm	100%
Styrene	0,999	Y= 2,3006x + 0,0219	0.07-10ppm	0,08 ppm 7ppm	0,2 ppm	97,3%

In addition, reversed phase gradient elution is carried out using a mobile phase containing water, acetonitrile and tetrahydrofurane. This solvent mixture is a gradient. It was prepared in order to elute monomers with different polarities and solubilities. The validation data for recovery, linearity, detection and quantification limits are collected in table 3. For all standards the linearity ranges are statistically demonstrated from LQ to 10 ppm by regression analysis. All monomers linear regression coefficients are higher than 0,999 with relative standard deviation (RSD %) lower than 5% for all regressions.

The limits of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ) are also determined at approximately 3 times and 10-times the signal to noise ratio respectively.

According to these results, in terms of accuracy, sensitivity and reliability of the method, it can be applied to the residual monomers determinations in acrylic polymers. This method

could be used as a synthetic analysis for quality control of medical devices composed of acrylic polymers.

In the present work, the method is applied to the monitoring of monomers migration in a polymer stored in saline solution. The main interest of this method is to separate and analyse multiple acrylics and saline matrices at the same time.

The method is sensitive enough to quantify monomers under their cytotoxic concentrations^{25,26}. The contribution of this technic relies on the fact that it has both a low detection and quantification limits. It is also used in a saline matrix which resembles physiological saline. Therefore, it may be used in biological matrices, such as aqueous humor.

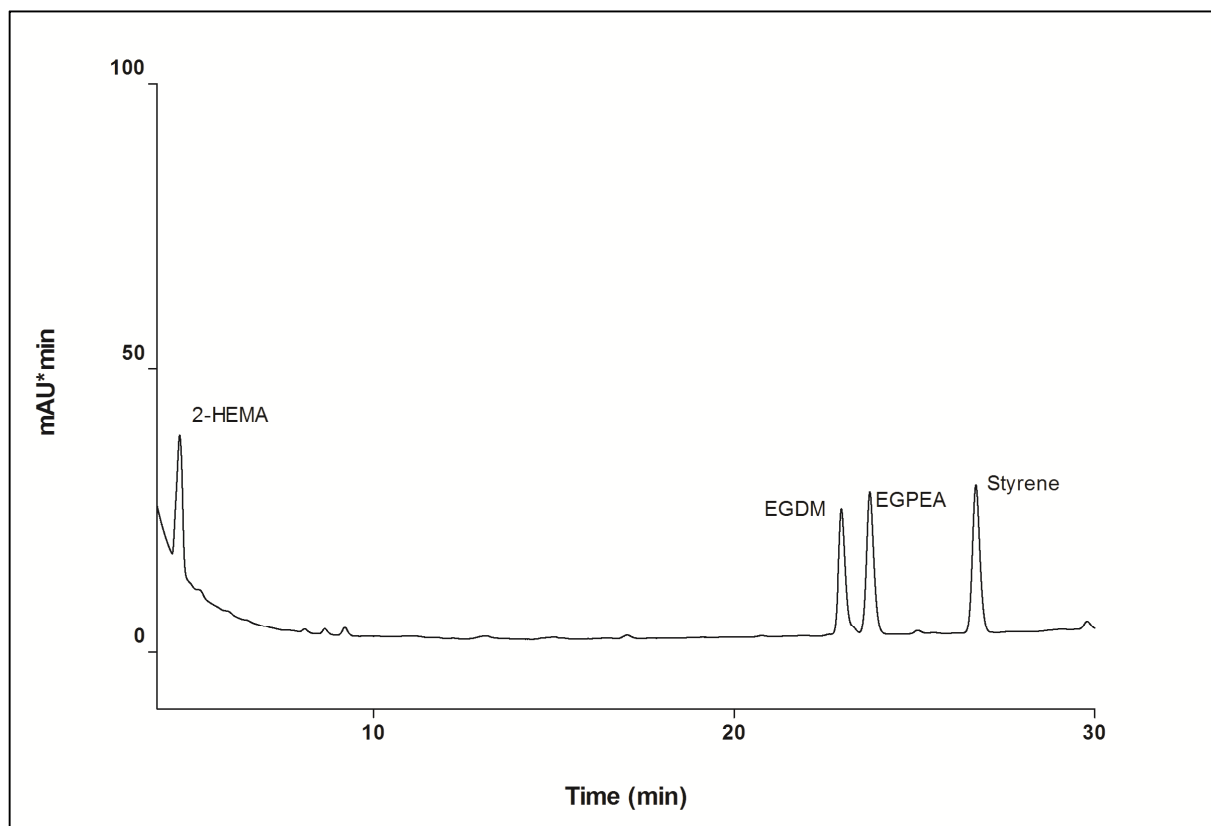


Figure 1: 228nm spectrum of 4 EnVISTA®'s monomers mixed at 5 ppm each.

The second part of this work consists on testing the method for the detectability of degradation products and released compounds during polymer synthesis and aging. Many different samples were analyzed on the present RP-HPLC method. In all cases, the method proved its efficiency to separate and quantify released monomers that did not polymerized, and separate the degradation products of the copolymer.

The monomers exposed to Xenon arc light have polymerized. This result confirms the previous observations^{9,11,20}. None of the monomer controls (same Xenon arc chamber but

hidden from light) polymerized. The temperature in the Xenon arc chamber did not affect the spectral characteristics of monomers (data not shown).

The copolymer was treated in the same conditions as monomers. The aging process changed the color of the acrylic/styrene copolymer. A yellow color appeared which could be the consequence of the styrene depolymerization or the acrylic alkyl chains recombination and/or scission^{20,24,25}

After the aging process, all the aged-copolymers and the controls were rinsed in pure saline water. These solutions were analyzed by RP-HPLC. The first observation is the important number of acrylic elements seen in the copolymers' aged solutions. Three dimensional chromatograms revealed the ubiquity of a 270 nm maximum for all eluted compounds. This maximum is identified as an "EGPEA-like" element. This maximum can be attributed to the phenyl function of ethylene glycol phenyl ethyl acrylate (figure 2).

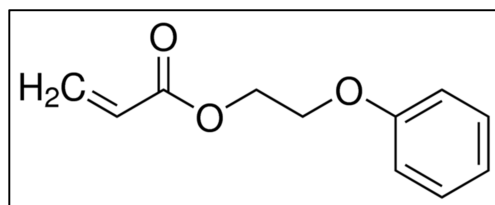


Figure 2: Ethylene glycol phenyl ether acrylate

Figure 3 and figure 4 are the comparisons of UV and no-UV area under curves of the 3 major compounds for both 218 nm and 270 nm wavelengths.

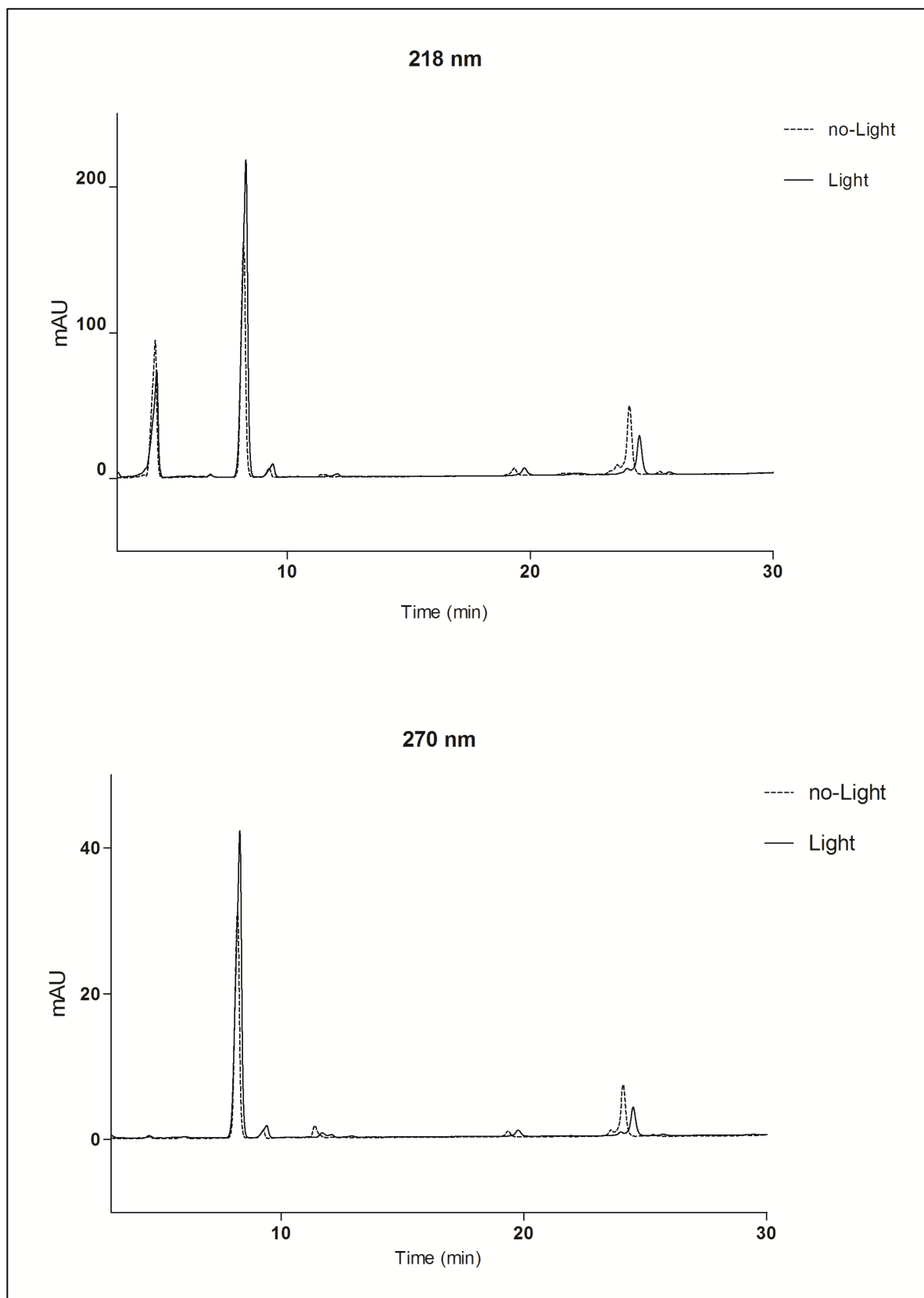


Figure 3

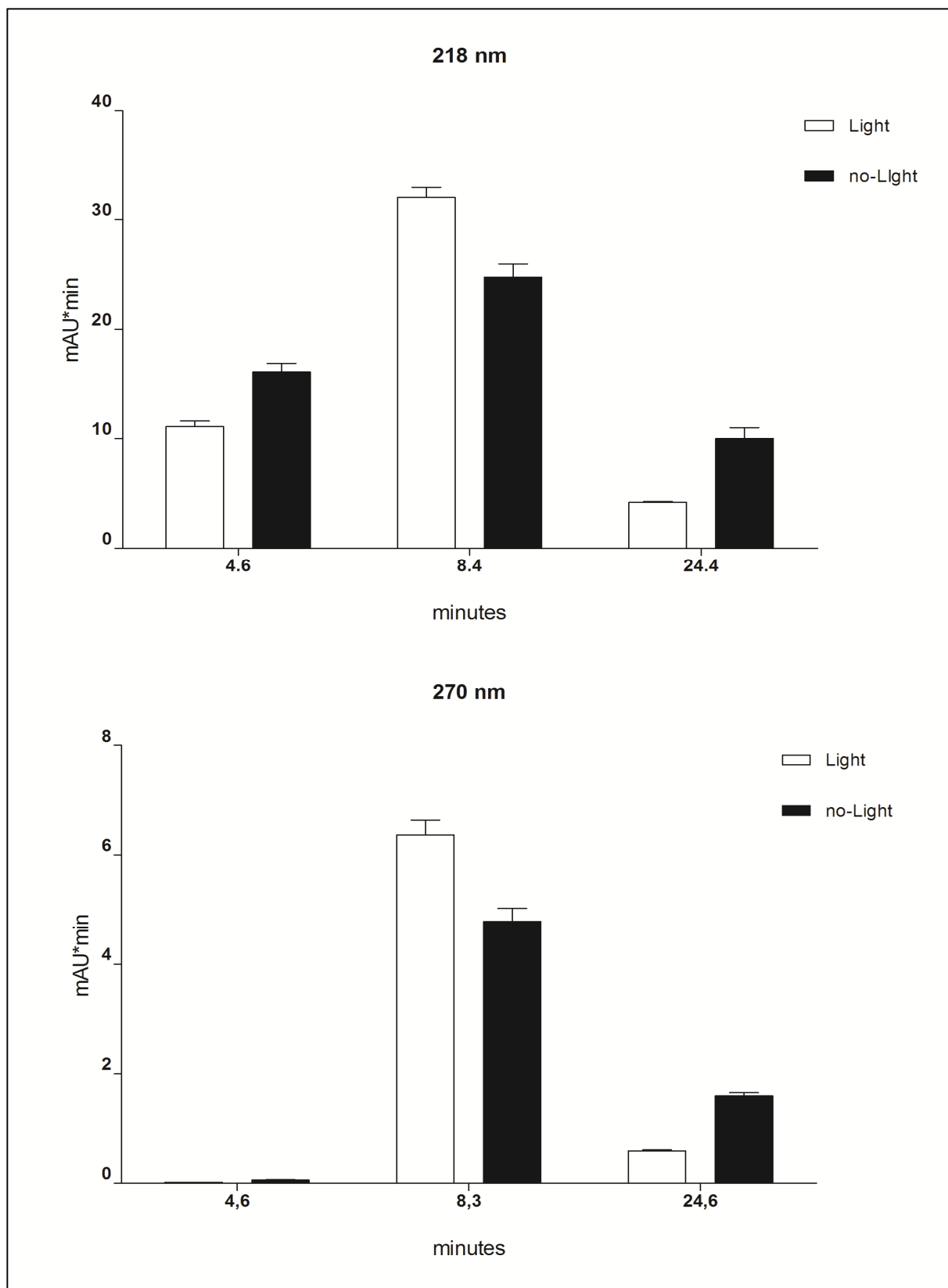


Figure 4

Figure 3 and 4 represent the area under curve for each compound released during the aging process. In order to allow a comparison between aged copolymers and controls, AUC are weighted with the initial mass of each copolymer.

The statistic tests conclude to a significant difference in the released compounds between the exposed copolymers and the non-exposed controls (t-test; $p < 0,001$). Both the hydrolysis and the light aging process impact on the copolymer's stability during time.

The conditions applied for polymerization and aging lead to a release of EGPEA monomers (same RT and 3D spectrum).

The temperature of the Xenon arc chamber explains the release of EGPEA monomers in control saline solution. For closer physiologic conditions, the chamber temperature was set at 34°C which is upper than the copolymer glass transition temperature. Under these conditions, polymer chains are flexible and allow the mobility of low-mass compounds like monomers and degradation products.

The results demonstrate that temperature, hydrolysis and oxidation combined should lead to the release of EGPEA monomers. Nevertheless, the EGPEA concentration decreases significantly under light exposure. According to previous studies about acrylics, it can be the result of new polymerization reactions or of the alkyl chains scission under hydrolysis^{10,20,23,33}.

Two unknown compounds were separated in aged solutions.

The first at 4,6 minutes has a second maximum absorbance at 270nm. The low signal at 270 nm disappears under light exposure. It can be assumed that the compound was the subject of a photolysis. This chemical has a high polarity and could be the result of alkyl chain scissions during aging. The decrease of EGPEA and the compound at 4.6 minutes under light exposure can also be the result of a new reaction between the two chemicals. The reaction could take place in the copolymer and explain the decrease of the releasing process. On the opposite it could be a reaction between the two molecules under light in the aged solution. This second option could explain the presence of the third compound at 8.3 minutes.

This third chemical increases significantly under UV exposure. The maximum at 270 nm is in favor of a more polar cyclic compound than EGPEA. We tested phenol in the same analytical conditions as the acrylic samples. The three-dimension spectrums and retention times are close, phenol 8.1 min vs 8.6 for the unidentified compound. EGPEA has two site of polymerization. One is on the acrylic function; the second is on the ethylene glycol function. This second kind of polymerization needs a scission of the EGPEA and could explain the release of more polar degradation products. Considering all data obtained, the compound at

8.3 minutes could be a phenyl cycle with an alkyl chain graft on it. The chemical reaction that leads to this compound needs further exploration.

The data obtained during this work confirm the interest of this RP-HPLC method. The results observed on copolymer aging and releasing compounds could warn about the safety of medical devices with the same composition. Nevertheless our results can't be directly transposed on medical devices. Many chemical supplements are used to regulate polymerization. UV-filters, light-filters or anti-oxidants can be used to increase safety and chemical resistance to UV, oxygen and temperature. Further exploration is needed to understand the specific aging of copolymers and intraocular lenses. . The global toxicity and inflammatory character of the released compounds should be evaluated in further studies. Moreover, the feasibility of a coupling with mass spectrometry should be explored.

Conclusion:

We developed a routine RP-HPLC method for acrylic monomers and degradation products. This method is validated in saline solvent and could be applied to intraocular lenses studies *in vitro* or *in vivo* in aqueous humor.

References:

- 1 Cash-Torunarigha, O. E.; Eichie, F. E.; Arhewoh, M. I. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2015**, 28 (2), 547–551.
- 2 del Real, A.; Wallander, D.; Maciel, A.; Cedillo, G.; Loza, H. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 117, 11–18.
- 3 Xu, G.; Wang, X.; Deng, C.; Teng, X.; Suuronen, E. J.; Shen, Z.; Zhong, Z. *Acta Biomater.* **2015**, 15, 55–64.
- 4 Packer, M.; Rajan, M.; Ligabue, E.; Heiner, P. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **2014**, 8, 421–427.
- 5 Louage, B.; Zhang, Q.; Vanparijs, N.; Voorhaar, L.; Vande Casteele, S.; Shi, Y.; Hennink, W. E.; Van Bocxlaer, J.; Hoogenboom, R.; De Geest, B. G. *Biomacromolecules* **2015**, 16 (1), 336–350.
- 6 Bohra, P. K.; Ganesh, P. R.; Reddy, M. M.; Ebenezar, A. V. R.; Sivakumar, G. J. *Clin. Diagn. Res. JCDR* **2015**, 9 (1), ZC12–ZC15.
- 7 Ethgen-Bonnet, M.; Wisniewski, S.; Szwarcberg, J.; Beretz, L. *Pharm. Hosp.* **2009**, 44 (2), 75–85.

- 8 Kim, S. J.; Choi, B.; Kim, K. S.; Bae, W. J.; Hong, S. H.; Lee, J. Y.; Hwang, T.-K.; Kim, S. W. *BioMed Res. Int.* **2015**, 2015, 852456.
- 9 Lee, H.; Tae, G.; Kim, Y. H. *Macromol. Res.* **2008**, 16 (7), 614–619.
- 10 Chiantore, O.; Lazzari, M. *Polymer* **2001**, 42 (1), 17–27.
- 11 Chiantore, O.; Trossarelli, L.; Lazzari, M. *Polymer* **2000**, 41 (5), 1657–1668.
- 12 Perea, L.; Matinlinna, J. P.; Tolvanen, M.; Mannocci, F.; Watson, T. F.; Vallittu, P. *K. J. Prosthet. Dent.* **2015**.
- 13 Cakan, U.; Kara, O.; Kara, H. B. *Dent. Mater. J.* **2015**.
- 14 Werner, L. J. *Cataract Refract. Surg.* **2010**, 36 (8), 1398–1420.
- 15 Kato, K.; Nishida, M.; Yamane, H.; Nakamae, K.; Tagami, Y.; Tetsumoto, K. J. *Cataract Refract. Surg.* **2001**, 27 (9), 1493–1498.
- 16 Tao, L. W.; Hall, A. J. *Ophthalmic Inflamm. Infect.* **2015**, 5, 10.
- 17 Yotsukura-Tsutsui, E.; Koto, T.; Tsubota, K.; Ozawa, Y. *J. Cataract Refract. Surg.* **2015**, 41 (4), 892–894.
- 18 Apple, D. J.; Mamalis, N.; Loftfield, K.; Googe, J. M.; Novak, L. C.; Kavka-Van Norman, D.; Brady, S. E.; Olson, R. J. *Surv. Ophthalmol.* **1984**, 29 (1), 1–54.
- 19 Heiner, P.; Ligabue, E.; Fan, A.; Lam, D. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **2014**, 8, 629–635.
- 20 Yousif, E.; Haddad, R. *SpringerPlus* **2013**, 2, 398.
- 21 Yousif, E.; Hameed, A.; Salih, N.; Salimon, J.; Abdullah, B. M. *SpringerPlus* **2013**, 2 (1), 104.
- 22 Mansouri, H. El; Yagoubi, N.; Ferrier, D. J. *Chromatogr. A* **1997**, 771 (1–2), 111–118.
- 23 Chiantore, O.; Trossarelli, L.; Lazzari, M. *Polymer* **2000**, 41 (5), 1657–1668.
- 24 Ophthalmic lens materials containing chromophores that absorb both uv and short wavelength visible light.
- 25 Yoshii, E. J. *Biomed. Mater. Res.* **1997**, 37 (4), 517–524.
- 26 Camps, J.; Tardieu, C.; Déjou, J.; Franquin, J. C.; Ladaique, P.; Rieu, R. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* **1997**, 13 (1), 34–42.
- 27 Raust, J.-A.; Brüll, A.; Moire, C.; Farcet, C.; Pasch, H. J. *Chromatogr. A* **2008**, 1203 (2), 207–216.
- 28 Witono, J. R.; Marsman, J. H.; Noordergraaf, I.-W.; Heeres, H. J.; Janssen, L. P. B. *M. Carbohydr. Res.* **2013**, 370, 38–45.

- 29 Uzunova, Y.; Lukanov, L.; Filipov, I.; Vladimirov, S. J. *Biochem. Biophys. Methods* **2008**, 70 (6), 883–888.
- 30 Urban, V. M.; Machado, A. L.; Oliveira, R. V.; Vergani, C. E.; Pavarina, A. C.; Cass, Q. B. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* **2007**, 23 (3), 363–368.
- 31 Nik, T. H.; Shahroudi, A. S.; Eraghihzadeh, Z.; Aghajani, F. J. *Orthod.* **2014**, 41 (1), 30–37.
- 32 Mandal, B.; Ray, S. K. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, 44, 132–143.
- 33 Krongauz, V. V.; Ling, M. T. K. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2009**, 96 (3), 715–725.

Annexe 3 : Dosage de la fibronectine par ELISA

Objectifs des méthodes :

- Dosage de la fibronectine présente en surface des implants
- Dosage de la fibronectine libre

Réactifs :

- Albumine bovine 1 % (Sigma Aldrich) dilué à la concentration de 10mg/mL dans de l'eau milliQ.
- Fibronectine 1mg/mL humaine (Sigma Aldrich)
- Anticorps primaire murin monoclonal anti-fibronectine humaine
- Anticorps secondaire de chèvre monoclonal anti-IgG Murine couplée à la peroxydase (Sigma Aldrich)
- TMB (Roth Chemical)
- H₂S₀₄ 2N (Ficher chemical)
- Plaque 24 puits non traitée à surface hydrophobe (Fisher Scientific)
- Lecteur de plaque ELx800 BioTek
- PBS (Sigma Aldrich)

Mode opératoire pour dosage sur implant intraoculaire :

1. Avant dosage

Saturation à l'albumine des plaques 24 puits destinées à contenir les implants. 500µL d'albumine 10% 2 heures à 37°C.

Rinçage des puits au PBS : 2 x 300 µL

Dépôt des lentilles intraoculaires dans les puits en faisant attention de respecter la face contact de la face libre.

2. Dosage

- Pour dosage sur implants, dépôt de la fibronectine humaine dans les puits : 300 µL dans chaque puits à la concentration de 2µg/mL.
- Pour la gamme fibronectine, dépôt de la gamme de fibronectine dans une plaque non traitée 24 puits. Gamme de 0 à 2µg/mL (3 puits par point de gamme). 2 heures à 37°C
- Pour dosage d'un échantillon de concentration en fibronectine inconnue (dosage indirect ou sur surnageant de culture cellulaire)

Pour le dosage sur implants, à la fin de l'incubation, récupération des solutions de chaque puits pour dosage indirect de la fibronectine non adsorbée.

Lavage au PBS (3 x 300µL)

- Saturation des puits avec de l'albumine 10%. 400µL / puits 2 heures à 37°C.

Lavage au PBS (3 x 300µL)

- Ajout de l'anticorps primaire dilué au 1 :10000. 300µL par puits 1 heure 37°C.

Lavage PBS 3x 300µL

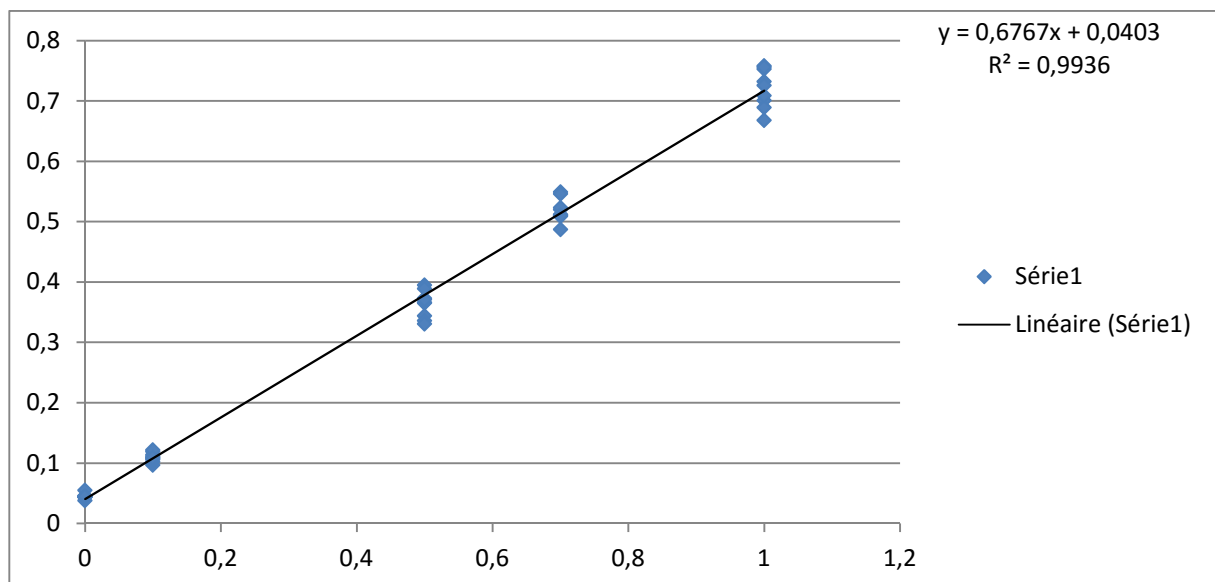
- Ajout de l'anticorps secondaire dilué au 1/30000. 300µL par puits 30 minutes 37°C.

Lavage PBS 3x 300µL

- Ajout du TMB : 300µL par puits. Réaction à l'abri de la lumière 37°C. 10 minutes précise.
- Arrêt de la réaction par 300µL d'H₂SO₄.
- Lecture à 450 nm.

Validation de la méthode de dosage :

Réalisation de trois gammes de fibronectine sur plaques 24 puits non traitées.



Régression linéaire du dosage de la fibronectine humaine par ELISA.

La régression linéaire réalisée sur 3 séries de dosage ELISA de la fibronectine démontre une relation linéaire entre les concentrations 0 et 1µg/ml.

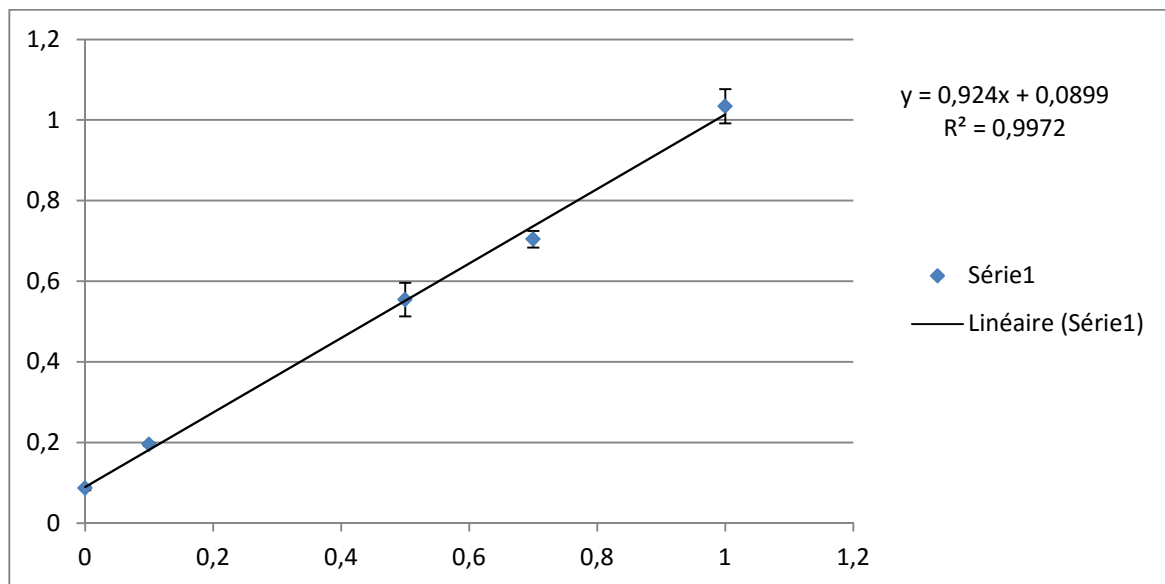
La limite de détection calculée de la méthode est de 0,0025µg/ml. La limite de quantification 0,083µg/mL.

Le recouvrement de la méthode est de 90%.

Le mauvais taux de recouvrement est lié à des variations notables liées à une mauvaise répétabilité.

Ce manque de répétabilité est fréquent pour les méthodes de dosage immunologique par ELISA. Pour pallier cette erreur, à chaque série de dosage une gamme est réalisée en parallèle.

Chacune des gammes réalisée indépendamment présente de bonne caractéristique de régression linéaire : $r^2=0,990$ et un taux de recouvrement >95%.



Gamme du dosage de la fibronectine humaine par méthode ELISA.

Annexe 4 : Publication scientifique

Interaction of intraocular lenses with fibronectin and human lens epithelial cells: Effect of chemical composition and aging

Lionel Tortolano,^{1,2*} Carole Serrano,^{1*} Emile Jubeli,¹ Johanna Saunier,¹ Najet Yagoubi¹

¹Université Paris-Sud, EA401 Matériaux et Santé, IFR 141, Faculté De Pharmacie, Châtenay Malabry, F-92296, France
²Gustave Roussy Cancer Institute, Pharmacy Department, Villejuif, F-94800, France

Received 27 December 2014; revised 1 May 2015; accepted 23 June 2015

Published online 14 July 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.35528

Abstract: The aim of this study is to investigate *in vitro* interactions between hydrophobic acrylate intraocular lenses (IOLs) and their biological environment. The influence of lens chemical composition and aging on fibronectin (FN) adsorption and on IOLs cytotoxicity on human lens epithelial cells was examined. Cytotoxicity of acrylate monomers used in IOLs manufacture was also investigated. Four different IOLs were included in the study: Acrysof[®], Tecnis[®], EnVista[®], and iSert[®]. Implants were artificially aged in a xenon arc chamber to simulate 2 years of light exposure. Fibronectin adsorption on IOL surface was quantified using ELISA and correlated to surface roughness determined with AFM. Direct contact cytotoxicity was determined with the MTT assay and cell morphology was observed with light microscopy. Results showed that fibronectin

adsorption did not differ significantly among IOLs, whatever their chemical composition. Moreover, aging conditions did not impact fibronectin adsorption. All IOLs were biocompatible even after applying 2-year aging conditions, with cell viability higher than 70%. Five acrylate monomers appeared to be toxic in the range of concentrations tested, but no monomer release from the IOLs could be detected during accelerated 2-year incubation with saline solution. This study did not reveal an influence of chemical composition and aging on protein adsorption and on biocompatibility. © 2015 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part A*: 103A: 3843–3851, 2015.

Key Words: hydrophobic acrylic intraocular lenses, polymer aging, biocompatibility, lens epithelial cells

How to cite this article: Tortolano L, Serrano C, Jubeli E, Saunier J, Yagoubi N. 2015. Interaction of intraocular lenses with fibronectin and human lens epithelial cells: Effect of chemical composition and aging. *J Biomed Mater Res Part A* 2015;103A:3843–3851.

INTRODUCTION

Cataract is the leading cause of blindness worldwide. It is characterized by an opacification of the lens interrupting the proper transmission of light. To date, the only therapeutic strategy is cataract surgery. The gold-standard technique consists of extracting the lens by phacoemulsification, opacified lenses are disintegrated with ultra-sound irradiation and lens fragments are then extracted. This leads to the formation of a capsular bag between the anterior and posterior capsule, in which an intraocular lens (IOL) is inserted to replace the extracted lens.

Posterior capsule opacification (PCO) is the most common complication occurring after cataract surgery and IOL implantation, affecting 18% of patients 1 year post surgery and 38% within 9 years of surgery.¹ The pathophysiology of PCO has been widely investigated and it is now well established that residual lens epithelial cells (LECs) proliferation, migration, and trans-differentiation are the main cellular processes leading to secondary opacification.² Hence, the interaction of IOLs with their biological environment is a key factor in understanding PCO pathogenesis.

Many studies have been carried out to identify factors influencing PCO incidence. Impact of IOL design is well documented, with a lower PCO rate associated with sharp-edge IOL.^{3–7} The influence of IOL material is still unclear but hydrophobic acrylic IOLs seem to better prevent PCO occurrence than do polymethyl methacrylate (PMMA) and silicon IOLs.^{8–10} Several studies have already compared *in vitro* lens epithelial cells behavior on IOLs made of different materials.^{11–14} Yan et al.¹⁵ demonstrated that these cells were able to maintain their epithelial phenotype when cultured on acrylic IOLs, whereas they exhibit a myofibroblast-like morphology on PMMA and silicon IOLs.

In vivo, the initial event occurring after material implantation is protein adsorption, which subsequently influences cellular adhesion. Understanding the interaction between proteins and surfaces is critical. Fibronectin (FN) adsorption on IOLs has been demonstrated mostly *in vivo* in several studies^{16–19} and differences in its adsorption may explain differences in PCO occurrence. The “sandwich theory,” developed by Linnola et al.,²⁰ suggests that a strong fibronectin adsorption prevents the onset of PCO. As fibronectin contains functional

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: E. Jubeli; e-mail: emile.jubeli@u-psud.fr

Contract grant sponsor: French Agency for the Safety of Health Products (ANSM); contract; contract grant number: 2014-S-017

domains that bind to collagen, surfaces presenting a fibronectin-adsorbed layer can adhere strongly to anterior and posterior capsules. Thus, LEC proliferation between IOL surface and posterior capsule is inhibited.

PCO typically occurs between 3 months and 4 years postsurgery.¹ However, the role of IOL material aging on their interactions with lens cells has not been previously investigated. In fact, intraocular lenses are implanted in a complex aqueous environment and exposed to solar light for many years. Vadim et al.²¹ investigated acrylate degradation kinetics and found that light exposure leads to depolymerization of acrylates. It may be supposed that this phenomenon occurs *in vivo* on acrylate IOL and results in modification of its surface characteristics. To date, despite the numerous studies concerning PCO prevention, none considered hydrophobic acrylic IOL late aging as a risk factor of PCO.

The aim of the present report was to investigate the influence of intraocular lens aging on surface roughness, fibronectin adsorption, monomer release in the surrounding media and on cytotoxicity. Because of the importance of any potential toxicity of monomers that can be released from the IOLs in the ocular environment, a comparative study of monomer cytotoxicity on lens cells was conducted, and reported herein.

Four different commercial hydrophobic IOLs were included and compared with each other regarding the above mentioned effects. IOL surface roughness was analyzed with Atomic Force Microscopy (AFM). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to investigate the amount of adsorbed fibronectin on IOL surfaces. Cytotoxicity, a key parameter of material biocompatibility, was investigated for both monomer solutions and commercial implants using the MTT assay. Cell morphology was also observed with light microscopy. Monomer release from the IOLs into the aqueous environment was investigated through RP-HPLC analysis of saline solutions incubated with IOLs under accelerated conditions simulating a period of 2 years.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Eight monomer solutions were purchased from Sigma-Aldrich: ethylacrylate (EA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDM), ethyleneglycol phenyl ether acrylate (EGPEA), ethylmethacrylate (EMA), hydroxyethyl methacrylate (HEMA), n-butyl acrylate (NBA), styrene and trifluoroethyl methacrylate (TFM). Three others were purchased from Polysciences: 1,4-butanediol diacrylate (BD), phenylethyl acrylate (PEA) and phenylethyl methacrylate (PEMA). Acetonitrile (ACN), water, and tetrahydrofuran (THF) were used for HPLC analysis and were purchased from Fisher.

Sulfuric acid 2N (H₂SO₄), fibronectin from human plasma (solution 0.1%), polyclonal anti-fibronectin antibody produced in rabbit, anti-rabbit whole immunoglobulin G (IgG) secondary antibody conjugated with peroxidase produced in goat, 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB), bovine serum albumin (BSA), trypsin-EDTA solution, and phosphate buffer saline were also obtained from Sigma-Aldrich.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) came from Fischer chemicals and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) from Carl Roth.

Human lens epithelial cells, nonaffected by cataract (hLECs; ATCC No: CRL-11421), were cultured in Dubelcco Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (Sigma) and 1% antibiotics (penicillin 10,000 U/mL, streptomycin 10 mg/mL; Sigma). Cells were maintained at 37°C under 5% CO₂.

Four commercial intraocular, sharp-edged, single-piece hydrophobic acrylic foldable lenses²² were tested: Acrysof[®] (Alcon), a copolymer of phenylethyl acrylate, phenylethyl methacrylate, and 1,4-butanediol diacrylate, which is the first foldable IOL used in France; Tecnis[®] (Abbott Medical Optics), a copolymer of ethyl acrylate, ethyl methacrylate, 2,2,2-trifluoroethyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate, and iSert[®] (Hoya) a copolymer of phenylethyl methacrylate, n-butyl acrylate and fluoroalkyl methacrylate are direct competitors of Acrysof[®]. The fourth IOL, EnVista[®] (Bausch & Lomb) is a copolymer of ethylene glycol dimethacrylate, ethyleneglycol phenyl ether acrylate, hydroxyethyl methacrylate, and styrene, and was included because of the use of a hydrophilic acrylate monomer in its manufacture. To avoid inter-serial variability, all lenses from a manufacturer had the same batch number and were produced within 3 months before experiments.

Aging conditions

Implants underwent an aging process based on the NF EN ISO 11979-5 standard.²³ Samples were artificially aged in a xenon arc chamber (QSun Xe-1, Labomat) which reproduces full spectrum sunlight. Conditions were 96 h irradiation with a power of 6.8 mW/cm² from 300 to 400 nm, at 34°C. These conditions simulate 2 years light exposure of the evaluated implants, according to the following formula: $T2 = 365 \times T1 \left(\frac{I2}{I1}\right)^n \times \left(\frac{24}{t}\right)^{-1}$ (T2, *in vitro* test period in days; T1, *in vivo* exposure time; I2, *in vitro* intensity of the radiation source in the 300–400 nm range; I1, *in vivo* UV-radiation intensity in the range 300–400 nm at the position of the IOL at diffuse light conditions; n, intensity factor; t, daily exposure time to sun light.)

Surface roughness characterization by AFM

Surface roughness of IOLs was analyzed with Atomic Force Microscopy. Measurements were performed in ambient air with an Innova AFM (Brücker, France) using tapping mode. The cantilever resonant frequency was of 320 kHz using a silicon probe tip with a nominal spring constant of 42 N/m (NCHV-A, Brücker) and a radius of 10 nm. The scan rate was 0.5 Hz. Each implant was scanned in eight different areas.

The increase in surface area due to roughness and the roughness R_q (root mean squared roughness) were calculated using Gwyddion 2.35 software. Means of roughness for all the IOLs types were compared using a one way ANOVA test ($\alpha = 0.05$). The difference between two roughness means for each type of implant, before and after aging, were compared with Student's *t* test (where the difference

was considered statistically significant if the Student *t* test *p* values is less than 0.05).

Fibronectin adsorption

Implants were deposited in a 96-well plate and immersed in fibronectin solution (1 µg/mL) for 2 h at 37°C. Prior to IOL insertion, the 96-well plates were saturated with a 1% solution of bovin serum albumin (BSA) for 2 h at 37°C to block fibronectin adsorption onto the wells.

The amount of fibronectin adsorbed onto the lens was determined using an ELISA assay that was performed on six IOLs from each manufacturer (3 nontreated and 3 artificially aged under conditions simulating 2 years exposure to sunlight). After fibronectin solution removal, wells were carefully washed three times with PBS. Implants were then blocked with 1% BSA for 2 h then washed with PBS. The primary antibodies were added at a dilution of 1 : 10,000 and incubated 1 h at 37°C. After rinsing, the secondary antibodies conjugated with peroxidase were incubated at a dilution of 1 : 30,000 for 30 min at 37°C. Wells were rinsed three times with PBS and TMB solution was added. After 10 min, the reaction was stopped by the addition of sulfuric acid diluted to one tenth. The absorbance was read at 450 nm with a microplate reader (ELx800 BioTek). The amount of FN adsorbed was calculated using a standard curve established in the range of 0–1 µg/mL. Numerical data were analyzed statistically using a two-way ANOVA test ($\alpha = 0.05$).

Monomer cytotoxicity

Monomer cytotoxicity was determined with the MTT assay. It assesses cell viability by measuring mitochondrial dehydrogenase cell activity. A range of monomer concentrations from 10,000 to 100,000 parts-per-million (ppm) were prepared in DMSO, a followed by a one to one thousandth dilution in culture medium. DMSO diluted similarly was used as a blank for background absorbance. Final concentrations applied on cells were from 10 to 100 ppm.

Human LECs were seeded onto 96-well plates at a density of 10^4 cells/well. After 24 h, medium was removed and 100 µL of each monomer dilution was added. After an incubation period of 48 h at 37°C, 20 µL MTT solution (5 mg/mL in PBS) were added and incubated for a further 2 h at 37°C. Medium was then removed and formazan crystals were dissolved in 100 µL DMSO. Absorbance was read at 570 nm using a microplate reader (ELx800 BioTek). Cell viability was calculated as the absorbance ratio between cells exposed to monomer and cells exposed to the blank solution. Each monomer was tested at least two times and each concentration was applied to eight wells/experiment.

For morphology observation, cells were seeded onto 24-well plates at a density of 5×10^4 cells/well. After 24 h, culture medium was removed and 500 µL of monomer solution was added at the following concentrations in DMEM: BD at 20 ppm, EA at 50 ppm, EGPEA at 40 ppm, PEA at 20 ppm, NBA 60 ppm (concentrations associated with cell viability lower than 70% determined by the quantitative MTT assay), and 100 ppm for all the others. After further

incubation for 48 h at 37°C, the morphology was assessed by light microscopy (Optika XDS-2) using 20× magnification with a digital camera (Optikam Pro 5). Images were processed with image analysis software (Optika Vision Pro 2.7 and ImageJ 1.47m).

IOLs cytotoxicity

IOLs cytotoxicity was investigated following the standard EN ISO 10993-5 established for the biological evaluation of medical devices. Cytotoxicity was determined using the MTT assay as described for monomers. Human LECs were seeded onto 24-well plates at a density of 5×10^4 cells/well. After 24 h, medium was renewed and implants were deposited gently onto cells. After an incubation period of 24 h at 37°C, cell morphology was observed with light microscopy (Optika XDS-2) and images were processed with image analysis software (Optika Vision Pro 2.7 and ImageJ 1.47 m). After further 24 h of incubation 100 µL MTT solution (5 mg/mL in PBS) were added and incubated for 2 h at 37°C. Medium was removed and formazan crystals were dissolved in 500 µL DMSO. Absorbance was read at 570 nm using a microplate reader (ELx800 BioTek). Cell viability was calculated as the absorbance ratio between cells exposed to implants and nontreated cells. Six IOLs/manufacturer were tested (3 nontreated samples and 3 artificially aged samples). Numerical data were analyzed statistically using a two-way ANOVA test ($\alpha = 0.05$).

Test for leachables, hydrolytic stability, and

RP-HPLC analysis

The purpose of these two tests was to assess potential release of monomers in an aqueous environment simulating physiological conditions. Test for leachables was realized through the incubation of three implants of each manufacturer individually with 300 µL of saline solution (0.9% NaCl) at 37°C for 72 h. Implants were then removed and the saline solution was analyzed using reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) as described below.

For the hydrolytic stability test, three implants were placed individually in glass vials containing 300 µL saline solution (0.9% NaCl) and were incubated at 70°C for 60 days. These conditions simulate two years of exposure to aqueous environment according to the following formula: $t_2 = t_1 \times 2^{(T_a - T_b)/10}$ (t_2 , simulated exposure time; t_1 : *in vitro* test period; T_a , the accelerated temperature; T_b , the temperature of the inside of the eye (34°C)). After the specified period, implants were removed and the saline solution was analyzed using RP-HPLC as described below.

HPLC (Dionex, Thermo Scientific, with diode array UV and visible detectors) was used for determination of monomer concentration in the analyzed samples. Separation was performed with an inverse phase Kinetex® C18 column, 250 × 4.6 mm, 5 µm particle size, (Phenomenex, United Kingdom). All spectra were recorded and treated with chameleon™ software. Monomers were separated by gradient elution using ACN, water, and THF. Totally, 20 µL samples were injected and analyzed at 30°C for 80 min at a 1 mL/min

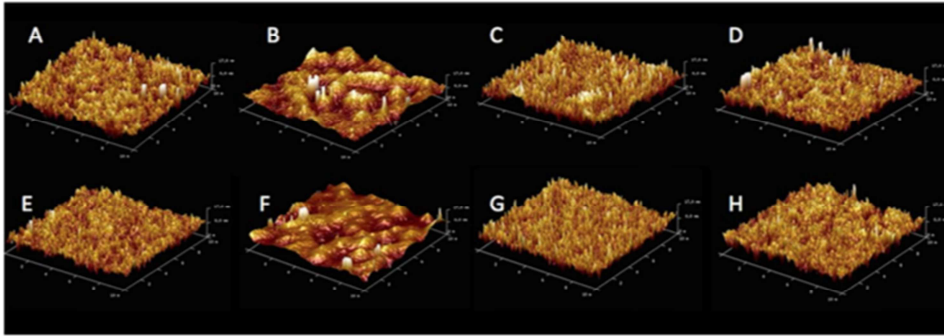


FIGURE 1. 3D AFM topographic images of IOLs without aging process (A: EnVista®, B: Acrysof®, C: Tecnis®, D: iSert®) and after 2 years aging process (E: EnVista®, F: Acrysof®, G: Tecnis®, H: iSert®). Cells displayed an epithelial-like morphology and formed a growing monolayer of adherent cells.

flow rate. Monomers were identified by their elution time and 3D UV spectra.

Monomers were weighed at 25°C and diluted in a mixture of ACN and 0.9% NaCl solution. Each sample was filtered prior to injection. All samples were analyzed in triplicate. Calibration curves for the monomers included were obtained by plotting average peak area versus concentration using linear regression analysis. Each monomer was analyzed from 0 to 10 ppm.

RESULTS

Surface roughness characterization

Figure 1 represents surface topography for each implant, without aging process (A, B, C, and D) and after simulated aging of two years by UV exposure (E, F, G, and H) whereas

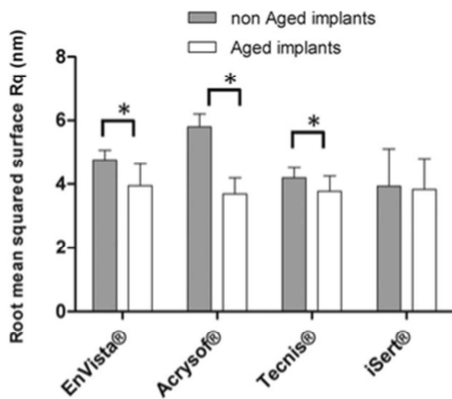


FIGURE 2. IOL surface roughness before and after aging. Results are expressed as the mean \pm SD (seven experiments). A significant difference in surface roughness among the four commercial nonaged implants was observed ($p < 0.001$). A significant decrease in surface roughness was observed after aging for all implants except iSert® (Student's *t* test).

Figure 2 shows the measured roughness of the different IOLs before and after aging. As could be seen in Figures 1 and 2, within the set of nonaged IOLs, Acrysof® was associated with a rougher surface compared with Tecnis®, iSert®, and EnVista®. This was reflected in the significant difference in surface roughness among the four nonaged IOLs when analysed using a one-way ANOVA ($p < 0.001$). No significant difference of roughness was detected when comparing Tecnis®, iSert®, and EnVista® ($p > 0.05$).

Interestingly, differences in roughness among the four commercial implants after aging were not significant ($p = 0.36$). In addition, a statistical difference in surface roughness before and after aging process was observed for all implants, with the exception of iSert® (Fig. 2). The increase in the surface area (Δs , difference between the projected surface area and the actual area), due to roughness, was lower than $0.35 \mu\text{m}^2$ for a $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ area for all implants with or without 2 years aging (data not shown). Only in the case of EnVista® implants, the difference in Δs was significant between nonaged and 2-year aged implants (0.34 vs. $0.14 \mu\text{m}^2$, respectively).

Fibronectin adsorption

The amount of fibronectin adsorbed onto lenses was detected and quantified by ELISA, performed on six IOLs samples from each manufacturer (3 untreated and 3 artificially aged under conditions simulating 2 years exposure to sunlight) for comparison. Figure 3 shows the quantity of adsorbed FN on commercial IOLs. No significant difference was observed among the four types of IOLs tested ($p = 0.116$), which indicates that chemical composition did not affect fibronectin adsorption density. In addition, no significant difference was detected between aged and nonaged implants ($p = 0.302$).

Monomer cytotoxicity

Concentrated monomer solutions were first prepared in DMSO which has the advantage of being miscible with the aqueous cell culture medium. All solutions were diluted to one one-thousandth in culture medium prior to application

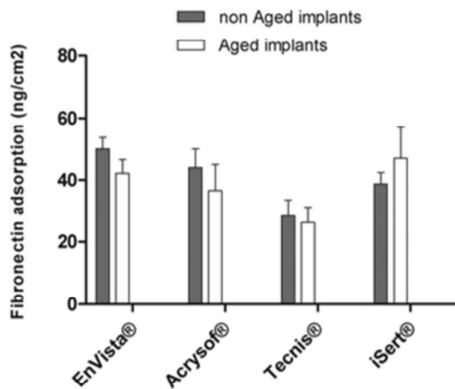


FIGURE 3. Fibronectin adsorbed on IOLs as determined by ELISA. Results are expressed as the mean \pm SEM obtained for three implants. No significant difference was observed among the four types of IOLs tested ($p = 0.116$), nor between aged and nonaged implants ($p = 0.302$).

onto cells followed by incubation for 48 h. According to the ISO 10993-5 standards, cell viability $<70\%$ is considered as a cytotoxic effect.

Results presented in Figure 4 revealed a cytotoxic effect for BD, PEA, EGPEA, NBA, and EA at concentrations [mt]10, 20, 30, 50 and 80 ppm, respectively. All others presented no cytotoxicity in this range of concentrations Figure 5.

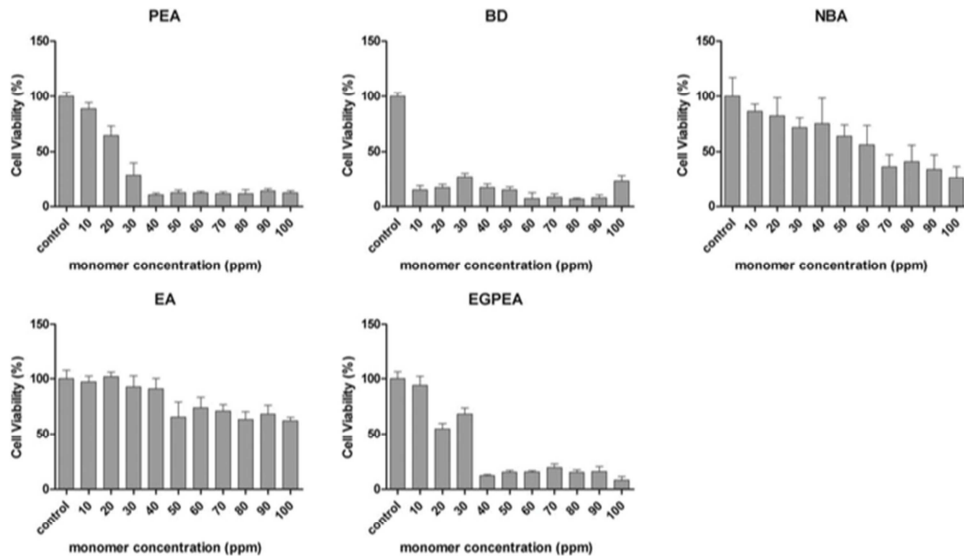


FIGURE 4. Viability of hLEC cells as determined by the MTT assay after incubation with monomer solutions for 48 h. Results are expressed as the mean \pm SED obtained for at least two experiments (eight measurements each). BD, EA, EGPEA, NBA, and PEA were found cytotoxic for concentrations higher than 10, 20, 60, 20, and 80 ppm respectively.

Cell morphology (using concentrations associated with cell viability lower than 70% determined by the quantitative MTT assay) was observed using light microscopy after 48 h incubation. In the blank control well, cells were stretched and formed an adherent confluent monolayer [Fig. 6(A)]. Similar morphology was observed in wells exposed to nontoxic monomers such as HEMA [Fig. 6(F)]. In contrast, cells exposed to BD, EA, EGPEA, NBA and PEA showed visible signs of toxicity [Fig. 6(A–E)]. That includes losing contact with neighboring cells, nuclear fragmentation and chromatin condensation which was visible as black spots [Fig. 6(A,B,D,E)], typical characteristics of apoptosis.²⁴ Late apoptosis characterized by membrane blabbing and the formation of apoptotic bodies were detected within BD, NBA (arrow-heads in Fig. 6) and were more pronounced in cells exposed to EGPEA [Fig. 6(C)]. These observations are consistent with the data obtained from the MTT cell viability assay.

IOL cytotoxicity

The cytotoxicity of the IOLs on hLECs cells was also determined using the MTT assay. For each manufacturer, six IOLs were tested (3 nonaged and 3 artificially aged). Results are shown in Figure 7. Cell viability was greater than 70% in all cases. A two-way ANOVA test was performed to evaluate the influence of aging and chemical composition on cell viability. The difference in the mean values among aged and nonaged implants was not significant enough to exclude the possibility that the difference was simply due to random sampling

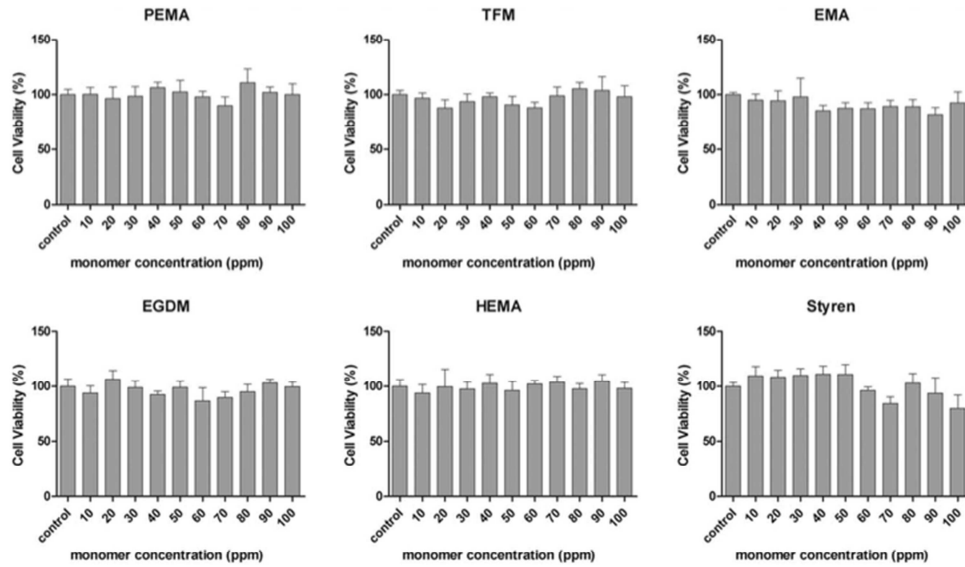


FIGURE 5. Viability of hLEC cells as determined by the MTT assay after 48 h incubation with monomer solutions. Results are expressed as the mean \pm SD obtained for at least two experiments (eight measurements each). EGDM, EMA, HEMA, PEMA, Styrene, and TFM presented no cytotoxicity within concentrations up to 100 ppm.

variability after allowing for the effects of chemical composition differences ($p = 0.961$). A statistically significant difference was found among fabricants ($p < 0.001$), but as cellular viability was greater than 70% for all of them, this difference is not supposed to impact the overall biocompatibility of the IOLs.

Cell morphology was observed after 24 h of direct contact with the implants. No difference was shown between cells exposed to nonaged implants and cells exposed to aged implants (Fig. 8). Cells displayed an epithelial-like morphology and formed a growing monolayer of adherent cells.

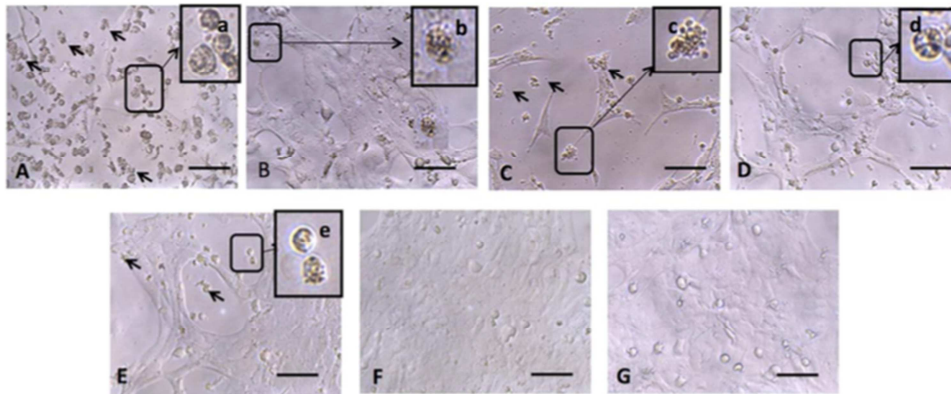


FIGURE 6. Morphology of hLEC cells assessed by light microscopy (Optika XDS-2) using 20 \times magnification with a digital camera (Optika pro 5) after 48 h of incubation with (A) BD at 20 ppm, (B) EA at 50 ppm, (C) EGPEA at 40 ppm, (D) PEA at 20 ppm (E) NBA at 60 ppm, (F) HEMA at 40 ppm, and (G) Control cells. a, b, c, d, and e are higher optical magnification for some individual cells. Cells incubated with HEMA showed a healthy monolayer of adherent cells, while signs of apoptosis (chromatin condensation in a, b, d, and e; and the formation of apoptotic bodies in (c) could be seen with other monomers. Refer to the text for more details. Scale bar = 100 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

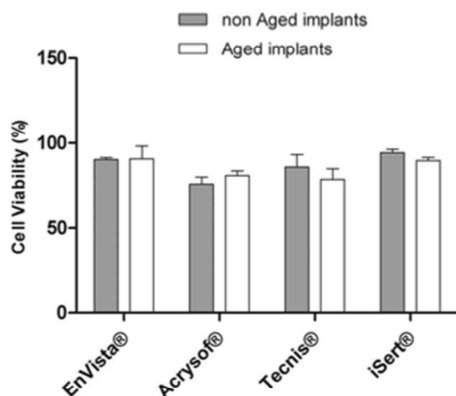


FIGURE 7. The viability of hLEC cells was determined by MTT assay after 48-h incubation with IOLs. Results are expressed as the mean \pm SD obtained for three implants. Cell viability was higher than 70% with all types of IOLs before and after 2 years of simulated light exposure.

Test for leachables and hydrolytic stability

When the IOLs were incubated under physiological conditions (saline solution at 37°C for 72 h) and under accelerated conditions simulating 2 years of contact with aqueous environment (saline solution at 70°C for 60 days), none of the 11 monomers investigated could be detected in the saline solutions analyzed by RP-HPLC. When these solutions were diluted with cell culture medium and incubated with hLECs, no cytotoxicity was detected (data not shown).

DISCUSSION

This study investigated the impact of aging process affecting hydrophobic acrylic IOLs on the adsorption of a protein model on their surface as well as on the morphology and cell viability of human lens cells in the contact with these IOLs.

Prior to studies with the commercial implants, the cytotoxicity of each monomer used in the production of one or more of these IOLs was evaluated on lens epithelial cells. As these monomers are also used in dental resin manufacture, their cytotoxicity on other cell lines is well described in the literature. Several studies^{25,26} found that their cytotoxicity was correlated with lipophilicity. For example, monomer concentrations for EGDM, EMA, and HEMA that reduced MTT-formazan production by 50% (IC50) on HeLa S3 cells were reported to be 209 ppm, 3335 ppm, and 1309 ppm, respectively. These concentrations are much higher than those used in our study.²⁵ This is consistent with the absence of cytotoxicity in our data for concentrations up to 100 ppm for these monomers. NBA appeared to be more toxic on hLECs than on HeLa cells (reported IC50 for NBA is 140 ppm²⁵), while in the present study it was found to be cytotoxic above 50 ppm (Fig. 4).

Analysis of the saline solutions incubated under physiological conditions and accelerated conditions simulating 2 years of contact with aqueous environment, did not reveal detectable levels of monomer leaching. Nevertheless, the cytotoxic levels of monomers determined within the MTT assay can be useful for the evaluation of biocompatibility after longer exposure time to UV irradiation and aqueous environment, and provide important elements for risk assessment of IOLs during their development and clinical evaluation.

The ISO 11979-5 standard²³ defines the requirements for biocompatibility testing of materials used in intraocular lenses. Long-term stability must be evaluated in different conditions: in aqueous environment (forced hydrolysis) and after light exposure (photostability). The main aim of this study was to assess the impact of solar exposure on implants surface and biocompatibility. A mathematical formula allows a link between exposure time at a preset irradiance with natural aging time. Our choice of light irradiance corresponding to 2 years of natural aging is consistent with clinical data as PCO typically occurs between 3 months and 4 years post cataract surgery, and affects 18% of patients 1

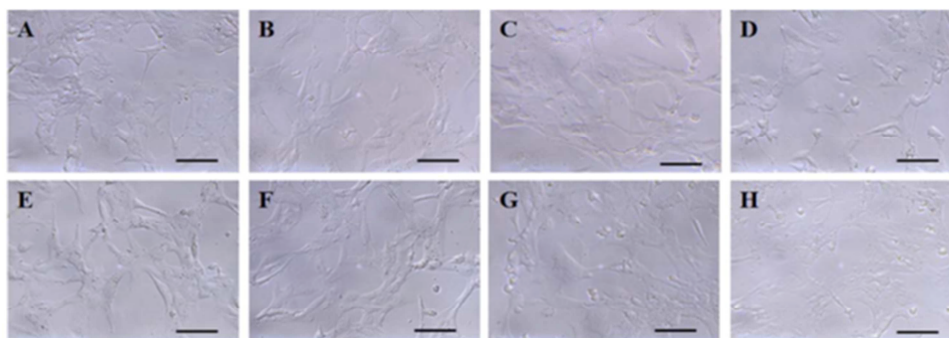


FIGURE 8. Morphology of hLEC cells was assessed by light microscopy (Optika XDS-2) using 20 \times magnification with a digital camera (Optika Pro 5) after 24 h of direct contact with IOLs without aging (A: EnVista®, B: Acrysof®, C: Tecnis®, D: iSert®) and on IOLs after aging process (E: EnVista®, F: Acrysof®, G: Tecnis®, H: iSert®). Scale bar = 100 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

year following surgery. Interestingly, this irradiation resulted in a decrease of surface roughness for three of the four types of IOLs evaluated herein. There are no reports in the literature on the impact of UV irradiation on surface roughness of IOLs or on acrylate surfaces in general.

Chiantore et al.²⁷ demonstrated that UV exposure of acrylic polymers used for dental implants can induce new polymerization or depolymerization of hydrophobic PEA and PEMA polymers, also used in Acrysof[®] lenses. They have shown a correlation between depolymerization/polymerization and acrylic chemical structure. These polymer restructurings could impact roughness and explain our observation. Further studies are needed to explore this hypothesis and the impact of reticulation on acrylate UV stability.

The interaction between an organism and a foreign body begins with nonspecific adsorption of proteins on its surface. Hence, it was essential to investigate this phenomenon on intraocular lens. Protein adsorption is dominated by surface physico-chemical characteristics, such as charge density, surface polarity and roughness.²⁸ The acrylate ester bond breaking, which may occur upon light exposure, can lead to the formation of new compounds and thus, to surface modifications. These changes can affect protein adsorption on intraocular lens surface and probably the biocompatibility of the lens itself.

This study focused on fibronectin adsorption because this protein promotes cell adhesion and has a major role in PCO physiopathology.^{16,19,20} Surface analysis by AFM revealed significant differences in surface roughness among nonaged implants; a review by Werner et al. explains that all IOLs do not have the same modelling process.²² No difference was detected in FN adsorption among the four types of IOLs in this study. More importantly, the significant decrease in surface roughness after aging observed on Acrysof[®], EnVista[®], and Tecnis[®] lenses was not associated with FN adsorption density modification on the surface of the three types of implants. The fourth commercial implant neither revealed a modification of FN adsorption after aging. The increase in the surface area related to roughness was small (lower than 0.35 μm^2 for 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ area); this may explain why the differences in the roughness did not quantitatively impact the FN adsorption on implant surface. Nevertheless, Xu et al. did not find a correlation between surface roughness and fibrinogen adsorption.²⁹ Taken together, these data demonstrate that surface roughness alone cannot explain the interaction with proteins; the micro-scale chemical structure of the surface should also be considered to better correlate *in vitro* changes with the clinical PCO outbreak.

The immersion time of the lenses in fibronectin solution might also explain the absence of difference in FN adsorption. IOLs were incubated in fibronectin solution (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 h at 37°C. Johnston et al.³⁰ compared albumin and fibronectin adsorption on PMMA and hydrophobic acrylate IOLs and demonstrated that protein adsorption occurred within the first 2 h. However, they highlighted a quantitative difference in fibronectin adsorption between these two surfaces only

after 1 day of incubation. Longer incubation times need to be tested in further experiments. It is important to mention that the level of fibronectin adsorbed on the surface of Acrysof[®] IOLs was slightly greater than the values reported by Johnston et al. This difference in fibronectin adsorption may be a result of the different techniques used for FN quantification (scintillation counting of radiolabeled fibronectin versus ELISA detection in our study).

In this study, cytotoxicity tests performed on implants showed cell viabilities greater than 70% for the four types of IOLs tested. These data, together with the absence of monomer release, demonstrate that 2 years aging of the four IOLs types under light exposure or in aqueous environment do not impact lens biocompatibility. Once again, surface modifications after aging elucidated by AFM analysis for Acrysof[®], Envista[®], and Tecnis[®] IOLs did not have an impact on the biocompatibility of the implants investigated through cell viability. This study clearly demonstrated that the cytotoxicity of IOLs did not increase with aging. In other words, lens cells could proliferate in contact with IOLs. This finding confirms that aging does not reduce the potential adhesion and proliferation of residual lens cells responsible for the PCO. It could then be concluded that aging does not have a preventive effect against the PCO. Further experiments should be performed with longer aging times to confirm or refute IOLs photostability. In addition, an aging process associating hydrolysis and light exposure should be interesting to better mimic physiological conditions.

CONCLUSIONS

Aging is an under evaluated parameter in the investigation of IOL interactions with their environment. Four different IOLs were investigated in this study: Acrysof[®], Tecnis[®], EnVista[®], and iSert[®]. Herein, we demonstrated that aging conditions simulating two years of exposure to sunlight tends to reduce the IOLs surface roughness, but do not impact their interaction with fibronectin or their biocompatibility with human lens cells *in vitro*. Cells displayed high viability and epithelial-like morphology in contact with the four IOLs. Under accelerated conditions simulating 2 years of contact with aqueous environment no monomers could be detected in the saline solutions analyzed by RP-HPLC. All monomers used in the fabrication of these IOLs were screened for their cytotoxicity on lens cells; cytotoxic levels detected can provide important element for risk assessment of IOLs during their development and clinical evaluation. Further studies will involve evaluating the impact of aging on the fine chemical structure of the IOL surface; and the application of aging conditions that closer mimic physiological environment of intraocular lenses including simultaneous UV exposure and hydrolytic environment with an extended aging time corresponding to longer period of intraocular life of the lenses.

REFERENCES

1. HAS/AFSSAPS. Mise au point sur les implants intraoculaires mono focaux utilisés dans le traitement chirurgical de la cataracte. Joined report by the French high authority of health and

- National agency for drugs and health products security, April 2008.
2. Saika S. Relationship between posterior capsule opacification and intraocular lens biocompatibility. *Prog Retin Eye Res* 2004;23: 283-305.
 3. Nishi O, Nishi K. Preventing posterior capsule opacification by creating a discontinuous sharp bend in the capsule. *J Cataract Refract Surg* 1999;25:521-526.
 4. Nishi O, Nishi K, Wickström K. Preventing lens epithelial cell migration using intraocular lenses with sharp rectangular edges. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:1543-1549.
 5. Nishi O, Nishi K, Akura J, Nagata T. Effect of round-edged acrylic intraocular lenses on preventing posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:608-613.
 6. Nishi O, Nishi K, Osakabe Y. Effect of intraocular lenses on preventing posterior capsule opacification: Design versus material. *J Cataract Refract Surg* 2004;30:2170-2176.
 7. Buehl W, Findl O. Effect of intraocular lens design on posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 2008;34:1976-1985.
 8. Cheng JW, Wei RL, Cai JP, Xi GL, Zhu H, Li Y, Ma XY. Efficacy of different intraocular lens materials and optic edge designs in preventing posterior capsular opacification: A meta-analysis. *Am J Ophthalmol* 2007;143:428-436.
 9. Ram J, Kumar S, Sukhija J, Severia S. Nd:YAG laser capsulotomy rates following implantation of square-edged intraocular lenses: Polymethyl methacrylate versus silicone versus acrylic. *Can J Ophthalmol J Can Ophtalmol* 2009;44:160-164.
 10. Boureau C, Lafuma A, Jeanbat V, Berdeaux G, Smith AF. Incidence of Nd:YAG laser capsulotomies after cataract surgery: Comparison of 3 square-edged lenses of different composition. *Can J Ophthalmol* 2009;44:165-170.
 11. Iersura P, Torreggiani A, Cellini M, Caramazza R. Adhesion mechanisms of human lens epithelial cells on 4 intraocular lens materials. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25:527-533.
 12. Cunanan CM, Tarboux NM, Knight PM. Surface properties of intraocular lens materials and their influence on in vitro cell adhesion. *J Cataract Refract Surg* 1991;17:767-773.
 13. Hesse Y, Kampmeier J, Lang GK, Baldysiak-Figiel A, Lang GE. Adherence and viability of porcine lens epithelial cells on three different IOL materials in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Für Klin Exp Ophthalmol* 2003;241: 823-826.
 14. Larsson R, Selén G, Björklund H, Fagerholm P. Intraocular PMMA lenses modified with surface-immobilized heparin: Evaluation of biocompatibility in vitro and in vivo. *Biomaterials* 1989;10: 511-516.
 15. Yan Q, Perdue N, Sage EH. Differential responses of human lens epithelial cells to intraocular lenses in vitro: Hydrophobic acrylic versus PMMA or silicone discs. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:1253-1262.
 16. Saika S, Kobata S, Yamanaka O, Yamanaka A, Okubo K, Oka T, Hosomi M, Kano Y, Ohm P S, Uenoyama S, Tamura M, Kanagawa R, Uenoyama K. Cellular fibronectin on intraocular lenses explanted from patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993; 231:718-721.
 17. Kanagawa R, Saika S, Ohmi S, Tamura M, Nakao T. Presence and distribution of fibronectin on the surface of implanted intraocular lenses in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1990;228: 398-400.
 18. Boyd W, Peiffer RL, Siegal G, Eifrig DE. Fibronectin as a component of pseudophakic acellular membranes. *J Cataract Refract Surg* 1992;18:180-183.
 19. Linnola RJ, Werner L, Pandey SK, Escobar-Gomez M, Znoiko SL, Apple DJ. Adhesion of fibronectin, vitronectin, laminin, and collagen type IV to intraocular lens materials in pseudophakic human autopsy eyes, Part 1: Histological sections. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:1792-1806.
 20. Linnola RJ. Sandwich theory: Bioactivity-based explanation for posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 1997;23: 1539-1542.
 21. Krongauz VV, Ling MTK. Photo-crosslinked acrylates degradation kinetics. *J Therm Anal Calorim* 2009;96:715-725.
 22. Werner L. Glistenings and surface light scattering in intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 2010;36:1399-1420.
 23. ISO standard : NF EN ISO 11979-5. Ophthalmic implants - Intraocular lenses Part 5: Biocompatibility 2006.
 24. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *Physiology* 2004;19:124-128.
 25. Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 1997;37:517-524.
 26. Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki K. (Meth)acrylate monomer-induced cytotoxicity and intracellular Ca(2+) mobilization in human salivary gland carcinoma cells and human gingival fibroblast cells related to monomer hydrophobicity. *Biomaterials* 2006; 27:5794-5800.
 27. Chiantore O, Trossarelli L, Lazzari M. Photooxidative degradation of acrylic and methacrylic polymers. *Polymer* 2000;33:1657-1668.
 28. Chen H, Yuan L, Song W, Wu Z, Li D. Biocompatible polymer materials: Role of protein-surface interactions. *Prog Polym Sci* 2008;33:1059-1087.
 29. Xu LC, Siedlecki CA. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2007;28:3273-3283.
 30. Johnston RL, Spalton DJ, Hussain A, Marshall J. In vitro protein adsorption to 2 intraocular lens materials. *J Cataract Refract Surg* 1999;25:1109-1115.

Annexe 5 : Liste des normes ISO consultées

NF EN ISO 11979-5 (2006-10-01)

Indice de classement : S94-750-5

Titre : Implants ophtalmiques - Lentilles intraoculaires - Partie 5 : biocompatibilité

NF EN ISO 11979-7 (2014-10-24)

Indice de classement : S94-750-7

Titre : Implants ophtalmiques - Lentilles intraoculaires - Partie 7 : investigations cliniques

NF EN ISO 11979-8 (2015-09-19)

Indice de classement : S94-750-8

Titre : Implants ophtalmiques - Lentilles intraoculaires - Partie 8 : exigences fondamentales

NF EN ISO 10993-1 (2010-07-01)

Indice de classement : S99-501-1

Titre : Évaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 1 : évaluation et essais au sein d'un processus de gestion du risque (Tirage 2 (2010-09-01))

NF EN ISO 10993-2 (2006-12-01)

Indice de classement : S99-502

Titre : Évaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 2 : exigences relatives à la protection des animaux

NF EN ISO 10993-5 (2010-07-01)

Indice de classement : S99-501-5

Titre : Évaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 5 : essais concernant la cytotoxicité in vitro

NF EN ISO 10993-9 (2010-05-01)

Indice de classement : S99-501-9

Titre : Évaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 9 : cadre pour l'identification et la quantification des produits potentiels de dégradation

NF EN ISO 10993-12 (2012-09-01)

Indice de classement : S99-501-12

Titre : Évaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 12 : préparation des échantillons et matériaux de référence

NF EN ISO 10993-13 (2010-09-01)

Indice de classement : S99-501-13

Titre : Évaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 13 : identification et quantification de produits de dégradation de dispositifs médicaux à base de polymères

NF EN ISO 10993-16 (2010-07-01)

Indice de classement : S99-501-16

Titre : Évaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 16 : conception des études toxicocinétiques des produits de dégradation et des substances relargables

NF EN ISO 10993-18 (2009-12-01)

Indice de classement : S99-501-18

Titre : Évaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 18 : caractérisation chimique des matériaux

Références bibliographiques

1. Brian, G. & Taylor, H. Cataract blindness--challenges for the 21st century. *Bull. World Health Organ.* **79**, 249–256 (2001).
2. Rigal-Sastourné, J.-C. & Delbarre, M. Sémiologie et formes cliniques de la cataracte chez l'adulte. *EMC - Ophtalmol.* **9**, 1–10 (2012).
3. Mickler, C., Boden, J., Trivedi, R. H. & Wilson, M. E. Pediatric cataract. *Pediatr. Ann.* **40**, 83–87 (2011).
4. Medsinge, A. & Nischal, K. K. Pediatric cataract: challenges and future directions. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **9**, 77–90 (2015).
5. Lambert, S. R. & Drack, A. V. Infantile cataracts. *Surv. Ophthalmol.* **40**, 427–458 (1996).
6. Petrash, J. M. Aging and age-related diseases of the ocular lens and vitreous body. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, ORSF54–59 (2013).
7. Tetz, M. R. & Nimsgern, C. Posterior capsule opacification. Part 2: Clinical findings. *J. Cataract Refract. Surg.* **25**, 1662–1674 (1999).
8. Weatherall, M. *et al.* Dose-response relationship of inhaled corticosteroids and cataracts: a systematic review and meta-analysis. *Respirol. Carlton Vic* **14**, 983–990 (2009).
9. Manaviat, M. R., Oveisi, N. & Zare-Bidoki, A. Accelerated bilateral cataract formation as a first manifestation of diabetes mellitus. *Prague Med. Rep.* **114**, 258–262 (2013).
10. Taylor, H. R. Epidemiology of age-related cataract. *Eye Lond. Engl.* **13** (Pt 3b), 445–448 (1999).
11. Brown, C. J. & Akaichi, F. Vitamin D deficiency and posterior subcapsular cataract. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **9**, 1093–1098 (2015).
12. AAO Cataract and Anterior Segment PPP Panel. *Cataract in the Adult Eye PPP*. (American Academy of Ophthalmology, 2011).
13. Ethgen-Bonnet, M., Wisniewski, S., Szwarcberg, J. & Beretz, L. Revue des implants ophtalmiques. *Pharm. Hosp.* **44**, 75–85 (2009).
14. Collignon, C. *et al.* *Mise au point sur les implants intraoculaires monofocaux utilisés*

dans le traitement chirurgical de la cataracte. (Afssaps, HAS, 2008).

15. Hashemi, H. *et al.* The role of demographic characteristics in the outcomes of cataract surgery and gender roles in the uptake of postoperative eye care: a hospital-based study. *Ophthalmic Epidemiol.* **19**, 242–248 (2012).
16. Malot, J. *et al.* [Direct cost of cataract surgery in public hospital]. *Ann. Pharm. Fr.* **68**, 380–387 (2010).
17. Apple, D. J. *et al.* Posterior capsule opacification. *Surv. Ophthalmol.* **37**, 73–116 (1992).
18. Schaumberg, D. A., Dana, M. R., Christen, W. G. & Glynn, R. J. A systematic overview of the incidence of posterior capsule opacification. *Ophthalmology* **105**, 1213–1221 (1998).
19. Spalton, D. Posterior capsule opacification: have we made a difference? *Br. J. Ophthalmol.* **97**, 1–2 (2013).
20. Linnola, R. J. Sandwich theory: bioactivity-based explanation for posterior capsule opacification. *J. Cataract Refract. Surg.* **23**, 1539–1542 (1997).
21. Linnola, R. J., Sund, M., Ylönen, R. & Pihlajaniemi, T. Adhesion of soluble fibronectin, laminin, and collagen type IV to intraocular lens materials. *J. Cataract Refract. Surg.* **25**, 1486–1491 (1999).
22. Linnola, R. J. *et al.* Adhesion of fibronectin, vitronectin, laminin, and collagen type IV to intraocular lens materials in pseudophakic human autopsy eyes. Part 2: explanted intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **26**, 1807–1818 (2000).
23. Rønbeck, M. & Kugelberg, M. Posterior capsule opacification with 3 intraocular lenses: 12-year prospective study. *J. Cataract Refract. Surg.* **40**, 70–76 (2014).
24. Samalonis, L. B. The Impact of Lens Design on Outcomes. *Rev. Ophthalmol.* (2006).
25. Morgan-Warren, P. J. & Smith, J. A. Intraocular lens-edge design and material factors contributing to posterior-capsulotomy rates: comparing Hoya FY60aD, PY60aD, and AcrySof SN60WF. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **7**, 1661–1667 (2013).
26. Nishi, Y., Ikeda, T., Nishi, K. & Mimura, O. Epidemiological evaluation of YAG capsulotomy incidence for posterior capsule opacification in various intraocular lenses in Japanese eyes. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **9**, 1613–1617 (2015).
27. Nishi, O., Nishi, K. & Osakabe, Y. Effect of intraocular lenses on preventing posterior capsule opacification: design versus material. *J. Cataract Refract. Surg.* **30**, 2170–2176 (2004).
28. Yuen, C., Williams, R., Batterbury, M. & Grierson, I. Modification of the surface

properties of a lens material to influence posterior capsular opacification. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **34**, 568–574 (2006).

29. Mukherjee, R., Chaudhury, K., Das, S., Sengupta, S. & Biswas, P. Posterior capsular opacification and intraocular lens surface micro-roughness characteristics: an atomic force microscopy study. *Micron Oxf. Engl.* **43**, 937–947 (2012).
30. Saika, S. Relationship between posterior capsule opacification and intraocular lens biocompatibility. *Prog. Retin. Eye Res.* **23**, 283–305 (2004).
31. Briz, N. *et al.* Fibronectin fixation on poly(ethyl acrylate)-based copolymers. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **101**, 991–997 (2013).
32. Kurosaka, D., Obasawa, M., Kurosaka, H. & Nakamura, K. Inhibition of lens epithelial cell migration by an acrylic intraocular lens in vitro. *Ophthalmic Res.* **34**, 29–37 (2002).
33. Chiantore, O., Trossarelli, L. & Lazzari, M. Photooxidative degradation of acrylic and methacrylic polymers. *Polymer* **41**, 1657–1668 (2000).
34. Vinu, R. & Madras, G. Photocatalytic degradation of methyl methacrylate copolymers. *Polym. Degrad. Stab.* **93**, 1440–1449 (2008).
35. Vinu, R. & Madras, G. Kinetics of sono-photooxidative degradation of poly(alkyl methacrylate)s. *Ultrason. Sonochem.* **18**, 608–616 (2011).
36. Konaganti, V. K. & Madras, G. Photooxidative and pyrolytic degradation of methyl methacrylate-alkyl acrylate copolymers. *Polym. Degrad. Stab.* **94**, 1325–1335 (2009).
37. Heavner, W. & Pevny, L. Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
38. Flammer, J. *et al.* The eye and the heart. *Eur. Heart J.* **34**, 1270–1278 (2013).
39. Renier, G. Immunologie de l'œil. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* **48**, 303–313 (2008).
40. Rose, A. in *Vision* 29–53 (Plenum Press, 1973).
41. Danysh, B. P. & Duncan, M. K. The lens capsule. *Exp. Eye Res.* **88**, 151–164 (2009).
42. Michael, R. & Bron, A. J. The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **366**, 1278–1292 (2011).
43. Horwitz, J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10449–10453 (1992).
44. Friedenwald, J. S. The Permeability of the Lens Capsule to Water, Dextrose, and Other Sugars. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **28**, 195–211 (1930).
45. Friedenwald, J. S. The Permeability of the Lens Capsule to Water, Dextrose, and

Other Sugars. *Arch. Ophthalmol.* **3**, 182 (1930).

46. Danysh, B. P. *et al.* Characterizing molecular diffusion in the lens capsule. *Matrix Biol.* **29**, 228–236 (2010).
47. Kastner, C. *et al.* Permeability of the Anterior Lens Capsule for Large Molecules and Small Drugs. *Curr. Eye Res.* **38**, 1057–1063 (2013).
48. Yan, Q., Clark, J. I., Wight, T. N. & Sage, E. H. Alterations in the lens capsule contribute to cataractogenesis in SPARC-null mice. *J. Cell Sci.* **115**, 2747–2756 (2002).
49. Gotoh, N. *et al.* An in vitro model of posterior capsular opacity: SPARC and TGF-beta2 minimize epithelial-to-mesenchymal transition in lens epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 4679–4687 (2007).
50. Hodgkinson, L. M. *et al.* MMP and TIMP expression in quiescent, dividing, and differentiating human lens cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 4192–4199 (2007).
51. Tamiya, S., Wormstone, I. M., Marcantonio, J. M., Gavrilovic, J. & Duncan, G. Induction of matrix metalloproteinases 2 and 9 following stress to the lens. *Exp. Eye Res.* **71**, 591–597 (2000).
52. Simirskii, V. N., Wang, Y. & Duncan, M. K. Conditional deletion of beta1-integrin from the developing lens leads to loss of the lens epithelial phenotype. *Dev. Biol.* **306**, 658–668 (2007).
53. Macknight, A. D. *et al.* Formation of the aqueous humor. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **27**, 100–106 (2000).
54. Dulaurent, T. & Douet, J.-Y. Physiologie comparée de l'angle iridocornéen du chien et de l'homme. *Rev. Médecine Vét.* **158**, 569–578 (2007).
55. De Berardinis, E., Tieri, O., Polzella, A. & Iuglio, N. The chemical composition of the human aqueous humour in normal and pathological conditions. *Exp. Eye Res.* **4**, 179–186 (1965).
56. Hightower, K. R., Leverenz, V. & Reddy, V. N. Calcium transport in the lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **19**, 1059–1066 (1980).
57. Hightower, K. R., Harrison, S. E., Unakar, N. J. & Tsui, J. Effects of intracellular calcium on lens membrane permeability. *Curr. Eye Res.* **4**, 693–701 (1985).
58. Matsushima, H., Mukai, K., Yoshida, S. & Obara, Y. Effects of calcium on human lens epithelial cells in vitro. *Jpn. J. Ophthalmol.* **48**, 97–100 (2004).
59. Rhodes, J. D. & Sanderson, J. The mechanisms of calcium homeostasis and signalling in the lens. *Exp. Eye Res.* **88**, 226–234 (2009).
60. Agarwal, R., Iezhitsa, I., Agarwal, P. & Spasov, A. Magnesium deficiency: does it

have a role to play in cataractogenesis? *Exp. Eye Res.* **101**, 82–89 (2012).

61. Tsentralovich, Y. P. *et al.* Metabolomic composition of normal aged and cataractous human lenses. *Exp. Eye Res.* **134**, 15–23 (2015).
62. Brennan, L. A., McGreal, R. S. & Kantorow, M. Oxidative stress defense and repair systems of the ocular lens. *Front. Biosci. Elite Ed.* **4**, 141–155 (2012).
63. Yam, J. C. S. & Kwok, A. K. H. Ultraviolet light and ocular diseases. *Int. Ophthalmol.* **34**, 383–400 (2014).
64. Ottonello, S., Foroni, C., Carta, A., Petrucco, S. & Maraini, G. Oxidative stress and age-related cataract. *Ophthalmol. J. Int. Ophthalmol. Int. J. Ophthalmol. Z. Für Augenheilkd.* **214**, 78–85 (2000).
65. Spector, A. & Garner, W. H. Hydrogen peroxide and human cataract. *Exp. Eye Res.* **33**, 673–681 (1981).
66. Bagnis, A., Izzotti, A., Centofanti, M. & Saccà, S. C. Aqueous humor oxidative stress proteomic levels in primary open angle glaucoma. *Exp. Eye Res.* **103**, 55–62 (2012).
67. Black, A. T. *et al.* UVB light regulates expression of antioxidants and inflammatory mediators in human corneal epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **81**, 873–880 (2011).
68. Sharma, R. K., Rogojina, A. T. & Chalam, K. V. Multiplex immunoassay analysis of biomarkers in clinically accessible quantities of human aqueous humor. *Mol. Vis.* **15**, 60–69 (2009).
69. Duke-Elder, W. S. The pathological action of light upon the eye. *The Lancet* **207**, 1137–1141 (1926).
70. Duke-Elder, W. S. The pathological action of light upon the eye. *The Lancet* **207**, 1188–1191 (1926).
71. Podskochy, A. Protective role of corneal epithelium against ultraviolet radiation damage. *Acta Ophthalmol. Scand.* **82**, 714–717 (2004).
72. Marchitti, S. A., Chen, Y., Thompson, D. C. & Vasiliou, V. Ultraviolet radiation: cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes. *Eye Contact Lens* **37**, 206–213 (2011).
73. Truscott, R. J. W. Age-related nuclear cataract-oxidation is the key. *Exp. Eye Res.* **80**, 709–725 (2005).
74. Kammeyer, A. & Luiten, R. M. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **21**, 16–29 (2015).
75. Rapp, L. M. & Ghalayini, A. J. Influence of UVA Light Stress on Photoreceptor Cell Metabolism: Decreased Rates of Rhodopsin Regeneration and Opsin Synthesis. *Exp. Eye Res.*

68, 757–764 (1999).

76. Remé, C., Reinboth, J., Clausen, M. & Hafezi, F. Light damage revisited: converging evidence, diverging views? *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* **234**, 2–11 (1996).

77. Owsley, C. Aging and vision. *Vision Res.* **51**, 1610–1622 (2011).

78. Dagnelie, G. Age-related psychophysical changes and low vision. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, ORSF88–93 (2013).

79. Grossniklaus, H. E., Nickerson, J. M., Edelhauser, H. F., Bergman, L. A. M. K. & Berglin, L. Anatomic alterations in aging and age-related diseases of the eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, ORSF23–27 (2013).

80. Fisher, R. F. Changes in the permeability of the lens capsule in senile cataract. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* **97**, 100–103 (1977).

81. Brian, G. & Taylor, H. Cataract blindness - challenges for the 21st century. *Bull. World Health Organ.* 249–256 (2001).

82. Prokofyeva, E., Wegener, A. & Zrenner, E. Cataract prevalence and prevention in Europe: a literature review. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **91**, 395–405 (2013).

83. Truscott, R. J. W. & Friedrich, M. G. Old proteins and the Achilles heel of mass spectrometry. The role of proteomics in the etiology of human cataract. *Proteomics Clin. Appl.* **8**, 195–203 (2014).

84. Grewal, D. S., Brar, G. S. & Grewal, S. P. S. Correlation of nuclear cataract lens density using Scheimpflug images with Lens Opacities Classification System III and visual function. *Ophthalmology* **116**, 1436–1443 (2009).

85. Horwitz, J., Emmons, T. & Takemoto, L. The ability of lens alpha crystallin to protect against heat-induced aggregation is age-dependent. *Curr. Eye Res.* **11**, 817–822 (1992).

86. Delcourt, C. *et al.* Lifetime exposure to ambient ultraviolet radiation and the risk for cataract extraction and age-related macular degeneration: the Alienor Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 7619–7627 (2014).

87. James, E. R. The etiology of steroid cataract. *J. Ocul. Pharmacol. Ther. Off. J. Assoc. Ocul. Pharmacol. Ther.* **23**, 403–420 (2007).

88. Spaeth, G. L. & Von Sallmann, L. Corticosteroids and cataracts. *Int. Ophthalmol. Clin.* **6**, 915–928 (1966).

89. Gong, Y., Feng, K., Yan, N., Xu, Y. & Pan, C.-W. Different amounts of alcohol consumption and cataract: a meta-analysis. *Optom. Vis. Sci. Off. Publ. Am. Acad. Optom.* **92**, 471–479 (2015).

90. Kanthan, G. L., Mitchell, P., Burlutsky, G. & Wang, J. J. Alcohol consumption and the long-term incidence of cataract and cataract surgery: the Blue Mountains Eye Study. *Am. J. Ophthalmol.* **150**, 434–440.e1 (2010).
91. Artigas, J. M., Felipe, A., Navea, A., Artigas, C. & Menezo, J. L. Ultraviolet radiation at Mediterranean latitudes and protection efficacy of intraocular lenses. *J. Fr. Ophthalmol.* **36**, 23–28 (2013).
92. Javitt, J. C. & Taylor, H. R. Cataract and latitude. *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* **88**, 307–325 (1994).
93. Kelman, C. D. Phaco-emulsification and aspiration. A new technique of cataract removal. A preliminary report. *Am. J. Ophthalmol.* **64**, 23–35 (1967).
94. Bozukova, D., Pagnouille, C., Jérôme, R. & Jérôme, C. Polymers in modern ophthalmic implants—Historical background and recent advances. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **69**, 63–83 (2010).
95. Evolution of Cataract Surgery and Intraocular Lenses (IOLs). *Surv. Ophthalmol.* **45**, S53–S69 (2000).
96. Dewey, S. *et al.* Microincisions in cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **40**, 1549–1557 (2014).
97. Birinci, H., Kuruoğlu, S., Oge, I., Oge, F. & Acar, E. Effect of intraocular lens and anterior capsule opening type on posterior capsule opacification. *J. Cataract Refract. Surg.* **25**, 1140–1146 (1999).
98. Pande, M., Spalton, D. J. & Marshall, J. Continuous curvilinear capsulorhexis and intraocular lens biocompatibility. *J. Cataract Refract. Surg.* **22**, 89–97 (1996).
99. Cekiç, O. & Batman, C. Effect of capsulorhexis size on postoperative intraocular pressure. *J. Cataract Refract. Surg.* **25**, 416–419 (1999).
100. Aykan, U., Bilge, A. H., Karadayi, K. & Akin, T. The effect of capsulorhexis size on development of posterior capsule opacification: small (4.5 to 5.0 mm) versus large (6.0 to 7.0 mm). *Eur. J. Ophthalmol.* **13**, 541–545 (2003).
101. Takamura, Y. *et al.* Large capsulorhexis with implantation of a 7.0 mm optic intraocular lens during cataract surgery in patients with diabetes mellitus. *J. Cataract Refract. Surg.* **40**, 1850–1856 (2014).
102. Langwińska-Wośko, E., Broniek-Kowalik, K. & Szulborski, K. The impact of capsulorhexis diameter, localization and shape on posterior capsule opacification. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **17**, CR577–582 (2011).
103. Stein, J. D. Serious adverse events after cataract surgery. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **23**,

219–225 (2012).

104. Grewal, D. S., Schultz, T., Basti, S. & Dick, H. B. Femtosecond Laser Assisted Cataract Surgery - Current Status And Future Directions. *Surv. Ophthalmol.* (2015). doi:10.1016/j.survophthal.2015.09.002

105. Kent, C. Who's Getting Femto Laser Cataract Surgery? *Rev. Ophthalmol.* (2015).

106. Ho, J. W. & Afshari, N. A. Advances in cataract surgery: preserving the corneal endothelium. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **26**, 22–27 (2015).

107. Shah, S. K. *et al.* Impact of anterior capsule polishing on anterior capsule opacification after cataract surgery: a randomized clinical trial. *Eye Lond. Engl.* **23**, 1702–1706 (2009).

108. Sarwar, H. & Modi, N. Sir Harold Ridley: innovator of cataract surgery. *J. Perioper. Pract.* **24**, 210–212 (2014).

109. Downes, S. M. Ultraviolet or blue-filtering intraocular lenses: what is the evidence? *Eye Lond. Engl.* **30**, 215–221 (2016).

110. Leung, T. G., Lindsley, K. & Kuo, I. C. Types of intraocular lenses for cataract surgery in eyes with uveitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **3**, CD007284 (2014).

111. Apple, D. J. *et al.* Irreversible silicone oil adhesion to silicone intraocular lenses. A clinicopathologic analysis. *Ophthalmology* **103**, 1555–1561; discussion 1561–1562 (1996).

112. Apple, D. J. *et al.* Silicone oil adhesion to intraocular lenses: an experimental study comparing various biomaterials. *J. Cataract Refract. Surg.* **23**, 536–544 (1997).

113. Braga-Mele, R. *et al.* Multifocal intraocular lenses: relative indications and contraindications for implantation. *J. Cataract Refract. Surg.* **40**, 313–322 (2014).

114. Schroeder, A. C. *et al.* Impact of fibronectin on surface properties of intraocular lenses. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* **247**, 1277–1283 (2009).

115. Tognetto, D., Toto, L., Ballone, E. & Ravalico, G. Biocompatibility of hydrophilic intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **28**, 644–651 (2002).

116. Nishi, O. & Nishi, K. Preventing posterior capsule opacification by creating a discontinuous sharp bend in the capsule. *J. Cataract Refract. Surg.* **25**, 521–526 (1999).

117. Nanavaty, M. A., Spalton, D. J., Boyce, J., Brain, A. & Marshall, J. Edge profile of commercially available square-edged intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **34**, 677–686 (2008).

118. Mencucci, R., Favuzza, E., Boccalini, C., Gicquel, J.-J. & Raimondi, L. Square-edge intraocular lenses and epithelial lens cell proliferation: implications on posterior capsule opacification in an in vitro model. *BMC Ophthalmol.* **15**, 5 (2015).

119. Miyata, A. & Yaguchi, S. Equilibrium water content and glistenings in acrylic intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **30**, 1768–1772 (2004).
120. Pagnouille, C., Bozukova, D., Gobin, L., Bertrand, V. & Gillet-De Pauw, M.-C. Assessment of new-generation glistening-free hydrophobic acrylic intraocular lens material. *J. Cataract Refract. Surg.* **38**, 1271–1277 (2012).
121. Maedel, S., Hirnschall, N., Chen, Y.-A. & Findl, O. Effect of heparin coating of a foldable intraocular lens on inflammation and capsular bag performance after cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **39**, 1810–1817 (2013).
122. Edwards, K. H. & Gibson, G. A. Intraocular lens short wavelength light filtering. *Clin. Exp. Optom. J. Aust. Optom. Assoc.* **93**, 390–399 (2010).
123. Kuehn, K.-D., Ege, W. & Gopp, U. Acrylic bone cements: composition and properties. *Orthop. Clin. North Am.* **36**, 17–28, v (2005).
124. Kuehn, K.-D., Ege, W. & Gopp, U. Acrylic bone cements: mechanical and physical properties. *Orthop. Clin. North Am.* **36**, 29–39, v–vi (2005).
125. Lidgren, L. & Robertson, O. Acrylic bone cements: clinical developments and current status: Scandinavia. *Orthop. Clin. North Am.* **36**, 55–61, vi (2005).
126. Klinger, D. R. *et al.* Autologous and acrylic cranioplasty: a review of 10 years and 258 cases. *World Neurosurg.* **82**, e525–530 (2014).
127. Magnan, B. *et al.* Acrylic bone cement: current concept review. *Musculoskelet. Surg.* **97**, 93–100 (2013).
128. Stayton, P. S. *et al.* ‘Smart’ delivery systems for biomolecular therapeutics. *Orthod. Craniofac. Res.* **8**, 219–225 (2005).
129. Bromberg, L. Intelligent hydrogels for the oral delivery of chemotherapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2**, 1003–1013 (2005).
130. Langlais, F. *et al.* [Use of acrylic cement with antibiotic in primary arthroplasty]. *Rev. Chir. Orthopédique Réparatrice Appar. Mot.* **94 Suppl**, S215–218 (2008).
131. Lewis, G. Properties of antibiotic-loaded acrylic bone cements for use in cemented arthroplasties: a state-of-the-art review. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **89**, 558–574 (2009).
132. Schuren, J., Becker, A. & Sibbald, R. G. A liquid film-forming acrylate for peri-wound protection: a systematic review and meta-analysis (3M Cavilon no-sting barrier film). *Int. Wound J.* **2**, 230–238 (2005).
133. Calvert, P. D. Polymer degradation and stabilisation. *Br. Polym. J.* **18**, 278–278 (1986).

134. Singh, B. & Sharma, N. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym. Degrad. Stab.* **93**, 561–584 (2008).
135. Bohra, P. K., Ganesh, P. R., Reddy, M. M., Ebenezar, A. V. R. & Sivakumar, G. Colour stability of heat and cold cure acrylic resins. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **9**, ZC12–15 (2015).
136. Holland, B. & Hay, J. The kinetics and mechanisms of the thermal degradation of poly(methyl methacrylate) studied by the thermal analysis-fourier transform infrared spectroscopy. *Polymer* 4825–4835 (2001).
137. Ferriol, M., Gentilhomme, A., Cochez, M., Oget, N. & Mieloszynski, J. L. Thermal degradation of poly(methyl methacrylate) (PMMA): modelling of DTG and TG curves. *Polym. Degrad. Stab.* **79**, 271–281 (2003).
138. Hu, Y.-H. & Chen, C.-Y. Study of the thermal behaviour of poly(methyl methacrylate) initiated by lactams and thiols. *Polym. Degrad. Stab.* **80**, 1–10 (2003).
139. Hu, Y.-H. & Chen, C.-Y. The effect of end groups on the thermal degradation of poly(methyl methacrylate). *Polym. Degrad. Stab.* **82**, 81–88 (2003).
140. Hu, Y.-H., Chen, C.-Y. & Wang, C.-C. Thermal degradation kinetics of poly(n-butyl acrylate) initiated by lactams and thiols. *Polym. Degrad. Stab.* **84**, 505–514 (2004).
141. Rabek, J. F. in *Polymer Photodegradation* 255–352 (Springer Netherlands, 1995).
142. Konaganti, V. K. & Madras, G. Ultrasonic degradation of poly(methyl methacrylate-co-alkyl acrylate) copolymers. *Ultrason. Sonochem.* **17**, 403–408 (2010).
143. Chiantore, O. & Lazzari, M. Photo-oxidative stability of paraloid acrylic protective polymers. *Polymer* **42**, 17–27 (2001).
144. Krongauz, V. V. & Ling, M. T. K. Photo-crosslinked acrylates degradation kinetics. *J. Therm. Anal. Calorim.* **96**, 715–725 (2009).
145. Krongauz, V. V. Crosslink density dependence of polymer degradation kinetics: Photocrosslinked acrylates. *Thermochim. Acta* **503–504**, 70–84 (2010).
146. Pintus, V. & Schreiner, M. Characterization and identification of acrylic binding media: influence of UV light on the ageing process. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 2961–2976 (2011).
147. Chiantore, O., Lazzari, M., Aglietto, M., Castelvetro, V. & Ciardelli, F. Photochemical stability of partially fluorinated acrylic protective coatings I. Poly(2,2,2-trifluoroethyl methacrylate) and poly(1H,1H,2H,2H-perfluorodecyl methacrylate-co-2-ethylhexyl methacrylate)s. *Polym. Degrad. Stab.* **67**, 461–467 (2000).
148. Yousif, A., Jamal, M. A. & Raad, I. Biofilm-based central line-associated bloodstream

- infections. *Adv. Exp. Med. Biol.* **830**, 157–179 (2015).
149. Kaczmarek, H., Kamińska, A., Świątek, M. & Sanyal, S. Photoinitiated degradation of polystyrene in the presence of low-molecular organic compounds. *Eur. Polym. J.* **36**, 1167–1173 (2000).
150. Ghaffar, A. *et al.* Fast in vitro hydrolytic degradation of polyester urethane acrylate biomaterials: structure elucidation, separation and quantification of degradation products. *J. Chromatogr. A* **1218**, 449–458 (2011).
151. Seidel, J. M. & Malmonge, S. M. Synthesis of polyHEMA hydrogels for using as biomaterials. Bulk and solution radical-initiated polymerization techniques. *Mater. Res.* **3**, 79–83 (2000).
152. Mamalis, N. Intraocular lens dislocation. *J. Cataract Refract. Surg.* **39**, 973–974 (2013).
153. Dabrowska-Kloda, K., Kloda, T., Boudiaf, S., Jakobsson, G. & Stenevi, U. Incidence and risk factors of late in-the-bag intraocular lens dislocation: Evaluation of 140 eyes between 1992 and 2012. *J. Cataract Refract. Surg.* (2015). doi:10.1016/j.jcrs.2014.10.040
154. Werner, L. Glistenings and surface light scattering in intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **36**, 1398–1420 (2010).
155. Kato, K. *et al.* Glistening formation in an AcrySof lens initiated by spinodal decomposition of the polymer network by temperature change. *J. Cataract Refract. Surg.* **27**, 1493–1498 (2001).
156. Tognetto, D., Toto, L., Sanguinetti, G. & Ravalico, G. Glistenings in foldable intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **28**, 1211–1216 (2002).
157. Xi, L., Liu, Y., Zhao, F., Chen, C. & Cheng, B. Analysis of glistenings in hydrophobic acrylic intraocular lenses on visual performance. *Int. J. Ophthalmol.* **7**, 446–451 (2014).
158. Kodjikian, L. *et al.* Postcataract acute endophthalmitis in France: national prospective survey. *J. Cataract Refract. Surg.* **35**, 89–97 (2009).
159. Gower, E. W. *et al.* Characteristics of Endophthalmitis after Cataract Surgery in the United States Medicare Population. *Ophthalmology* (2015). doi:10.1016/j.optha.2015.04.036
160. Fong, C. S.-U. *et al.* Three-year incidence and factors associated with posterior capsule opacification after cataract surgery: The Australian Prospective Cataract Surgery and Age-related Macular Degeneration Study. *Am. J. Ophthalmol.* **157**, 171–179.e1 (2014).
161. Ong, M. D., Callaghan, T. A., Pei, R. & Karakelle, M. Etiology of surface light scattering on hydrophobic acrylic intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **38**, 1833–1844 (2012).

162. Morris, C. *et al.* Light scattering and light transmittance of cadaver eye-explanted intraocular lenses of different materials. *J. Cataract Refract. Surg.* **40**, 129–137 (2014).
163. Sangal, N. & Chen, T. C. Cataract Surgery in Pseudoexfoliation Syndrome. *Semin. Ophthalmol.* **29**, 403–408
164. Sekeroğlu, H. T., Erdem, E., Yar, K. & Demircan, N. An unexpected delayed complication of cataract surgery: retinal detachment secondary to capsular tension ring dislocation. *Case Rep. Ophthalmol.* **3**, 266–269 (2012).
165. da Rocha-Bastos, R. A., Silva, S. E., Prézia, F., Falcão-Reis, F. & Melo, A. B. Pseudoexfoliation material on posterior chamber intraocular lenses. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **8**, 1475–1478 (2014).
166. Jovanović, M. Bilateral spontaneous crystalline lens dislocation to the anterior chamber: a case report. *Srp. Arh. Celok. Lek.* **141**, 800–802 (2013).
167. Yotsukura-Tsutsui, E., Koto, T., Tsubota, K. & Ozawa, Y. Predisposing factors for intraocular lens dislocation treated by pars plana vitrectomy: Involvement of atopic dermatitis. *J. Cataract Refract. Surg.* **41**, 892–894 (2015).
168. Tao, L. W. & Hall, A. In-bag dislocation of intraocular lens in patients with uveitis: a case series. *J. Ophthalmic Inflamm. Infect.* **5**, 10 (2015).
169. Leung, V. C., Singh, H. & Ahmed, I. I. K. Inter-eye differences in patients with pseudoexfoliation syndrome presenting with intraocular lens dislocation. *Ophthalmology* **122**, 480–485 (2015).
170. Ascaso, F. J., Huerva, V. & Grzybowski, A. Epidemiology, Etiology, and Prevention of Late IOL-Capsular Bag Complex Dislocation: Review of the Literature. *J. Ophthalmol.* **2015**, (2015).
171. Rezaei-Kanavi, M., Javadi, M.-A. & Mirbabaei-Ghafghazi, F. Intraocular lens calcification; a clinicopathologic report. *J. Ophthalmic Vis. Res.* **4**, 122–124 (2009).
172. Schmidbauer, J. M., Apple, D. J. & Werner, L. Posterior Capsule Opacification. *Int. Ophthalmol. Clin.* **41**, 109–131 (2001).
173. Milazzo, S., Grenot, M. & Benzerroug, M. [Posterior capsule opacification]. *J. Fr. Ophtalmol.* **37**, 825–830 (2014).
174. Findl, O. *et al.* Comparison of 4 methods for quantifying posterior capsule opacification. *J. Cataract Refract. Surg.* **29**, 106–111 (2003).
175. Sundelin, K., Almarzouki, N., Soltanpour, Y., Petersen, A. & Zetterberg, M. Five-year incidence of Nd:YAG laser capsulotomy and association with in vitro proliferation of lens epithelial cells from individual specimens: a case control study. *BMC Ophthalmol.* **14**, 116

(2014).

176. Nibourg, L. M. *et al.* Prevention of posterior capsular opacification. *Exp. Eye Res.* **136**, 100–115 (2015).
177. Awasthi, N., Guo, S. & Wagner, B. J. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* **127**, 555–562 (2009).
178. Chang, A., Behndig, A., Rønbeck, M. & Kugelberg, M. Comparison of posterior capsule opacification and glistenings with 2 hydrophobic acrylic intraocular lenses: 5- to 7-year follow-up. *J. Cataract Refract. Surg.* **39**, 694–698 (2013).
179. Rønbeck, M., Zetterström, C., Wejde, G. & Kugelberg, M. Comparison of posterior capsule opacification development with 3 intraocular lens types: five-year prospective study. *J. Cataract Refract. Surg.* **35**, 1935–1940 (2009).
180. Spyratou, E. *et al.* UV laser ablation of intraocular lenses: SEM and AFM microscopy examination of the biomaterial surface. *Appl. Surf. Sci.* **256**, 2539–2545 (2010).
181. Marcantonio, J. M. & Vrensen, G. F. Cell biology of posterior capsular opacification. *Eye Lond. Engl.* **13 (Pt 3b)**, 484–488 (1999).
182. Duncan, G., Wormstone, I. M. & Davies, P. D. The aging human lens: structure, growth, and physiological behaviour. *Br. J. Ophthalmol.* **81**, 818–823 (1997).
183. Buehl, W., Findl, O., Neumayer, T., Georgopoulos, M. & Sacu, S. Short-term changes in the morphology of posterior capsule opacification. *J. Cataract Refract. Surg.* **31**, 962–968 (2005).
184. Neumayer, T. *et al.* Long-term changes in the morphology of posterior capsule opacification. *J. Cataract Refract. Surg.* **31**, 2120–2128 (2005).
185. Neumayer, T., Findl, O., Buehl, W. & Georgopoulos, M. Daily changes in the morphology of Elschnig pearls. *Am. J. Ophthalmol.* **141**, 517–523 (2006).
186. Caballero, A., Garcia-Elskamp, C., Losada, M., Salinas, M. & Marin, J. M. Natural evolution of Elschnig pearl posterior capsule opacification after posterior capsulotomy. *J. Cataract Refract. Surg.* **27**, 1979–1986 (2001).
187. Nakashima, Y., Yoshitomi, F. & Oshika, T. Regression of Elschnig pearls on the posterior capsule in a pseudophakic eye. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* **120**, 397–398 (2002).
188. Kurosaka, D., Kato, K., Nagamoto, T. & Negishi, K. Growth factors influence contractility and alpha-smooth muscle actin expression in bovine lens epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 1701–1708 (1995).
189. Tingström, A., Heldin, C. H. & Rubin, K. Regulation of fibroblast-mediated collagen

gel contraction by platelet-derived growth factor, interleukin-1 alpha and transforming growth factor-beta 1. *J. Cell Sci.* **102 (Pt 2)**, 315–322 (1992).

190. Wormstone, I. M. & Eldred, J. A. Experimental models for posterior capsule opacification research. *Exp. Eye Res.* (2015). doi:10.1016/j.exer.2015.04.021

191. McDowell, C. M., Tebow, H. E., Wordinger, R. J. & Clark, A. F. Smad3 is necessary for transforming growth factor-beta2 induced ocular hypertension in mice. *Exp. Eye Res.* **116**, 419–423 (2013).

192. Saika, S. *et al.* Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. *Am. J. Pathol.* **164**, 651–663 (2004).

193. Linnola, R. J. *et al.* Adhesion of fibronectin, vitronectin, laminin, and collagen type IV to intraocular lens materials in pseudophakic human autopsy eyes. Part 1: histological sections. *J. Cataract Refract. Surg.* **26**, 1792–1806 (2000).

194. Schroeder, A. C. *et al.* Influence of fibronectin on the adherence of *Staphylococcus epidermidis* to coated and uncoated intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **34**, 497–504 (2008).

195. Olivero, D. K. & Furcht, L. T. Type IV collagen, laminin, and fibronectin promote the adhesion and migration of rabbit lens epithelial cells in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 2825–2834 (1993).

196. Probst, K., Fijnheer, R., Schellekens, P. & Rothova, A. Intraocular and plasma levels of cellular fibronectin in patients with uveitis and diabetes mellitus. *Br. J. Ophthalmol.* **88**, 667–672 (2004).

197. Kochounian, H. H., Kovacs, S. A., Sy, J., Grubbs, D. E. & Maxwell, W. A. Identification of intraocular lens-adsorbed proteins in mammalian in vitro and in vivo systems. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* **112**, 395–401 (1994).

198. Linnola, R. J., Sund, M., Ylönen, R. & Pihlajaniemi, T. Adhesion of soluble fibronectin, vitronectin, and collagen type IV to intraocular lens materials. *J. Cataract Refract. Surg.* **29**, 146–152 (2003).

199. Praveen, M. R. *et al.* A prospective evaluation of posterior capsule opacification in eyes with diabetes mellitus: a case-control study. *Eye Lond. Engl.* **28**, 720–727 (2014).

200. Rauz, S., Stavrou, P. & Murray, P. I. Evaluation of foldable intraocular lenses in patients with uveitis. *Ophthalmology* **107**, 909–919 (2000).

201. Dana, M. R., Chatzistefanou, K., Schaumberg, D. A. & Foster, C. S. Posterior capsule opacification after cataract surgery in patients with uveitis. *Ophthalmology* **104**, 1387–1393; discussion 1393–1394 (1997).

202. Østern, A. E., Saethre, M., Sandvik, G., Råen, M. & Drolsum, L. Posterior capsular opacification in patients with pseudoexfoliation syndrome: a long-term perspective. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **91**, 231–235 (2013).
203. Findl, O., Buehl, W., Bauer, P. & Sycha, T. in *Cochrane Database of Systematic Reviews* (ed. The Cochrane Collaboration) (John Wiley & Sons, Ltd, 2010).
204. Peng, Q. *et al.* Surgical prevention of posterior capsule opacification. Part 3: Intraocular lens optic barrier effect as a second line of defense. *J. Cataract Refract. Surg.* **26**, 198–213 (2000).
205. Luft, N. *et al.* Evaluation of laser capsule polishing for prevention of posterior capsule opacification in a human ex vivo model. *J. Cataract Refract. Surg.* **41**, 2739–2745 (2015).
206. Rahman, R., Briffa, B. V., Gupta, A. & Chinn, D. J. Factors contributing to posterior capsule opacification following 23-gauge transconjunctival phacovitrectomy. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging Off. J. Int. Soc. Imaging Eye* **42**, 229–233 (2011).
207. Yap, E. Y. & Heng, W. J. Visual outcome and complications after posterior capsule rupture during phacoemulsification surgery. *Int. Ophthalmol.* **23**, 57–60 (1999).
208. Zafeiropoulos, P., Katsanos, A., Gorgoli, K., Asproudis, I. & Aspiotis, M. Late-onset capsular bag distension syndrome: a report of two cases. *Acta Medica Hradec Král. Univ. Carol. Fac. Medica Hradec Král.* **57**, 165–167 (2015).
209. Wertheimer, C. *et al.* EGF receptor inhibitor erlotinib as a potential pharmacological prophylaxis for posterior capsule opacification. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* **251**, 1529–1540 (2013).
210. Wertheimer, C. *et al.* EGFR-blockade with erlotinib reduces EGF and TGF- β 2 expression and the actin-cytoskeleton which influences different aspects of cellular migration in lens epithelial cells. *Curr. Eye Res.* **39**, 1000–1012 (2014).
211. Wertheimer, C. *et al.* Erufosine, a phosphoinositide-3-kinase inhibitor, to mitigate posterior capsule opacification in the human capsular bag model. *J. Cataract Refract. Surg.* (2015). doi:10.1016/j.jcrs.2015.02.034
212. Sun, C., Teng, W., Cui, J., Huang, X. & Yao, K. The effect of anti-TGF- β 2 antibody functionalized intraocular lens on lens epithelial cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **113**, 33–42 (2014).
213. Hazra, S. *et al.* Modulation of matrix metalloproteinase activity by EDTA prevents posterior capsular opacification. *Mol. Vis.* **18**, 1701–1711 (2012).
214. Meacock, W. R. *et al.* Double-masked prospective ocular safety study of a lens epithelial cell antibody to prevent posterior capsule opacification. *J. Cataract Refract. Surg.*

26, 716–721 (2000).

215. Ayaki, M., Ishida, Y., Nishimura, E. & Yaguchi, S. Lens epithelial cell migration between posterior capsule and intraocular lens with variously finished posterior optic edge and two haptic angulations. *Ophthalmic Res.* **35**, 261–267 (2003).
216. Prinz, A. *et al.* Comparison of posterior capsule opacification between a 1-piece and a 3-piece microincision intraocular lens. *Br. J. Ophthalmol.* **97**, 18–22 (2013).
217. Davison, J. A. Clinical performance of Alcon SA30AL and SA60AT single-piece acrylic intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **28**, 1112–1123 (2002).
218. Cunanan, C. M., Tarbaux, N. M. & Knight, P. M. Surface properties of intraocular lens materials and their influence on in vitro cell adhesion. *J. Cataract Refract. Surg.* **17**, 767–773 (1991).
219. Tanaka, T., Shigeta, M., Yamakawa, N. & Usui, M. Cell adhesion to acrylic intraocular lens associated with lens surface properties. *J. Cataract Refract. Surg.* **31**, 1648–1651 (2005).
220. Katayama, Y., Kobayakawa, S., Yanagawa, H. & Tochikubo, T. The relationship between the adhesion characteristics of acrylic intraocular lens materials and posterior capsule opacification. *Ophthalmic Res.* **39**, 276–281 (2007).
221. Yamakawa, N., Tanaka, T., Shigeta, M., Hamano, M. & Usui, M. Surface roughness of intraocular lenses and inflammatory cell adhesion to lens surfaces. *J. Cataract Refract. Surg.* **29**, 367–370 (2003).
222. Palacio, M., Schricker, S. & Bhushan, B. Morphology and protein adsorption characteristics of block copolymer surfaces. *J. Microsc.* **240**, 239–248 (2010).
223. Amon, M. & Menapace, R. In vivo documentation of cellular reactions on lens surfaces for assessing the biocompatibility of different intraocular implants. *Eye Lond. Engl.* **8** (Pt 6), 649–656 (1994).
224. Yan, Q., Perdue, N. & Sage, E. H. Differential responses of human lens epithelial cells to intraocular lenses in vitro: hydrophobic acrylic versus PMMA or silicone discs. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* **243**, 1253–1262 (2005).
225. Nishi, O. & Nishi, K. Effect of the optic size of a single-piece acrylic intraocular lens on posterior capsule opacification. *J. Cataract Refract. Surg.* **29**, 348–353 (2003).
226. Leishman, L. *et al.* Prevention of capsular bag opacification with a modified hydrophilic acrylic disk-shaped intraocular lens. *J. Cataract Refract. Surg.* **38**, 1664–1670 (2012).

227. Floyd, A. M. *et al.* Capsular bag opacification with a new accommodating intraocular lens. *J. Cataract Refract. Surg.* **39**, 1415–1420 (2013).
228. Neugebauer, D. Graft copolymers with poly(ethylene oxide) segments. *Polym. Int.* **56**, 1469–1498 (2007).
229. Lutz, J.-F. Polymerization of oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **46**, 3459–3470 (2008).
230. Wischerhoff, E. *et al.* Controlled Cell Adhesion on PEG-Based Switchable Surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 5666–5668 (2008).
231. Xu, X. *et al.* Surface PEGylation of intraocular lens for PCO prevention: An in vivo evaluation. *J. Biomater. Appl.* (2016). doi:10.1177/0885328216638547
232. Lee, H. I. *et al.* The efficacy of an acrylic intraocular lens surface modified with polyethylene glycol in posterior capsular opacification. *J. Korean Med. Sci.* **22**, 502–507 (2007).
233. Viveiros, M. M. H. *et al.* Adhesion study of cultured human lens capsule cells on hydrophilic intraocular lenses coated with polyethylene glycol. *J. Cataract Refract. Surg.* (2015). doi:10.1016/j.jcrs.2014.11.047
234. Cole, M. A., Voelcker, N. H., Thissen, H. & Griesser, H. J. Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein-surface and cell-surface interactions. *Biomaterials* **30**, 1827–1850 (2009).
235. D'Sa, R. A., Burke, G. A. & Meenan, B. J. Lens epithelial cell response to atmospheric pressure plasma modified poly(methylmethacrylate) surfaces. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **21**, 1703–1712 (2010).
236. Larsson, R., Selén, G., Björcklund, H. & Fagerholm, P. Intraocular PMMA lenses modified with surface-immobilized heparin: evaluation of biocompatibility in vitro and in vivo. *Biomaterials* **10**, 511–516 (1989).
237. Madrid-Costa, D., Ruiz-Alcocer, J., Ferrer-Blasco, T., García-Lázaro, S. & Montés-Micó, R. In vitro optical performance of a new aberration-free intraocular lens. *Eye Lond. Engl.* **28**, 614–620 (2014).
238. Shen, W. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition contributes to docetaxel resistance in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Res.* **22**, 47–55 (2014).
239. Eldred, J. A., Dawes, L. J. & Wormstone, I. M. The lens as a model for fibrotic disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **366**, 1301–1319 (2011).
240. Kurosaka, D., Yoshino, M., Kurosaka, H. & Nakamura, K. Effect of posterior

- convexity of intraocular lenses on lens epithelial cell migration. *Jpn. J. Ophthalmol.* **47**, 332–337 (2003).
241. Hesse, Y., Kampmeier, J., Lang, G. K., Baldysiak-Figiel, A. & Lang, G. E. Adherence and viability of porcine lens epithelial cells on three different IOL materials in vitro. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* **241**, 823–826 (2003).
242. Jun, J. H., Sohn, W.-J., Lee, Y., Chang, S. D. & Kim, J.-Y. Experimental lens capsular bag model for posterior capsule opacification. *Cell Tissue Res.* **357**, 101–108 (2014).
243. Pintwala, R., Postnikoff, C., Molladavoodi, S. & Gorbet, M. Coculture with intraocular lens material-activated macrophages induces an inflammatory phenotype in lens epithelial cells. *J. Biomater. Appl.* **29**, 1119–1132 (2015).
244. Lois, N., Dawson, R., McKinnon, A. D. & Forrester, J. V. A new model of posterior capsule opacification in rodents. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 3450–3457 (2003).
245. Mamuya, F. A. *et al.* The roles of αV integrins in lens EMT and posterior capsular opacification. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 656–670 (2014).
246. Lois, N., Taylor, J., McKinnon, A. D. & Forrester, J. V. Posterior capsule opacification in mice. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* **123**, 71–77 (2005).
247. Dawes, L. J., Illingworth, C. D. & Wormstone, I. M. A fully human in vitro capsular bag model to permit intraocular lens evaluation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 23–29 (2012).
248. Lloyd, A. W. *et al.* The development of in vitro biocompatibility tests for the evaluation of intraocular biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **10**, 621–627 (1999).
249. Amoozgar, B., Morarescu, D. & Sheardown, H. Sulfadiazine modified PDMS as a model material with the potential for the mitigation of posterior capsule opacification (PCO). *Colloids Surf. B Biointerfaces* **111**, 15–23 (2013).
250. Lovicu, F. J., Shin, E. H. & McAvoy, J. W. Fibrosis in the lens. Sprouty regulation of TGF β -signaling prevents lens EMT leading to cataract. *Exp. Eye Res.* (2015). doi:10.1016/j.exer.2015.02.004
251. Finnson, K. W., McLean, S., Di Guglielmo, G. M. & Philip, A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Adv. Wound Care* **2**, 195–214 (2013).
252. Drews, R. C. Residual monomer in Ridley lens. *J. Cataract Refract. Surg.* **15**, 463 (1989).
253. Chirila, T. V., Walker, L. N., Constable, I. J., Thompson, D. E. & Barrett, G. D.

Cytotoxic effects of residual chemicals from polymeric biomaterials for artificial soft intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **17**, 154–162 (1991).

254. Lombardo, M., De Santo, M. P., Lombardo, G., Barberi, R. & Serrao, S. Analysis of intraocular lens surface properties with atomic force microscopy. *J. Cataract Refract. Surg.* **32**, 1378–1384 (2006).

255. Saylor, D. M., Coleman Richardson, D., Dair, B. J. & Pollack, S. K. Osmotic cavitation of elastomeric intraocular lenses. *Acta Biomater.* **6**, 1090–1098 (2010).

256. Tai, H. *et al.* Photo-cross-linked hydrogels from thermoresponsive PEGMEMA-PPGMA-EGDMA copolymers containing multiple methacrylate groups: mechanical property, swelling, protein release, and cytotoxicity. *Biomacromolecules* **10**, 2895–2903 (2009).

257. Cheong, S. I., Kim, B., Lee, H. & Rhim, J. W. Physical adsorption of water-soluble polymers on hydrophobic polymeric membrane surfaces via salting-out effect. *Macromol. Res.* **21**, 629–635 (2013).

258. Orimoto, A. *et al.* Effect of 2-hydroxyethyl methacrylate on antioxidant responsive element-mediated transcription: a possible indication of its cytotoxicity. *PLoS One* **8**, e58907 (2013).

259. Camps, J. *et al.* In vitro cytotoxicity of dental adhesive systems under simulated pulpal pressure. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* **13**, 34–42 (1997).

260. Fujisawa, S. & Kadoma, Y. Prediction of the reduced glutathione (GSH) reactivity of dental methacrylate monomers using NMR spectra - Relationship between toxicity and GSH reactivity. *Dent. Mater. J.* **28**, 722–729 (2009).

261. Yamanaka, Y., Karuppaiah, K. & Abu-Amer, Y. Polyubiquitination events mediate polymethylmethacrylate (PMMA) particle activation of NF-kappaB pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 23735–23741 (2011).

262. Kappelhof, J. P., Pameyer, J. H., De Jong, P. T., Jongkind, J. F. & Vrensen, G. F. The proteinaceous coating and cytology of implant lenses in rabbits. *Am. J. Ophthalmol.* **102**, 750–758 (1986).

263. Yoshii, E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res.* **37**, 517–524 (1997).

264. Kubinski, H., Gutzke, G. E. & Kubinski, Z. O. DNA-cell-binding (DCB) assay for suspected carcinogens and mutagens. *Mutat. Res.* **89**, 95–136 (1981).

265. Fujita, S., Tanaka, T., Miyata, A., Hirose, M. & Usui, M. Cell adhesion and glistening formation in hybrid copolymer intraocular lenses. *Ophthalmic Res.* **48**, 102–108 (2012).

266. Kawai, K., Hayakawa, K. & Suzuki, T. Simulation of 20-year deterioration of acrylic IOLs using severe accelerated deterioration tests. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **37**, 62–65 (2012).
267. Yang, S., Makker, H. & Christ, F. R. Accelerated ultraviolet aging of intraocular lens optic materials: a 50 year simulation. *J. Cataract Refract. Surg.* **23**, 940–947 (1997).
268. van Norren, D. & van de Kraats, J. Spectral transmission of intraocular lenses expressed as a virtual age. *Br. J. Ophthalmol.* **91**, 1374–1375 (2007).
269. Francese, J. E., Pham, L. & Christ, F. R. Accelerated hydrolytic and ultraviolet aging studies on SI-18NB and SI-20NB silicone lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **18**, 402–405 (1992).
270. Hayashi, K., Hayashi, H., Nakao, F. & Hayashi, F. Aging changes in apparent accommodation in eyes with a monofocal intraocular lens. *Am. J. Ophthalmol.* **135**, 432–436 (2003).
271. Werner, L. *et al.* Accelerated 20-year sunlight exposure simulation of a photochromic foldable intraocular lens in a rabbit model. *J. Cataract Refract. Surg.* **37**, 378–385 (2011).
272. Imazato, S., McCabe, J. F., Tarumi, H., Ehara, A. & Ebisu, S. Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* **17**, 178–183 (2001).
273. Yousif, E. & Haddad, R. Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: review. *SpringerPlus* **2**, 398 (2013).
274. Packer, M. *et al.* Safety and effectiveness of a glistening-free single-piece hydrophobic acrylic intraocular lens (enVista). *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **7**, 1905–1912 (2013).
275. Tuna, E. B., Rohlig, B. G., Sancakli, E., Evlioglu, G. & Gencay, K. Influence of acrylic resin polymerization methods on residual monomer release. *J. Contemp. Dent. Pract.* **14**, 259–264 (2013).
276. Singh, R. D. *et al.* High performance liquid chromatographic determination of residual monomer released from heat-cured acrylic resin. An in vivo study. *J. Prosthodont. Off. J. Am. Coll. Prosthodont.* **22**, 358–361 (2013).
277. Davy, K. W. & Braden, M. Residual monomer in acrylic polymers. *Biomaterials* **12**, 540–544 (1991).
278. Werner, L. Causes of intraocular lens opacification or discoloration. *J. Cataract Refract. Surg.* **33**, 713–726 (2007).
279. Seiss, M. *et al.* Identification of 2,3-epoxymethacrylic acid as an intermediate in the metabolism of dental materials in human liver microsomes. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad.*

Dent. Mater. **23**, 9–16 (2007).

280. Seiss, M., Track, N., Hickel, R. & Reichl, F.-X. In vitro stability of methylmethacrylic acid, TEGDMA and HEMA exposed to esterases. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* **25**, 1044–1049 (2009).

281. Reichl, F.-X. *et al.* Expression of CYP450-2E1 and formation of 2,3-epoxymethacrylic acid (2,3-EMA) in human oral cells exposed to dental materials. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* **26**, 1151–1156 (2010).

282. Majima, K. An evaluation of the biocompatibility of intraocular lenses. *Ophthalmic Surg. Lasers* **27**, 946–951 (1996).

283. Strauss, R. W. *et al.* Changes in intraocular lens surface roughness during cataract surgery assessed by atomic force microscopy. *J. Cataract Refract. Surg.* **38**, 146–154 (2012).

284. Lombardo, M., Carbone, G., Lombardo, G., De Santo, M. P. & Barberi, R. Analysis of intraocular lens surface adhesiveness by atomic force microscopy. *J. Cataract Refract. Surg.* **35**, 1266–1272 (2009).

285. Dogru, M., Tetsumoto, K., Tagami, Y., Kato, K. & Nakamae, K. Optical and atomic force microscopy of an explanted AcrySof intraocular lens with glistenings. *J. Cataract Refract. Surg.* **26**, 571–575 (2000).

286. Ishizone, T., Han, S., Hagiwara, M. & Yokoyama, H. Synthesis and Surface Characterization of Well-Defined Amphiphilic Block Copolymers Containing Poly[oligo(ethylene glycol) methacrylate] Segments. *Macromolecules* **39**, 962–970 (2006).

287. Nishi, O. *et al.* Inhibition of migrating lens epithelial cells by blocking the adhesion molecule integrin: a preliminary report. *J. Cataract Refract. Surg.* **23**, 860–865 (1997).

288. Taliana, L., Evans, M. D. M., Ang, S. & McAvoy, J. W. Vitronectin is present in epithelial cells of the intact lens and promotes epithelial mesenchymal transition in lens epithelial explants. *Mol. Vis.* **12**, 1233–1242 (2006).

289. Serini, G. *et al.* The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J. Cell Biol.* **142**, 873–881 (1998).

290. Biazar, E., Heidari, M., Asefnejad, A., Asefnezhad, A. & Montazeri, N. The relationship between cellular adhesion and surface roughness in polystyrene modified by microwave plasma radiation. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 631–639 (2011).

291. Keshel, S. H. *et al.* The relationship between cellular adhesion and surface roughness for polyurethane modified by microwave plasma radiation. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 641–647 (2011).

292. Folkman, J. & Moscona, A. Role of cell shape in growth control. *Nature* **273**, 345–349

(1978).

293. Lombello, C. B., Malmonge, S. M. & Wada, M. L. PolyHEMA and polyHEMA-poly(MMA-co-AA) as substrates for culturing Vero cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **11**, 541–546 (2000).
294. Lombello, C. B. *et al.* Adhesion and morphology of fibroblastic cells cultured on different polymeric biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **13**, 867–874 (2002).
295. Versura, P., Torreggiani, A., Cellini, M. & Caramazza, R. Adhesion mechanisms of human lens epithelial cells on 4 intraocular lens materials. *J. Cataract Refract. Surg.* **25**, 527–533 (1999).
296. Beebe, D. C., Shui, Y.-B., Siegfried, C. J., Holekamp, N. M. & Bai, F. Preserve the (intraocular) environment: the importance of maintaining normal oxygen gradients in the eye. *Jpn. J. Ophthalmol.* **58**, 225–231 (2014).
297. Bozukova, D. *et al.* Improved performances of intraocular lenses by poly(ethylene glycol) chemical coatings. *Biomacromolecules* **8**, 2379–2387 (2007).
298. Bozukova, D. *et al.* Imparting antifouling properties of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels by grafting poly(oligoethylene glycol methyl ether acrylate). *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **24**, 6649–6658 (2008).
299. Thomes, B. E. & Callaghan, T. A. Evaluation of in vitro glistening formation in hydrophobic acrylic intraocular lenses. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **7**, 1529–1534 (2013).
300. Apple, D. J., Escobar-Gomez, M., Zaugg, B., Kleinmann, G. & Borkenstein, A. F. Modern cataract surgery: unfinished business and unanswered questions. *Surv. Ophthalmol.* **56**, S3–53 (2011).
301. Katai, N., Yokoyama, R. & Yoshimura, N. Progressive brown discoloration of silicone intraocular lenses after vitrectomy in a patient on amiodarone. *J. Cataract Refract. Surg.* **25**, 451–452 (1999).
302. Matsushima, H. *et al.* Analysis of surface whitening of extracted hydrophobic acrylic intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **35**, 1927–1934 (2009).
303. Werner, L. *et al.* Light transmittance of 1-piece hydrophobic acrylic intraocular lenses with surface light scattering removed from cadaver eyes. *J. Cataract Refract. Surg.* **40**, 114–120 (2014).
304. Ollerton, A. *et al.* Evaluation of a new single-piece 4% water content hydrophobic acrylic intraocular lens in the rabbit model. *J. Cataract Refract. Surg.* **38**, 1827–1832 (2012).
305. Leydolt, C., Schriefl, S., Stifter, E., Haszcz, A. & Menapace, R. Posterior capsule opacification with the iMics1 NY-60 and AcrySof SN60WF 1-piece hydrophobic acrylic

- intraocular lenses: 3-year results of a randomized trial. *Am. J. Ophthalmol.* **156**, 375–381.e2 (2013).
306. Vock, L. *et al.* Posterior capsule opacification and neodymium:YAG laser capsulotomy rates with a round-edged silicone and a sharp-edged hydrophobic acrylic intraocular lens 10 years after surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **35**, 459–465 (2009).
307. Lundqvist, B. & Mönestam, E. Ten-year longitudinal visual function and Nd: YAG laser capsulotomy rates in patients less than 65 years at cataract surgery. *Am. J. Ophthalmol.* **149**, 238–244.e1 (2010).
308. Zhu, X. *et al.* Adhesion of the posterior capsule to different intraocular lenses following cataract surgery. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* (2015). doi:10.1111/aos.12739
309. Dick, H. B. *et al.* Vacuoles in the Acrysof intraocular lens as factor of the presence of serum in aqueous humor. *Ophthalmic Res.* **33**, 61–67 (2001).
310. Moreno-Montañés, J., Alvarez, A., Rodríguez-Conde, R. & Fernández-Hortelano, A. Clinical factors related to the frequency and intensity of glistenings in AcrySof intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **29**, 1980–1984 (2003).
311. Mehta, S., Linton, M. M. & Kempen, J. H. Outcomes of cataract surgery in patients with uveitis: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Ophthalmol.* **158**, 676–692.e7 (2014).

Nécessité d'une approche analytique confondante dans l'évaluation des dispositifs médicaux implantables en biopolymères : application aux lentilles intraoculaires à base de polyacrylate.

Mots clés : Cataracte ; Dispositifs médicaux ; Biocompatibilité ; Lentilles intraoculaires ; Acrylates ; Produits de dégradation

Résumé : L'implantation de lentilles intraoculaires est le traitement substitutif standard de la cataracte toutes origines confondues. L'implantation est faite à la suite de l'extraction du cristallin par phacoémulsification. Les implants souples, en acrylates hydrophobes, à bord carrés et « 1 pièce » sont recommandés pour prévenir la survenue de complications post-opératoires telles que l'opacification capsulaire postérieure. Cette complication multifactorielle est associée à un défaut de biocompatibilité. L'acte chirurgical, la physiopathologie du patient ainsi que la forme de la lentille intraoculaire modifient l'incidence. Malgré plusieurs mesures préventives, l'incidence n'est pas nulle et la prévalence continue d'augmenter avec le temps. Des cas tardifs d'opacifications surviennent jusqu'à 9 ans après la chirurgie. Un de nos objectifs dans le cadre de ce travail était de relier cette complication tardive au mécanisme de vieillissement des implants intraoculaires. Les résultats obtenus après hydrolyse et photo-oxydation, ont montré une altération des caractéristiques du polymère avec formation de composés néoformés de faibles masses moléculaires, qui diffusent au travers du polymère et migrent vers la surface en fonction de leur polarité et leur masse moléculaire. Il en résulte la création d'un gradient de concentrations de composés hydrophiles en surface et de composés hydrophobes dans les couches inférieures de l'implant. La vitesse du mécanisme de vieillissement est directement liée aux conditions (température, intensité de photo-oxydation). Par ailleurs, nous avons démontré l'existence d'une variation inter et intra lots des caractéristiques physico-chimiques de ces implants. Ces modifications de propriétés de surface constituent une explication à la survenue des complications tardives qui est liée à une modification de la biocompatibilité des implants intraoculaires, après vieillissement.

Necessity of a multi-step analytical evaluation for the implantable biopolymer medical devices: example of the polyacrylic intraocular lenses.

Keywords: Cataract; Medical devices; Biocompatibility; Intraocular lenses; Acrylics; Degradation products.

Abstract : Intraocular lenses are the main treatment for cataract surgery whatever the origin. The implantation is done in the same surgical time as the lens extraction by phacoemulsification. Today, the recommended lenses are foldable acrylic copolymers with square edges and "1-piece". This design decreases the incidence of adverse events as posterior capsular opacification (PCO). This complication is multifactorial and is associated with a poor biocompatibility. The surgery and physiopathology are two others factor that impact the incidence of PCO. Despite many preventive actions, the incidence is not null and prevalence keep on increasing each year after the surgery. The late PCO cases occur until 9 years after the surgery. One of our objectives in the context of this work was to link this late complication to the aging mechanism of intraocular implants. The results obtained after hydrolysis and photo-oxidation have showed the characteristic modifications of the polymer with formation of low molecular weight compounds, which diffuse through the polymer and migrate to the surface, as a function of their polarity and their molecular weight. All these modifications have created concentration gradient. Indeed, the hydrophilic compounds have diffused on the surface and hydrophobic compounds in the implant matrix. The kinetic of the aging process is directly related to the aging conditions applied (temperature, intensity of photo-oxidation). Furthermore, we have demonstrated the existence of the variability between and within batches, of the physicochemical characteristics of these implants. These surface property modifications are an explanation for the occurrence of late complications that is related to a modification of the intraocular lenses biocompatibility after aging.