

Les nouveaux revêtements antimicrobiens pour les dispositifs médicaux : des stratégies contre les maladies nosocomiales ?

Philippe Lavalle est directeur de recherche à l'INSERM, au sein de l'unité 1121 « Biomatériaux et Bioingénierie »/Université de Strasbourg, et enseigne à l'ECPM (École européenne de chimie, polymères et matériaux de Strasbourg).

1 La problématique des infections nosocomiales

1.1. Définitions et chiffres clés

Les infections nosocomiales¹ sont des infections acquises en milieu hospitalier. Lors d'un séjour à l'hôpital, le patient risque d'acquérir une infection

bactérienne. Cela frappe environ 5 % des patients hospitalisés et correspond à près de 4 millions de personnes par an en Europe, générant 37 000 décès, dont 4 000 en France.

S'ajoute la question des coûts liés aux soins supplémentaires occasionnés. On arrive à 7 milliards d'euros en Europe de surcoût pour des problématiques pour lesquelles les patients n'étaient pas concernés initialement.

1. Le terme *nosocomial* vient du grec *nosos*, « maladie », et de *komein*, « soigner », qui forment le mot *nosokomeion*, « hôpital ».

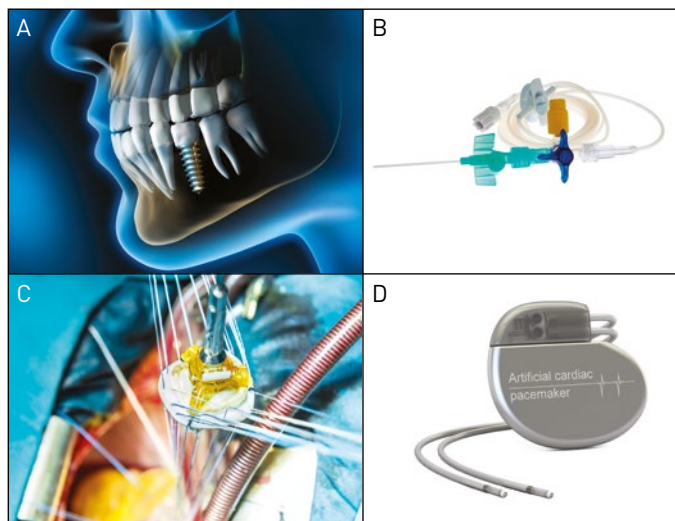


Figure 1

Les implants dentaires (A), les cathéters (B), les valves cardiaques (C) et les pacemakers (D) sont des exemples de dispositifs médicaux, dont l'implantation peut engendrer des infections nosocomiales.

Par convention, une infection est qualifiée de nosocomiale si elle a été contractée deux jours après l'hospitalisation du patient ou trente jours après un acte chirurgical, qui intrinsèquement présente plus de risques infectieux. Dans le cas d'une implantation, on considère que si une infection intervient un an après la pose de

l'implant, elle peut être liée à une infection contractée lors de l'hospitalisation : elle a pu être contractée au moment de l'implantation mais s'est déclenchée un an après. Dans l'ensemble, on peut affirmer que 50 % des infections nosocomiales sont liées aux dispositifs médicaux : il peut s'agir d'implants dentaires, de cathéters, de valves cardiaques, etc. (Figure 1).

1.2. Origines des infections nosocomiales

Il est difficile d'avoir des informations précises sur les origines des infections nosocomiales, mais il y a un consensus pour dire que les germes sont généralement issus du patient lui-même. Rappelons qu'une personne a dix fois plus de bactéries que de cellules eucaryotes, ce qui correspond à environ 500 bactéries différentes, ce qui est considérable (Figure 2).

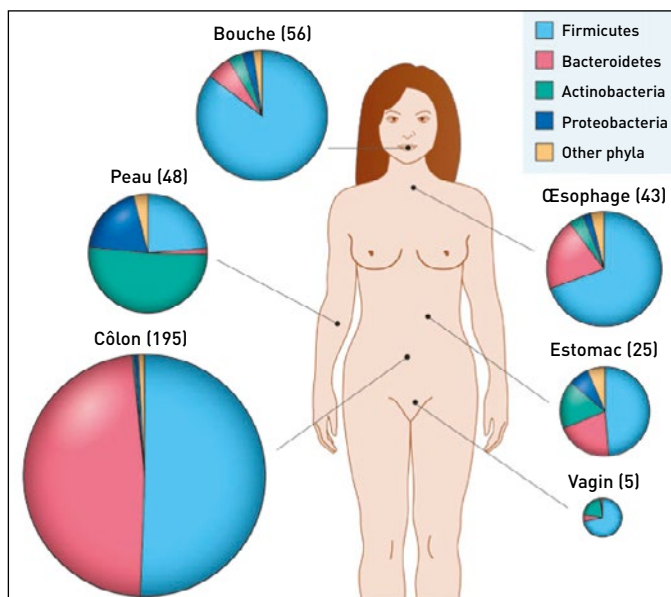


Figure 2

Répartition des classes de bactéries majoritaires dans le corps humain.

Certaines d'entre elles sont des pathogènes potentiels, notamment au niveau du site d'implantation.

Par ailleurs, les personnels soignants et ceux de l'environnement hospitalier sont des vecteurs pour transporter les germes d'un patient à l'autre.

1.3. L'augmentation des infections nosocomiales

Ce sujet ancien est à nouveau d'actualité depuis quelques années à la suite de sollicitations d'industriels alertés par la forte augmentation des risques infectieux observés, notamment au niveau de l'hôpital. Cette augmentation peut s'expliquer par l'augmentation des bactéries résistantes vis-à-vis des antibiotiques (Figure 3). Un deuxième facteur est l'augmentation des porteurs de dispositifs médicaux, essentiellement en raison du vieillissement de la population. Il y a en outre de plus en plus de patients implantés qui sont « à risques », notamment des patients diabétiques

ou en rémission de cancers, pour qui le risque infectieux est plus important. Une autre raison vient du très faible nombre de nouvelles molécules antibiotiques ou d'autres systèmes mis sur le marché ces dernières années pour lutter contre les infections.

Les prévisions que l'on peut établir sur l'augmentation du nombre des infections sont alarmistes. Cela pourrait devenir la première cause de décès dans le monde : la résistance microbienne pourrait être responsable du décès de dix millions de personnes par an en 2050. Cette situation s'est d'ailleurs présentée à l'opinion : des articles parlent de « tsunami lié aux péri-implantites » (infections liées aux implants dentaires) (Figure 4) ; un grand plan avait été lancé en 2015 par le président américain Obama : 1,2 milliards de dollars ont été débloqués pour lutter contre les infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques. Fin 2017, l'OMS a publié un rapport alarmant



Figure 3

L'augmentation des bactéries résistantes pourrait favoriser les maladies nosocomiales.

THEMATIC ABSTRACT REVIEW

Chi Hoiph-Su, DDS, MS
University of Illinois, Urbana, Illinois, USA

Kevin Eberly, Clark Beardsley, DDS, PhD
The University of Texas, Long Beach, Texas

Thomas M. Eaton, DDS, PhD
University of Illinois, Urbana, Illinois, USA

John E. Simpson, DDS, PhD
University of Illinois, Urbana, Illinois, USA

Martin Oswald, BDS, MSc
Florida, Canada

Shah M. Hashmi, DDS, MSc
The University of Texas, Long Beach, Texas

Peri-implantitis: "Tsunami" or Marginal Problem?

The use of dental implants has been steadily increasing over the past few decades. In 2015, the prevalence of this treatment modality was estimated to be 1.2% among patients with complete dentures. This has emerged as a global public health concern because of the high prevalence of peri-implantitis, a chronic inflammatory disease that can lead to implant failure.

In 2013, the American Academy of Periodontology published the Consensus Report on the Classification of Peri-implant Diseases. This classification was based on the extent of inflammation and the presence of radiographic bone loss around the implant.

Non-implant specific diseases in which the presence of inflammation is confined to the tissues surrounding a dental implant with no signs of loss of supporting tissue.

Non-implant specific inflammatory disease around an implant that includes both soft tissue inflammation and loss of supporting tissue.

These definitions were applied to the data developed by the Consensus Conference of Periodontology during the 11th European Workshop on Periodontology in 2016. Despite similar definitions in Europe and the American continent, the findings regarding the prevalence or incidence of peri-implantitis varies greatly in the Report regarding the use of radiographic bone loss as a criterion for diagnosis. The prevalence of peri-implantitis was 1.2% among patients with complete dentures in the United States. In contrast, Hashmi et al. (2017) reported that the prevalence of peri-implantitis was 1.2% among patients with complete dentures in the United States. In contrast, Hashmi et al. (2017) reported that the prevalence of peri-implantitis was 1.2% among patients with complete dentures in the United States. In contrast, Hashmi et al. (2017) reported that the prevalence of peri-implantitis was 1.2% among patients with complete dentures in the United States.

The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants 32(5) 2017

FACT SHEET Obama Administration Releases National Action Plan to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria

Peri-implantitis

Today, the White House released a comprehensive plan that identifies critical actions to reduce the burden of antibiotic resistance and to combat the rise of antibiotic-resistant bacteria. The National Action Plan for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria (NARBR) is the first comprehensive plan to combat antibiotic resistance in the United States. The plan includes a number of key actions to reduce the burden of antibiotic resistance, including:

- Investing in research and development to develop new antibiotics and diagnostic tools.
- Strengthening infection prevention and control practices in hospitals and long-term care facilities.
- Improving antibiotic stewardship programs to ensure that antibiotics are used only when necessary and in the most effective way.
- Enhancing public awareness and education about antibiotic resistance.
- Supporting the development of new diagnostic tools to detect antibiotic resistance.
- Strengthening international cooperation to combat antibiotic resistance.

Figure 4

Les infections liées aux implants alarment la communauté scientifique ainsi que l'OMS.

Antibiorésistance : un premier constat alarmant de l'OMS

Le rapport de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) sur l'antibiorésistance, publié en novembre 2017, constitue un véritable avertissement. Les antibiotiques sont devenus des médicaments indispensables pour soigner de nombreuses maladies infectieuses. Cependant, l'usage excessif et inapproprié de ces médicaments a conduit à l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques, ce qui constitue une véritable menace pour la santé humaine.

Le rapport de l'OMS met en évidence que l'antibiorésistance est devenue un problème mondial, avec des conséquences graves pour la santé humaine. Les antibiotiques sont devenus des médicaments indispensables pour soigner de nombreuses maladies infectieuses. Cependant, l'usage excessif et inapproprié de ces médicaments a conduit à l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques, ce qui constitue une véritable menace pour la santé humaine.



Figure 5

Les pacemakers sont implantés pour réguler les battements cardiaques.

sur ces phénomènes : il s'agit bien d'un problème majeur de santé publique accompagné, bien sûr, d'un problème économique.

2 Infection et implants : l'exemple du pacemaker

2.1. Implantation puis rejet d'un pacemaker

Pour illustrer les maladies nosocomiales, considérons l'exemple des pacemakers et défibrillateurs (**Figure 5**), qui sont des boîtiers implantés pour réguler les battements cardiaques. La **Figure 6** donne l'exemple d'une implantation qui s'est suivie de complications puisqu'il y a eu un bourgeonnement, une infection, puis un rejet. L'implant est rejeté par l'organisme suite à l'infection avec formation d'une coque fibreuse. Ces cas-là sont très graves, puisque généralement une explantation, suivie d'un nettoyage et d'une nouvelle implantation, ne permettent pas de prévenir une récurrence et l'issue risque d'être dramatique.

2.2. Hausses des implantations et des infections

On dispose de données fournies par la société Medtronic, un des leaders mondiaux des dispositifs médicaux. En quinze ans, le nombre de patients implantés avec ces défibrillateurs a doublé (+96 %). (**Figure 7**). En parallèle, les infections ont été mesurées : elles ont été multipliées par quatre (+210 %).

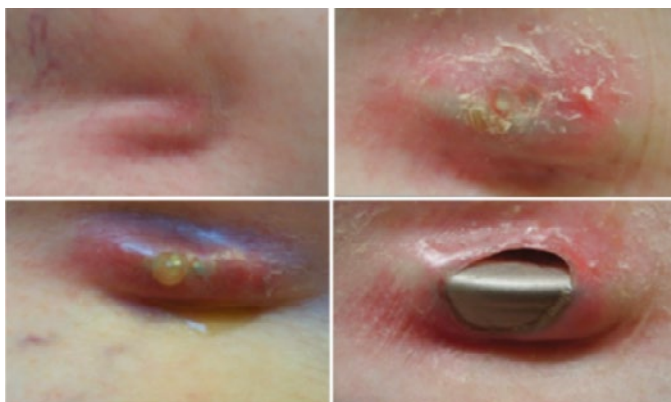
2.3. Des solutions d'implants

Les solutions adoptées à l'heure actuelle consistent à utiliser des boîtiers de pacemakers et défibrillateurs en titane, qui sont assez bien acceptés par les tissus, auxquels est rajouté un film fin d'argent (**Figure 8**). L'argent s'oxyde et libère des ions argent, qui peuvent avoir une action forte sur les bactéries. Ces systèmes posent cependant des questions parce que l'on ne connaît pas le devenir de l'argent libéré ni donc la toxicité potentielle que cela pourra engendrer : des études récentes en débat semblent montrer que les ions argent

Figure 6

Évolution pendant deux ans de l'infection causée par l'implantation d'un pacemaker : bourgeonnement, infection puis rejet de l'implant.

Source : *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2013, 11 : 607.



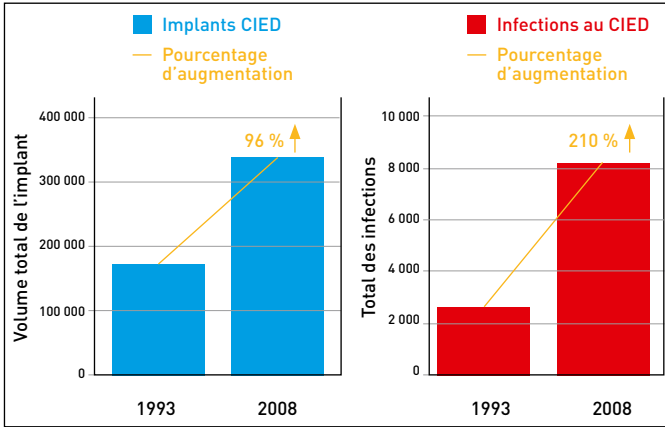


Figure 7

Comparaison du nombre de pacemakers implantés aux États-Unis en 1993 et en 2008 (hausse de 96 %), et du nombre d'infections (hausse de 210 %).

Source : Medtronic.

Titane + Revêtement argent



Cardiac surgery
openheart In vivo biocompatibility and pacing function study of silver ion-based antimicrobial surface technology applied to cardiac pacemakers

James Shawcross,¹ Ameet Bakhai,² Ali Ansari pour,³ James Armstrong,¹ David Lewis,¹ Philip Agg,¹ Roberta De Godoy,⁴ Gordon Blunn⁴

Figure 8

Pacemaker en titane recouvert d'une couche d'argent.

pourraient avoir une forte toxicité. Au niveau réglementaire, ces systèmes sont de plus en plus contre-indiqués. Une solution différente pour le conditionnement de l'implant a été présentée par Medtronic, il y a deux ans. Elle fait intervenir l'utilisation d'une enveloppe en polymère (Figure 9), dénommée TyrX, et constituée d'un filet en polypropylène, donc non dégradé, sur lequel a été ajoutée une couche de polyarylate²,

un polymère biorésorbable³ contenant deux antibiotiques afin d'éviter les infections liées à l'implantation. Cette solution est maintenant disponible sur le marché. Elle ne prévient pas cependant les bactéries résistantes aux antibiotiques utilisés. Par ailleurs, il est clair que le système est complexe, avec deux polymères et deux antibiotiques. Enfin, les produits libérés ne sont pas naturels, notamment les polymères ;

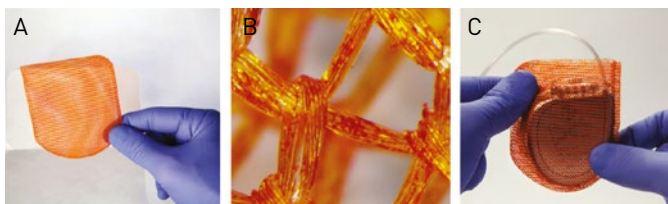
2. Polyarylate : polymère comportant un enchaînement de cycles aromatiques liés par des liaisons ester.

3. Biorésorbable : que l'organisme peut résorber naturellement. Un implant biorésorbable disparaît donc progressivement sans avoir besoin de l'extraire manuellement.

Figure 9

A) Enveloppe TyrX : un filet en polypropylène servant à envelopper un pacemaker ; B) zoom sur le filet en polypropylène recouvert de polyarylate et d'antibiotiques ; C) pacemaker dans son enveloppe TyrX constituée de quatre composants : deux polymères et deux antibiotiques pour contrôler les infections.

Source : Medtronic.



cela peut constituer un risque d'inflammation du site d'implantation et mettre en jeu les réponses immunitaires.

3 Implants et inflammation chronique

3.1. Inflammations chroniques

À côté des problèmes infectieux, les implants peuvent aussi être à l'origine de situations d'inflammation, et notamment d'inflammation chronique⁴. Quand on implante un biomatériau dans

4. Inflammation chronique : l'inflammation est la réaction de défense du système immunitaire déclenchée lorsqu'un élément étranger pénètre dans nos tissus (bactérie, virus, implant...). L'inflammation est dite chronique quand elle persiste dans le temps.

l'organisme, il se déroule tout d'abord un dépôt de protéines suivi de la mise en œuvre du système immunitaire qui va venir « sonder » le matériau et probablement le reconnaître comme un corps étranger (Figure 10). Le risque est que ce système immunitaire mette en place une réponse d'inflammation chronique et la formations d'une coque fibreuse autour du biomatériau pour l'isoler des autres tissus. Ce biomatériau risque alors d'être rejeté ou de devenir inutilisable. Dans le cas des implants orthopédiques, on pourra par exemple assister à un descellement de la prothèse.

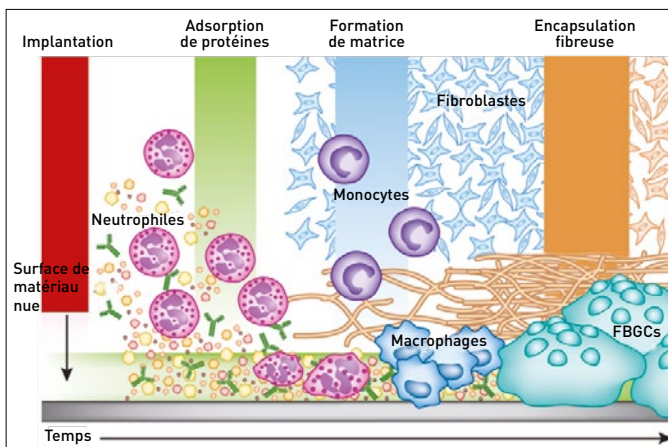
3.2. Rôle des monocytes dans le rejet des implants

Parmi les premières cellules arrivant sur le site infectieux,

Figure 10

Chronologie des évènements qui suivent l'implantation d'un corps étranger : adsorption de protéines à la surface de l'implant, recrutement de monocytes et différenciation en macrophages, fusion des macrophages en cellules géantes dans le but de phagocytter l'implant, et finalement formation d'une coque fibreuse autour de l'implant pour isoler le matériau considéré comme étranger à l'organisme.

Source : d'après Nat. Biotechnol. (2013).31(6) : 507-9.



se trouvent les monocytes⁵ qui ont la particularité, au cours de leur interaction avec le matériau, de se différencier. Deux principales voies de différenciation sont décrites : ils pourront devenir des macrophages soit de type M1, soit de type M2 (Figure 11). On considère que les macrophages de type M1 ont plutôt pour rôle de créer une légère inflammation durant les premières phases suivant l'implantation, mais sur des temps plus longs, cette inflammation peut devenir chronique : on va donc rechercher à éviter d'avoir ce type de différenciation en phénotype de macrophage M1 sur un temps très long. En revanche les phénotypes de macrophage M2 à plus long terme sont favorables pour générer la réparation tissulaire autour du site d'implantation (cicatrisation). Tout défi consiste donc à guider ces monocytes pour qu'ils aillent vers la voie de différenciation M2 et éviter la voie M1.

5. Monocytes : cellules appartenant à la famille des globules blancs. Leur rôle est principalement immunitaire.

4 Les revêtements d'implants

4.1. Propriétés des revêtements d'implants

Nos travaux au laboratoire se sont focalisés à réaliser, avec un seul système, un revêtement de surface combinant les deux propriétés, anti-infectieuses et anti-inflammatoires. En d'autres termes, il s'agit d'avoir en surface un agent antimicrobien pour empêcher les bactéries de proliférer, et un agent anti-inflammatoire pour limiter la différenciation en macrophages M1. Par ailleurs, il faut toujours garder la notion de biocompatibilité, éviter les systèmes toxiques, et, si possible, avoir des systèmes biodégradables.

4.2. Dépôt couche par couche de polymères chargés

On a utilisé une technique dénommée « dépôt couche par couche » de polyélectrolytes ou polymères chargés qui existait depuis quelques années mais que nous avons développée au laboratoire pour le domaine biomédical. Ces polymères sont appelés

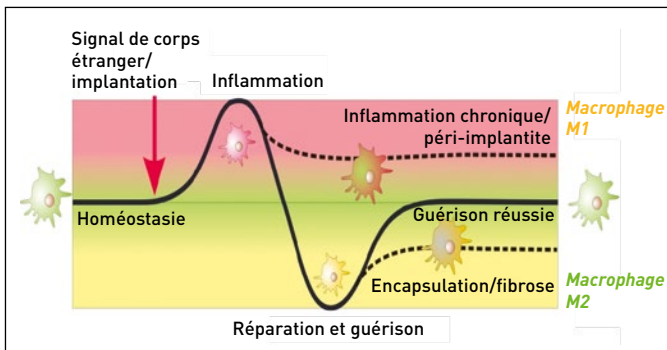
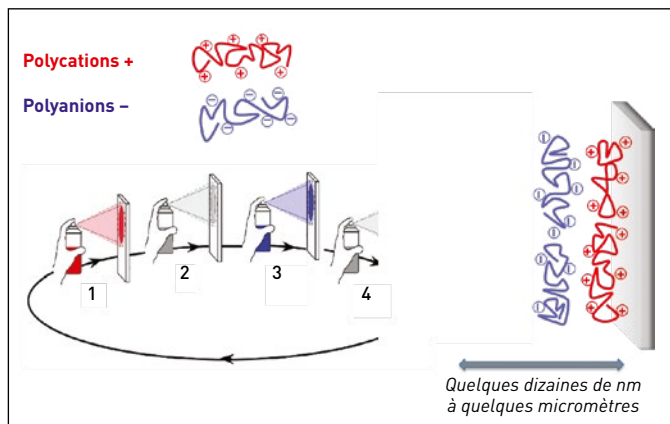


Figure 11

Processus de différenciation des monocytes en macrophages M1 et M2 à la suite d'une implantation. La différenciation en macrophage M1 peut mener à une inflammation chronique alors que la différenciation en macrophage M2 contribue à la régénération tissulaire et notamment à la cicatrisation. La combinaison des deux modes engendre un retour à la normale.

Figure 12

Dépôt par spray couche par couche de polycations (rouges) et de polyanions (bleus), alternés par des rinçages, pour les revêtements d'implants.



polycations lorsqu'ils comportent des charges positives et polyanions lorsqu'ils comportent des charges négatives. La plupart d'entre eux ont l'avantage de pouvoir être solubilisés dans des solutions aqueuses.

On va pouvoir, par exemple avec des systèmes de sprays, déposer une première couche de polycations sur nos biomatériaux. Des interactions électrostatiques entre le biomatériau, généralement chargé négativement, et la première couche de polycations interviennent et permettent la cohésion de la couche de polymère sur la surface. Sur la **Figure 12** est présenté un exemple de biomatériau chargé négativement sur lequel se « colle » une couche de polymères positifs. Après rinçage de l'excès de polymères, on peut continuer avec une deuxième couche de polyanions cette fois, qui vont, par leurs charges négatives, venir adhérer sur la première couche positive (**Figure 12**).

On peut, de cette manière, « empiler » des couches sur

les surfaces des biomatériaux, autant de fois que l'on veut pour réaliser des systèmes d'épaisseur contrôlée. En choisissant le nombre de cycles, nous allons choisir l'épaisseur finale. Ces processus sont très simples, facilement industrialisables, et ne sont pas utilisés à l'heure actuelle dans le domaine biomédical.

Les avantages de cette méthode, au-delà de la simplicité de mise en œuvre, se situent dans les types d'interactions qui reposent sur les charges entre les espèces permettant une « réticulation »⁶, qui agit sans mettre en jeu de modification chimique. Cela va permettre de couvrir tout type de matériau, quelle que soit la composition chimique, la forme, la porosité. On va pouvoir insérer dans le polymère d'autres molécules (**Figure 13**), comme cela a été démontré ces dernières années. Il est possible



Figure 13

Schéma d'un matériau revêtu d'une couche de polyanions (bleus) et d'une couche de polycations (rouges) où sont insérées des molécules (vertes) telles que des médicaments.

6. Réticulation : branchement de chaînes de polymères entre elles par des ponts ou liaisons chimiques, afin de constituer un réseau.

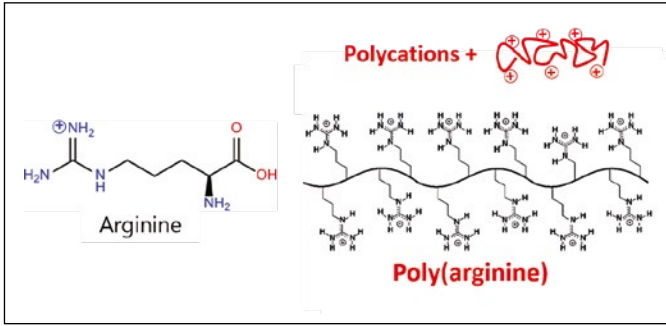


Figure 14

L'arginine est un acide aminé qui peut s'assembler en polyarginine sous forme d'un polymère branché cationique ayant des molécules d'arginine aux extrémités des branches.

d'y mettre des médicaments, que ce soit des facteurs de croissance⁷, des agents antitumoraux, etc. Cela sert finalement de système pour charger fortement la surface, de façon simple, en principes actifs.

La nouveauté de nos études est venue du choix du polycation. On a choisi la polyarginine initialement parce qu'il s'agissait d'un polymère d'arginine, un acide aminé, et donc relativement proche d'un produit naturel. De plus, ce polymère possède des charges positives dans des conditions physiologiques (Figure 14). L'arginine est par

ailleurs déjà décrite comme ayant naturellement des propriétés anti-inflammatoires. L'utilisation de ce polymère d'arginine était donc lié à l'objectif premier qui consistait finalement à un effet anti-inflammatoire.

Le deuxième choix a été l'acide hyaluronique (Figure 15), très utilisé dans le domaine médical et cosmétologique ; il est actuellement utilisé sous forme de gel injectable pour limiter la détérioration du cartilage articulaire. C'est un polysaccharide naturel, chargé négativement, et donc qui peut s'associer avec ses charges à la polyarginine positive. Il est aussi décrit comme anti-inflammatoire.

Nos expériences ont donc combiné ces deux produits, la polyarginine et l'acide hyaluronique, le tout sur les surfaces d'implants (Figure 16).

7. Facteurs de croissance : molécules qui régulent le nombre de nos cellules, en augmentant ou en diminuant leur multiplication en fonction des besoins. De nombreux facteurs de croissance sont des cytokines.

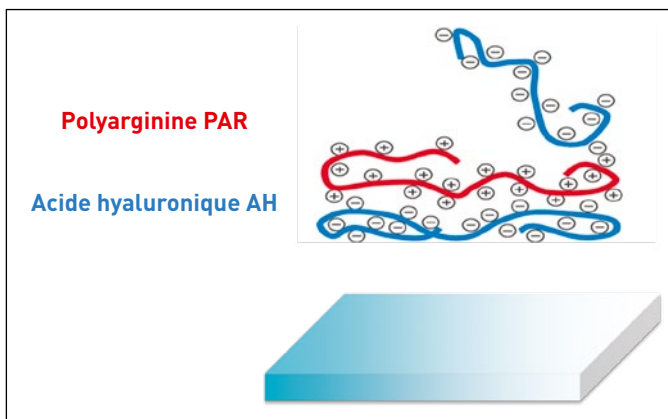


Figure 15

L'acide hyaluronique est un polymère naturel chargé négativement.

Figure 16

Schéma d'un matériau revêtu d'une couche d'acide hyaluronique (bleue), de polyarginine (rouge) puis à nouveau d'acide hyaluronique.



Par les techniques de microbalance à cristal de quartz, on peut suivre le dépôt de chaque couche (Figure 17) : une couche de polyarginine, une couche d'acide hyaluronique, etc. On suit la variation de fréquence du cristal qui est proportionnelle à la masse qui se dépose sur les biomatériaux permettant de vérifier la construction couche par couche du revêtement.

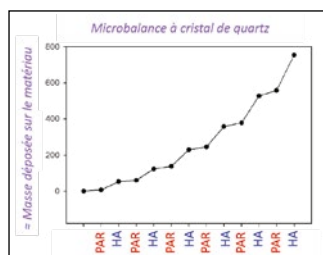


Figure 17

Le dépôt des couches de polyarginine et d'acide hyaluronique est suivi grâce à la technique de microbalance à cristal de quartz. L'augmentation de la variation de fréquence du cristal est proportionnelle à la masse déposée sur le matériau lors de la construction couche par couche d'un revêtement.

cela, on utilise des chaînes de polyarginine qui ont été couplées à une sonde fluorescente pour visualiser une image reconstruite d'une section du film sur le matériau. Un film homogène est déposé sur la surface (Figure 18B).

4.3. Ajout de peptides pour conférer des propriétés antimicrobiennes aux surfaces

Le film devrait à priori posséder des propriétés anti-inflammatoires dues à la présence de polyarginine ; il faut cependant lui conférer une activité antimicrobienne. Pour cela, on a utilisé les « peptides antimicrobiens », des peptides que l'on trouve chez les insectes ou chez les batraciens (Figure 19). Ces sont de petits fragments de protéines qui ont des activités antimicrobiennes très fortes.

La catestatine (CAT), un peptide antimicrobien humain, a été déposée dans les films de polyarginine et d'acide hyaluronique. Pour suivre son insertion, la catestatine a été associée à un marqueur fluorescent rouge. On

8. Microscopie confocale : technique de microscopie de fluorescence permettant d'observer des échantillons marqués avec des fluorochromes. Un laser balaie l'échantillon et excite les fluorochromes qui vont ensuite émettre de la fluorescence. L'émission des fluorochromes dans le plan focal est captée par un photomultiplicateur et l'image est reconstituée point par point.

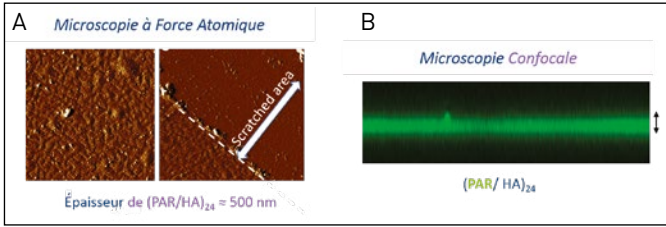


Figure 18

A) Visualisation de la topographie d'un film d'environ 500 nm d'épaisseur par microscopie à force atomique ; B) visualisation par microscopie confocale de la poly(arginine) fluorescente au sein d'un revêtement déposé couche par couche.

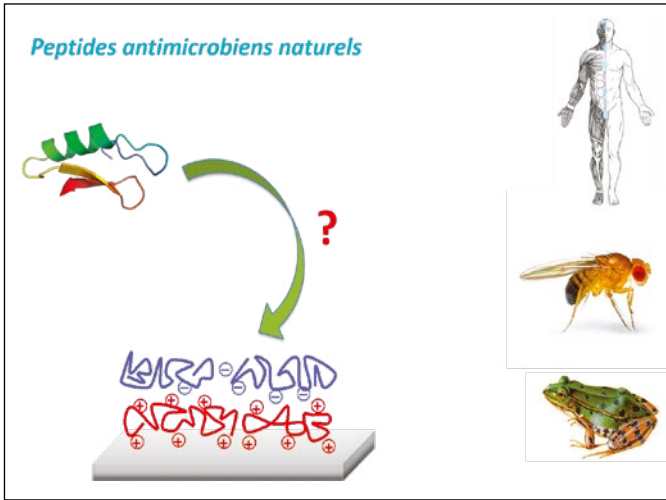


Figure 19

L'idée est d'insérer des peptides (issus de l'homme, des insectes ou des batraciens) au sein des revêtements de polymères chargés.

observe sur la **Figure 20** que la catestatine rentre très fortement dans les films et s'y concentre. Toujours par des méthodes très simples, il est ainsi possible de construire des surfaces fonctionnalisées avec un peptide antimicrobien inséré à l'intérieur de façon très simple.

4.4. Efficacité du revêtement polyarginine, acide hyaluronique et catestatine

Pour tester la fonction anti-inflammatoire sur le film, des monocytes issus de quatre donneurs différents ont été prélevés et leur comportement au contact des surfaces a été étudié. Le test consiste

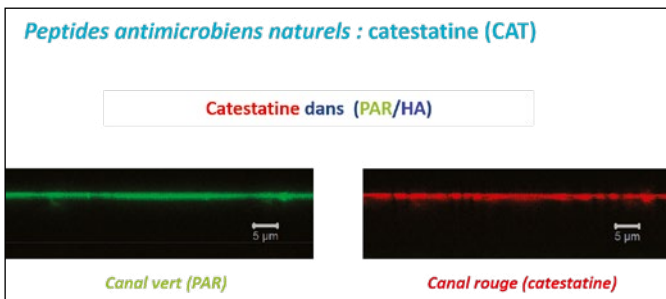


Figure 20

Visualisation par fluorescence de la présence de catestatine dans la couche de polyarginine.

à regarder comment les macrophages se différencient en monocytes sur les surfaces : si ils tendent à se différencier en monocytes dits de type « M1 », on parle d'un phénotype « pro-inflammatoire » et cela se traduit par une production d'un marqueur de l'inflammation chronique spécifique, les cytokines⁹ pro-inflammatoires telles que le TNF α (« *Tumor Necrosis Factor alpha* »). Les mesures sont réalisées sur nos surfaces contrôles sans revêtement, ou sur nos surfaces traitées par la polyarginine et l'acide hyaluronique, ou encore sur nos surfaces traitées avec la polyarginine, l'acide hyaluronique, ainsi que le peptide antimicrobien.

La **Figure 21** décrit la réponse des monocytes et la production de TNF α pour différents temps de contact avec le film : plus la valeur est haute et plus les macrophages se différencient en monocytes M1 et produisent du TNF α . Sur

une surface « nue », c'est-à-dire sans revêtement, il y a une production importante de TNF α après 1, 3, 5 ou 6 jours. Par contre, lorsque le revêtement est composé de polyarginine/acide hyaluronique, on ne voit plus du tout au bout dès le premier jour de production de TNF α , et donc il n'y a probablement pas de différenciation en monocytes M1. De même, à trois jours, cinq jours ou six jours, on a complètement inhibé la réponse M1. Cela caractérise, à priori, un système anti-inflammatoire qui fonctionne bien. L'ajout du peptide catestatine (CAT) ne change pratiquement pas cet effet anti-inflammatoire.

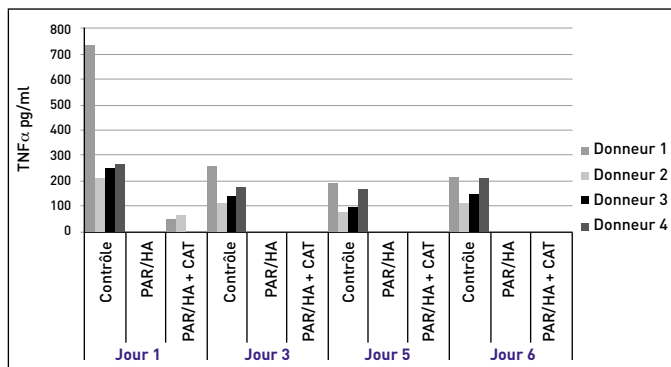
Au niveau antimicrobien, le même film a été étudié en présence de bactéries, des souches de staphylocoques dorés. Des marquages fluorescents permettent d'observer les bactéries vivantes en vert et les bactéries mortes en rouge. Sans revêtement, une forte concentration de bactéries à la surface est observée au bout d'un jour avec le début de formation d'un biofilm¹⁰

10. Biofilm : amas structuré de bactéries enrobé d'une matrice polymère et attachés à une surface.

Figure 21

Production de TNF α (marqueur de l'inflammation chronique) lorsque des macrophages de quatre donneurs sont mis en contact avec des surfaces contrôles, des surfaces traitées par la polyarginine et l'acide hyaluronique, et des surfaces traitées par la polyarginine, l'acide hyaluronique et le peptide antimicrobien. Il n'y a pas de réponse pro-inflammatoire lorsque les macrophages sont au contact des surfaces traitées par la polyarginine et l'acide hyaluronique.

9. Cytokines : hormones du système immunitaire. Ces molécules polypeptidiques sont produites en réponse à différents stimuli. Elles sont impliquées notamment dans la régulation des fonctions immunitaires.



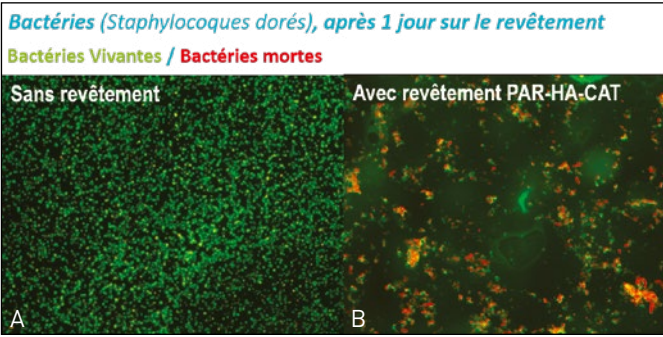


Figure 22

A) Début de formation d'un biofilm constitué de bactéries vivantes (vertes) à la surface d'un matériau sans revêtement ; B) biofilm déstructuré et constitué majoritairement de bactéries mortes (rouges) à la surface d'un matériau revêtu d'acide hyaluronique, polyarginine et catestatine.

(**Figure 22A**). Le processus de prolifération est très rapide. En revanche, l'utilisation du revêtement PAR/HA-CAT permet de complètement déstructurer ce film bactérien (**Figure 22B**), et on observe pratiquement uniquement des bactéries rouges sur la surface – des bactéries mortes. Cette expérience souligne bien l'activité antimicrobienne du système.

Des mesures ont également été réalisées dans la solution, au-dessus du revêtement, pour étudier le comportement des bactéries éloignées de la surface. Une solution bactérienne est déposée, et l'on étudie au bout d'un jour ce qui se passe (**Figure 23**).

La bonne surprise est que le système fonctionne bien sûr sur la surface, mais également dans la solution surnageante. Les bactéries, à tour de rôle, viennent au contact de la surface et sont finalement tuées dès qu'elles entrent en contact avec le film. On arrive ainsi à éliminer une quantité très importante de bactéries issues de la solution. On démontre que la catestatine permet probablement ainsi de diminuer la croissance bactérienne.

Un résultat très surprenant est venu d'une expérience contrôle, utilisant le revêtement sans catestatine. Nous avons observé que le revêtement fonctionnait également,

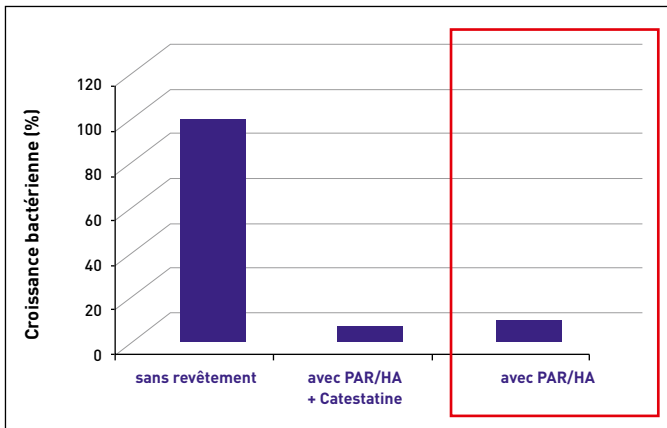
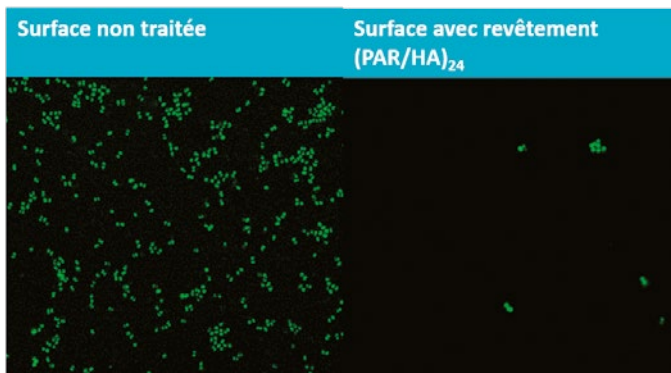


Figure 23

Croissance bactérienne dans la solution au-dessus de la surface avec ou sans revêtement après un jour. Les bactéries sont tuées par le revêtement. À droite : les bactéries sont tuées par le revêtement ne contenant pas de catestatine.

Figure 24

Observations microscopiques de *Staphylocoques dorés* sur la surface avec ou sans revêtement après un jour. Très peu de bactéries sont visibles sur la surface couverte d'acide hyaluronique et de polyarginine, même en l'absence de catestatine.



et il présente une activité antimicrobienne bien que le peptide antimicrobien catestatine ne soit pas présent. L'activité antimicrobienne est donc liée au revêtement polyarginine/acide hyaluronique uniquement, et n'a pas besoin de la catestatine. Le peptide antimicrobien a donc été inséré dans le revêtement alors que l'on n'en avait finalement pas besoin !

Ces observations ont été confirmées par des observations au microscope (Figure 24). Dès que l'on utilise le revêtement, on se retrouve avec très peu de bactéries : ces systèmes sont donc très efficaces. Le mécanisme responsable de cette activité antimicrobienne a donc fait l'objet d'une recherche approfondie décrite par la suite.

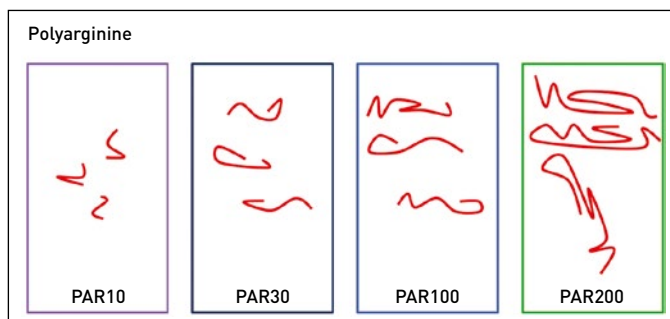
4.5. Optimisation de la composition du revêtement et mécanisme impliqué

La polyarginine utilisée dans les premiers travaux était un mélange de polymères de tailles différentes (Figure 25). Afin d'optimiser les performances, plusieurs essais ont été réalisés sur des lots mieux définis : des chaînes courtes (la polyarginine 10, contenant 10 résidus du peptide arginine), des chaînes un peu plus longues (polyarginine 30), et encore un peu plus longues (polyarginine 100 et 200). 10, 30, 100 et 200 sont donc les nombres de résidus d'arginine qui composent la chaîne de polymère de chaque échantillon.

Le résultat de l'étude a été surprenant : seule la polyarginine

Figure 25

La polyarginine utilisée au laboratoire est composée de tailles de chaînes différentes : 10, 30, 100 ou 200 résidus d'arginine les composent.



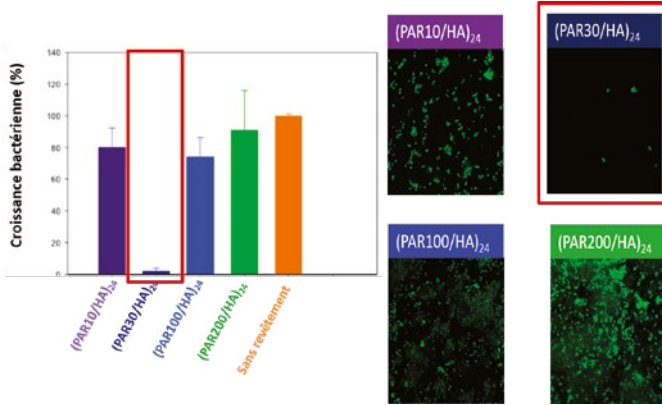


Figure 26

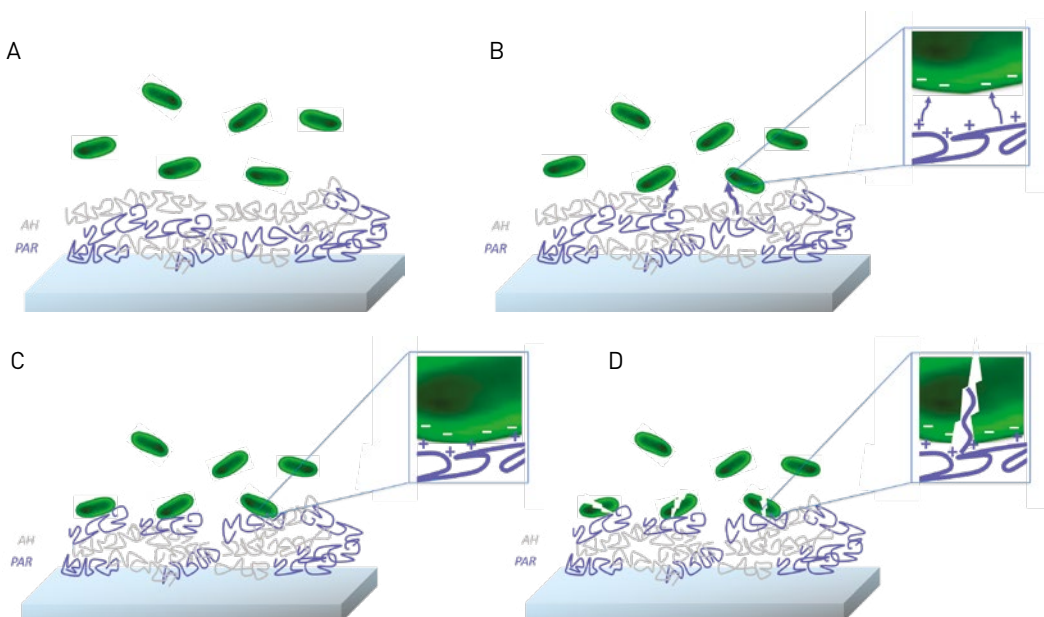
Pourcentage de croissance bactérienne sur une surface sans revêtement (100 %) ou en présence de revêtements contenant de la polyarginine avec 10, 30, 100 ou 200 résidus. Seule la polyarginine 30 a un effet antimicrobien, avec une croissance proche de 0 %.

avec 30 résidus confère à la surface une activité antimicrobienne ; les autres polyarginines, qu'elles soient plus courtes ou plus longues, ne permettent pas au film de démontrer des propriétés antimicrobiennes (Figure 26). Ce sont les propriétés physico-chimiques spécifiques du film qui font que seules les polyarginines de 30 résidus fonctionnent.

Le mécanisme qui explique cette propriété est le suivant : les chaînes de polyarginine du revêtement diffusent et vont se coller sur la membrane bactérienne (Figure 27B) par le jeu des interactions électrostatiques entre les polyarginines chargées positivement et la membrane bactérienne chargée négativement (Figure 27C). Ces polyarginines provoquent un dommage physique de

Figure 27

A) Bactéries à la surface du matériau couvert d'acide hyaluronique et polyarginine ; B) la polyarginine diffuse dans le revêtement et se colle aux bactéries présentes à la surface ; C) les interactions électrostatiques entre les polyarginines et les membranes des bactéries permettent ces interactions ; D) les membranes bactériennes sont endommagées par les interactions avec les polyarginines.



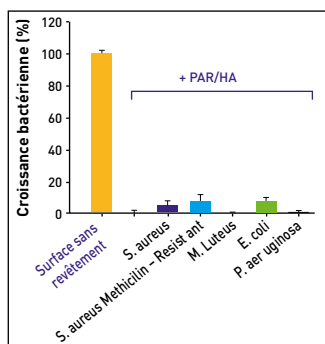


Figure 28

Pourcentage de croissance bactérienne sur une surface sans revêtement (100 %) ou en présence du revêtement pour plusieurs souches de bactéries. Le revêtement a une activité antimicrobienne pour chacune d'entre elles.

la membrane bactérienne, probablement une lyse (décomposition) de la bactérie s'ensuit (**Figure 27D**). Ce mécanisme repose donc sur la mobilité des chaînes de polyarginine dans le revêtement. Seules les chaînes 30 sont assez longues pour interagir efficacement avec les membranes et assez courtes pour assurer la mobilité.

Le mécanisme impliqué ne dépend pas du type de bactérie testée : des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif sont impactées par le revêtement, ainsi que les bactéries résistantes aux antibiotiques. L'efficacité est donc totale quel que soit le type de bactérie (**Figure 28**).

La toxicité de la polyarginine a été testée, une étape nécessaire avant sa future utilisation. La **Figure 29** représente un exemple de cellules endothéliales¹¹ imagées après prolifération sur des surfaces avec ou sans revêtement. Le développement cellulaire n'est pas affecté par le revêtement. Ce sont donc uniquement les bactéries qui sont

11. Cellules endothéliales : cellules qui tapissent la face interne des vaisseaux et importantes dans les processus de vascularisation et de régénération tissulaire.

détruites sur la surface, la toxicité cellulaire semble donc absente. Ces résultats ont été suivis d'études plus poussées comme décrit ultérieurement.

5 Revêtement d'implants à base de polyarginine et d'acide hyaluronique : vers un produit commercialisable ?

5.1. Stérilisation du revêtement

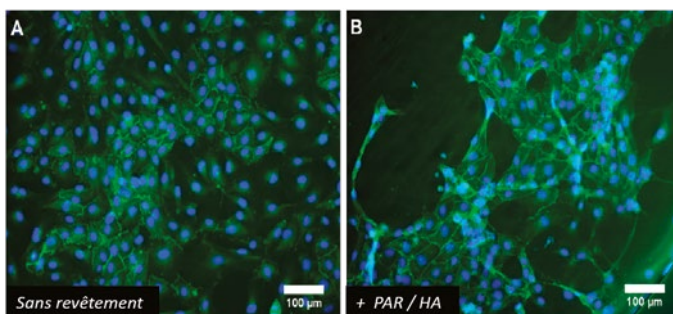
Pour être utilisé, c'est-à-dire placé sur des surfaces d'implants, le revêtement devra auparavant subir une étape de stérilisation. Les méthodes normées pour les dispositifs médicaux, l'autoclavage ou l'irradiation par rayonnement gamma, ont donc été testées avec nos revêtements. Dans les deux cas, lorsque le revêtement a suivi ces stérilisations puis mis au contact de bactéries, la croissance bactérienne reste inhibée, l'activité antimicrobienne est donc maintenue (**Figure 30**).

5.2. Packaging et durée de vie

Afin de garantir la commercialisation des produits revêtus, il faut aussi garantir la

Figure 29

Cellules endothéliales proliférant sur une surface avec ou sans revêtement. Le revêtement ne semble pas présenter de toxicité apparente.



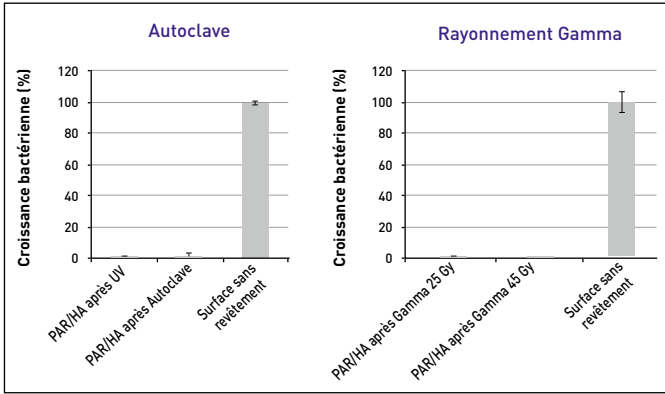


Figure 30

Pourcentage de croissance bactérienne après stérilisation de la surface par autoclave (gauche) ou rayonnement gamma (droite). Le revêtement conserve ses propriétés antimicrobiennes.

durée pendant laquelle ils peuvent être conservés sans perdre leur activité. Le revêtement, fabriqué dans des phases aqueuses, est séché puis stocké pendant des mois, voire des années. La **Figure 31** montre qu'après trois mois de stockage, les performances antimicrobiennes du revêtement n'ont pas changé. Ces expériences réalisées sur un an de stockage donnent le même résultat : le produit packagé peut être stocké sur une étagère et remis au contact de bactéries, on retrouve une activité antimicrobienne totale.

5.3. Autres validations

D'autres points ont fait l'objet de validations. On a poussé le nombre d'infections jusqu'à trois successives (une toutes les 24h) pour s'assurer de l'efficacité du revêtement. Les études animales au niveau antimicrobien sont en cours. On a également varié les types de support sur lesquels sont testés les revêtements, en expérimentant sur du titane, du polyuréthane, du silicone : le revêtement conserve une efficacité antimicrobienne totale. On s'est intéressé également

aux mécanismes de résistance, pour voir si les bactéries étaient capables d'acquérir une résistance vis-à-vis de la polyarginine : on ne voit apparaître aucune résistance alors que cela est le cas pour des antibiotiques conventionnels. Des études de biocompatibilité ont été menées, suivant des tests normés ISO, et aucune toxicité n'a été décelée.

Des aspects réglementaires se posent également. Nous sommes sur un dispositif médical, qui est un implant, et sur lequel vont être placés des biopolymères : cela reste-t-il encore un dispositif médical ou est-ce que cela devient un médicament ? La question est encore à l'étude avec les différentes agences. Dans tous les cas, nous sommes soumis à la nouvelle réglementation des dispositifs médicaux de 2016, ce qui ne devrait certainement pas simplifier la mise sur le marché bien que le besoin clinique soit identifié et urgent.

Ensuite, viendront des phases d'évaluation clinique qui demandent des budgets importants. Aussi, la mise sur le marché d'un nouveau produit médical nécessite de l'inscrire sur la liste des

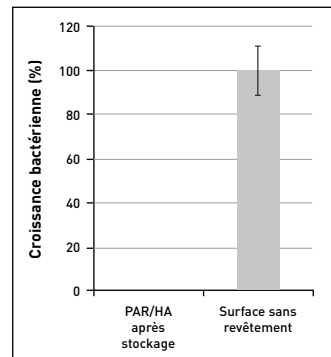


Figure 31

Pourcentage de croissance bactérienne sur la surface après séchage et stockage trois mois à température ambiante. Le revêtement conserve ses propriétés antimicrobiennes.

Figure 32

Évolution des sources de financements depuis le lancement du projet en 2014 jusqu'à nos jours.



produits remboursés et à sa prise en charge pour envisager ensuite une commercialisation. Valider tous ces processus demande généralement plusieurs années.

5.4. Les financements

Ce projet a démarré relativement récemment, en 2014, avec des fonds publics, puis l'aide de l'Institut Carnot MICA dans les phases d'amélioration.

Des projets européens ont également permis le financement du projet (**Figure 32**) et la SATT Conectus a financé les étapes de maturation du projet. D'autres projets prennent le relais, mais nous allons rapidement passer en 2019 sur la création d'une société et continuer l'aventure.

Un parcours compliqué et long, mais l'enjeu en vaut la peine !

Le succès au bout de la chimie des polymères

Pour le paléontologue Yves Coppens, « *La recherche c'est aussi de la chance* ». Ce fut notre cas puisque la polyarginine s'est avérée être antimicrobienne dans nos revêtements, un effet que nous n'attendions pas. Nous avons également trouvé un effet très spécifique de la polyarginine avec 30 résidus, ce qui nous a facilité notamment le dépôt de brevets.

Le résultat est un système extrêmement simple mais prometteur pour éviter de nombreuses affections nosocomiales. Il est uniquement constitué de deux biopolymères capables de conférer une action locale au niveau du matériau – pas de protocole chimique, une production très simple et applicable à tout type de matériau. Il est doté d'un effet antimicrobien et d'un effet anti-inflammatoire, peut être stocké et stérilisé en conservant toute ses propriétés.