



HAL
open science

Création de surfaces antibiofilms par greffage covalent de peptides et enzymes antibactériens sur les surfaces de cuivre et de titane

Jessie Peyre

► To cite this version:

Jessie Peyre. Création de surfaces antibiofilms par greffage covalent de peptides et enzymes antibactériens sur les surfaces de cuivre et de titane. Matériaux. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66535 . tel-00833434

HAL Id: tel-00833434

<https://theses.hal.science/tel-00833434>

Submitted on 12 Jun 2013

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 PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physique et Chimie des Matériaux
(ED 397)

Présentée par

Mlle Jessie PEYRE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Création de surfaces antibiofilms par greffage covalent de
peptides et enzymes antibactériens sur les surfaces de cuivre
et de titane.**

soutenue le 17 Décembre 2012

Devant le jury composé de :

M. Thierry JOUENNE

M. Hubert MUTIN

M. Philippe KAROYAN

M. Jean-Marc BERJEAUD

M. Jean-Loup HEUZE

Mme Claire-Marie PRADIER

M. Vincent HUMBLOT

Directeur de Recherche

Directeur de Recherche

Professeur

Professeur

Chef du groupe Matériaux

Navals DGA/SPN Paris

Directrice de Recherche

Chargé de Recherche

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Examineur

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physique et Chimie des Matériaux
(ED 397)

Présentée par

Mlle Jessie PEYRE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Création de surfaces antibiofilms par greffage covalent de peptides et enzymes antibactériens sur les surfaces de cuivre et de titane.

soutenue le 17 Décembre 2012

Devant le jury composé de :

M. Thierry JOUENNE

M. Hubert MUTIN

M. Philippe KAROYAN

M. Jean-Marc BERJEAUD

M. Jean-Loup HEUZE

Mme Claire-Marie PRADIER

M. Vincent HUMBLOT

Directeur de Recherche

Directeur de Recherche

Professeur

Professeur

Chef du groupe Matériaux

Navals DGA/SPN Paris

Directrice de Recherche

Chargé de Recherche

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Examineur

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés grâce à une bourse BDI cofinancée par le CNRS et la Délégation Générale pour l'Armement. Je remercie donc ces partenaires pour m'avoir permis de travailler sur ce sujet de thèse et pour l'intérêt qu'ils y ont porté.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers Mme Claire-Marie Pradier, ma directrice de thèse, pour avoir encadré ce travail. Je tiens à la remercier à la fois pour sa disponibilité et sa grande attention au travail mené durant ces 3 ans malgré son emploi du temps très chargé que pour son aide précieuse durant la rédaction de ce manuscrit.

Je suis très honorée que Messieurs Thierry Jouenne et Hubert Mutin aient accepté d'être rapporteurs de ce travail et à ce titre je tiens à les remercier pour avoir pris le temps de juger ce manuscrit. Je remercie Monsieur Philippe Karoyan, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie et Monsieur Jean-Loup Heuze, chef du groupe Matériaux Navals à la DGA, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je tiens à adresser un merci tout particulier à Monsieur Jean-Marc Berjeaud, Professeur à l'Université de Poitiers, pour avoir consenti à me recevoir trois fois dans son laboratoire afin de m'expliquer avec une patience inouïe les bases de la microbiologie. Et surtout de m'avoir laissé manipuler seule des équipements dont je n'avais pas l'habitude sans trop froncer les sourcils : Merci Jean-Marc !

Pour finir, au niveau strictement professionnel, je tiens à remercier chaleureusement Vincent Humblot pour son aide, sa disponibilité, sa bonne humeur (95% du temps) et surtout pour avoir su m'encadrer tout en me laissant libre d'explorer et de tester mes idées. Un grand merci à Christophe Méthivier pour avoir répondu à toutes mes questions sur l'XPS même les plus bêtes sans jamais se décourager.

Je souhaiterais également remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire de Réactivité de Surface grâce à qui j'ai passé 3 excellentes années. Notamment grâce aux secrétaires (et ex-secrétaires), Fanny et les Sabines, sur qui j'ai toujours pu compter pour m'aider à comprendre les trucs et astuces de l'administration française. Mais aussi Annie et Sonia, les gestionnaires, qui sont toujours prêtes à rendre service et m'ont évité bien des calculs compliqués !

Je voudrais faire aussi un petit clin d'œil à mes compagnons de galère même si la plupart d'entre eux voguent déjà vers des cieux plus cléments : Colin, Damien, Lilia, Nesrine et Sarah, ce fut un immense plaisir que de partager vos joies, vos peines et vos angoisses pendant ces 3 ans et surtout un grand bonheur de ne pas se sentir seule à traverser tout cela. Je pense bien sûr à la relève qui a su ramener de la fraîcheur et perpétuer la bonne

ambiance du laboratoire : Camella, Manel, Chirine (et oui même si tu n'es là que le midi) et surtout Catarina, qui va beaucoup me manquer.

Au laboratoire, il y a évidemment beaucoup d'autres personnes qui m'ont apporté soutien et joie comme Anne-Fée et Chris (qui m'ont permis de me défouler sur une balle de squash plutôt que sur mon ordinateur), Claudia qui transporte sa bonne humeur de bureau en bureau, encore une fois merci à Bôss qui bien que très moqueur est aussi beaucoup à l'écoute et enfin un grand merci à Jole de m'avoir supporter dans son bureau « made in sud » durant ces 3 ans et à Jessem pour son humour chronique. Et même les personnes qui n'ont fait que passer pour un temps plus ou moins court comme Soumeya, Jean et Camille.

D'un point de vue purement personnel, je voulais remercier mes amies qui mènent elles aussi leur barque dans leur thèse respective mais qui ont su m'accorder du temps, de la patience, écouter mes petites histoires, se réjouir avec moi des expériences fructueuses : Amandine, Eva et Marion vous êtes des trésors inestimables à mes yeux ! Je voudrais également remercier Emma qui, malgré une rencontre assez récente, est une personne tout simplement géniale.

Je tiens à remercier mes parents, Véronique et Patrick, qui même en suivant les choses de loin m'ont toujours apporté leur soutien et ont toujours trouvé les mots pour soigner mes maux et me redonner « la patate ». Ainsi que tout le reste de ma famille qui a toujours montré un intérêt mais a souvent renoncé à comprendre le pourquoi du comment de tous ces travaux.

Enfin, je tiens à remercier Manu. Manu, tu as pris le train en route mais tu as su développer des réserves de patience et de placidité qui m'ont maintes fois désarmée. Tu as réussi à me supporter pendant l'année la plus stressante de ma vie et pour ça je ne saurais jamais assez comment te remercier !

RESUME

La contamination bactérienne et le développement de biofilms marins sont des problèmes récurrents, et terriblement coûteux sur les structures immergées des bâtiments de l'armée. L'emploi de composés bactéricides et nocifs pour l'écosystème est désormais interdit. Les travaux menés lors de cette thèse avaient donc pour objectif de mettre au point des traitements de surface originaux préventifs, permettant de limiter l'adhésion des bactéries marines et, le cas échéant, leur développement sur des matériaux à base de cuivre et de titane. Des surfaces de cuivre ont été fonctionnalisées par des espaceurs sur lesquels ont été greffées des molécules antibactériennes : un peptide, la Magainine I et une enzyme, le lysozyme HEWL. Une deuxième stratégie a consisté en le greffage d'espaceurs, puis des agents antibactériens, sur des surfaces microstructurées à l'aide de photopolymères dérivés de poly(méthyl méthacrylate). Sur les surfaces de titane, la Magainine I et l'HEWL ont été greffés sur deux types d'espaceurs, un silane et un PEG diamine. Les traitements de surface, antibactériens, ont été optimisés grâce à des caractérisations à chaque étape par IR, XPS, AFM et mesures d'angle de contact. Afin de mettre en évidence les propriétés antibiofilms des surfaces fonctionnalisées, quatre tests ont été mis en place : un test d'adsorption de protéines, un test d'adhésion de bactéries, un test de viabilité des bactéries adhérees et enfin un test de croissance des bactéries après contact avec les surfaces fonctionnalisées. A titre d'exemples, le développement de bactéries sur les surfaces de titane a été réduit de 90% et l'adhésion de bactéries réduite de 80% sur les surfaces de cuivre.

Mots-Clés : biofilm, surface de cuivre, surface de titane, peptides et enzymes antibactériens, PM-IRRAS, XPS, AFM, PEG, photopolymères.

SUMMARY

Bacterial contamination and formation of biofilms on immersed structures in seawater are frequent and at the origin of high cost maintenance treatments. The use of compounds biocidal, but also harmful for the ecosystem, is nowadays forbidden. The aim of this thesis work was to find new preventive surface treatments to stop, or strongly reduce, biofilm formation on copper and titanium surfaces. This is possible by preventing bacteria adhesion and, if necessary, their development after their adhesion. Copper surfaces were functionalized by crosslinkers onto which two antimicrobial molecules, Magainin I and HEWL lysozyme, were then grafted. An alternative strategy consisted in grafting spacers, and antimicrobial agents, on a copper surface microstructured by using a photopolymer derived from poly(methyl methacrylate). Magainin I and HEWL were also grafted onto titanium surfaces *via* two kinds of spacers, a silane and a diamino-PEG. Antibacterial surface treatments were optimized after characterization of each step by IR, XPS, AFM and angle contact measurements. In order to highlight the antibiofilm properties of functionalized surfaces, four tests were conducted: one test for protein adsorption, one measuring bacteria adhesion and one testing their viability; the last one was conducted to assay bacteria growth after deposition onto functionalized surfaces. As examples, bacteria growth was reduced by 90% and 80 % onto functionalized titanium and copper surfaces respectively.

Key words: biofilm, copper surface, titanium surface, antibacterial peptides and enzymes, PM-RAIRS, XPS, AFM, PEG, photopolymers.

Abréviations utiles.

AIBN : 2,2'-Azobis(2-méthylpropionitrile)

AFM : Atomic Force Microscopy – Microscope à Force Atomique

APTES : AminoPropylTriEthoxySilane

BHI : Brain Heart Infusion

BSA : Bovin Serum Albumin

Cfu : Colony forming units

CPS : Count Per Second (ordonnées spectres XPS)

Cys : Cystéamine

DPT : DiPhenylTriazène

EDC : *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-EthylCarbodiimide

GA : Glutaraldehyde

HEWL : Hen Egg White Lysozyme

IRRAS : InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy – Spectroscopie InfraRouge en mode Réflexion Absorption

L.in : *Listeria innocua*

L.iv : *Listeria ivanovii*

Mag : Magainine I

MA-PEG : MéthAcrylate-Poly(Ethylène Glycol)

MHOH : 6-mercapto-1-hexanol

MMA : Méthyl MéthAcrylate

MUA : 11-MercaptoUndecanoïc Acid

NHS : *N*-HydroxySuccinimide

PBS: Phosphate Buffer Solution – Solution de Tampon Phosphate salin

PEG : Poly(Ethylène Glycol)

PETMP : PentaErythritol-Tetrakis(3-MercaptoPropionate)

PM-IRRAS : Polarisation Modulation InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy – Spectroscopie InfraRouge en mode Réflexion Absorption avec Polarisation de Modulation

PMMA : Poly(Méthyl MéthAcrylate)

R_{act} : rapport des concentrations d'EDC et NHS dans les solutions d'activation

$$R_{act} = \frac{[EDC]}{[NHS]}$$

RMS : Roughness Mean Square, définition normative de la rugosité d'une surface

SAM : Self Assembled Monolayer – Monocouche Auto-Assemblée

Téré : Téréphtaldéhyde

u.a : unité arbitraire (ordonnées spectres IR)

XPS : X-Ray Photoemission Spectroscopy – Spectroscopie de Photoémission de Rayons X

Introduction générale	p.1
Chapitre I : Etude bibliographique	p.7
I. Biofilm et moyens de lutte contre les biofilms marins	p.9
I.1. Définition d'un biofilm	p.9
I.2. Formation d'un biofilm marin	p.9
I.3. Moyens de lutte contre les biofilms marins	p.10
I.3.a. Généralités sur les membranes des bactéries	p.11
I.3.b. Les biocides	p.11
I.3.c. Création de surfaces bactériostatiques ou anti-adhésives	p.12
I.3.d. Création de surfaces biocides : utilisation de biocides naturels	p.13
1. Les peptides	p.13
2. Les enzymes	p.17
3. La micro-structuration des surfaces	p.19
II. Réactivité des surfaces de cuivre	p.19
II.1. Polymérisation sur les surfaces de cuivre	p.20
II.2. Utilisation de cache chimique sur les surfaces de cuivre	p.21
III. Réactivité des surfaces de titane	p.23
III.1. Silanisation	p.24
III.2. Phosphonation	p.24
III.3. Polymérisation sur le titane	p.25
Références bibliographiques	p.29
Chapitre II : Protocoles et techniques expérimentales	p.37
Protocoles de fonctionnalisation des surfaces de cuivre	p.39
I. Polissage et rinçage des surfaces	p.39
II. Solutions et conditions d'immersion	p.40
II.1. Protocoles du co-greffage d'un espaceur et de peptides ou enzymes antibactériens	p.40
II.1.a. Adsorption de l'acide 11-mercaptoundecanoïque (MUA)	p.40
II.1.b. Adsorption du thio-carboxy poly(éthylène glycol) (HS-PEG-COOH)	p.41
II.1.c. Activation des fonctions COOH	p.42
II.2. Protocoles pour les surfaces structurées par des polymères photosensibles	p.43
II.2.a. Greffage de polymères photosensibles	p.43
1. Optimisation du mode de greffage des polymères	p.44
Greffage par adhésion visqueuse entre les surfaces du cuivre et le PMMA	p.44
Greffage du PMMA sur un espaceur aminothiolié	p.44
<i>Greffage du PMMA sur le 4-aminothiophénol</i>	p.44
<i>Greffage du PMMA sur la cystéamine (Cys)</i>	p.44
Intégration de l'espaceur dans la synthèse du PMMA	p.45
2. Synthèse de polymères multifonctionnels	p.46
Intégration d'un dopant photosensible	p.46

Sommaire

Intégration de PEG dans le HS-PMMA	p.47
II.2.b. Irradiation UV des polymères	p.47
II.2.c. Greffage post-UV	p.48
II.3. Greffage de la Magainine I (Mag) et du lysozyme de blanc d'œuf (HEWL) sur les espaceurs (MUA, HS-PEG-COOH ou MHA)	p.48
II.3.a. Optimisation du greffage de la Mag	p.49
II.3.b. Greffage de HEWL	p.49
III. Test d'adsorption de protéines	p.4
Protocoles de fonctionnalisation des surfaces de titane	p.50
I. Polissage et oxydation des surfaces de titane	p.50
II. Solutions et protocoles d'immersion	p.51
II.1. Greffage de l'APTES	p.51
II.2. Greffage du catéchol (Cat)	p.52
II.3. Greffage du diamino-poly(éthylène glycol) (H ₂ N-PEG-NH ₂)	p.54
II.4. Greffage de la Magainine I (Mag)	p.54
II.5. Greffage du lysozyme de blanc d'œuf (HEWL)	p.55
II.5.a. Greffage du téréphtaldéhyde (Téré)	p.55
II.5.b. Greffage de HEWL	p.56
III. Test d'adsorption de protéines	p.56
Techniques expérimentales	p.57
Références bibliographiques	p.60

Chapitre III : Fonctionnalisation du cuivre et test d'adsorption de protéines

I. Caractérisation de la surface de cuivre nu	p.66
II. Adsorption de la couche de MUA ou de MUA + MHOH et activation des fonctions acides carboxyliques	p.68
II.1. Caractérisation par PM-IRRAS	p.68
II.2. Caractérisation par XPS	p.70
II.3. Caractérisation par AFM	p.72
III. Adsorption de la couche de HS-PEG-COOH et activation des fonctions acides carboxyliques.	p.73
III.1. Caractérisation par PM-IRRAS de l'adsorption du HS-PEG-COOH	p.74
III.2. Caractérisation au PM-IRRAS de l'activation des surfaces de Cu-PEG	p.75
III.3. Caractérisation par XPS	p.76
III.4. Caractérisation par AFM	p.78
IV. Greffage des polymères photosensibles	p.78
IV.1. Caractérisation par PM-IRRAS des différents modes de greffage	p.79
IV.2. Caractérisation des polymères multifonctionnels	p.80
IV.2.a. Caractérisation par PM-IRRAS	p.80
IV.2.b. Caractérisation par mesures d'angle de contact	p.82
IV.2.c. Caractérisation par AFM	p.83
V. Irradiation UV des polymères photosensibles	p.83

VI. Adsorption des espaceurs après irradiation UV	p.86
VII. Greffage de la Magainine I et de l'enzyme HEWL sur les surfaces activées	p.88
VII.1. Greffage covalent de la Magainine I (Mag)	p.89
VII.1.a. Greffage de la Magainine sur les surfaces de Cu-MUA-act, Cu-MHA et Cu-PEG-act	p.89
VII.1.a.i. Caractérisation par PM-IRRAS	p.89
VII.1.a.ii. Caractérisation par XPS	p.90
VII.1.b. Greffage de la Magainine sur les surfaces de Cu-PMMA-MHA et Cu-PMMA+PEG4000 10%-MHA	p.91
VII.2. Greffage covalent du lysozyme de blanc d'œuf (HEWL)	p.92
VII.2.a. Greffage de HEWL sur les surfaces de Cu-PEG	p.93
VII.2.b. Greffage de HEWL sur les surfaces de Cu-PMMA-MHA et Cu-PMMA+PEG4000-MHA	p.93
VIII. Test d'adsorption de protéines	p.95
Conclusion	p.97
Références Bibliographiques	p.98

Chapitre IV : Fonctionnalisation du titane et test d'adsorption de protéines

I. Caractérisation de la surface de titane oxydée	p.107
II. Caractérisation du greffage covalent du (3-aminopropyl)triéthoxy silane (APTES)	p.109
III. Greffage de la couche de catéchol (Cat) et de diamino-PEG (H ₂ N-PEG-NH ₂)	p.111
III.1. Caractérisation par IRRAS	p.111
III.2. Caractérisation XPS	p.112
III.3. Caractérisation AFM	p.114
IV. Greffage de la Magainine sur les surfaces fonctionnalisées de titane	p.116
V. Greffage de HEWL sur la couche de H ₂ N-PEG-NH ₂	p.117
VI. Test d'adsorption de protéines	p.120
Conclusion	p.122
Références bibliographiques	p.123

Chapitre V : Tests d'adhésion et de croissance bactérienne sur cuivre et titane fonctionnalisés

I. Protocole des tests	p.131
I.1. Culture des bactéries en solution	p.131
I.2. Test d'adhésion des bactéries (Test 1)	p.131
I.3. Test d'endommagement des bactéries (Test 2)	p.132
I.4. Test de la croissance des bactéries (Test 3)	p.132
II. Tests conduits sur les surfaces de cuivre fonctionnalisées	p.133
II.1. Surfaces fonctionnalisées par MUA et PEG	p.133

Sommaire

II.1.a. Test d'adhésion bactérienne (Test 1)	p.134
II.1.b. Test d'endommagement des bactéries (Test 2)	p.135
II.2. Test conduits sur les surfaces fonctionnalisées par les polymères photosensibles	p.138
II.2.a. Test d'adhésion bactérienne (Test 1)	p.138
II.2.b. Test d'endommagement des bactéries (Test 2)	p.140
III. Tests conduits sur les surfaces de titane fonctionnalisées	p.141
III.1. Test d'adhésion bactérienne (Test 1)	p.141
III.2. Test d'endommagement des bactéries (Test 2)	p.143
III.3. Test de croissance bactérienne (Test 3)	p.145
Conclusion	p.147
Références Bibliographiques	p.148
Conclusions et perspectives	p.151
Annexes	p.157

Introduction générale

Introduction générale

L'accroche de bactéries et, plus généralement, le développement de biofilms (composés essentiellement de micro-organismes, eau et sels) sur différents matériaux sont des problèmes récurrents aussi bien dans le domaine hospitalier (prothèse, table d'opération...) où cela entraîne le développement de maladies nosocomiales, l'industrie alimentaire, que dans l'armée (tuyauterie, circuits de refroidissement... dans les bateaux ou les sous-marins). Dans ce dernier cas, le développement d'un biofilm microscopique entraîne l'accroche d'organismes macroscopiques (comme par exemple les moules) et, parfois, l'apparition d'une corrosion « sous dépôt », corrosion localisée dans les zones d'eau stagnante. Pour remédier à ces problèmes, la DGA (Direction Générale de l'Armement) procède essentiellement à des traitements curatifs : décapage acide pour éliminer les macro-organismes, grattage avec des morceaux de bois, système d'électrochloration (efficace mais aussi toxique et coûteux) ou utilisation de pastilles d'eau de Javel (libération progressive des ions Cl⁻).

Les travaux menés lors de cette thèse ont pour objectif de mettre au point des stratégies préventives au développement de ces biofilms en diminuant ou empêchant l'adsorption de protéines et l'adhésion des bactéries marines sur des matériaux utilisés par la DGA, à savoir, majoritairement le titane et le cuivre. Les recherches ont donc porté sur la mise en place de protocoles permettant d'inhiber les premières étapes de la formation du biofilm. Par ailleurs, la solution trouvée doit être industrialisable, surtout dans le cas du cuivre, pour pouvoir être utilisée à grande échelle dans la confection des circuits de refroidissement des bateaux et des sous-marins.

Pour empêcher la formation de biofilm sur des surfaces métalliques, nous avons choisi de combiner deux stratégies : (i) protéger la surface afin que les protéines et les bactéries ne puissent pas adhérer à la surface, (ii) inhiber le développement des bactéries dans l'hypothèse où celles-ci parviendraient tout de même à se fixer sur la surface, voire (iii) tuer les bactéries ayant réussi à adhérer. Ces actions sont possibles en fixant sur la surface souhaitée des peptides à activités biocides ou bactériostatiques ou des enzymes connues pour leur action néfaste sur les bactéries. Afin de renforcer ces effets, il est possible d'associer ces composés à des molécules possédant des propriétés antiadhésives.

Dans le cadre des travaux de cette thèse, nous avons étudié le greffage et l'activité antibactérienne de la Magainine I (peptide antibactérien) et du lysozyme de blanc d'œuf (HEWL, enzyme antibactérien) greffés sur des surfaces de cuivre et de titane. L'enjeu est d'immobiliser ces agents anti-bactériens de façon stable et permettant de conserver leur activité. Afin de limiter l'adsorption des protéines et l'adhésion bactérienne, nous nous sommes intéressés au « co-greffage » de ces molécules antibactériennes avec des molécules possédant des propriétés antiadhésives comme par exemple les poly(éthylène glycol) (PEG). Nous avons également étudié une voie de fonctionnalisation des surfaces par des polymères photosensibles afin de microstructurer la couche organique et ainsi favoriser le greffage contrôlé, successif, de deux molécules sur une même surface.

En se basant sur les travaux effectués auparavant au Laboratoire de Réactivité de Surface [1, 2], nous avons greffé des bras espaceurs entre la surface et les molécules à activités antibactériennes. Cette première couche sert à espacer les molécules d'intérêt de la surface afin que l'activité des enzymes ou des peptides ne soit modifiée ni par la diminution de mobilité ni par la présence d'une surface métallique. Le choix des molécules espaceurs dépend de la réactivité des surfaces métalliques et de leurs oxydes.

Dans l'étude bibliographique, nous présenterons la problématique et le contexte dans lesquels se positionne ce travail. Nous expliquerons ce qu'est un biofilm, comment il se forme et quels sont les moyens de lutte actuels. Nous parlerons aussi des différents peptides ou enzymes antibactériens existants et de leur mode d'action. Enfin nous aborderons la chimie relative à chacune des deux surfaces : la réactivité et les méthodes de fonctionnalisation, du cuivre et du titane.

Le deuxième chapitre présentera les optimisations des protocoles de fonctionnalisations des surfaces de cuivre et de titane, afin d'obtenir des couches reproductibles, ainsi qu'un résumé des techniques d'analyses utilisées pour caractériser le greffage de chaque couche organique. Le principe de ces techniques est détaillé en Annexe I.

Le troisième chapitre s'intéressera aux fonctionnalisations de surfaces de cuivre, et aux tests d'adsorption de protéines sur échantillons ainsi modifiés. Nous caractériserons la composition chimique et l'homogénéité de chacune des couches greffées, avant de mesurer l'adsorption de la BSA (Bovine Serum Albumine). Dans le chapitre IV, les

Introduction générale

mêmes études seront réalisées avec comme support les échantillons de titane, une chimie très différentes sera alors employée pour immobiliser les agents anti-bactériens. Enfin le dernier chapitre permettra de mesurer l'activité des surfaces fonctionnalisées vis-à-vis de l'adhésion et de la croissance bactérienne. Plusieurs tests antibactériens ont été réalisés. Chaque test permet d'évaluer l'activité des différentes couches organiques greffées sur une étape ciblée du développement du biofilm.

L'ensemble du travail repose sur une approche combinant chimie de surface, techniques de caractérisation à l'échelle moléculaire et tests microbiologiques. Il a été réalisé pour sa majeure partie au Laboratoire de Réactivité de Surface de l'UPMC ; les tests d'adhésion et de croissance bactérienne ont été effectués au Laboratoire de Microbiologie de l'Eau de l'Université de Poitiers.

Références Bibliographiques

1. A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, M. Salmain, and C.-M. Pradier, *Grafting of lysozyme and/or poly(ethylene glycol) to prevent biofilm growth on stainless steel surfaces*. Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113** p. 2101-2109.
2. A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, L. Barbes, J. Li, M. Salmain, and C.-M. Pradier, *Bioengineering of stainless steel surface by covalent immobilization of enzymes. Physical characterization and interfacial enzymatic activity*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **349** p. 13-18.

Chapitre I : Etude bibliographique

Chapitre I : Etude Bibliographique

I. Biofilms et moyens de lutte contre les biofilms marins

I.1. Définition d'un biofilm

Les micro-organismes évoluant dans un milieu aqueux sont observables sous deux formes : planctonique (en suspension dans le milieu) ou dans un biofilm. Le biofilm est le résultat de l'adhésion, du développement et de la coopération au sein d'une communauté de micro-organismes. Le biofilm est composé de nutriments, de micro-organismes vivants ou morts et d'une matrice extracellulaire [1]. Grâce aux canaux de circulation présents dans la matrice, le biofilm permet d'apporter l'oxygène et les nutriments aux couches supérieures de micro-organismes [2], d'évacuer les déchets vers l'extérieur [3] et de protéger les micro-organismes des attaques extérieures [4-6].

La matrice extra cellulaire est composée à 95% d'eau et de substances polymériques extracellulaires (EPS) regroupant des polysaccharides (40 à 95%), des protéines (1 à 60%), des acides nucléiques (1 à 10%) et des lipides (1 à 40%) [7].

Dans le cas des surfaces plongées en milieu marin (voir Figure 1), le biofilm sert souvent de point d'accroche pour des organismes macroscopiques tels que les algues, les coquillages ou certains invertébrés.

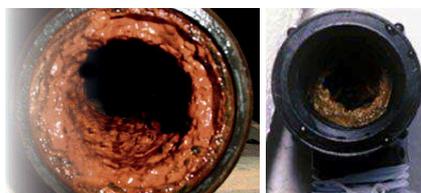


Figure 1 : Exemples de biofilms marins se développant dans les tuyaux de cuivre.

I.2. Formation d'un biofilm marin

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes [8, 9] : formation d'un film primaire, adhésion des micro-organismes, croissance et sécrétion des EPSs, et enfin la formation du biofilm (voir Figure 2).

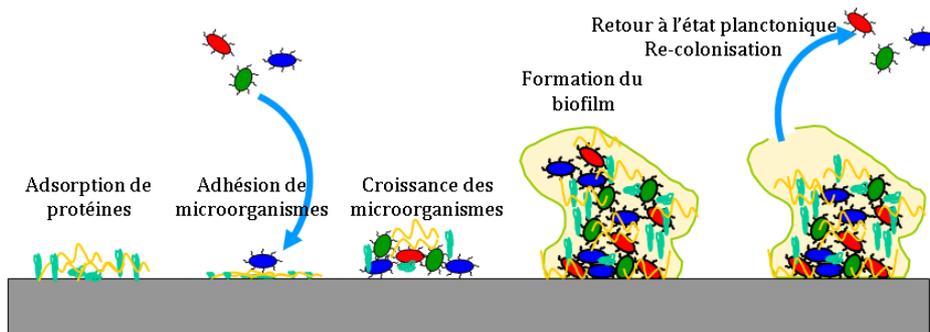


Figure 2 : Schéma de la formation d'un biofilm.

La *formation du film primaire* s'amorce dès l'introduction de la surface dans le milieu marin. Il modifie les propriétés physico-chimiques de la surface et facilite l'adhésion future des micro-organismes. Simultanément à la formation de ce film, il y a un *transport des micro-organismes* vers la surface soit de manière passive (courant ou diffusion) soit de manière active grâce à la présence de flagelles ou de pili sur certaines souches de bactéries [10]. L'accroche des micro-organismes sur la surface se fait en deux temps : *l'adsorption réversible* faisant intervenir des interactions faibles, types liaisons hydrogène, force de Van der Waals, etc... Puis, la phase dite d'*adhésion irréversible* mettant en jeu des phénomènes biologiques comme l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion, la production de biopolymères ou la communication entre les cellules. Les cellules vont à la fois créer des interactions fortes avec la surface (dipôle-dipôle, ponts polymériques... [11]) mais aussi entre elles via les EPSs, ce qui renforce leur adhésion. Après adhésion, les micro-organismes se multiplient, forment des micro-colonies et s'ensuivent la *maturation et la structuration du biofilm*. Le biofilm commence à se structurer sous la forme de colonnes ou de champignons comprenant des micro-organismes au sein de la matrice extracellulaire parcourue de canaux de circulation [12]. Il a été observé que ces canaux apportent davantage de nutriments aux couches externes du biofilm : en effet, dans les couches les plus enfouies il y a moins de bactéries détectées [13] et celles-ci se développent moins rapidement en raison de l'appauvrissement en nutriments [14]. Lorsque les nutriments viennent à manquer [15] ou lorsque le biofilm arrive à maturité complète [16], les *bactéries sessiles retournent à l'état planctonique* ; commence alors un nouveau cycle de colonisation de surface et développement de biofilm. Ce cycle de formation de biofilm a lieu avec tous les types de bactéries (à Gram positif et à Gram négatif).

I.3. Moyens de lutte contre les biofilms marins

Le problème récurrent dans la lutte contre les biofilms marins est la complexité et la diversité biologique des micro-organismes présents dans le monde marin (entre 3500 et 4500 espèces de phytoplanctons [17]), ce qui ne permet pas l'utilisation de principes actifs ciblés. On trouve en revanche beaucoup de peintures à base d'étain [18], de plomb [19] ou de cuivre [20] ou des polymères contenant des principes actifs non spécifiques comme par exemples des AMPs (AntiMicrobial Peptides [21, 22]).

I.3.a. Généralités sur les membranes des bactéries

Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif ont une membrane extérieure composée d'un peptidoglycane. L'épaisseur de cette paroi dépend de la nature de la bactérie : chez les bactéries à Gram positif, le peptidoglycane est épais et directement en contact avec le milieu extérieur [23] ; chez les bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane est plus fin et est protégé entre deux membranes plasmiques [24] (voir Figure 3).

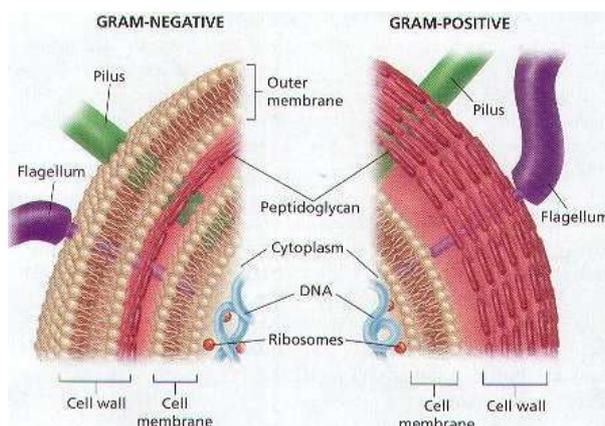


Figure 3 : Schéma comparatif de la membrane des bactéries Gram- (gauche) et Gram+ (droite).

Dans les deux cas, le peptidoglycane est composé d'un enchaînement de N-acétyl-glycosamine (NAG) et d'acide N-acétyl-muramique (NAM) reliés entre eux par des liaisons peptidiques. La plupart des peptides et enzymes à activités biocides endommagent la membrane des bactéries en détruisant ces peptidoglycane.

I.3.b. Les biocides

Au début du 20^{ème} siècle, les biocides les plus utilisés sont le cuivre et les sels à base d'étain (TBT) incorporés dans la formulation des peintures et relargués de façon plus ou moins régulière au fil du temps [25]. Ces deux composés sont interdits d'utilisation depuis 2008 en raison de leur nocivité pour l'environnement et leur impact sur la biodiversité [26, 27]. Dans un deuxième temps, des « boosters » organiques ont été utilisés pour augmenter l'action du cuivre [25, 28] mais des études complémentaires ont montré que ces composés auraient eux aussi des effets dommageables sur le milieu marin [29]. De manière générale, les méthodes impliquant des biocides agissant par diffusion progressive dans le milieu aqueux sont laissées de côté pour deux raisons : écologique, la concentration de ces biocides peut avoir un effet nocif sur la biodiversité, et économique, une fois la totalité du principe actif relargué il est nécessaire de re-protéger tous les systèmes immergés. Une alternative efficace est l'immobilisation, sur

les surfaces à protéger, de molécules possédant des effets anti-adhésifs ou l'utilisation de biocides naturels.

I.3.c. Création de surfaces bactériostatiques ou anti-adhésives

Dans un premier temps, pour limiter la formation d'un biofilm, il suffit de limiter l'approche et l'adhésion des micro-organismes sur les surfaces immergées. Ceci est obtenu en modifiant les propriétés de la surface en déposant sur celle-ci des couches organiques ou inorganiques capables de repousser les bactéries ou d'inhiber leur accroche. Une des méthodes les plus répandues est l'utilisation de peintures ultralissantes comme les fluoropolymères [30, 31] ou les silicones [32, 33]. Ces surfaces possèdent une énergie de surface très faible (de l'ordre de 20 mJ.m^{-2} pour les silicones) : elles sont donc très hydrophobes et permettent d'inhiber l'adhésion des biosalissures. Il est aussi possible d'utiliser la méthode du flochage qui consiste à fixer de manière perpendiculaire à la surface des fibres chargées (polyester, polyamide...) [34, 35] ; la plupart des bactéries possèdent des charges négatives dans leur membrane et sont donc repoussées par cette couche chargée négativement.

Enfin, une voie largement étudiée pour la création de surfaces antiadhésive est le greffage de polymère notamment l'utilisation de PEG (poly(éthylène glycol)) sur diverses surfaces [31, 36, 37]. Les propriétés répulsives du PEG sont dues à la forte interaction entre les molécules d'eau et les chaînes de polymères entraînant un gonflement de la matrice polymérique et la création d'une sphère de solvation inaccessible aux protéines [38, 39]. L'emploi de PEGs s'est considérablement développé d'une part parce que ces polymères sont biocompatibles (utilisation dans le cadre de la protection en milieu hospitalier [40]) et non-toxiques (synthèse d'enzymes couplés à des PEGs afin de diminuer leur impact immunogène [41]), ils ne représentent donc pas de danger pour l'écosystème. D'autre part, la capacité de répulsion des chaînes de PEGs est étroitement liée à leur longueur et, dans le cas de l'utilisation de copolymères amphiphiles, au taux de PEG présent dans le copolymère [42-44] : il est donc possible de contrôler l'adsorption des biosalissures en agissant directement sur la synthèse du PEG. Il existe plusieurs façons de greffer les polymères sur les surfaces à protéger :

- adsorption physique *via* des interactions électrostatiques [45] ou de l'adhésion visqueuse [46].

- utilisation d'un copolymère dans lequel le deuxième monomère interagit avec la surface comme par exemple lors de l'utilisation de PLL-g-PEG sur niobium (la masse de sérum adsorbé est diminué jusqu'à 59 fois selon la composition du copolymère) [47] ou sur titane (ralentissement du temps de coagulation du sang par un facteur 3 et diminution de la couche de plasma par un facteur 6) [37].
- immobilisation directe sur la surface en utilisant des motifs PEGs possédant une fonction terminale ayant une forte affinité avec la surface à fonctionnaliser (entre 2 et 12 fois moins de protéines adsorbées selon la fonction terminale utilisée) [48-50]
- immobilisation *via* une couche intermédiaire constituée d'une molécule capable de réagir avec la surface et le PEG [51-53].

Dans le cadre des travaux de cette thèse, nous nous sommes concentrés sur les deux dernières méthodes à savoir l'immobilisation directe du PEG sur les surfaces de cuivre et l'immobilisation *via* un dérivé catéchol sur les surfaces de titane. Ces deux méthodes seront détaillées dans le Chapitre II.

I.3.d. Création de surfaces biocides : utilisation de biocides naturels

Un moyen de lutte très efficace contre les biosalissures reste l'utilisation de biocides naturels. En effet, contrairement aux biocides à base de cuivre ou d'étain ceux-ci sont déjà présents dans la nature (sécrétés par des plantes, des animaux, des insectes ou même des micro-organismes) et ne risquent pas de perturber l'écosystème en place. Afin de limiter totalement leur impact, il est judicieux de les greffer de manière covalente aux surfaces que l'on souhaite protéger. Cette catégorie de biocides regroupe des peptides, des enzymes mais aussi des molécules dites biomimétiques (molécules non naturelles possédant les mêmes fonctions ou la même structure de site actif qu'une enzyme).

1. Les peptides

Le premier peptide largement étudié est la nisine (voir Figure 4). Ce peptide est produit par une bactérie à Gram positif, le *Lactococcus lactis* [54], et possède un large spectre d'action contre les bactéries à Gram positif. Il a été toutefois montré qu'en présence d'un agent de chélation comme l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) la nisine possède aussi un très bon effet vis-à-vis des bactéries à Gram négatif [55]. La nisine est utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour, par exemple, contrôler la croissance et la

production de toxines de *Clostridium botulinum* (responsable du botulisme) sur les fromages [54] ou pour prolonger la date de consommation des produits laitiers [56]. Ce peptide agit sur la membrane cytoplasmique des cellules en dormance [57] en interagissant avec un des lipides précurseurs de cette membrane et provoquant la formation de pores [58]. Plus précisément, les résidus déhydroalanine (marqué en rouge sur la Figure 4) et déhydrobutyrine (marqué en bleu sur la Figure 4) de la nisine agissent comme des accepteurs de Michael (l'addition de Michael est une addition nucléophile conjuguée) sur cette membrane et entraîne la perte de la force proton motrice et la désintégration de la membrane [59].

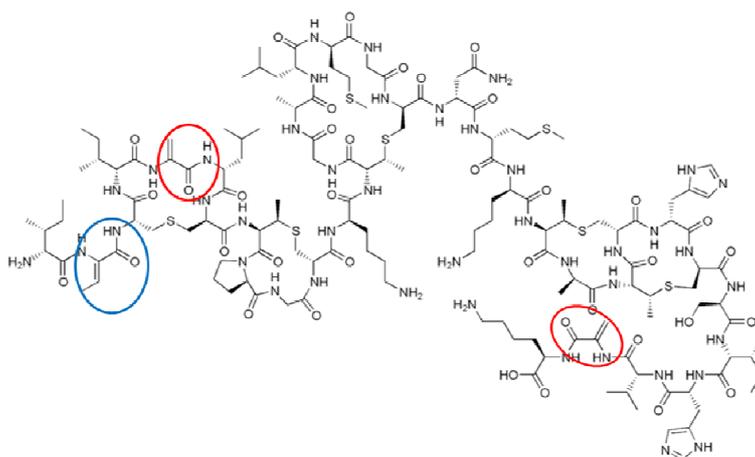


Figure 4 : Formule de la Nisine. En rouge : déhydroalanine ; en bleu : déhydrobutyrine.

La force proton motrice désigne le stockage d'énergie par combinaison d'un gradient de proton et d'une différence de potentiel de part et d'autre d'une membrane [60]. De plus ce peptide a déjà été greffé sur différentes couches de polymères soit de façon covalente sur le chitosane [61], soit par encapsulation au sein d'un réseau de PEO (poly(éthylène oxyde)) [62] et il conserve son activité après immobilisation.

Un deuxième peptide synthétisé par une bactérie et ayant un large spectre d'action sur les bactéries à Gram positif et négatif ainsi que sur certains champignons est la gramicidine (voir Figure 5).

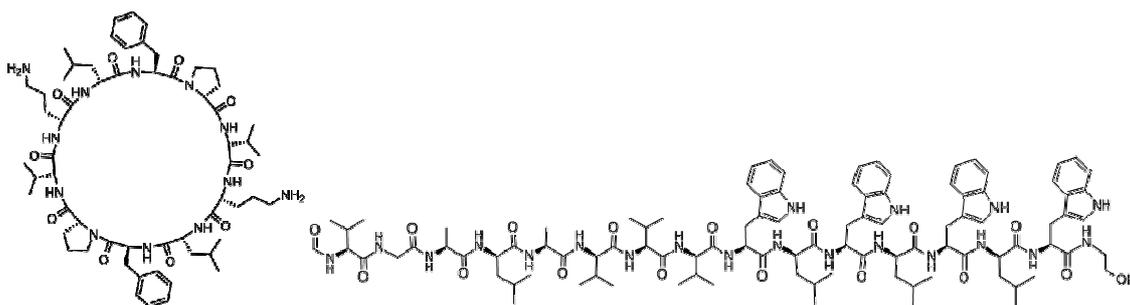


Figure 5 : Schéma de la gramicidine S (cyclique) et gramicidine A (linéaire).

Les gramicidines (il existe 3 gramicidines linéaires regroupées sous le nom gramicidine D (80% de A, 6% de B et 14% de C) et la gramicidine S) sont produites par le *Bacillus brevis* [63] ; contrairement aux autres peptides, elles sont composées d'acides aminés de configuration L et d'acides aminés de configuration D [64]. Ceci permet à la gramicidine D d'adopter deux formes différentes selon le milieu dans lequel elle est placée. Sous la forme d'une double hélice, les deux chaînes de peptides forment des liaisons hydrogène **intermoléculaires** sur toute la longueur des chaînes [65]. Sous la forme simple hélice, les deux chaînes de peptides forment des liaisons hydrogène **intramoléculaires** [65]. La gramicidine est un peptide ionophore dissipant les cations Na^+ , K^+ et H^+ . Ceci interfère dans la force proton motrice, diminue la concentration d'ATP (adénosine-5'-triphosphate, source d'énergie des cellules) dans la cellule [66] et permet la formation de pores dans la membrane de la bactérie [67]. Dans le cadre de la modification de surface, les gramicidines les plus utilisées sont les linéaires que ce soit par incorporation dans un réseau de phospholipides [68] ou par greffage covalent sur la cystamine [69].

La mélittine (Figure 6) est un peptide extrait du venin d'abeille [70]. Ce peptide est un peptide amphiphile composé de 26 acides aminés, possédant 6 charges positives [71]. La partie C-terminale (résidus 1 à 20) est composée d'acides aminés majoritairement hydrophobes [72], alors que la partie N-terminale (résidus 21 à 26 entouré en rouge sur la Figure 6) se termine par des acides aminés hydrophiles [73]. Il agit tel un anticoagulant et un anti-inflammatoire (production de prostaglandine E1 et E2). La mélittine permet de bloquer l'action des ATPases [74], en empêchant l'échange du potassium et du calcium au travers des membranes et possède donc aussi un effet analgésique. Ce peptide provoque la micellisation des bicouches phospholipidiques [70, 71]. Ceci induit une ouverture de la bactérie (par dégradation de la paroi) grâce à son

effet de « micellisation » ou une inhibition des pompes à sodium/potassium (enzymes transmembranaires permettant l'échange entre le Na^+ de la cellule et le K^+ du milieu extérieur afin de réguler le potentiel de repos des cellules) provoquant un dysfonctionnement de la bactérie et l'empêchant de se développer.

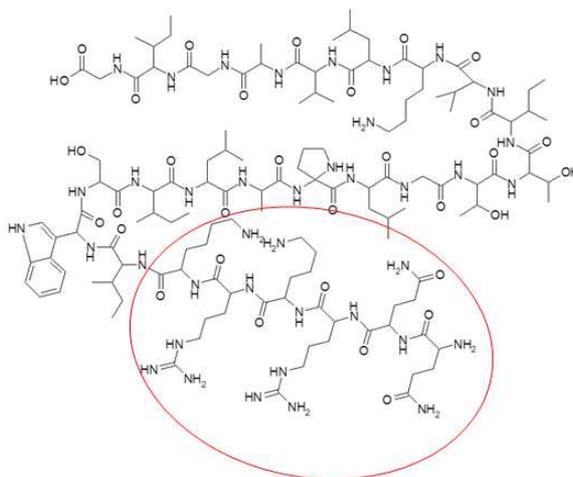


Figure 6 : Schéma de la mélittine.

La mélittine a une efficacité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram négatif [75], les levures [76] et les *Borrelia* (bactéries à l'origine de la maladie de Lyme) [77].

Enfin, il existe aussi des peptides sécrétés par des animaux pour se protéger des micro-organismes présents dans leur milieu naturel comme par exemple la magainine I présente sur la peau des *Xenopus laevis* (un crapaud originaire du centre et du sud de l'Afrique) [78]. La magainine I est composé de 23 acides aminés de conformation L (Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Gly-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Lys-Ser) et possède majoritairement des résidus cationiques, amphiphiles et hydrophobes [79] ; la magainine a une structure d'hélice α (Figure 7).

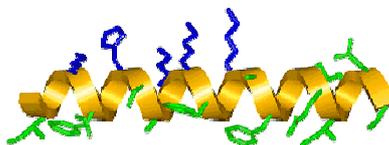


Figure 7 : Structure de la magainine I.

Ce peptide est connu pour désorganiser la membrane cellulaire en insérant des acides aminés hydrophobes au sein de la bicouche de lipides, retirer des sections de membranes et induire la formation de pores dans la membrane des bactéries [80]. Son action antibactérienne s'exprime en présence de bactéries à Gram positif et négatif mais

aussi sur d'autres microorganismes comme les champignons et les parasites [81]. Actuellement, la Magainine II est le peptide le plus étudié dans cette famille. Plusieurs études novatrices ont été menées par des équipes du Laboratoire de Réactivité de Surface sur le greffage de la Magainine I sur des surfaces d'or [82] ou d'acier inoxydable [61] ; il apparaît que ce peptide exprime aussi un très bon caractère antibactérien.

2. Les enzymes

Les enzymes dégradent des groupes spécifiques de molécules comme par exemple les sucres, les peptides, les lipides... Comme nous l'avons vu précédemment, la grande biodiversité présente dans le milieu marin restreint le choix d'enzymes à celles ayant pour cibles des molécules présentes dans toutes les souches de micro-organismes : les peptides et les lipides présents dans la membrane cellulaire. L'action antibactérienne de ces enzymes s'effectue par la dégradation de la membrane cellulaire.

Une première classe d'enzymes pouvant agir sur les peptides présents dans la membrane est le groupe des protéases. Elles brisent les liaisons peptidiques des protéines avec la participation d'une molécule d'eau (les protéases sont une sous-classe des hydrolases). Elles interviennent dans le corps humain dans le processus de digestion, de coagulation sanguine et dans la cicatrisation. La subtilisine (Figure 8) est une protéase à sérine obtenues à partir du *Bacillus subtilis* [83] : le site actif de ces enzymes est constitué d'une triade catalytique Asp-Hist-Ser [84] (acide aspartique-histidine-sérine avec la sérine 221 qui joue le rôle d'acide aminé nucléophile, labellisé en vert sur la Figure 8-droite). La coupure de la liaison peptidique se fait en deux temps : tout d'abord il y a libération de la partie N-terminale et acylation de la sérine par la partie C-terminale de la protéine puis une molécule d'eau suffit à hydrolyser la liaison acyle et il y a libération de la partie C-terminale.

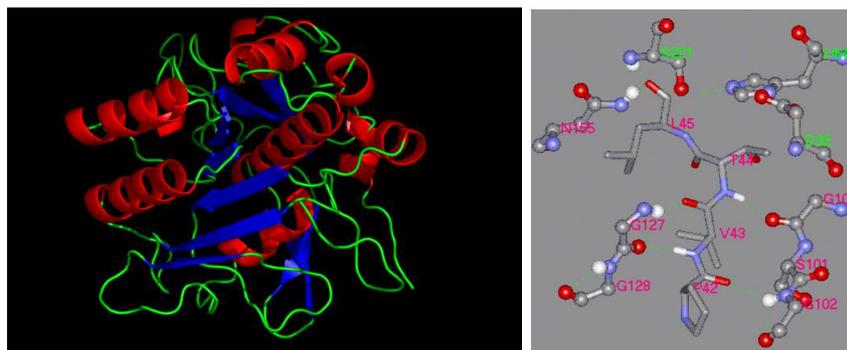


Figure 8 : Modélisation de la structure (gauche) et du site actif (droite) de la subtilisine.

Des travaux ont été menés sur l'immobilisation de la subtilisine pour créer des surfaces anti-biosalissures par un greffage covalent sur une couche de poly(anhydride maléique) [85].

La deuxième classe d'enzymes possédant une activité ciblant la membrane des bactéries est la classe des lysozymes. Ce groupe d'enzymes est classée dans les glycosides hydrolases : elles détruisent la paroi bactérienne en catalysant l'hydrolyse des peptidoglycanes la constituant. Les lysozymes agissent préférentiellement sur les bactéries à Gram positif [86-88] mais lorsqu'ils sont couplés avec d'autres petites molécules ou des protéines la dégradation des membranes des bactéries Gram négatif devient alors possible [89-91]. Les lysozymes sont présents dans l'ensemble du règne du vivant : chez l'homme, on en retrouve dans diverses sécrétions (larmes, salive, mucus...) et aussi dans le blanc d'œuf et chez certaines espèces d'insectes et d'acariens [92]. Nous nous sommes intéressés à un lysozyme en particulier : le lysozyme de blanc d'œuf de poules (Hen Egg White Lysozyme ou HEWL en anglais). Ce lysozyme est composé de 129 acides aminés et possède 4 ponts disulfures [93] lui conférant la structure 3D représentée ci-dessous (Figure 9) [94].

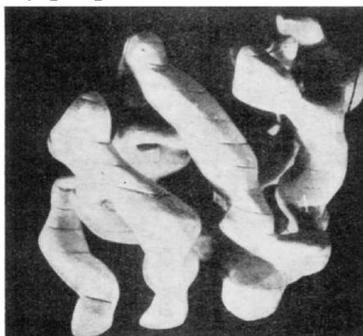


Figure 9 : Structure 3D du HEWL (extrait de [94]).

Ce lysozyme est connu pour avoir une action antibactérienne envers les *Listeria* dans le cadre de la protection des aliments et en présence d'EDTA [95]. Ce lysozyme a été immobilisé, lors de travaux précédents au Laboratoire de Réactivité de Surface, sur des surfaces d'acier inoxydables via des couches de PEI (poly(éthylène imine)) [96] ou de PEG/PEI [97] (avec 100% de l'activité enzymatique conservée).

3. La micro-structuration des surfaces

Dans de récents travaux, il a été montré que la topographie de la surface d'accroche influe sur la quantité de bactéries adhérees ainsi que sur la force d'adhésion [98]. L'adhésion des bactéries dépendrait à la fois de la rugosité moyenne (R_a) de la surface à coloniser et de la forme des bactéries : ainsi pour chaque famille de bactéries, il existe une rugosité minimale à partir de laquelle la rétention des cellules sur la surface est fortement augmentée [99]. Ces observations sont largement inspirées de ce que l'on trouve dans la nature. Par exemple, la peau des requins possède des micro-épines permettant de créer des turbulences d'eau lors de la nage empêchant ainsi l'adhésion des micro-organismes [100]. Dans des travaux de 2006, Allion *et al.* ont montrés qu'avec une micro-structuration adaptée à la taille des cellules étudiée il était possible de réduire d'un facteur 10 l'adhésion des cellules sur la surface et que les cellules adhérees étaient toutes mortes car isolées [101]. L'explication, proposée par l'équipe de Chung *et al.*, à ce phénomène est l'interruption spatiale dans la colonisation et la formation du biofilm induite par la présence de micro-structures (sans besoin d'ajouter un agent antibactérien) [102].

Nous avons choisi de travailler avec la Magainine I comme peptide modèle et le lysozyme HEWL. Plusieurs travaux menés au Laboratoire de Réactivité de Surfaces ont montré que ces deux composés pouvaient être greffés de façon covalente sur différentes surfaces tout en conservant des propriétés antibactériennes [82, 97].

II. Réactivité des surfaces de cuivre

Le cuivre dans les conditions atmosphériques peut être oxydé en surface exposant une fine couche (de l'ordre du nanomètre) de Cu_2O ; le cuivre métallique (Cu^0) et l'oxyde de cuivre Cu_2O (Cu^I) ont, pour ces deux degrés d'oxydation, une bonne affinité réactionnelle avec les molécules thiolées tout comme les surfaces d'or [103] ; nous nous sommes

d'ailleurs basés sur des travaux déjà effectués sur l'or au laboratoire lors de nos premiers essais sur le cuivre avec des espaceurs tels que le MUA (l'Acide 11-MercaptoUndecanoïque) [82], le MBA (l'Acide 4-MercaptoBenzoïque) ou le TUA (11-AminoUndecaneThiol). Quant au greffage de polymère, PEG en particulier, sur des surfaces de cuivre (Cu^0), celui-ci n'est pas ou très peu documenté. Nous avons alors essayé de transposer ce qui se faisait sur surfaces d'or aux surfaces de cuivre (greffage d'un PEG thiolé).

II.1. Polymérisation sur le cuivre

Les méthodes décrites dans cette partie concernent la fonctionnalisation de plaques, nanoparticules ou nano-bâtons d'or par des PEGs modifiés possédant des extrémités thiolées. Ce sont ces méthodes que nous transposerons au cuivre.

La première méthode, consiste donc à greffer la molécule HS-PEG₈-COOH. L'extrémité acide carboxylique permet de fixer ensuite des molécules « actives » souhaitées, anticorps par exemple, peptides ou enzymes dans notre cas.

Une autre méthode sur plaques d'or est le dépôt après nettoyage électrochimique. Cette méthode est particulièrement intéressante pour le cuivre car les montages électrochimiques permettent de contrôler l'état d'oxydation de la surface. Pour greffer le polymère, on fonctionnalise d'abord les plaques d'or par une couche de cysteamine ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$). L'accroche se fait par la formation d'une liaison amide entre l'extrémité amine de la cystéamine et une extrémité du PEG activée par NHS (N-hydroxysuccinimide) (voir Figure 10) [51].

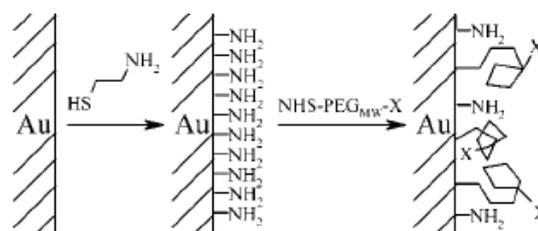


Figure 10 : Dépôt de PEG sur des plaques d'or (voie électrochimique).

Dans beaucoup d'articles, les PEGs sont greffés directement sur des nano-objets (bâtons ou particules). Par exemple, il est possible de greffer directement des PEGs-thioctamide (PEG-T) (Figure 11) sur des nanoparticules d'or avec un excellent taux de recouvrement [104].

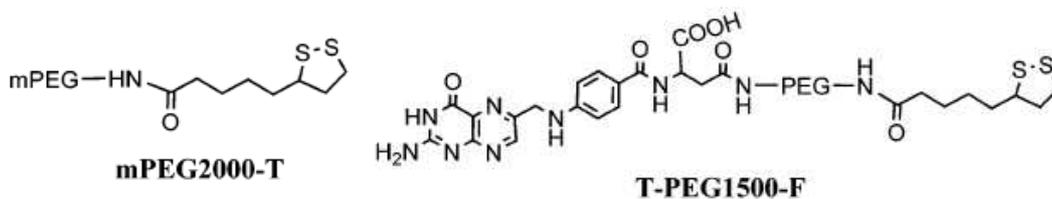


Figure 11 : PEGs modifiés greffés sur les nanoparticules.

La dernière méthode concerne le greffage d'un HS-PEG non fonctionnalisé : les nanoparticules d'or stabilisées par le CTAB sont mélangées avec une solution de HS-PEG. Le greffage se fait par échange de molécules de CTAB et de HS-PEG avec un très bon taux d'échange en faveur du polymère [105].

Nous utiliserons un greffage chimique (en solution) d'un PEG thiolé et portant une deuxième terminaison acide.

II.2. Utilisation de cache chimique sur les surfaces de cuivre

Nous l'avons vu précédemment, la micro-structuration d'une surface peut permettre de diminuer considérablement l'adhésion des bactéries et de limiter la formation d'un biofilm. Par ailleurs, nous souhaitons immobiliser des molécules à activité antibactérienne. Nous avons donc choisi, pour combiner microstructuration et immobilisation covalente, d'utiliser des molécules photolabiles (qui se dégradent sous exposition UV). Une première couche de polymère photolabile sur la surface de cuivre, est déposée, puis recouverte d'un cache physique. Après exposition sous UV, la couche de polymère est détruite et les espaceurs sont utilisés pour combler les espaces ainsi libérés. Ensuite, les peptides et enzymes sont greffés sur les molécules d'espaceurs « dilués » sur l'ensemble de la surface (Figure 12).

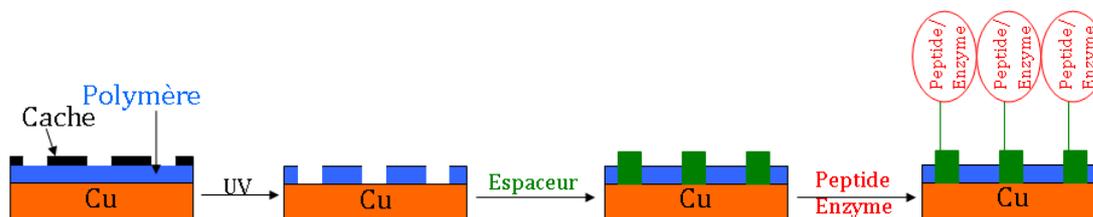


Figure 12 : Fonctionnalisation du cuivre avec des polymères photolabiles et utilisation de cache physique.

La réalisation de ces motifs peut se faire de deux façons : par photolithographie ou par lithographie à faisceau d'électrons (EBL).

Avec le procédé de photolithographie, il faut d'abord appliquer une photorésine sous forme d'un film fin sur la surface d'un substrat. Cette résine est ensuite exposée à une radiation lumineuse. Lors de cette étape l'utilisation d'un masque, formé de zones opaques et transparentes, permet de définir le motif que l'on souhaite reproduire sur la plaquette. Avec l'EBL, le dépôt d'une couche sensible aux électrons est nécessaire. Ensuite il suffit de focaliser précisément le faisceau dans la zone que l'on veut structurer et de réaliser le motif souhaité sans utilisation de masque [106].

La photolithographie est beaucoup utilisée sur des polymères modifiés par des fonctions acrylates (voir Figure 13) que l'on dépose sur des plaques de silices ou de borosilicates [107].

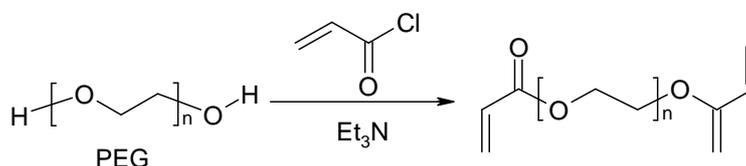


Figure 13 : Synthèse du polymère.

On prépare les plaques de silice pour la fonctionnalisation (Figure 14) :

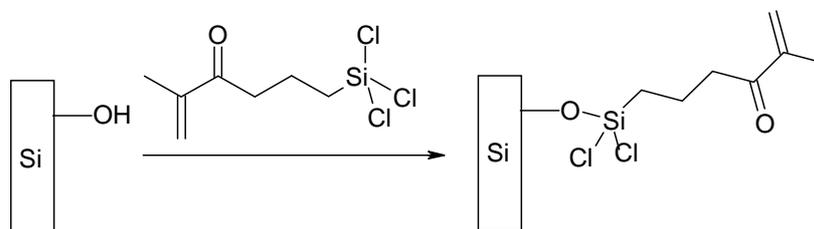


Figure 14 : Fonctionnalisation des plaques de silice par le TPM.

Pour déposer le polymère sur la surface, on se sert du PEG-diacrylate (PEG-DA) comme un macromère. La couche de PEG-DA est ensuite recouverte d'un masque et est exposée à 365 nm (UV proche) pendant 1 seconde. Le « développement » du polymère se fait dans une cuve à CO₂ supercritique (à plus de 74 bar et de 31°C). Un inconvénient de cette méthode de synthèse est que les PEGs synthétisés sont photonégatifs, c'est-à-dire que seules les parties irradiées sont conservées.

Grâce à l'EBL, on peut s'affranchir du masque et on peut réaliser facilement des motifs creusés dans la matière. Un des polymères utilisés est le PMMA (PolyMéthAcrylate de Méthyle) ($M = 150\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Figure 15) de faible indice de polydispersion [108].

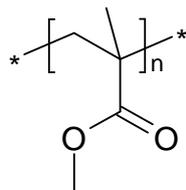


Figure 15 : Représentation générale du PMMA.

Les plaques de silices sont nettoyées puis on dépose ensuite la solution de PMMA par spin-coating. Finalement, on passe les plaques à l'EBL en « dessinant » le motif souhaité : lignes, trous, etc..., et on développe les parties exposées. Dans ce cas on se retrouve alors après lavage avec des trous (ou des lignes selon le dessin effectué) dans la matière.

Voici des exemples de polymère ayant une résistance positive à l'EBL [106] :

- le PMMA que l'on peut développer dans un mélange 1:3 de MBIK (méthyl isobutylcétone) / IPA (isopropanol) et rincer dans l'isopropanol.
- l'EBR-9 (Figure 16 gauche) qui réagit 10 fois plus vite que le PMMA et que l'on peut développer dans un mélange 3:1 de MBIK/IPA et rincer à l'IPA.
- le PBS (poly-(butène-1-sulfone)) (Figure 16 droite) que l'on peut développer dans un mélange 3:2 de MIAK (5-méthyl-2-hexanone) / propan-2-ol.
- Le ZEP-520 qui est un copolymère de chlorométhacrylate et méthylstyrène que l'on peut développer dans un mélange 20:1 de xylène/p-dioxane

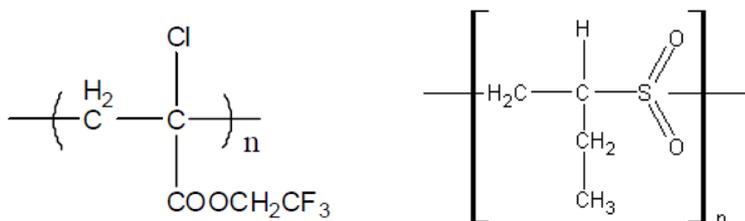


Figure 16 : EBR-9 (gauche) et PBS (droite).

Nous utiliserons des copolymères à base de PMMA que nous irradierons par un rayonnement dans le proche UV (365 nm).

III. Réactivité des surfaces de titane

Une surface d'oxyde est plus difficile à fonctionnaliser qu'une surface d'or ou de cuivre. Plusieurs types de molécules ont été utilisées, les molécules silanisées, ou les molécules possédant des extrémités phosphonates conduisant à des couches plus robustes [109].

Le dépôt de polymère sur le titane permet de combiner à la fois le pouvoir anti-adhésif de certains polymères (comme le PEG) [110] et le pouvoir anti-bactérien des enzymes/peptides que l'on veut greffer.

III.1. Silanisation

Avant toute silanisation, la surface de titane subit un prétraitement afin d'exposer un maximum de fonctions TiOH à la surface [111, 112].

Il existe plusieurs méthodes de silanisation, basées sur l'utilisation de solutions de silanes dans le toluène, pour les surfaces de titane [111, 112], ou de solutions de silane dans de l'acétone [113] ou de l'acide acétique [114] déjà appliquées à la fonctionnalisation de borosilicates ou de silice. Le greffage du silane est en général homogène et donne lieu à la formation de multicouches résistantes aux différentes étapes ultérieures. Ces couches de silane permettent de greffer de manière covalente des molécules d'intérêt biologique. Dans une publication plus récente [115], il a été démontré qu'un protocole plus efficace existait en utilisant une solution acide de méthanol à 2% en volume d'APTES.

D'autres molécules silanisées que l'APTES peuvent être greffées sur les surfaces telles le titane : le MPS (triméthoxysilylpropylméthacrylate) analogue de l'APTES mais possédant une fonction méthacrylate terminale, l'APIS (3-acryloxypropyltrichlorosilane) possédant une fonction terminale méthacrylate et trois atomes de chlore à la place des fonctions « éthoxy » [116] ou encore le VTPS (vinyltriisopropoxysilane) possédant 3 fonctions « propoxy » et une fonction terminale vinylique [117]. Nous avons choisi de nous concentrer sur l'APTES, comme molécule silanisée, car cette molécule avait déjà été utilisée dans des travaux précédents au Laboratoire de Réactivité de Surface [118].

III.2. Phosphonation

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les phosphonates peuvent posséder des fonctions terminales identiques aux silanes mais ils ont l'avantage de mieux recouvrir la surface et d'être plus robustes (par exemple face à l'hydroxylation) [109].

D'autres équipes ont reporté des travaux utilisant des phosphonates de formule générale $R-PO(OH)_2$, avec R, une chaîne alkyle possédant une fonction terminale permettant l'accrochage d'une molécule antibiofilm [109], ou des ions possédant des activités bactéricides [119]. Les phosphonates se lient de façon covalente avec la surface recouverte de TiOH grâce aux deux fonctions hydroxyles.

Pour fixer des molécules cibles, les phosphonates utilisés possèdent une fonction terminale acide (Figure 17). Les plaques de titane sont immergées dans une solution de phosphonate acide dissout dans du tétrahydrofurane et sont traitées par la méthode « T-BAG ». Cette méthode consiste à laisser le solvant s'évaporer jusqu'à ce que le niveau de liquide soit inférieur au niveau de la surface à traiter [120].

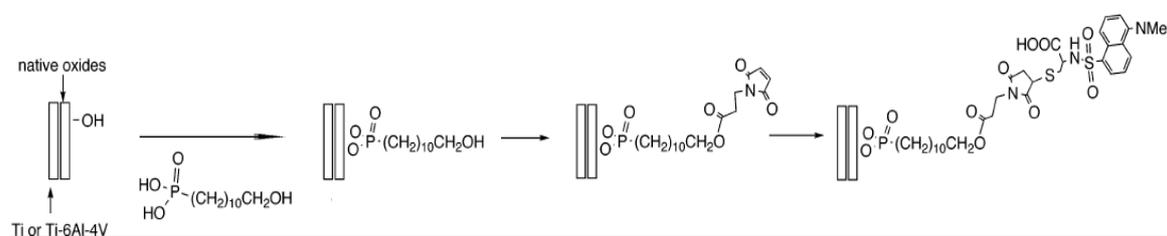


Figure 17 : Fonctionnalisation du titane par un phosphonate acide.

Pour fixer des cations (par exemple les ions Ag^+), on utilise un phosphonate thioacide (possédant à l'extrémité de la chaîne alkyle une fonction thiol) (Figure 18). Cette méthode permet de diviser par 6 le nombre de cellules adhérentes et de ralentir la formation du biofilm de quelques jours [119].

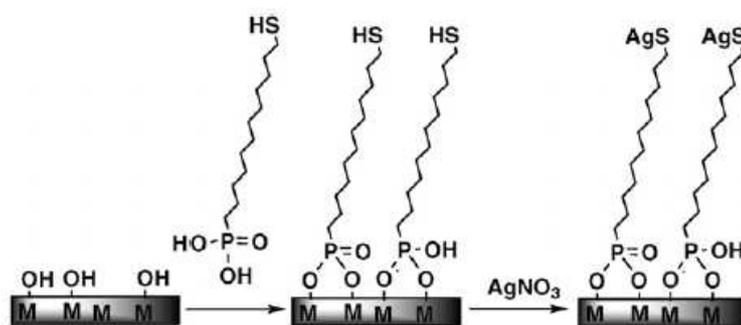


Figure 18 : Fonctionnalisation du titane par un phosphonate thioacide.

III.3. Polymérisation sur le titane

Comme expliqué précédemment, l'avantage de greffer des PEGs sur les surfaces de titane est de combiner les effets bactéricide et anti-adhésif des différentes couches.

Plusieurs voies de fixation des PEGs sur une surface de titane sont envisageables :

- on fonctionnalise le PEG avec des molécules (Y) pouvant réagir avec les TiOH de surface puis on dépose le PEG fonctionnalisé sur la surface (
- Figure 19) [121-123].

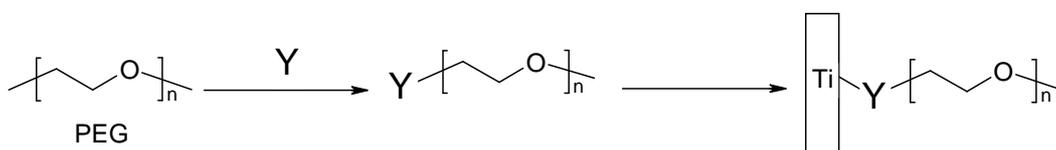


Figure 19 : Fonctionnalisation des surfaces de titane par des PEGs modifiés.

- on modifie la surface de titane avec un amorceur radicalaire et la polymérisation se fait directement sur la surface (Figure 20) [52].

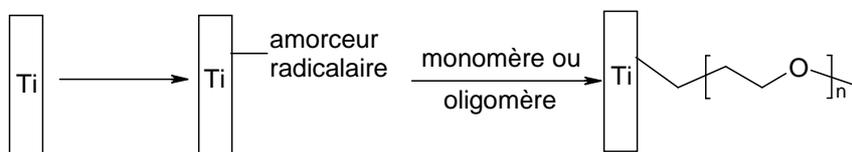


Figure 20 : Fonctionnalisation des surfaces de titane par un amorceur puis polymérisation radicalaire sur la surface.

Dans la majorité des articles, les polymères utilisés sont des polymères diblocs (association de deux polymères ou plus de la forme A-B-A ou de la forme A-g-B, A chaîne principale et B chaîne greffée en brosse) ou possédant une extrémité réactive greffée en brosse [37, 122, 123]. Toutes ces voies de greffage mènent à la fois à un bon recouvrement de la surface par les unités PEGs et permettent d'exploiter l'extrémité n'ayant pas réagi avec la surface pour greffer des molécules d'intérêt biologique comme la Magainine par exemple [121].

La fonctionnalisation de PEG avec des polyélectrolytes, notamment la PLL (Poly-L-Lysine), est une autre technique classique. La PLL possède des extrémités chargées positivement ($-\text{NH}_3^+$) et la surface de titane, recouverte de TiOH, est chargée négativement à un pH de 7,4 environ [37] ; les extrémités positives de la PLL créent des liens électrostatiques forts avec la surface de titane et la partie PEG du dibloc reste accessible (Figure 21).

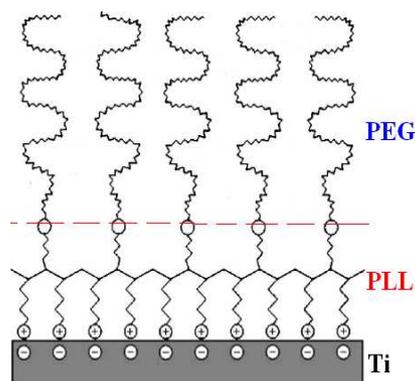


Figure 21 : Greffage du PEG via la PLL sur les surfaces de titane.

Avant de greffer le dibloc PLL-PEG sur le titane, on a dû le synthétiser. Les substrats utilisés sont des plaques de verre recouvertes d'une couche d'environ 100 nm de titane métallique. Avant de déposer le polymère, on nettoie les surfaces de titane et on recouvre la surface avec une fine couche de TiO_2 (par « sputter coating » [124]) pour faciliter l'accroche [122].

Pour accrocher un PEG, on peut aussi fonctionnaliser une des extrémités avec une molécule qui possède une bonne affinité réactionnelle vis-à-vis de la surface étudiée : par exemple avec un dérivé de la dopamine. Les dérivés de la dopamine réagissent grâce à leur fonctions hydroxyles avec les $-\text{OH}$ présents à la surface de titane (Figure 22) [123].

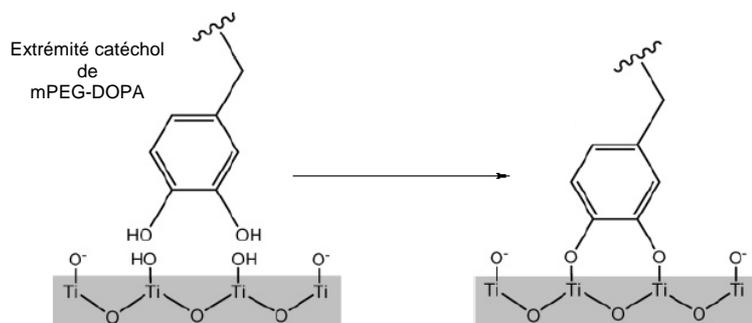


Figure 22 : Accroche des dérivés de la dopamine sur les surfaces de titane.

La première étape dans cette stratégie est la synthèse du synthon « DOPA » (3,4-dihydroxyphénylalanine) ; elle est suivie du greffage de ce synthon à une des extrémités du PEG (Figure 23).

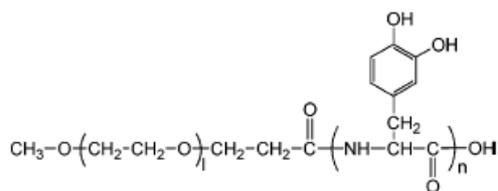


Figure 23 : PEG fonctionnalisé avec le synthon DOPA.

Le dépôt du PEG-DOPA se fait sur des plaques de silice recouvertes de TiO_2 nettoyées avec du propan-2-ol, de l'eau ultrapure et un plasma d' O_2 [123].

Afin d'éviter de multiplier les étapes et de perdre du polymère durant ces étapes, il est aussi possible de faire polymériser le PEG directement sur la surface [52]. Pour cela, il suffit de fixer sur la surface un dérivé de catéchol (Figure 24) possédant à son extrémité un initiateur de polymérisation radicalaire (Polymérisation Radicalaire par Transfert d'Atome). Le mode d'accroche du PEG sur la surface de titane est donc le même que dans le protocole décrit juste au-dessus.

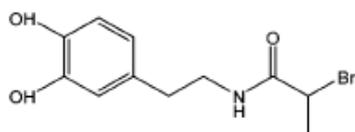


Figure 24 : Catéchol fonctionnalisé avec un initiateur d'ATRP.

Références Bibliographiques

1. R.M. Donlan, *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*. Emerging Infectious Diseases, 2002. **8** p. 881-890.
2. S.K. Hood and E.A. Zottola, *Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems*. International Journal of Food Microbiology, 1997. **37** p. 145-153.
3. P. Stoodley, D. DeBeer, and Z. Lewandowski, *Liquid Flow in Biofilm Systems*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60** p. 2711-2716.
4. B. Joseph, S.K. Otta, I. Karunasagar, and I. Karunasagar, *Biofilm formation by Salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers*. International Journal of Food Microbiology, 2001. **64** p. 367-372.
5. P. Sommer, C. Martin-Rouas, and E. Mettler, *Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination*. Food Microbiology, 1999. **16** p. 503-515.
6. V. Leriche and B. Carpentier, *Limitation of adhesion and growth of Listeria monocytogenes on stainless steel surfaces by Staphylococcus sciuri biofilms*. Journal of Applied Microbiology, 2000. **88** p. 594-605.
7. H.-C. Flemming and J. Wingender, *Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs). Part I. Structural and ecological aspects*. Water Science & Technology, 2001. **43** p. 1-8.
8. L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, and P. Stoodley, *Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases*. Nature Reviews Microbiology, 2004. **2** p. 95-108.
9. D. Haras, *Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention*. Matériaux & Techniques, 2005. **93** p. s.27-s.41.
10. G.A. O'Toole and R. Kolter, *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. Molecular Microbiology, 1998. **30** p. 295-304.
11. J.W. Costerton, *Introduction to biofilm*. International Journal of Antimicrobial Agents, 1999. **11** p. 217-221.
12. D.G. Davies, M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, and E.P. Greenberg, *The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm*. Science, 1998. **280** p. 295-298.
13. M.S. Chae and H. Schraft, *Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different Listeria monocytogenes strains*. International Journal of Food Microbiology, 2000. **62** p. 103-111.
14. C.J. Holmes and R.C. Evans, *Resistance of bacterial biofilms to antibiotics*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1989. **24** p. 84.
15. L.K. Sawyer and S.W. Hermanowicz, *Detachment of biofilm bacteria due to variations in nutrient supply*. Water Science and Technology 1998. **37** p. 211-214.
16. P. Gacesa, *Bacterial alginate biosynthesis - recent progress and future prospects*. Microbiology-UK, 1998. **144** p. 1133-1143.
17. M.V. Angel, *Biodiversity of the Pelagic Ocean*. Conservation Biology, 1993. **7** p. 760-772.
18. G. Han and J. Cooney, *Effects of butyltins and inorganic tin on chemotaxis of aquatic bacteria*. Journal of Industrial Microbiology, 1995. **14** p. 293-299.
19. K.Y. Chan and A.C.R. Dean, *Effects of Cadmium and Lead on Growth, Respiration and Enzyme-Activity of the Marine Bacterium Pseudomonas-Marina*. Chemosphere, 1988. **17** p. 597-607.

20. D.R. Schreiber, A.S. Gordon, and F.J. Millero, *The Toxicity of Copper to the Marine Bacterium Vibrio-Alginolyticus*. Canadian Journal of Microbiology, 1985. **31** p. 83-87.
21. K.A. Brogden, *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nature Reviews Microbiology, 2005. **3** p. 238-250.
22. K. Glinel, P. Thebault, V. Humblot, C.-M. Pradier, and T. Jouenne, *Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches*. Acta Biomaterialia, 2012. **8** p. 1670-1684.
23. W.W. Navarre and O. Schneewind, *Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999. **63** p. 174-229.
24. J.M. DiRienzo, K. Nakamura, and M. Inouye, *The Outer Membrane Proteins of Gram-Negative Bacteria: Biosynthesis, Assembly, and Functions*. Annual Review of Biochemistry, 1978. **47** p. 481-532.
25. D.M. Yebra, S. Kiil, and K. Dam-Johansen, *Antifouling technology: past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings*. Progress in Organic Coatings, 2004. **50** p. 75-104.
26. L.D. Chambers, K.R. Stokes, F.C. Walsh, and R.J.K. Wood, *Modern approaches to marine antifouling coatings*. Surface and Coatings Technology, 2006. **201** p. 3642-3652.
27. C. Alzieu, *Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment*. Ocean & Coastal Management, 1998. **40** p. 23-36.
28. I. Omae, *General Aspects of Tin-Free Antifouling Paints*. Chemical Reviews, 2003. **103** p. 3431-3448.
29. I.K. Konstantinou and T.A. Albanis, *Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review*. Environment International, 2004. **30** p. 235-248.
30. S.R. Coulson, I. Woodward, J.P.S. Badyal, S.A. Brewer, and C. Willis, *Super-Repellent Composite Fluoropolymer Surfaces*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104** p. 8836-8840.
31. C.S. Gudipati, J.A. Finlay, J.A. Callow, M.E. Callow, and K.L. Wooley, *The Antifouling and Fouling-Release Performance of Hyperbranched Fluoropolymer (HBFP)-Poly(ethylene glycol) (PEG) Composite Coatings Evaluated by Adsorption of Biomacromolecules and the Green Fouling Alga Ulva*. Langmuir, 2005. **21** p. 3044-3053.
32. A. Hozumi and O. Takai, *Preparation of silicon oxide films having a water-repellent layer by multiple-step microwave plasma-enhanced chemical vapor deposition*. Thin Solid Films, 1998. **334** p. 54-59.
33. L. Cao, T.P. Price, M. Weiss, and D. Gao, *Super Water- and Oil-Repellent Surfaces on Intrinsically Hydrophilic and Oleophilic Porous Silicon Films*. Langmuir, 2008. **24** p. 1640-1643.
34. V.A. Semenov, S.P. Hersh, and B.S. Gupta, *Maximum Fiber-Packing Density in Electrostatic Flocking*. Textile Research Journal, 1981. **51** p. 768-773.
35. J.-L. Lin, C. Huang, C.-J.M. Chin, and J.R. Pan, *Coagulation dynamics of fractal flocs induced by enmeshment and electrostatic patch mechanisms*. Water Research, 2008. **42** p. 4457-4466.
36. S. Sharma, R.W. Johnson, and T.A. Desai, *XPS and AFM analysis of antifouling PEG interfaces for microfabricated silicon biosensors*. Biosensors & Bioelectronics, 2004. **20** p. 227-239.

37. K.M. Hansson, S. Tosatti, J. Isaksson, J. Wetterö, M. Textor, T.L. Lindahl, and P. Tengvall, *Whole blood coagulation on protein adsorption-resistant PEG and peptide functionalised PEG-coated titanium surfaces*. *Biomaterials*, 2005. **26** p. 861-872.
38. K.D. Park, Y.-S. Kim, D.K. Han, Y.-H. Kim, E.H.B. Lee, H. Suh, and K.S. Choi, *Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces*. *Biomaterials*, 1998. **19** p. 851-859.
39. P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G.M. Whitesides, and P.E. Laibinis, *Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption*. *Journal of Physical Chemistry B*, 1998. **102** p. 426-436.
40. X. Ding, C. Yang, T.P. Lim, L.Y. Hsu, A.C. Engler, J.L. Hedrick, and Y.-Y. Yang, *Antibacterial and antifouling catheter coatings using surface grafted PEG-b-cationic polycarbonate diblock copolymers*. *Biomaterials*, 2012. **33** p. 6593-6603.
41. F. Fuertges and A. Abuchowski, *The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins*. *Journal of Controlled Release*, 1990. **11** p. 139-148.
42. X. Chen, Y. Su, F. Shen, and Y. Wan, *Antifouling ultrafiltration membranes made from PAN-b-PEG copolymers: Effect of copolymer composition and PEG chain length*. *Journal of Membrane Science*, 2011. **384** p. 44-51.
43. A. Roosjen, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, and W. Norde, *Microbial Adhesion to Poly(ethylene oxide) Brushes: Influence of Polymer Chain Length and Temperature*. *Langmuir*, 2004. **20** p. 10949-10955.
44. D.K. Han and J.A. Hubbell, *Synthesis of Polymer Network Scaffolds from L-Lactide and Poly(ethylene glycol) and Their Interaction with Cells*. *Macromolecules*, 1997. **30** p. 6077-6083.
45. T. Serizawa, H. Takeshita, and M. Akashi, *Electrostatic Adsorption of Polystyrene Nanospheres onto the Surface of an Ultrathin Polymer Film Prepared by Using an Alternate Adsorption Technique*. *Langmuir*, 1998. **14** p. 4088-4094.
46. C.B. Walsh and E.I. Franses, *Thickness and quality of spin-coated polymer films by two-angle ellipsometry*. *Thin Solid Films*, 1999. **347** p. 167-177.
47. S. Pasche, S.M. De Paul, J. Vörös, N.D. Spencer, and M. Textor, *Poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol) Assembled Monolayers on Niobium Oxide Surfaces: A Quantitative Study of the Influence of Polymer Interfacial Architecture on Resistance to Protein Adsorption by ToF-SIMS and in Situ*. *Langmuir*, 2003. **19** p. 9216-9225.
48. S.R. Benhabbour, L. Liu, H. Sheardown, and A. Adronov, *Protein Resistance of Surfaces Prepared by Chemisorption of Monothiolated Poly(ethylene glycol) to Gold and Dendronization with Aliphatic Polyester Dendrons: Effect of Hydrophilic Dendrons*. *Macromolecules*, 2008. **41** p. 2567-2576.
49. B. Malisova, S. Tosatti, M. Textor, K. Gademann, and S. Zürcher, *Poly(ethylene glycol) adlayers immobilized to metal oxide substrates through catechol derivatives: influence of assembly conditions on formation and stability*. *Langmuir*, 2010. **26** p. 4018-4026.
50. H. Chen, X. Hu, Y. Zhang, D. Li, Z. Wu, and T. Zhang, *Effect of chain density and conformation on protein adsorption at PEG-grafted polyurethane surfaces*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008. **61** p. 237-243.
51. A. Anne, C. Demaille, and J. Moiroux, *Terminal Attachment of Polyethylene Glycol (PEG) Chains to a Gold Electrode Surface. Cyclic Voltammetry Applied to the Quantitative Characterization of the Flexibility of the Attached PEG Chains and of Their Penetration by Mobile PEG Chains*. *Macromolecules*, 2002. **35** p. 5578-5586.

52. X. Fan, L. Lin, and P.B. Messersmith, *Cell fouling resistance of polymer brushes grafted from Ti substrates by surface-initiated polymerization: effect of ethylene glycol side chain length*. *Biomacromolecules*, 2006. **7** p. 2443-2448.
53. J. Zhang, X. Xu, J. Chen, and E.-T. Kang, *Covalent attachment of polymer thin layers to self-assembled monolayers on gold surface by graft polymerization*. *Thin Solid Films*, 2002. **413** p. 76-84.
54. K.A. Stevens, B.W. Sheldon, N.A. Klapes, and T.R. Klaenhammer, *Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram-negative bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991. **57** p. 3613-3615.
55. P. Blackburn, J. Polak, S. Gusik, and S.D. Rubino, *Nisin compositions for use as enhanced, broad range bacteriocins*. 1989, New York: Applied Microbiology, Inc.
56. J. Delves-Broughton, *Nisin and its uses as a food preservative*. *Food Technology*, 1990. **4** p. 100-112.
57. M. Kordel, F. Schuller, and H.-G. Sahl, *Interaction of the pore forming-peptide antibiotics Pep 5, nisin and subtilin with non-energized liposomes*. *FEBS Letters*, 1989. **244** p. 99-102.
58. H.E. Van Heusden, B. De Kruijff, and E. Breukink, *Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin*. *Biochemistry*, 2002. **41** p. 12171-12178.
59. W. Liu and J.N. Hansen, *Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990. **56** p. 2551-2558.
60. S. Ogawa and T.M. Lee, *The relation between the internal phosphorylation potential and the proton motive force in mitochondria during ATP synthesis and hydrolysis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1984. **259** p. 10004-10011.
61. A. Héquet, V. Humblot, J.-M. Berjeaud, and C.-M. Pradier, *Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011. **84** p. 301-309.
62. Y.-C. Tai, J. McGuire, and J.A. Neff, *Nisin antimicrobial activity and structural characteristics at hydrophobic surfaces coated with the PEO-PPO-PEO triblock surfactant Pluronic® F108*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008. **322** p. 104-111.
63. R.J. Dubos and C. Cattaneo, *Studies on a bactericidal agent extracted from a soil Bacillus*. *Journal of Experimental Medicine*, 1939. **70** p. 249-256.
64. R. Sarges and B. Witkop, *Gramicidin A. V. The Structure of Valine- and Isoleucine-gramicidin A*. *Journal of the American Chemical Society*, 1965. **87** p. 2011-2020.
65. B.A. Wallace, *Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A*. *Journal of Structural Biology*, 1998. **121** p. 123-141.
66. K.F. Jarrell and E.A. Hamilton, *Effect of Gramicidin on Methanogenesis by Various Methanogenic Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985. **50** p. 179-182.
67. H. Khandelia, J.H. Ipsen, and O.G. Mouritsen, *The impact of peptides on lipid membranes*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2008. **1778** p. 1528-1536.
68. S. Naydenova, A.G. Petrov, and J. Yarwood, *An FTIR-ATR Study of the Incorporation of the Peptide Gramicidin D into DPPA Self-Assembled Multilayers*. *Langmuir*, 1995. **11** p. 3435-3437.
69. J.-F. Yala, P. Thebault, A. Héquet, V. Humblot, C.-M. Pradier, and J.-M. Berjeaud, *Elaboration of antibiofilm materials by chemical grafting of an antimicrobial peptide*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011. **89** p. 623-634.

70. J.F. Popplewell, M.J. Swann, N.J. Freeman, C. McDonnell, and R.C. Ford, *Quantifying the effects of melittin on liposomes*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2007. **1768** p. 13-20.
71. C.E. Dempsey, *The actions of melittin on membranes*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1990. **1031** p. 143-161.
72. E. Habermann and J. Jentsch, *Sequence analysis of melittin from tryptic and peptic degradation products*. *Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem.*, 1967. **348** p. 884-890.
73. L. Yang, T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Ding, and H.W. Huang, *Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores*. *Biophysical Journal*, 2001. **81** p. 1475-1485.
74. E.A. Shorina, N.V. Dolgova, A.M. Rubtsov, K.B. Storey, and O.D. Lopina, *Melittin induces both time-dependent aggregation and inhibition of Na,K-ATPase from duck salt glands however these two processes appear to occur independently*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2004. **1661** p. 188-195.
75. V.N. Lazarev, M.M. Shkarupeta, G.A. Titova, E.S. Kostjukova, T.A. Akopian, and V.M. Govorun, *Effect of induced expression of an antimicrobial peptide melittin on Chlamydia trachomatis and Mycoplasma hominis infections in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005. **338** p. 946-950.
76. S.A. Klotz, N.K. Gaur, J. Rauceo, D.F. Lake, Y. Park, K.S. Hahm, and P.N. Lipke, *Inhibition of adherence and killing of Candida albicans with a 23-Mer peptide (Fn/23) with dual antifungal properties*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004. **48** p. 4337-41.
77. L.L. Lubke and C.F. Garon, *The Antimicrobial Agent Melittin Exhibits Powerful In Vitro Inhibitory Effects on the Lyme Disease Spirochete*. *Clinical Infectious Diseases*, 1997. **25** p. S48-S51.
78. H. Duclouhier, G. Molle, and G. Spach, *Antimicrobial peptide magainin I from Xenopus skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers*. *Biophysical Journal*, 1989. **56** p. 1017-1021.
79. J.M. Nascimento, O.L. Franco, M.D.L. Oliveira, and C.A.S. Andrade, *Evaluation of Magainin I interactions with lipid membranes: An optical and electrochemical study*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2012. **165** p. 537-544.
80. Y. Huang, J. Huang, and Y. Chen, *Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function*. *Protein & Cell*, 2010. **1** p. 143-152.
81. M. Zasloff, *Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987. **84** p. 5449-5453.
82. V. Humblot, J.-F. Yala, P. Thebault, K. Boukerma, A. Héquet, J.-M. Berjeaud, and C.-M. Pradier, *The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers*. *Biomaterials*, 2009. **30** p. 3503-3512.
83. L. Hedstrom, *Serine Protease Mechanism and Specificity*. *Chemical Reviews*, 2002. **102** p. 4501-4524.
84. R. Bott, M. Ultsch, A. Kossiakoff, T. Graycar, B. Katz, and S. Power, *The three-dimensional structure of Bacillus amyloliquefaciens subtilisin at 1.8 Å and an analysis of the structural consequences of peroxide inactivation*. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263** p. 7895-7906.

85. M. Tasso, A.L. Cordeiro, K. Salchert, and C. Werner, *Covalent Immobilization of Subtilisin A onto Thin Films of Maleic Anhydride Copolymers*. *Macromolecular Bioscience*, 2009. **9** p. 922-929.
86. B.M. Chassy and A. Giuffrida, *Method for the lysis of Gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980. **39** p. 153-158.
87. B. Masschalck, D. Deckers, and C.W. Michiels, *Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of gram-positive bacteria by lysozyme under atmospheric and high hydrostatic pressure*. *Journal of Food Protection*, 2002. **65** p. 1916-1923.
88. C. Erridge, *Lysozyme promotes the release of Toll-like receptor-2 stimulants from gram-positive but not gram-negative intestinal bacteria*. *Gut Microbes*, 2010. **1** p. 383-387.
89. R.T. Ellison and T.J. Giehl, *Killing of Gram-negative Bacteria by Lactoferrin and Lysozyme*. *Journal of Clinical Investigation*, 1991. **88** p. 1080-1091.
90. S. Nakamura, A. Kato, and K. Kobayashi, *Novel Bifunctional Lysozyme-Dextran Conjugate That Acts on Both Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990. **54** p. 3057-3059.
91. H.R. Ibrahim, H. Hatta, M. Fujiki, M. Kim, and T. Yamamoto, *Enhanced Antimicrobial Action of Lysozyme against Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria Due to Modification with Perillaldehyde*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994. **42** p. 1813-1817.
92. L. Grunclová, H. Fouquier, V. Hypša, and P. Kopáček, *Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003. **27** p. 651-660.
93. C.A. Nelson, R.W. Roof, D.W. McCourt, and E.R. Unanue, *Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992. **89** p. 7380-7383.
94. C.C.F. Blake, D.F. Koenig, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, and V.R. Sarma, *Structure of hen egg white lysozyme*. *Nature*, 1965. **4986** p. 757-761.
95. V.L. Hughey, P.A. Wilger, and E.A. Johnson, *Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *Listeria monocytogenes* Scott A in foods*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989. **55** p. 631-638.
96. A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, L. Barbes, J. Li, M. Salmain, and C.-M. Pradier, *Bioengineering of stainless steel surface by covalent immobilization of enzymes. Physical characterization and interfacial enzymatic activity*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010. **349** p. 13-18.
97. A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, M. Salmain, and C.-M. Pradier, *Grafting of lysozyme and/or poly(ethylene glycol) to prevent biofilm growth on stainless steel surfaces*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2009. **113** p. 2101-2109.
98. L. Ploux, A. Ponche, and K. Anselme, *Bacteria/Material Interfaces: Role of the Material and Cell Wall Properties*. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 2010. **24** p. 2165-2201.
99. K.A. Whitehead, J. Colligon, and J. Verran, *Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005. **41** p. 129-138.
100. Y.L. Peng, C.G. Lin, and L. Wang, *The Preliminary Study on Antifouling Mechanism of Shark Skin*, in *Multi-Functional Materials and Structures II, Parts 1 and 2*, Y.W. Yin, X, Editor. 2009, Trans Tech Publications Ltd: Stafa-Zurich. p. 977-980.

101. A. Allion, J.P. Baron, and L. Boulange-Petermann, *Impact of surface energy and roughness on cell distribution and viability*. Biofouling, 2006. **22** p. 269-278.
102. K.K. Chung, J.F. Schumacher, E.M. Sampson, R.A. Burne, P.J. Antonelli, and A.B. Brennan, *Impact of engineered surface microtopography on biofilm formation of Staphylococcus aureus*. Biointerphases, 2007. **2** p. 89-94.
103. Y. Lee, D.-H. Lee, A.A. Narducci, and K.D. Karlin, *Thiol-copper (I) and disulfide-dicopper (I) complex O₂-reactivity leading to sulfonate-copper (I) complex or the formation of a cross-linked thioether-phenol product with phenol addition*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2007. **101** p. 1845-1858.
104. V. Dixit, J. van den Bossche, D.M. Sherman, D.H. Thompson, and R.P. Andres, *Synthesis and grafting of thioctic acid-PEG-folate conjugates onto Au nanoparticles for selective targeting of folate receptor-positive tumor cells*. Bioconjugate Chemistry, 2006. **17** p. 603-609.
105. T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, and Y. Niidome, *PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications*. Journal of Controlled Release 2006. **114** p. 343-347.
106. M.A. McCord and M.J. Rooks, *SPIE Handbook of Microlithography, Micromachining and Microfabrication*. Vol. 1: Microlithography 1997, Bellingham, Washington.
107. A. Revzin, R.J. Russell, V.K. Yadavalli, W.G. Koh, C. Deister, D.D. Hile, M.B. Mellott, and M.V. Pishko, *Fabrication of poly(ethylene glycol) hydrogel microstructures using photolithography*. Langmuir 2001. **17** p. 5440-5447.
108. A. Pallandre, K. Glinel, A.M. Jonas, and B. Nysten, *Binary Nanopatterned Surfaces Prepared from Silane Monolayers*. Nano Letters, 2004. **4** p. 365-371.
109. B.M. Silverman, K.A. Wieghaus, and J. Schwartz, *Comparative properties of siloxane vs phosphonate monolayers on a key titanium alloy*. Langmuir, 2005. **21** p. 225-228.
110. P. Kingshott and H.J. Griesser, *Surfaces that resist bioadhesion*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 1999. **4** p. 403-412.
111. S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer, M. Wieland, B. Keller, and H. Sigrist, *Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1997. **8** p. 867-872.
112. P. Dubruel, E. Vanderleyden, M. Bergada, I. Depaepe, H. Chen, S. Kuypers, J. Luyten, J. Schrooten, L. Vanhoorebeke, and E. Schacht, *Comparative study of silanisation reactions for the biofunctionalisation of Ti-surfaces*. Surface Science, 2006. **600** p. 2562-2571.
113. K.C. Olbrich, T.T. Andersen, F.A. Blumenstock, and R. Bizios, *Surfaces modified with covalently-immobilized adhesive peptides affect fibroblast population motility*. Biomaterials, 1996. **17** p. 759-764.
114. L.A. Chrisey, G.U. Lee, and C.E. O'Ferrall, *Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films*. Nucleic Acids Research, 1996. **24** p. 3031-3039.
115. P.T. Charles, G.J. Vora, J.D. Andreadis, A.J. Fortney, C.E. Meador, C.S. Dulcey, and D.A. Stenger, *Fabrication and Surface Characterization of DNA Microarrays Using Amine- and Thiol-Terminated Oligonucleotide Probes*. Langmuir, 2003. **19** p. 1586-1591.
116. N. Smith, G. Antoun, A. Ellis, and W. Crone, *Improved adhesion between nickel-titanium shape memory alloy and a polymer matrix via silane coupling agents*. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 2004. **35** p. 1307-1312.

117. J.P. Matinlinna, M. Ozcan, L.V.J. Lassila, and P.K. Vallittu, *The effect of a 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane and vinyltriisopropoxysilane blend and tris(3-trimethoxysilylpropyl)isocyanurate on the shear bond strength of composite resin to titanium metal*. Dental Materials 2004. **20** p. 804-813.
118. E. Briand, V. Humblot, J. Landoulsi, S. Petronis, C.-M. Pradier, B. Kasemo, and S. Svedhem, *Chemical Modifications of Au/SiO₂ Template Substrates for Patterned Biofunctional Surfaces*. Langmuir, 2010. **27** p. 678-685.
119. J. Amalric, P.H. Mutin, G. Guerrero, A. Ponche, A. Sotto, and J.-P. Lavigne, *Phosphonate monolayers functionalized by silver thiolate species as antibacterial nanocoatings on titanium and stainless steel*. Journal of Materials Chemistry, 2009. **19** p. 141-149.
120. E.L. Hanson, J. Schwartz, B. Nickel, N. Koch, and M.F. Danisman, *Bonding self-assembled, compact organophosphonate monolayers to the native oxide surface of silicon*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125** p. 16074-16080.
121. K. Glinel, A.M. Jonas, T. Jouenne, J. Leprince, L. Galas, and W.T.S. Huck, *Antibacterial and antifouling polymer brushes incorporating antimicrobial peptide*. Bioconjugate Chemistry, 2009. **20** p. 71-77.
122. N.-P. Huang, R. Michel, J. Vörös, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D.L. Elbert, J.A. Hubbell, and N.D. Spencer, *Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption*. Langmuir, 2001. **17** p. 489-498.
123. J.L. Dalsin, L. Lin, S. Tosatti, J. Vörös, M. Textor, and P.B. Messersmith, *Protein resistance of titanium oxide surfaces modified by biologically inspired mPEG-DOPA*. Langmuir, 2005. **21** p. 640-646.
124. R. Kurrat, M. Textor, J.J. Ramsden, P. Böni, and N.D. Spencer, *Instrumental improvements in optical waveguide light mode spectroscopy for the study of biomolecule adsorption*. Review of Scientific Instruments, 1997. **68** p. 2172-2176.

Chapitre II : Protocoles et techniques expérimentales

Protocoles de fonctionnalisation des surfaces de cuivre

Les surfaces de cuivre étudiées sont celles de coupons de cuivre massif de pureté 99,9% demi-dur fournis par Goodfellow. Le fournisseur indique la présence de quelques éléments à l'état de traces (en ppm) : Ag 500, Bi<10, Pb<50, O400 et autres métaux à moins de 300 ppm. Les dimensions des coupons sont : 10 mm x 10 mm x 1,6 mm.

Avant toute fonctionnalisation, les surfaces sont traitées pour assurer une contamination organique minimale. Pour cela, un nettoyage mécanique (polissage) ainsi qu'un nettoyage chimique (rinçage) sont effectués selon différents protocoles.

I. Polissage et rinçage des surfaces

Lors de la première utilisation, les surfaces sont placées dans une cuve à ultrasons pendant 15 minutes dans un bain d'acétone afin de dissoudre la colle de protection. Elles sont ensuite polies sur disque de feutre avec une pâte de diamant de granulométrie $\frac{1}{4}$ μm pendant 10 minutes. Après une première utilisation, les surfaces sont polies pendant 1 minute sur du papier de verre de grain 1,2 μm (afin d'éliminer les résidus organiques) puis 2 minutes sur disque de feutre avec une pâte diamantée de granulométrie 1 μm et enfin 10 minutes avec une pâte diamantée de granulométrie $\frac{1}{4}$ μm .

Afin de minimiser la présence de résidus organiques sur les surfaces de cuivre, plusieurs traitements ont été testés avant et après polissage.

Avant polissage, les surfaces de cuivre ont été placées dans le bain à ultrasons pendant 1 heure dans une solution d'acétone sous atmosphère ambiante et sous atmosphère d'azote. L'atmosphère d'azote permet de limiter l'oxydation et la dissolution de la surface de cuivre dans le bain d'acétone (relargage d'ions Cu^{2+}). L'acétone laissant une forte empreinte sur les spectres infrarouge, nous avons diminué le temps de sonication à 15 minutes sous atmosphère ambiante et azote. Deux autres méthodes de préparation ont également été testées : une plus agressive, en immergeant les coupons durant 1 minute dans une solution de piranha (H_2SO_4 : H_2O_2 , 3 : 1) et une, plus douce, en nettoyant les coupons avec un papier Joseph imbibé d'acétone.

Après polissage, certaines surfaces ont été placées dans une cuve à ultrasons pendant 15 minutes dans de l'eau milli-Q puis dans l'éthanol absolu sous atmosphère ambiante ou sous atmosphère d'azote. Certaines surfaces ont été traitées sous UV-Ozone pendant 20 minutes ou encore soniquées dans de l'eau milli-Q pendant 10 minutes sous atmosphère ambiante.

Les différentes méthodes de traitement des surfaces de cuivre avant et après polissage sont résumées dans le Tableau 1.

N° Expérience	Atmosphère avant polissage	Méthode	Atmosphère après polissage
Cu1	Ambiante	15 min acétone	Ambiante
Cu2	Ambiante	15 min acétone	Azotée
Cu3	Azotée	15 min acétone	Ambiante
Cu4	Azotée	15 min acétone	Azotée
Cu5	Ambiante	Papier Joseph	Ambiante
Cu6	Ambiante	Papier Joseph	Azotée
Cu7	Ambiante	10 min H ₂ O	Ambiante

Tableau 1 : Optimisation du traitement des surfaces de cuivre nu.

Le protocole retenu dans la suite du manuscrit est le protocole Cu7 : sonication des échantillons pendant 10 minutes dans de l'eau milli-Q. Avec ce protocole, les surfaces sont très peu polluées par les résidus organiques.

II. Solutions et conditions d'immersion

L'ensemble des produits chimiques utilisés provient de chez Sigma Aldrich, excepté le thio-carboxy polyéthylène glycol HS-PEG-COOH provenant d'IRIS Biotech GmbH.

II.1. Protocoles pour le greffage de peptides ou enzymes antibactériens sur une couche d'espaceur

Ces protocoles ont pour principe le greffage successif d'une molécule « espaceur » à la surface de l'échantillon de cuivre, puis du peptide ou de l'enzyme antibactérien. Le cuivre ayant une très bonne affinité vis-à-vis de l'élément soufre (tout comme l'or) [1], deux espaceurs possédant une extrémité thiol, et une autre portant une fonction -COOH, ont été testés.

II.1.a. Adsorption de l'acide 11-mercaptoundecanoïque (MUA)

La première molécule testée est l'acide 11-mercaptoundecanoïque (MUA), connu pour former des couches auto-assemblées, ou SAMs, sur les surfaces d'or [2]. Le protocole couramment utilisé sur les surfaces d'or est donc transposé aux surfaces de cuivre.

Des essais ont également été effectués avec des solutions de MUA diluées à 50% ou 75% avec du 6-mercapto1-hexanol (MHOH). On attend de cette dilution d'espacer les fonctions acides carboxyliques accessibles aux peptides ou aux enzymes antibactériens et de limiter l'encombrement stérique entre les molécules afin de conserver leur pouvoir antibactérien

intact. Dans le cas de la fonctionnalisation par une SAM de MUA pure, une solution de MUA à 10 mmolL^{-1} dans EtOH absolu est homogénéisée pendant 30 minutes dans un bain à sonication avant utilisation.

Dans le cas des fonctionnalisations par des SAMS diluées, deux solutions à 25% de MUA ($2,5 \text{ mmolL}^{-1}$) + 75% de MHOH ($7,5 \text{ mmolL}^{-1}$) et à 50% de MUA ($5,0 \text{ mmolL}^{-1}$) + 50% de MHOH ($5,0 \text{ mmolL}^{-1}$) dans EtOH absolu sont préparées et homogénéisées pendant 30 minutes dans un bain à sonication. Les coupons de cuivre sont ensuite immergés dans la solution de thiols pendant 3 heures sous agitation. Les surfaces sont alors rincées sous agitation douce durant 2×5 minutes dans EtOH absolu et 10 minutes dans H_2O milli-Q, puis séchées à l'air sec. Les couches idéales de MUA pures et de MUA diluées attendues sont représentées sur la Figure 1 ci-dessous.

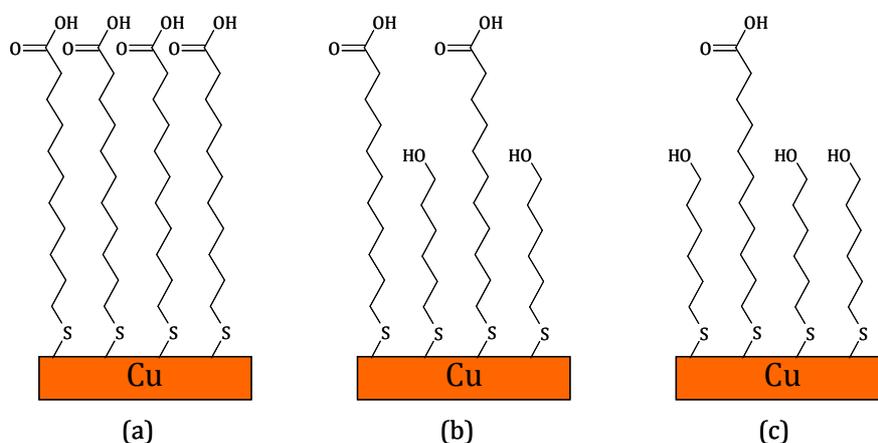


Figure 1 : Schémas des surfaces de cuivre attendues après immersion dans les solutions de MUA pures (a) et diluées à (b) 50% et (c) 75%.

II.1.b. Adsorption du thio-carboxy poly(éthylène glycol) (HS-PEG-COOH)

Dans un premier temps, nous avons essayé d'utiliser un protocole de greffage de PEG préalablement testé au laboratoire sur des surfaces d'acier inox [3]. Les échantillons sont placés une nuit dans une solution à 1 mM de thio-carboxy poly(éthylène glycol) (HS-PEG-COOH, avec une chaîne comprenant 8 motifs éthylène glycol) dans PBS (Phosphate Buffer Solution). Une coloration bleue de la solution ayant indiqué une dissolution partielle de la surface de cuivre, le protocole de greffage du HS-PEG-COOH a dû être optimisé, afin d'obtenir une couche homogène, stable et minimisant cette dissolution. Les optimisations ont été réalisées en faisant varier la concentration en HS-PEG-COOH : 1 et 2 mmolL^{-1} et la nature du solvant utilisé : tampon pH 9, PBS, EtOH absolu et H_2O milli-Q. Les différentes conditions d'adsorption du HS-PEG-COOH sont exposées dans le Tableau 2

N° expérience	Concentration en PEG	Nature du solvant	Atmosphère
PEG1	1 mmol.L ⁻¹	PBS	Ambiante
PEG2	1 mmol.L ⁻¹	Tampon pH 9	Azote
PEG3	2 mmol.L ⁻¹	PBS	Ambiante
PEG4	2 mmol.L ⁻¹	EtOH	Ambiante
PEG5	2 mmol.L ⁻¹	H ₂ O milli-Q	Ambiante
PEG6	2 mmol.L ⁻¹	Tampon pH 9	Ambiante

Tableau 2 : Optimisation de l'adsorption de HS-PEG-COOH sur les surfaces de cuivre.

Dans chacun des protocoles, les échantillons sont ensuite rincés 2 x 5 minutes avec le solvant utilisé lors du greffage du PEG et séchés avec de l'air sec. **Le protocole de greffage du HS-PEG-COOH retenu est l'immersion des échantillons dans une solution à 2 mmol.L⁻¹ de HS-PEG-COOH dans de l'H₂O milli-Q sous atmosphère ambiante.** Les raisons du choix de ce protocole seront détaillées dans le Chapitre III. La Figure 2 présente la structure de la couche idéale de HS-PEG-COOH greffée sur les surfaces de cuivre nu.

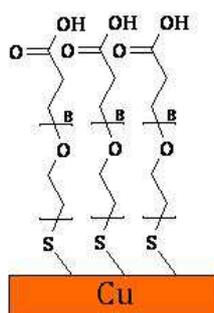


Figure 2 : Structure idéale de HS-PEG-COOH sur les surfaces de cuivre propres, n= 8.

II.1.c. Activation des fonctions COOH

Le greffage covalent des peptides ou enzymes antibactériens suppose la formation d'une liaison amide entre l'espaceur et la molécule. L'activation des fonctions acides carboxyliques est réalisée par immersion des surfaces fonctionnalisées par les thiols dans une solution d'EDC (*N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N*'-EthylCarbodiimide) et NHS (*N*-HydroxySuccinimide) [2] dans l'eau milli-Q ($C^{\circ}_{\text{EDC}} = 35 \text{ mmol.L}^{-1}$ et $C^{\circ}_{\text{NHS}} = 55 \text{ mmol.L}^{-1}$) pendant 90 minutes ($R_{\text{act}} = C^{\circ}_{\text{EDC}}/C^{\circ}_{\text{NHS}} = 0,64$) suivi d'un rinçage pendant 10 minutes avec H₂O milli-Q.

Pour chacun des espaceurs (MUA et HS-PEG-COOH) les protocoles d'activation ont été optimisés afin d'augmenter le nombre de fonctions acides activées et ainsi améliorer l'accroche des peptides ou des enzymes. Ces optimisations seront présentées en détail dans le chapitre présentant les résultats de caractérisation des surfaces de cuivre fonctionnalisées (Chapitre III).

II.2. Protocoles pour les surfaces structurées par des polymères photosensibles

Dans cette partie, nous allons décrire l'utilisation de polymères photosensibles dérivés du poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA, voir Figure 3), utilisés pour structurer la surface par irradiation localisée avant de greffer les peptides ou les enzymes. Le principe de ce traitement est représenté sur la Figure 4.

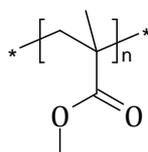


Figure 3 : Structure générale du PMMA.

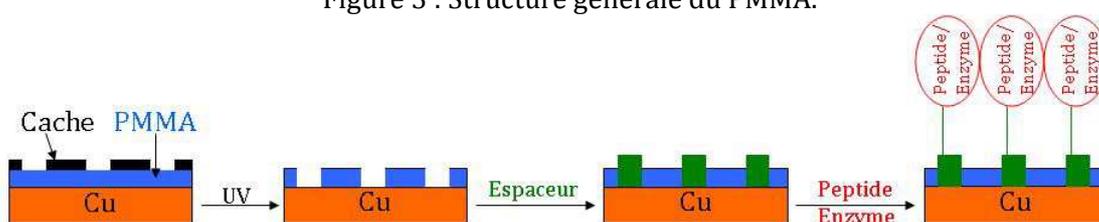


Figure 4 : Structuration des couches organiques sur des surfaces de cuivre par des polymères photosensibles.

Ce principe de « structuration » a pour objectif une dilution des fonctions acides carboxyliques sur la surface de cuivre. C'est une alternative à la dilution en solution de l'espaceur, et devrait permettre de mieux contrôler la répartition des molécules antibactériennes sur la surface. Pour cela, l'irradiation des surfaces de cuivre fonctionnalisées est effectuée à travers un masque métallique afin de détruire localement la couche de polymère. Les échantillons irradiés sont ensuite fonctionnalisés avec les espaceurs utilisés dans les protocoles précédents. Le greffage des espaceurs est attendu dans les espaces laissés vacants après l'irradiation du PMMA, *i.e.* directement sur le cuivre. Enfin, les peptides ou enzymes sont greffés de manière covalente sur ces espaceurs, comme précédemment.

En intégrant un polymère antiadhésif, possédant des motifs PEGs par exemple, dans la synthèse du PMMA, nous espérons réaliser une surface structurée qui combinera les effets antiadhésifs du polymère et antibactériens des peptides et des enzymes.

II.2.a. Greffage de polymères photosensibles

Le premier enjeu dans la réalisation de surfaces structurées est d'optimiser le greffage du PMMA afin d'obtenir une couche homogène et stable. Ceci permet de mieux contrôler l'effet de l'irradiation à travers le cache.

1. Optimisation du mode de greffage du PMMA

Trois voies ont été testées pour greffer le PMMA : le greffage par adhésion visqueuse (physisorption), le greffage sur un espaceur amino-thiolé et le greffage par incorporation de l'espaceur thiolé dans la synthèse du PMMA.

- Greffage par adhésion visqueuse entre les surfaces du cuivre et le PMMA

Les échantillons sont immergés dans une solution de PMMA ($M_w = 3150 \text{ g.mol}^{-1}$) dans du dichlorométhane (concentration en PMMA égale à $3,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) pendant une nuit à température ambiante. Ces échantillons sont ensuite rincés 5 minutes dans CH_2Cl_2 et séchés avec de l'air sec.

- Greffage du PMMA sur un espaceur amino-thiolé

Selon ce protocole, le PMMA ($M_w = 265 \text{ kg.mol}^{-1}$) est greffé de manière covalente sur les fonctions amines terminales d'un espaceur thiolé. Deux thiols ont été testés, le 4-aminothiophénol et la cystamine, afin de mettre en évidence l'influence éventuelle de la longueur et de la flexibilité de la chaîne sur le greffage du PMMA.

→ *Greffage du PMMA sur le 4-amino-thiophénol*

Les échantillons sont immergés dans une solution de 4-aminothiophénol ($\text{HS}-(\text{C}_6\text{H}_4)-\text{NH}_2$) (3 mg.mL^{-1}) dans EtOH absolu pendant 4 heures à température ambiante (Figure 5). Les surfaces sont ensuite rincées 10 minutes dans EtOH absolu et 5 minutes dans l'eau milli-Q puis séchées avec de l'air sec. Dans un deuxième temps, les surfaces aminées sont plongées dans une solution de PMMA à $2,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans CH_2Cl_2 pendant une nuit à température ambiante. Ces échantillons sont ensuite rincés 5 minutes dans CH_2Cl_2 et séchés avec de l'air sec. Les réactions attendues sont schématisée sur la Figure 5.

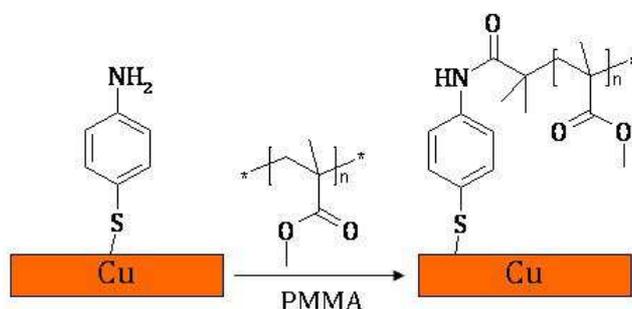


Figure 5 : Fonctionnalisation des surfaces de cuivre par le 4-aminothiophénol puis greffage du PMMA.

→ *Greffage du PMMA sur la cystéamine (Cys)*

En 1 étape : Ce protocole consiste à greffer simultanément sur les surfaces de cuivre le PMMA avec l'espaceur. Le couplage entre la Cys ($\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$) et le PMMA est réalisé à température ambiante pendant 3 heures dans un mélange 5 : 1 EtOH : CH_2Cl_2 contenant $C^\circ_{\text{Cys}} =$

2,5 mg.mL⁻¹ et C°_{PMMA} = 2,7 mg.mL⁻¹. Les échantillons sont ensuite immergés dans cette solution à température ambiante pendant une nuit. Les surfaces sont rincées pendant 10 minutes dans une solution EtOH : CH₂Cl₂ (5 : 1) et séchées avec de l'air sec.

En 2 étapes : Dans ce protocole, une SAM de cystamine est déposée sur les échantillons de cuivre dans un premier temps puis le PMMA est greffé sur cette couche. Les échantillons sont immergés dans une solution de Cys dans EtOH absolu à température ambiante pendant une nuit (C°_{Cys} = 2,5 mg.mL⁻¹). Les surfaces sont ensuite rincées 10 minutes avec EtOH et séchées avec de l'air sec. Les échantillons thio-aminés sont ensuite plongés dans une solution de PMMA dans CH₂Cl₂ pendant une nuit à température ambiante (C°_{PMMA} = 2,7 mg.mL⁻¹). Ces échantillons sont finalement rincés pendant 10 minutes dans CH₂Cl₂ et séchés avec de l'air sec.

La surface attendue après adsorption de la cystéamine et du PMMA (en 1 ou 2 étapes) est schématisée sur la Figure 6.

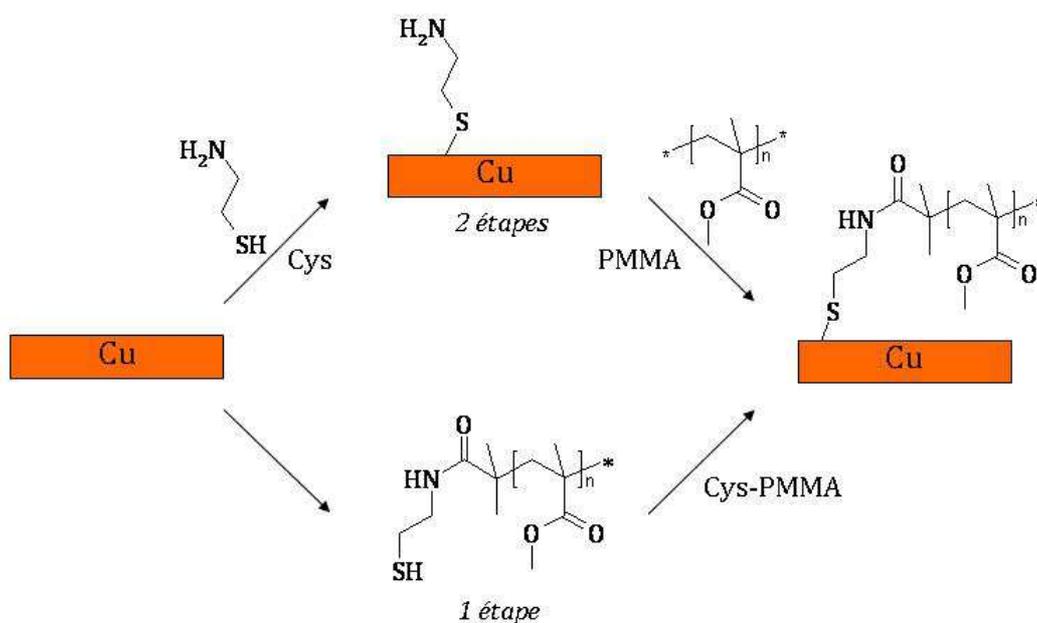


Figure 6 : Fonctionnalisation des surfaces de cuivre par la Cys et le PMMA (n = 2650).

- Intégration de l'espaceur dans la synthèse du PMMA

Le polymère synthétisé selon la méthode de Kong *et al* [4] permet d'intégrer une molécule thiolée, le pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate) (PETMP), à l'intérieur du polymère. Le PETMP possède 4 extrémités thiols (voir Figure 7) dont deux réagissent avec le monomère de méthacrylate de méthyl (MMA) afin d'intégrer cette molécule dans la chaîne polymérique. Les 2 extrémités thiols n'ayant pas réagi permettent au PMMA de se greffer sur la surface de cuivre nettoyé. **Ce polymère sera par la suite nommé HS-PMMA.**

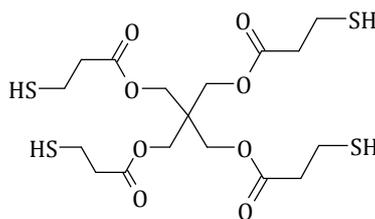


Figure 7 : Molécule de PETMP.

La synthèse du polymère HS-PMMA a été réalisée en chauffant à 70°C pendant 3 heures une solution de 2,7 mL de MMA (5 molL⁻¹) + 2,3 mL de toluène + 16 mg d'AIBN (azobisisobutyronitrile, précurseur des polymérisations radicalaires) (20 mmolL⁻¹) + 145 µL de PETMP (76 mmolL⁻¹). Les échantillons sont immergés dans cette solution pendant une nuit à température ambiante. Une fois le greffage effectué, les surfaces sont rincées 10 minutes dans le toluène et séchées avec de l'air sec. Le Tableau 3 résume les différentes méthodes utilisées pour greffer le PMMA sur les surfaces de cuivre nues.

N° expérience	Mode d'accroche	Concentration en monomère	Solvant
PMMA1	Adhésion visqueuse	32 mmolL ⁻¹	CH ₂ Cl ₂
PMMA2a	Covalent sur 4-aminothiophénol	32 mmolL ⁻¹	CH ₂ Cl ₂
PMMA2b	Covalent sur Cystéamine	32 mmolL ⁻¹	CH ₂ Cl ₂ /EtOH
PMMA2c	Liaison en solution avec Cystéamine puis greffage covalent	20 mmolL ⁻¹	CH ₂ Cl ₂
PMMA3 (HS-PMMA)	Insertion du PETMP en solution puis greffage covalent	5 molL ⁻¹	Toluène

Tableau 3 : Récapitulatif des différents protocoles de greffage du PMMA sur les surfaces de cuivre.

2. Synthèse de polymères multifonctionnels

Il est intéressant de synthétiser et de greffer des polymères pouvant à la fois structurer la surface et avoir un effet antiadhésif. Pour cela, nous avons dans un premier temps intégré un dopant dans le HS-PMMA afin de le rendre plus sensible aux irradiations UV. Dans un second temps nous avons synthétisé des copolymères HS-PMMA et PEG pour introduire un motif ayant des propriétés antiadhésives (PEG) dans la couche structurante.

- Intégration d'un dopant photosensible

L'intégration du dopant dans le polymère de HS-PMMA est réalisable en deux étapes. Une solution de 2,7 mL de MMA (5 molL⁻¹) + 2,3 mL de toluène + 16 mg d'AIBN (20 mmolL⁻¹) + 145 µL de PETMP (76 mmolL⁻¹) est chauffée pendant 2 heures à 70°C puis 490 mg (2,5 mmolL⁻¹) de 1,3-diphényltriazène (DPT, voir Figure 8) sont ajoutés et la solution portée à 75°C pendant 1 heure [5]. Les échantillons sont ensuite immergés dans cette solution pendant une nuit à

température ambiante ou à 75°C puis rincées 10 minutes dans le toluène et séchées à l'air sec.

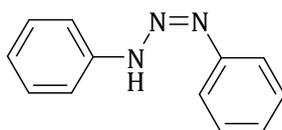


Figure 8 : Molécule de DPT.

- Intégration de PEG dans le HS-PMMA

L'incorporation de PEGs pour leurs propriétés antiadhésives se fait *via* des poly(éthylène glycol) possédant une extrémité méthacrylate (MA-PEG) dont la structure générale est présentée sur la Figure 9. Pour cela, deux longueurs de PEGs sont utilisées : PEG300 ($M_w \approx 300$ g.mol⁻¹, n = 5), et PEG4000 ($M_w \approx 4854$ g.mol⁻¹, n = 108).

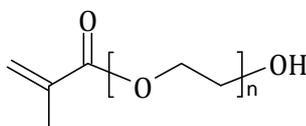


Figure 9 : Structure générale des MA-PEGs incorporés au HS-PMMA.

Les PEGs sont intégrés lors de la première étape de la synthèse en 2 temps du HS-PMMA avec le dopant, décrite précédemment. La solution de départ contient 2,7 mL de MMA (5 molL⁻¹) + 2,3 mL de toluène + 16 mg d'AIBN (20 mmolL⁻¹) + 145 µL de PETMP (76 mmolL⁻¹) + 100% ou 10% molaire de monomère de MA-PEG par rapport à MMA. La solution est chauffée 2 heures à 70°C puis, après ajout du DPT, la température est augmentée jusqu'à 75°C pendant 1 heure. Les échantillons sont immergés pendant une nuit à 75°C. Les surfaces sont rincées 3 x 5 minutes avec un mélange toluène : acétone (2 : 1) et 5 minutes avec H₂O milli-Q puis séchées à l'air sec. Le Tableau 4 résume l'ensemble des polymères dérivés du PMMA synthétisés : HS-PMMA seul (PMMA3), HS-PMMA avec un dopant (PMMA4) et les copolymères de HS-PMMA avec MA-PEGs (PMMA5, PMMA6a et PMMA6b).

N° expérience	Dopant	Molécule greffée	Longueur du PEG
PMMA3	Non	HS-PMMA	-
PMMA4	Oui	HS-PMMA+DPT	-
PMMA5	Oui	HS-PMMA+DPT+PEG300	n = 4-5
PMMA6a	Oui	HS-PMMA+DPT+PEG4000	n = 108
PMMA6b	Oui	HS-PMMA+DPT+PEG4000 à 10%	n = 108

Tableau 4 : Récapitulatif des différentes synthèses de co-polymères PMMA/PEG.

II.2.b. Irradiation UV des polymères

Le PMMA dopé avec du DPT possède un maximum d'absorbance vers 351 nm [5]. A cette longueur d'onde, le DPT se dégrade en formant des radicaux libres qui vont ensuite réagir avec

les branches de PMMA et poursuivre la dégradation. La bande d'absorption étant large, nous avons irradié les surfaces recouvertes de PMMA pendant 5 minutes à 365 nm (longueur d'onde imposée par la lampe UV utilisée).

Afin de structurer la couche organique de polymère, nous avons utilisé un masque, une grille d'or dont les dimensions sont représentées sur la Figure 10. Les échantillons irradiés sont ensuite rincés 5 minutes dans un mélange toluène : acétone (2 : 1). Pour les polymères HS-PMMA+MA-PEG, un rinçage supplémentaire de 5 minutes dans H₂O milli-Q est réalisé.

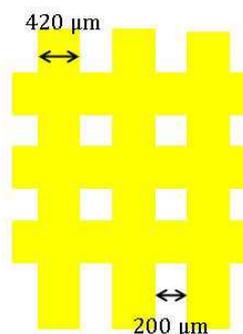


Figure 10 : Schéma de la grille d'or utilisée lors de l'irradiation des dérivés de PMMA.

II.2.c. Greffage des espaceurs sur la surface nanostructurée après UV

Afin de pouvoir greffer de manière covalente la Magainine I et le lysozyme de blanc d'œuf HEWL, il est nécessaire de combler les espaces laissés vacants après irradiation des polymères dérivés du PMMA par un thiol possédant une extrémité acide carboxylique. Le choix s'est porté sur l'acide 16-mercaptohexadécanoïque (MHA) qui est un analogue du MUA possédant une chaîne carbonnée plus longue (16 carbones). L'allongement de la chaîne permet de conserver l'accessibilité aux fonctions terminales malgré l'épaisse couche de polymère conservée après irradiation (voir Chapitre III-IV). Les molécules de MHA sont greffées en suivant le même protocole que pour le greffage de MUA : immersion des échantillons dans une solution de MHA à 10 mmolL⁻¹ dans EtOH absolu pendant 3 heures, rinçage avec EtOH puis avec H₂O milli-Q pendant 10 minutes et séchage à l'air sec.

II.3. Greffage de la Magainine I (Mag) et du lysozyme de blanc d'œuf (HEWL) sur les espaceurs (MUA, HS-PEG-COOH ou MHA)

La dernière partie des travaux de fonctionnalisation des surfaces de cuivre consiste à greffer de manière covalente la Magainine I (Mag) ou le lysozyme de blanc d'œuf (HEWL) sur les espaceurs afin d'obtenir une surface ayant des propriétés antibactériennes. Pour cela, nous ferons réagir les molécules antibactériennes portant des fonctions amines avec les fonctions acides activées des espaceurs, afin de former des liaisons amides.

II.3.a. Optimisation du greffage de la Magainine (Mag)

Selon la nature de l'espaceur greffé sur les surfaces de cuivre, le protocole de greffage de la Magainine a été modifié pour éviter les phénomènes de dissolution de la surface de cuivre. Trois méthodes ont été expérimentées.

- Dépôt d'une goutte de 100 μL d'une solution de Mag dans H_2O milli-Q ($C^\circ_{\text{Mag}} = 8,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) sur les surfaces activées pendant 3 heures à température ambiante [2].
- Immersion des échantillons de cuivre activés, dans une solution de Mag dans H_2O milli-Q ($C^\circ_{\text{Mag}} = 8,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) pendant 3 heures.
- Immersion des échantillons de cuivre non activés dans une solution de Mag et d'EDC dans H_2O milli-Q ($C^\circ_{\text{Mag}} = 8,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et $C^\circ_{\text{EDC}} = 35 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) pendant 3 heures. Dans ce cas, on espère limiter le temps de contact entre l'EDC et la surface de cuivre fonctionnalisée.

Dans chaque protocole, les échantillons sont ensuite rincés 10 minutes avec H_2O milli-Q et séchés à l'air sec.

Le protocole retenu pour le greffage covalent de la Mag est le protocole dans lequel on immerge les échantillons dans une solution contenant la Magainine et l'EDC. Cela permet simultanément un bon greffage de la Mag et évite l'oxydation des surfaces de cuivre.

II.3.b. Greffage du lysozyme de blanc d'œuf (HEWL)

Le greffage de l'enzyme se fait par immersion des échantillons dans une solution de PBS contenant l'enzyme HEWL et l'EDC (avec $C^\circ_{\text{HEWL}} = 70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et $C^\circ_{\text{EDC}} = 35 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Cette solution est homogénéisée pendant 1 heure à température ambiante. Les échantillons sont placés dans cette solution une nuit à 4°C . Les surfaces sont rincées pendant 20 minutes dans PBS puis 20 minutes dans H_2O milli-Q et séchées à l'air sec.

III. Test d'adsorption de protéines

Afin d'évaluer les propriétés antiadhésives des surfaces fonctionnalisées vis-à-vis des protéines, nous avons caractérisé les surfaces, fonctionnalisées par les différents protocoles décrits, après immersion dans une solution d'Albumine de Sérum Bovin (BSA). Cette protéine est connue pour s'adsorber fortement sur de nombreux types de surfaces [3]. Pour cela, la BSA est dissoute dans de l' H_2O milli-Q avec une concentration en BSA égale à $100 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Une goutte de $150 \mu\text{L}$ de cette solution est déposée sur chaque surface de cuivre pendant 1 heure à température ambiante. Les surfaces de cuivre sont ensuite rincées pendant 5 minutes dans H_2O milli-Q et séchées à l'air sec.

Protocoles de fonctionnalisation des surfaces de titane

Les surfaces étudiées sont des coupons de titane de pureté 99,6% recuit (montée graduelle en température suivie d'un refroidissement contrôlé) fournis par Goodfellow. Les échantillons de titane recèlent quelques impuretés (données en ppm) : Al 500, Co 2, Cr 500, Cu 200, Fe 300, Mg 20, Mn 500, Ni 500, Si 200, Sn 200, Ta 10, V 500. Les dimensions des coupons sont 10 mm x 10 mm x 1 mm. Afin de travailler sur des surfaces très peu contaminées, un nettoyage mécanique (polissage) ainsi qu'un nettoyage chimique (rinçage) sont effectués selon différents protocoles.

I. Polissage et oxydation des surfaces de titane

Les surfaces sont polies pendant 10 minutes sur du papier de verre de grain 1.2 μm , puis 10 minutes sur disque de feutre avec une pâte diamantée de granulométrie 1 μm et 10 minutes avec une pâte diamantée de granulométrie $\frac{1}{4}$ μm . Après chaque étape de polissage, les surfaces de titane sont soniquées 15 minutes dans H₂O milli-Q.

L'étape suivante est l'oxydation des échantillons réalisée pour augmenter le nombre de fonctions hydroxyles à la surface des échantillons de titane (voir Figure 11) et ainsi permettre un meilleur greffage des couches organiques.

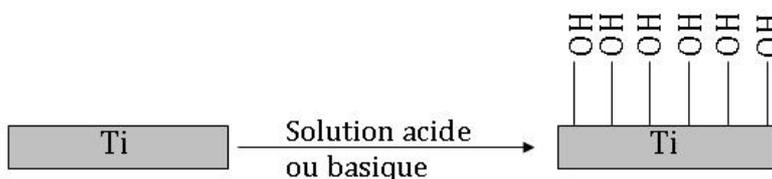


Figure 11: Hydroxylation des surfaces de titane.

Plusieurs protocoles ont été mis en place pour hydroxyler les surfaces de titane.

Dans un premier temps, les échantillons sont traités avec une solution d'acide sulfochromique [6] : 30 mg de dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) sont dissous dans 10 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré (37%) et chauffés à environ 40°C pendant 10 minutes sous agitation. Après refroidissement de la solution d'acide sulfochromique, les échantillons sont immergés pendant 20 minutes dans le bain acide et ensuite rincés 3 x 10 minutes avec H₂O milli-Q.

Une seconde méthode utilisée par Dubruel *et al.* [7] consiste à préalablement nettoyer les surfaces de titane dans différents solvants : cyclohexane, HCl à 35%, H₂O milli-Q et acétone avant de les plonger dans les solutions d'oxydation acides ou basiques. Dans les conditions acides, les échantillons de titane sont plongés pendant 1 heure dans un mélange équimolaire d'eau oxygénée (H_2O_2 , 30 wt%) et d'acide sulfurique concentré. Dans les conditions basiques,

les échantillons sont immergés pendant 10 minutes dans une solution d'ammoniaque (NH_4OH), d' H_2O_2 et d' H_2O milli-Q dans les proportions 1 : 1 : 5. Après oxydation, les échantillons de titane sont rincés 10 minutes avec H_2O milli-Q puis 10 minutes avec de l'acétone.

La dernière méthode testée est inspirée des travaux de Fan *et al.* [8]. Les échantillons de titane sont successivement passés aux ultra-sons 10 minutes dans H_2O milli-Q, l'acétone, le n-dodécane et le propan-2-ol avant greffage des couches organiques.

Après analyses par IRRAS (Spectroscopie InfraRouge en mode Réflexion Absorption) et par XPS (Spectroscopie de Photoélectrons X), nous avons retenu l'oxydation acide (deuxième méthode) pour la fonctionnalisation des surfaces de titane par l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES). La méthode d'oxydation la plus efficace pour greffer l'espaceur dérivé du catéchol (Cat) est le traitement sous ultrasons successivement dans l'eau, l'acétone, le n-dodécane et le propan-2-ol (troisième méthode). Ces méthodes ont été sélectionnées car elles permettent l'obtention d'une couche d'espaceurs la plus homogène possible, et le meilleur greffage de la Magainine I ou de l'enzyme HEWL dans les étapes terminales. Ces surfaces seront par la suite appelées Ti-OH.

II. Solutions et protocoles d'immersion

Pour fixer de manière covalente la Magainine I et le lysozyme (HEWL), plusieurs étapes de fonctionnalisation avec différents espaceurs ont été réalisées. Dans les paragraphes qui suivent, les divers protocoles et optimisations utilisés seront détaillés.

II.1. Greffage de l'APTES

L'APTES sert d'espaceur entre la surface de titane hydroxylée et le peptide ou l'enzyme que nous grefferons par la suite. En présence de molécules d'eau, l'APTES est hydrolysé et peut polymériser de plusieurs façons, soit verticalement (formation de multicouches) soit horizontalement (formation d'une monocouche stable) [9]. La Figure 12 représente le cas idéal, avec formation d'une monocouche polymérisée comme souhaité :

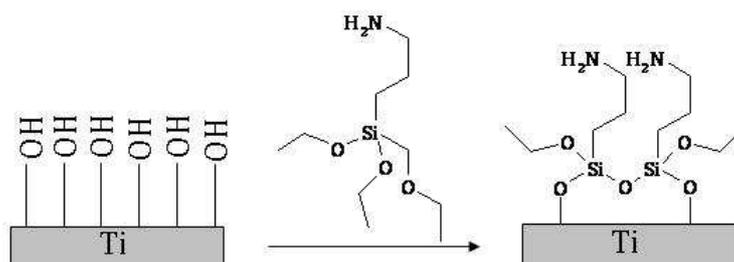


Figure 12 : Greffage idéal de l'APTES sur les surfaces de titane hydroxylées.

Afin de favoriser la polymérisation horizontale de l'APTES, plusieurs protocoles ont été testés.

Dans un premier temps, la fonctionnalisation est effectuée à température ambiante en plongeant les échantillons de titane hydroxylés dans une solution d'APTES à 2% ou 20% (v/v) dans l'acétone pendant 3 heures sous agitation douce. Les échantillons sont ensuite rincés pendant 5 minutes à l'acétone et 10 minutes avec H₂O milli-Q. Après fonctionnalisation, les échantillons de titane sont rincés 5 minutes à l'acétone et 10 minutes avec H₂O milli-Q.

Le protocole à 2% en APTES ne conduit qu'à une faible quantité d'APTES en surface. De plus, avec ces deux protocoles, la couche de silane est peu stable et se dégrade dans les étapes ultérieures [10]. Nous avons donc mis en place des protocoles dans lesquels la fonctionnalisation est réalisée à haute température.

Dans la continuité du protocole précédent, nous nous sommes inspirés des travaux d'Olbrich *et al* [11] pour réaliser le greffage de l'APTES dans l'acétone. Les échantillons de titane ont été immergés dans une solution d'APTES à 20% (v/v) dans l'acétone et placés à 40°C pendant une nuit. Ces échantillons sont ensuite rincés successivement dans CH₂Cl₂, dans l'acétone, dans EtOH absolu et dans H₂O milli-Q pendant 10 minutes et séchés pendant 10 minutes à l'étuve à 100°C. En utilisant ce protocole, la détection de l'APTES à l'IRRAS est bonne et la couche de silane paraît stable mais la fonctionnalisation n'est pas reproductible.

Pour pallier ce problème, il a été décidé de changer le solvant de la fonctionnalisation : nous avons opté pour le toluène qui est le plus couramment utilisé dans la littérature lorsque l'on souhaite utiliser des dérivés silanes [7, 12-14]. Suivant les travaux de Dubruel *et al*, les échantillons de titane ont été immergés dans une solution d'APTES à 5% et à 10% (v/v) dans le toluène à 100°C pendant 4 heures [7]. Les échantillons sont ensuite rincés 5 minutes dans le toluène et 5 minutes dans l'acétone.

Au terme de cette optimisation, nous avons gardé le dernier protocole avec la solution à 10% en APTES dans le toluène placée à 100°C pendant 4 heures. Ces surfaces seront par la suite appelées Ti-Sil.

II.2. Greffage du catéchol (Cat)

Les essais de greffage de la Magainine I (Mag) sur les couches fonctionnalisées par l'APTES ont présenté un faible greffage de Mag. Le choix d'un nouvel espaceur a été fait selon les deux critères suivants :

a. La molécule doit posséder une extrémité capable de réagir avec les fonctions hydroxyles du titane : par exemple dérivés silanisés ou dérivé de la DOPA [15, 16].

b. La molécule doit posséder une extrémité capable de réagir avec les fonctions présentes dans les chaînes latérales du peptide ou de l'enzyme : une fonction amine ou une fonction acide carboxylique.

Le nouvel espaceur choisi est le catéchol (Cat), un dérivé de la DOPA, qui réagit avec le titane via ses fonctions hydroxyles (Figure 13) [17].

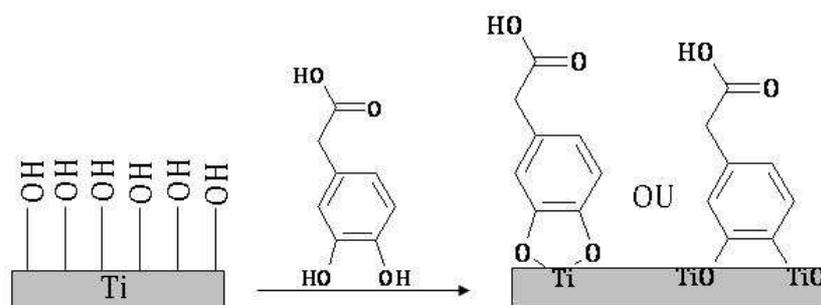


Figure 13 : Greffage du Cat sur une surface de titane hydroxylée.

Trois protocoles issus de la littérature ont été testés sur les surfaces de titane hydroxylées.

Dans le premier, les échantillons sont soniqués 2 x 10 minutes dans du toluène suivi de 2 x 7 minutes dans du propan-2-ol et traités à l'UV-ozone pendant 5 minutes avant rinçage à l'eau milli-Q. Ces surfaces sont ensuite immergées pendant 4 heures dans une solution tampon pH 6 (citrate de sodium et chlorure de sodium) de Cat à 0,1 mg.mL⁻¹ à l'étuve à 50°C. Après greffage du Cat, les échantillons sont rincés avec la solution tampon puis H₂O milli-Q pendant 5 minutes [18].

Dans le deuxième protocole testé, issu des travaux de Fan *et al.* [8], les échantillons de titane sont plongés pendant 12 heures dans une solution tampon pH 6 de Cat à 1 mg.mL⁻¹ à l'abri de toute source lumineuse. Après greffage du Cat les échantillons sont rincés avec la solution tampon puis dans H₂O milli-Q pendant 5 minutes.

Le dernier mode opératoire mis en place s'inspire des travaux de Dalsin *et al.* [19]. Les échantillons de titane sont immergés pendant 24 heures dans une solution tampon pH 6 (citrate de sodium et chlorure de sodium) de Cat à 1 mg.mL⁻¹ à l'étuve à 50°C. Après greffage du Cat, les échantillons sont rincés avec la solution tampon puis H₂O milli-Q pendant 5 minutes.

Ces surfaces seront par la suite appelées Ti-Cat. Dans la suite du manuscrit, nous utiliserons le protocole de Dalsin pour le greffage du Cat [19]. Ce choix repose sur l'analyse des spectres IRRAS des surfaces de Ti-Cat, détaillés dans le Chapitre IV.

Pour combiner les effets antiadhésifs et antibactériens sur une même surface, nous avons greffé un poly(éthylène glycol) (PEG), antiadhésif connu [20-23], sur la couche de Cat avant le greffage covalent des molécules antibactériennes.

II.3. Greffage du poly(éthylène glycol) diamine (H₂N-PEG-NH₂)

Le Cat se terminant par une fonction acide carboxylique, nous avons choisi d'utiliser un PEG diamine afin créer une liaison amide avec le catéchol adsorbé (voir Figure 14).

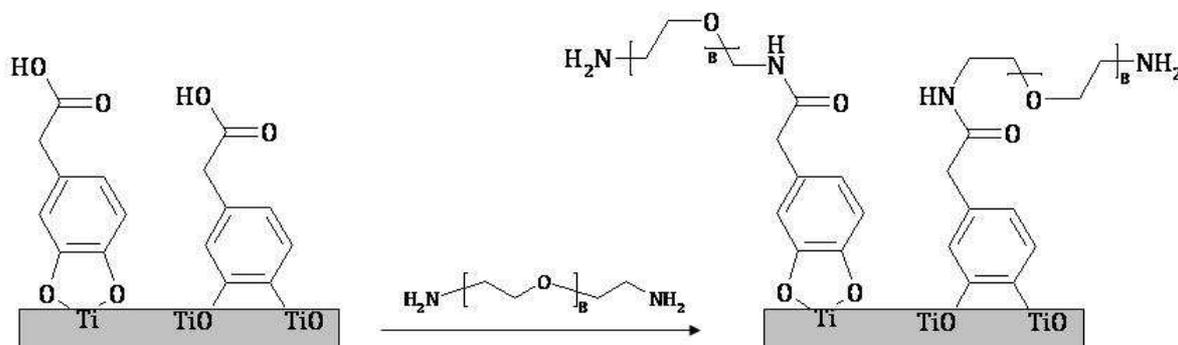


Figure 14 : Greffage de H₂N-PEG-NH₂ (n ≈ 67) sur les surfaces Ti-Cat.

Avant le greffage du H₂N-PEG-NH₂, les fonctions acides carboxyliques du Cat sont activées avec une solution d'EDC/NHS selon le protocole décrit dans le chapitre II-II. **Ces surfaces sont appelées Ti-Cat-act.** Le greffage du H₂N-PEG-NH₂ est effectué en immergeant les surfaces de Ti-Cat-act dans une solution de H₂N-PEG-NH₂ à 2 mg.mL⁻¹ dans H₂O milli-Q pendant une nuit à 50°C. Les échantillons sont ensuite rincés pendant 5 minutes avec H₂O milli-Q. **Ces surfaces seront par la suite appelées Ti-Cat-PEG.**

II.4. Greffage de la Magainine I (Mag)

Le greffage de la Magainine I sur les surfaces de Ti-Cat-PEG est également réalisé par création d'une liaison amide entre l'extrémité amine du H₂N-PEG-NH₂ et le résidu -COOH de l'acide glutamique (Glu) de la Mag (voir Figure 15).

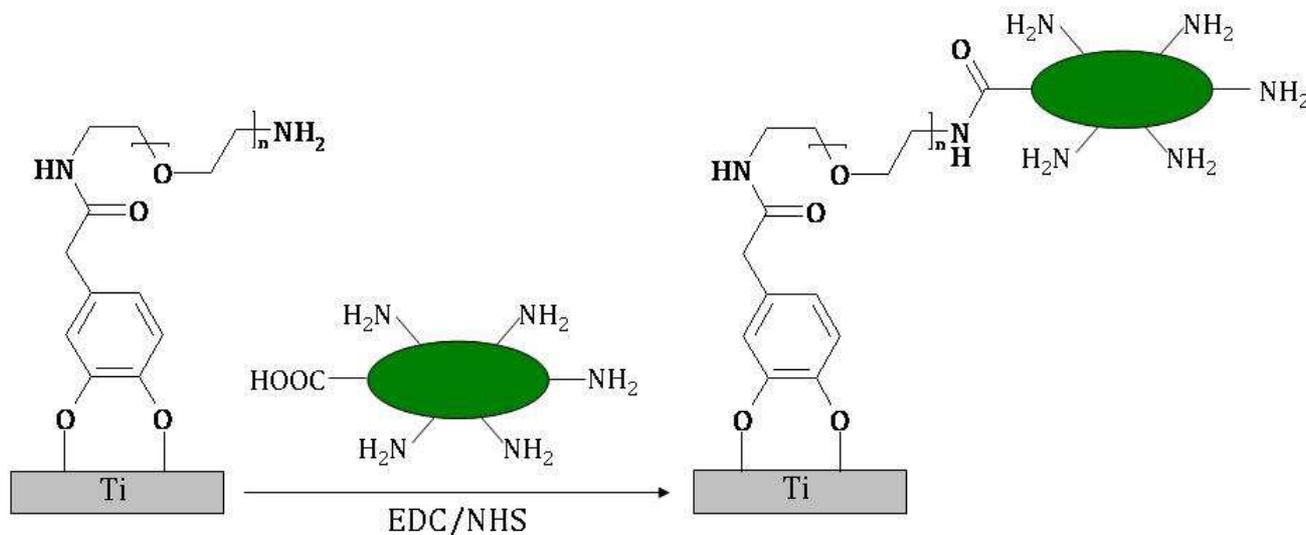


Figure 15 : Greffage de la Mag sur les surfaces Ti-Cat-PEG.

Pour cela, la Mag est activée dans une solution contenant 20 mg.L⁻¹ de Mag, 55 mg.L⁻¹ d'EDC et 70 mg.L⁻¹ de NHS dans H₂O milli-Q pendant 90 minutes. Après activation, une goutte de 100 µL de Mag activée est déposée sur chaque surface de Ti-Cat-PEG pendant 3 heures à température ambiante. Les échantillons sont rincés pendant 10 minutes avec H₂O milli-Q. **Ces échantillons seront par la suite appelés Ti-Cat-PEG-Mag.**

II.5. Greffage du lysozyme de blanc d'œuf (HEWL)

Dans le cas du lysozyme de blanc d'œuf, un dialdéhyde a été intercalé entre la couche de PEG et l'enzyme, ceci afin d'éviter d'altérer ses propriétés antibactériennes. Usuellement, le dialdéhyde utilisé est le glutaraldéhyde (GA) [24-26] mais celui-ci est connu pour créer des ponts entre les fonctions libres de la couche inférieure : dans ces travaux, nous avons opté pour le téréphtaldéhyde (Téré). Le Téré (voir Figure 16) possède un cœur aromatique qui permet de limiter le pontage de la molécule entre deux chaînes de PEG et de garder le maximum de fonctions aldéhyde accessibles pour le greffage de HEWL. L'utilisation d'un dialdéhyde permet d'éviter l'activation par EDC ou NHS des fonctions acides comme l'acide glutamique (Glu) de l'enzyme qui semble jouer un rôle dans son activité [27, 28].

II.5.a. Greffage du téréphtaldéhyde (Téré)

Le greffage du Téré se fait en créant une liaison imine entre l'amine terminale du H₂N-PEG-NH₂ et une des fonctions aldéhyde du Téré. Cette liaison imine est ensuite réduite en amine secondaire en introduisant dans la solution de fonctionnalisation un réducteur, le borohydrure de sodium (NaBH₄) (Figure 16).

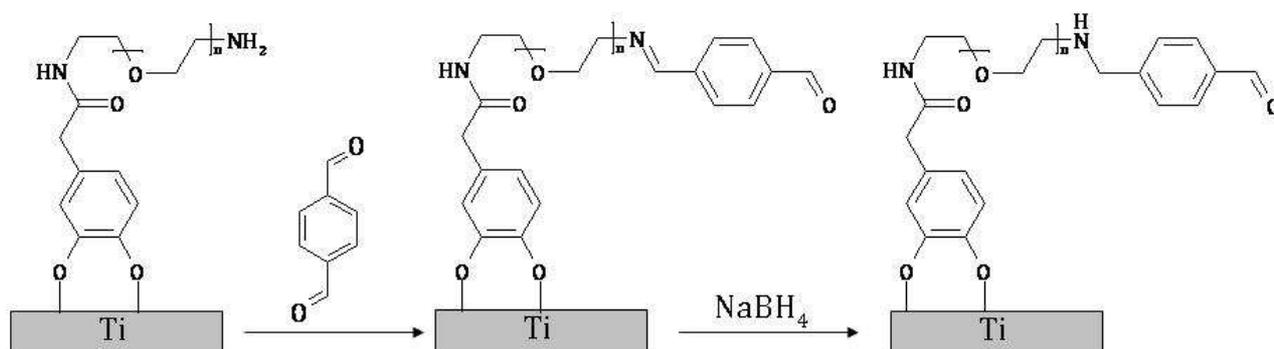


Figure 16 : Greffage du Téré sur les surfaces de Ti-Cat-PEG.

Les échantillons de Ti-Cat-PEG sont ainsi immergés pendant 90 minutes dans une solution de Téré à 100 µg.mL⁻¹ et de NaBH₄ à 25 µg.mL⁻¹ dans H₂O milli-Q. Le greffage se fait sous agitation et à température ambiante. Après greffage du Téré, les échantillons sont rincés pendant 5 minutes avec H₂O milli-Q. **Ces échantillons sont par la suite appelés Ti-Cat-PEG-Téré.**

II.5.b. Greffage de HEWL

Le lysozyme de blanc d'œuf (HEWL) se greffe de façon covalente au Téré en formant de nouveau une liaison imine entre la deuxième extrémité aldéhyde du Téré et une des fonctions amines de l'enzyme. Cette liaison imine est à son tour réduite en présence de NaBH_4 (Figure 17).

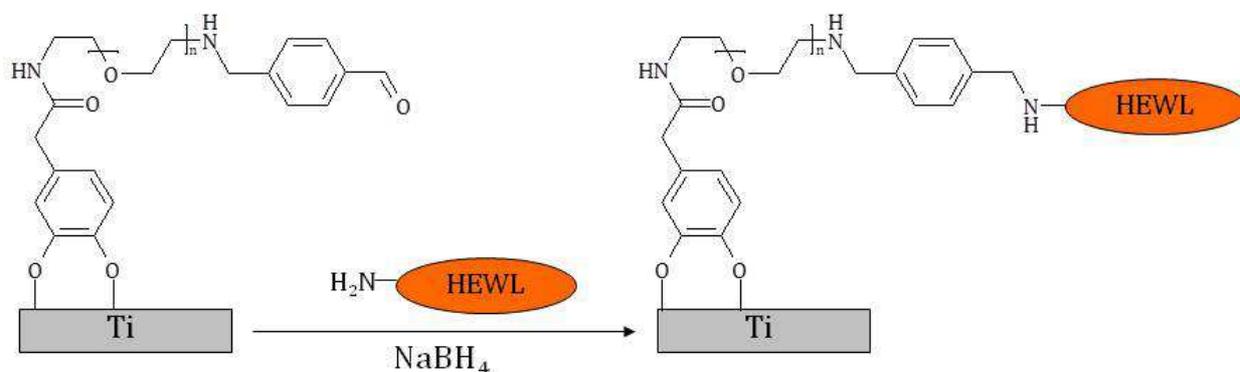


Figure 17 : Greffage de HEWL sur les surfaces Ti-Cat-PEG-Téré.

Avant de procéder au greffage de HEWL sur les surfaces de Ti-Cat-PEG-Téré, l'enzyme est dissoute dans une solution de PBS (Phosphate Buffer Solution) à pH 7 (1 mg.mL^{-1}) à laquelle sont ajoutés 3 mg.mL^{-1} de NaBH_4 . Cette solution est homogénéisée pendant 1 heure. Les échantillons Ti-Cat-PEG-Téré sont ensuite immergés dans cette solution pendant une nuit à 4°C [29]. Après greffage de HEWL, les échantillons sont rincés pendant 20 minutes dans une solution de PBS puis 20 minutes dans H_2O milli-Q. **Ces échantillons sont par la suite appelés Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL.**

III. Test d'adsorption de protéines

Afin d'évaluer les propriétés antiadhésives des surfaces fonctionnalisées vis-à-vis des protéines, nous avons étudié le comportement des différentes surfaces après immersion dans une solution d'Albumine de Serum Bovin (BSA). Cette protéine est connue pour fortement adhérer sur toutes sortes de surfaces [3]. L'étude de l'adhésion de cette protéine permet donc d'avoir accès de manière qualitative au pouvoir antiadhésif des surfaces de cuivre fonctionnalisées. L'évaluation se fait en comparant l'aire des bandes amides mesurées sur les surfaces fonctionnalisées à celle mesurée sur les surfaces de Ti-OH après dépôt de BSA.

Pour cela, la BSA est dissoute dans de l' H_2O milli-Q avec une concentration en BSA égale à 100 mg.L^{-1} . Une goutte de $150 \mu\text{L}$ de cette solution est déposée sur chaque surface de titane pendant 1 heure à température ambiante. Les surfaces de titane sont ensuite rincées pendant 5 minutes dans H_2O milli-Q et séchées à l'air sec.

Techniques expérimentales

Après chaque étape de fonctionnalisation, les échantillons ont été analysés par différentes techniques de caractérisation apportant des informations différentes et complémentaires sur la surface métallique ou sur la couche organique déposée sur les échantillons. Par exemple, les analyses infrarouge par IRRAS (Spectroscopie InfraRouge en mode Reflexion-Absorption) et PM-IRRAS (Spectroscopie InfraRouge en mode Reflexion-Absorption par Modulation de Polarisation) renseignent la nature chimique des groupements présents sur la surface ; l'XPS (Spectroscopie de Photoémission de Rayons X) donne accès à la composition élémentaire des couches organiques greffées sur la surface et permet d'en estimer une épaisseur moyenne ; grâce à l'AFM (Microscopie à Force Atomique) il est possible de connaître la topographie et l'homogénéité d'une couche organique et enfin la mesure de l'angle de contact renseigne sur la mouillabilité d'une surface. En regroupant ces données, il est possible de faire le lien entre les caractéristiques physico-chimiques d'une surface et son activité en milieu biologique. La mise en évidence de telles corrélations permet ensuite d'orienter les recherches vers l'optimisation de critères ciblés sur des surfaces présentant une bonne activité antibiofilm.

Les techniques utilisées sont résumées dans le Tableau 5. Le détail des techniques d'IRRAS, PM-IRRAS, XPS et AFM sont consultables dans l'Annexe I.

Techniques	Principe physique	Informations	Dimension	Limitation
IRRAS	Absorption et réflexion d'un rayon InfraRouge du faisceau à incidence rasante.	Vibrations caractéristiques des liaisons au sein des molécules adsorbées.	Profondeur : >200 nm Largeur : 5 mm.	Détection des vibrations dont le moment dipolaire a une composante perpendiculaire à la surface.
PM-IRRAS				
XPS	Après irradiation par des photons X, émission d'un électron de cœur et mesure de l'énergie cinétique permettant de calculer l'énergie de liaison selon $E_L = hv - E_C - \Phi$.	Composition élémentaire, nature des groupements chimiques et évaluation de l'épaisseur des couches organiques.	Profondeur : de 1 à 10 nm (< 3λ , λ étant le libre parcours moyen des électrons dans le matériau analysé). Largeur : de 20 à 200 μm .	Pas de détection des éléments H et He. Echantillons non réutilisables. Effet de charge sur les échantillons non conducteurs.
Auger	Après émission de l'électron de cœur, un électron d'une couche plus haute en énergie vient remplir le niveau vacant, causant un dégagement d'énergie absorbée par un autre électron qui est éjecté de l'atome.		Profondeur : 5nm Largeur : <1 μm .	
AFM	En mode Tapping®, le levier portant la pointe AFM vibre à sa propre fréquence de résonance avec une certaine amplitude. Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude décroît.	Topographie et homogénéité physique ou chimique des couches externes de la surface.	Profondeur : 500 nm Largeur : de 1 μm à 100 μm sur le di Caliber, de 100 nm à 50 μm sur le NanoScope 8.	Mesures difficiles si la surface est très adhésive. Artefacts possibles dus à un grand rayon de courbure des bactéries.
Angle de Contact	Dépôt d'une goutte d'eau sur la surface. Mesure de l'angle θ entre la surface et la tangente à la goutte au point de contact.	Caractère hydrophobe ou hydrophile des couches externes de l'échantillon.	Dépôt de 3 gouttes de 1 μL d'eau. La dimension analysée dépend de la mouillabilité de la surface.	Mesure locale de la mouillabilité. Pas de renseignements sur l'homogénéité physique ou chimique.

Tableau 5 : Récapitulatif des différentes techniques de caractérisation utilisées et des informations obtenues. (E_L : Energie de liaison, E_C : Energie cinétique, Φ : travail de sortie du spectromètre et hv : l'énergie du photon incident).

Principe de la mesure d'angle de contact

La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact (θ) (Figure 18).

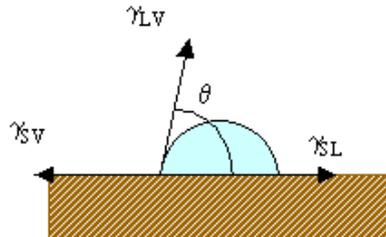


Figure 18 : Schéma de la mesure d'un angle de contact.

Cette technique permet de mesurer l'énergie libre de surface du solide si on utilise plusieurs solvants. Si on utilise l'eau comme seul liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface.

Dans le cadre des travaux de cette thèse, seule l'eau a été utilisée comme solvant et ce afin de déterminer le caractère hydrophile ou hydrophobe des surfaces fonctionnalisées.

Les mesures présentées dans le Chapitre III sont obtenues en moyennant les valeurs acquises par dépôt de 3 gouttes de 1 μ L sur chaque échantillon. Pour chaque goutte, nous avons utilisé le mode « sessile drop » et mesuré l'angle de contact entre la goutte et la surface en utilisant trois modèles mathématiques (utilisés par le fournisseur Krüss) permettant d'obtenir une valeur moyenne de l'angle de contact :

- Mode « tangente 1 » : le profil complet de la goutte déposée est assimilé par le programme à une équation de conique générale. La dérivée de cette équation à l'intersection du point triple (eau-surface-air) donne la pente de la tangente en ce point et donc l'angle de contact.
- Mode « tangente 2 » : seule la partie du profil de la goutte déposée qui se trouve près de la ligne de base est intégré dans une fonction polynôme du type $y = a + bx + cx^{0,5} + (d/\ln x) + e/x^2$. La pente au point triple et l'angle de contact sont déterminés en adaptant les paramètres de manière itérative.
- Mode « circle fitting » : le contour de la goutte est amalgamé à un segment d'un cercle. L'angle de contact est calculé en mesurant la pente de la tangente au cercle modèle au point triple. Cette méthode est particulièrement adaptée à la mesure des faibles angles de contact.

Références bibliographiques

1. I.M. Klotz, G.H. Czerlinski, and H.A. Fiess, *A Mixed-valence Copper Complex with Thiol Compounds*. Journal of American Chemical Society, 1958. **80** p. 2920-2923.
2. V. Humblot, J.-F. Yala, P. Thebault, K. Boukerma, A. Héquet, J.-M. Berjeaud, and C.-M. Pradier, *The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers*. Biomaterials, 2009. **30** p. 3503-3512.
3. A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, M. Salmain, and C.-M. Pradier, *Grafting of lysozyme and/or poly(ethylene glycol) to prevent biofilm growth on stainless steel surfaces*. Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113** p. 2101-2109.
4. Z. Kong, Z. Luo, Z. Fu, and Y. Shi, *Synthesis of amphiphilic heteroarm star-shaped polymer by the use of polyfunctional chain-transfer agent via conventional free radical polymerization*. Acta Polymerica Sinica, 2008. **2** p. 102-106.
5. M. Bolle, K. Luther, and J. Troe, *Photochemically assisted laser ablation polymethyl-methacrylate*. Applied Surface Science, 1990. **46** p. 279-283.
6. A. Héquet, V. Humblot, J.-M. Berjeaud, and C.-M. Pradier, *Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011. **84** p. 301-309.
7. P. Dubruel, E. Vanderleyden, M. Bergada, I. Depaepe, H. Chen, S. Kuypers, J. Luyten, J. Schrooten, L. Vanhoorebeke, and E. Schacht, *Comparative study of silanisation reactions for the biofunctionalisation of Ti-surfaces*. Surface Science, 2006. **600** p. 2562-2571.
8. X. Fan, L. Lin, and P.B. Messersmith, *Cell fouling resistance of polymer brushes grafted from Ti substrates by surface-initiated polymerization: effect of ethylene glycol side chain length*. Biomacromolecules, 2006. **7** p. 2443-2448.
9. E.A. Smith and W. Chen, *How To Prevent the Loss of Surface Functionality Derived from Aminosilanes*. Langmuir, 2008. **24** p. 12405-12409.
10. N. Aissaoui, L. Bergaoui, J. Landoulsi, J.-F. Lambert, and S. Boujday, *Silane Layers on Silicon Surfaces: Mechanism of Interaction, Stability and Influence on Protein Adsorption*. Langmuir, 2012. **28** p. 656-665.
11. K.C. Olbrich, T.T. Andersen, F.A. Blumenstock, and R. Bizios, *Surfaces modified with covalently-immobilized adhesive peptides affect fibroblast population motility*. Biomaterials, 1996. **17** p. 759-764.
12. P.T. Charles, G.J. Vora, J.D. Andreadis, A.J. Fortney, C.E. Meador, C.S. Dulcey, and D.A. Stenger, *Fabrication and Surface Characterization of DNA Microarrays Using Amine- and Thiol-Terminated Oligonucleotide Probes*. Langmuir, 2003. **19** p. 1586-1591.
13. R.M. Pasternack, S. Rivillon Amy, and Y.J. Chabal, *Attachment of 3-(Aminopropyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature*. Langmuir, 2008. **24** p. 12963-12971.
14. J.A. Howarter and J.P. Youngblood, *Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane*. Langmuir, 2006. **22** p. 11142-11147.
15. J.H. Waite and M.L. Tanzer, *Polyphenolic Substance of Mytilus edulis: Novel Adhesive Containing L-Dopa and Hydroxyproline*. Science 1981. **212** p. 1038-1040.
16. A. Charlot, V. Sciannaméa, S. Lenoir, E. Faure, R. Jérôme, C. Jérôme, C. Van De Weerd, J. Martial, C. Archambeau, N. Willet, A.-S. Duwez, C.-A. Fustin, and C. Detrembleur, *All-in-one strategy for the fabrication of antimicrobial biomimetic films on stainless steel*. Journal of Materials Chemistry, 2009. **19** p. 4117-4125.

17. R. Rodriguez, M.A. Blesa, and A.E. Regazzoni, *Surface Complexation at the TiO₂ (anatase)/Aqueous Solution Interface: Chemisorption of Catechol*. Journal of Colloid and Interface Science, 1996. **177** p. 122-131.
18. B. Malisova, S. Tosatti, M. Textor, K. Gademann, and S. Zürcher, *Poly(ethylene glycol) adlayers immobilized to metal oxide substrates through catechol derivatives: influence of assembly conditions on formation and stability*. Langmuir, 2010. **26** p. 4018-4026.
19. J.L. Dalsin, L. Lin, S. Tosatti, J. Vörös, M. Textor, and P.B. Messersmith, *Protein resistance of titanium oxide surfaces modified by biologically inspired mPEG-DOPA*. Langmuir, 2005. **21** p. 640-646.
20. N.-P. Huang, R. Michel, J. Vörös, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D.L. Elbert, J.A. Hubbell, and N.D. Spencer, *Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption*. Langmuir, 2001. **17** p. 489-498.
21. K.D. Park, Y.-S. Kim, D.K. Han, Y.-H. Kim, E.H.B. Lee, H. Suh, and K.S. Choi, *Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces*. Biomaterials, 1998. **19** p. 851-859.
22. P. Kingshott and H.J. Griesser, *Surfaces that resist bioadhesion*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 1999. **4** p. 403-412.
23. S. Yuan, D. Wan, B. Liang, S.O. Pehkonen, Y.P. Ting, K.G. Neoh, and E.T. Kang, *Lysozyme-Coupled Poly(poly(ethylene glycol)methacrylate)-Stainless Steel Hybrids and Their Antifouling and Antibacterial Surfaces*. Langmuir, 2011. **27** p. 2761-2774.
24. A. Habeeb and R. Hiramoto, *Reaction of proteins with glutaraldehyde*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968. **126** p. 16-26.
25. K. Okuda, I. Urabe, Y. Yamada, and H. Okada, *Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991. **71** p. 100-105.
26. M. Reichlin, *Use of glutaraldehyde as a coupling agent for proteins and peptides*. Methods in Enzymology, 1980. **70** p. 159-165.
27. Q. Jian-Xun and J. Fan, *The balance of flexibility and rigidity in the active site residues of hen egg white lysozyme*. Chinese Physics B, 2011. **20** p. 058701-1 - 058701-11.
28. S.J. Li, *Structural Details at Active Site of Hen Egg White Lysozyme with Di and Trivalent Metal Ions*. Biopolymers, 2006. **81** p. 74-80.
29. K.Z. Marolia and S.F. D'Souza, *Enhancement in the lysozyme activity of the hen egg white foam matrix by cross-linking in the presence of N-acetyl glucosamine*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1999. **39** p. 115-117.

Chapitre III :
Fonctionnalisation du
cuivre et test d'adsorption
de protéines

Ce chapitre présente la fonctionnalisation du cuivre et l'immobilisation de molécules à propriétés antibactériennes. Plusieurs méthodes ont été testées, toutes basées sur l'utilisation de thiols, en en faisant varier la longueur de chaînes. Les types de fonctionnalisations testées sont schématisés dans le Tableau 1 ci-dessous.

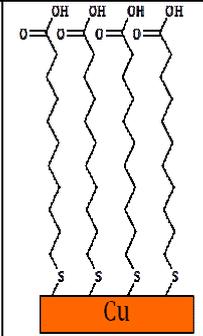
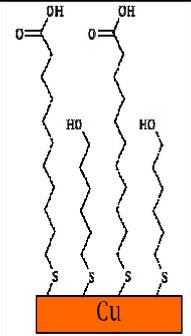
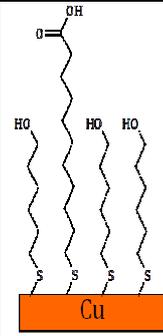
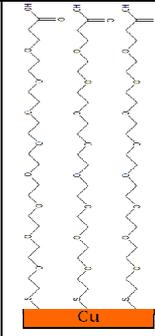
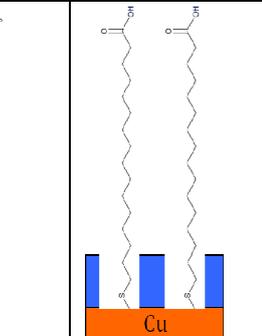
Stratégie de la fonctionnalisation envisagée	Utilisation d'un espaceur capable de s'adsorber sur la surface de cuivre et de former une liaison covalente avec le peptide ou l'enzyme			Utilisation d'un espaceur possédant des propriétés antiadhésives	Création d'une couche organique structurant la surface et possédant des propriétés antiadhésives
	Utilisation d'un espaceur « classique » : le MUA				
	100% MUA	50% MUA	25% MUA		
Représentation graphique de la surface idéale					

Tableau 1 : Résumé des stratégies employées pour fonctionnaliser le cuivre, et schémas des surfaces idéales attendues.

Les techniques de caractérisation utilisées sont le PM-IRRAS (Spectroscopie InfraRouge de Réflexion Absorption par Modulation de Polarisation), l'XPS (Spectroscopie de Photoélectrons X), l'AFM (Microscopie à Force Atomique) et les mesures d'angle de contact. Deux voies de fonctionnalisation ont été employées : une classique, l'adsorption de molécules espaceurs comme le MUA ou le HS-PEG-COOH et la deuxième plus originale, la microstructuration de la surface en utilisant des polymères photosensibles. Nous verrons ensuite les expériences qui ont permis d'immobiliser de manière covalente la Magainine I et l'enzyme HEWL.

Ce chapitre permettra de présenter enfin l'efficacité antiadhésive de ces modifications de surfaces grâce à des tests d'adsorption de protéines. Des tests d'adhésion et de viabilité de bactéries seront présentés dans le Chapitre V.

I. Caractérisation de la surface de cuivre nu

La caractérisation PM-IRRAS, après différents protocoles de nettoyage de la surface de cuivre, est présentée dans l'Annexe II-1. Le protocole Cu7 a été conservé pour les raisons que nous développerons ci-dessous. Le spectre général XPS de la surface Cu7 est disponible en Annexe II-2 : l'élément représenté majoritairement est bien sûr le cuivre (Cu2p, Cu3s, Cu3p et Cu LMM), l'élément oxygène (O1s) et quelques traces de carbone (C1s) sont aussi détectées. Sur la Figure 1, sont reportées les différentes analyses effectuées sur la surface Cu7 : le spectre PM-IRRAS (Figure 1-a) et les analyses XPS (Figure 1-b et Figure 1-c) relatives à l'élément cuivre.

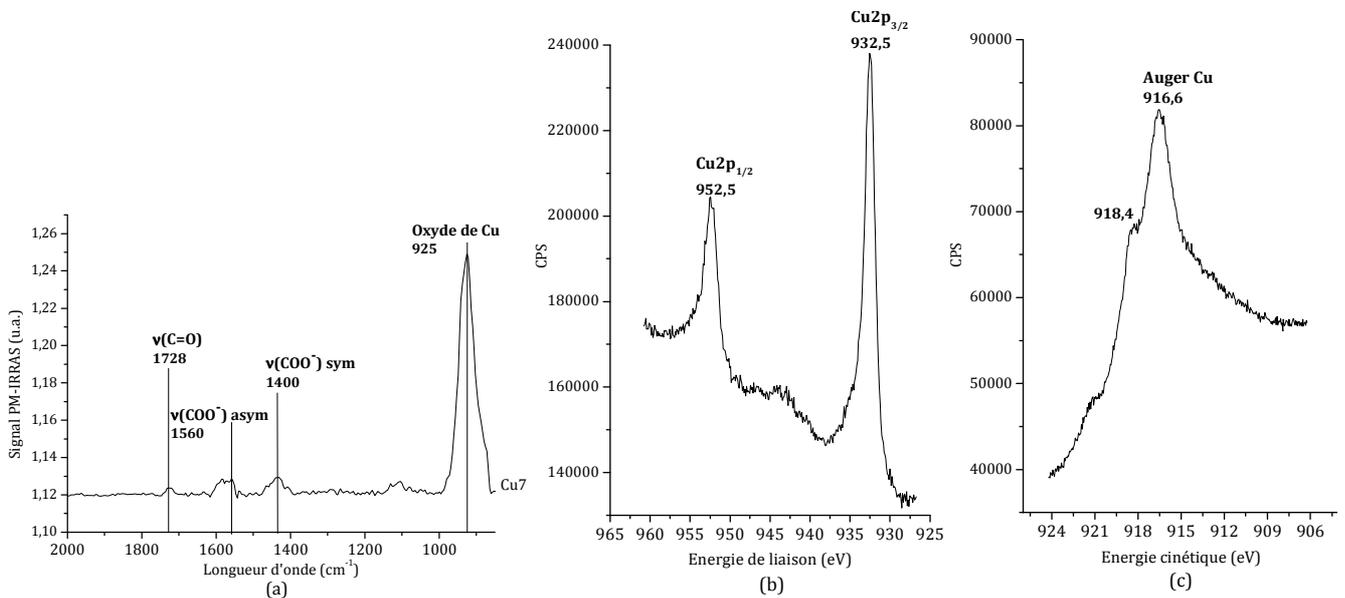


Figure 1 : Analyses de la surface Cu7 : (a) Spectre PM-IRRAS, (b) Spectre XPS Cu2p et (c) Transition Auger LMM.

L'analyse InfraRouge de la surface Cu7 (Figure 1-a) montre la présence d'une bande de vibration intense à 925 cm⁻¹ attribuée aux vibrations ν(C-O) des oxydes de cuivre [1]. Quelques traces de contamination organique sont détectées : trois bandes de faibles intensités à 1730 cm⁻¹ correspondant aux vibrations de liaisons C=O et à 1400 cm⁻¹ et 1560 cm⁻¹ respectivement liés aux vibrations symétriques et antisymétriques de carbonates ou carboxylates. Le pic XPS de Cu2p_{3/2} à 932,5 eV (Figure 1-b) peut correspondre à du cuivre métallique ou oxydé à l'état Cu^I [2]. Pour déterminer l'espèce majoritaire présente à la surface des échantillons de cuivre, on étudie la raie Auger LMM (Figure 1-c). On note une contribution majoritaire à 916,6 eV avec un épaulement à 918,4 eV.

Degré d'oxydation	Cu ⁰ Cu métallique	Cu ^I Cu ₂ O	Cu ^{II} CuO	Valeurs observées
Cu2p _{3/2} (E _{liaison}) [2]	932,5 eV	932,5 eV	933,8 eV	932,5 eV
Cu LMM (E _{cinétique}) [3]	917,8 eV	916,5 eV	918,4 eV	916,6 eV 918,4 eV
Paramètre Auger E _L (Cu2p) + E _C (Cu LMM) [4, 5]	1851,3 eV	1849,3 eV	1851,6 eV	1849,1eV 1850,9 eV

Tableau 2 : Energies des pics XPS et Auger du cuivre à différents degré d'oxydation.

Dans le cas présent, le paramètre Auger (à partir des valeurs observées sur la Figure 1) est égal à 1849,1 eV. D'après le Tableau 2, la contribution majoritaire est attribuée à la présence de Cu₂O en extrême surface et l'épaulement à 918,4 eV (donnant un deuxième paramètre Auger égal à 1850,9 eV) correspond à la détection du cuivre métallique dans le volume de l'échantillon.

Enfin, les images AFM enregistrées en mode Tapping® (voir description de l'AFM en Annexe I) permettent de connaître l'état de surface des échantillons nus avant fonctionnalisation.

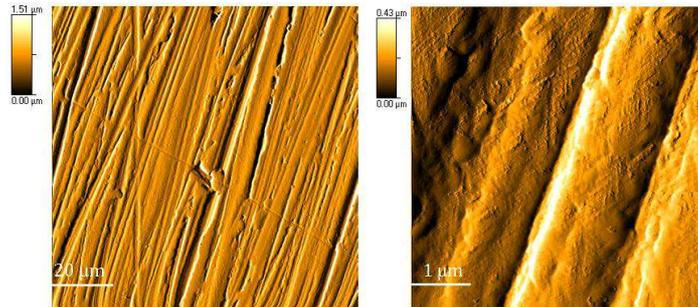


Figure 2 : Images AFM (topographie) de l'échantillon Cu propre de 100 µm x 100 µm (gauche) et 5 µm x 5µm (droite).

L'analyse des images topographiques (Figure 2) permet de calculer la rugosité de la surface de cuivre propre. A grande échelle (100 µm x 100 µm) la rugosité RMS (Root Mean Square ou valeur efficace moyenne) est égale à 0,17 µm. En prenant en compte le fait que le polissage le plus fin est effectué avec une pâte de diamant de granulométrie égale à 0,25 µm, ces mesures de la rugosité moyenne montrent que la surface de travail est une surface plane sans défaut majeur.

En conclusion, le traitement choisi pour polir et nettoyer les surfaces de cuivre avant fonctionnalisation permet d'obtenir des surfaces planes et exposant une couche de Cu₂O, en extrême surface, très peu contaminée par des molécules organiques. L'étape suivante consistera en la fonctionnalisation de cette surface propre de cuivre par une première

couche organique (espaceur) sur laquelle seront greffés, dans un second temps, les peptides et enzymes antibactériens.

II. Adsorption de la couche de MUA et activation des fonctions acides carboxyliques

Après polissage et rinçage, les surfaces sont fonctionnalisés dans des solutions de MUA seul dans l'éthanol. Les surfaces résultant de ce traitement seront appelées **Cu-MUA**. Plusieurs protocoles ont été optimisés afin d'obtenir le meilleur compromis entre la quantité de fonctions acides carboxyliques activées, la stabilité des surfaces de Cu-MUA et la quantité de Magainine I (Mag) ou de lysozyme de blanc d'œuf (HEWL) greffée par la suite. Le Tableau 3 regroupe les différents protocoles d'activation testés en fonction de la solution utilisée et du temps de contact avec les surfaces de Cu-MUA. Les surfaces de Cu-MUA activées seront dans la suite du manuscrit notées **Cu-MUA-act**.

N° expérience	R_{act}	Solution	Concentration en mmol.L⁻¹	Temps de contact
Act1	-	Immersion EDC	C° _{EDC} = 35	90 min
Act2	-	Immersion NHS	C° _{NHS} = 55	90 min
Act3	0,64	Goutte	C° _{EDC} = 35 et C° _{NHS} = 55	90 min
Act4	0,64	Goutte concentrée	C° _{EDC} = 70 et C° _{NHS} = 110	90 min
Act5	0,64	Goutte	C° _{EDC} = 35 et C° _{NHS} = 55	180 min

Tableau 3 : Récapitulatif des différentes optimisations de l'activation des fonctions carboxyles sur Cu-MUA. $R_{act} = C^{\circ}_{EDC}/C^{\circ}_{NHS}$

II.1. Caractérisation par PM-IRRAS

Les échantillons immergés sont analysés après rinçage et séchage à de l'air sec. Les spectres correspondants sont représentés sur la Figure 3.

Sur le premier spectre InfraRouge de la Figure 3 (Cu-MUA) on distingue des bandes de vibrations attribuées aux fonctions acides carboxyliques ($\nu(C=O)$ à 1725 cm^{-1}) et les vibrations d'élongation asymétriques à 1553 cm^{-1} et symétriques entre 1445 et 1426 cm^{-1} des carboxylates [6]. La présence de ces bandes, ajoutée à la détection des bandes relatives aux déformations des $-CH_2$ à 1469 cm^{-1} et aux vibrations d'élongation symétriques et antisymétriques, $\nu(CH_2)$, à 2850 et 2923 cm^{-1} , confirment la présence de molécules de MUA adsorbées à la surface des échantillons de cuivre. La position des bandes de vibrations d'élongations $\nu(CH_2)$ à 2850 et 2923 cm^{-1} indique que les couches de MUA forment une SAM de structure ordonnée [7, 8].

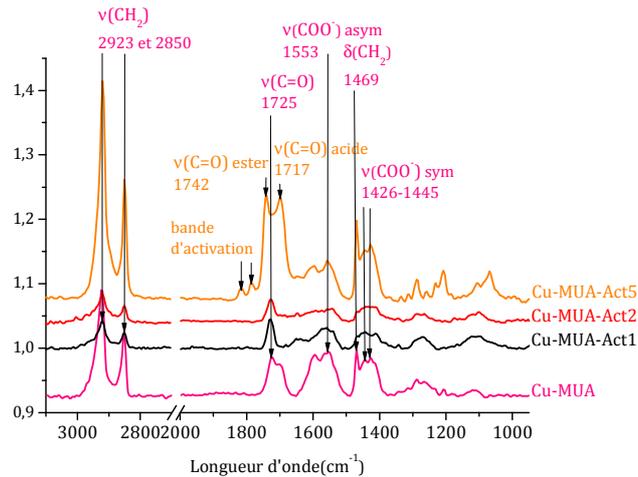


Figure 3 : Spectres PM-IRRAS des surfaces Cu-MUA, Cu-MUA-Act1, Cu-MUA-Act2 et Cu-MUA-Act5.

Après activation des surfaces de Cu-MUA dans des solutions ne contenant qu'EDC ou que NHS (Figure 3-Act1 et Figure 3-Act2), le changement essentiel est une diminution de l'intensité des bandes observables sur le spectre Cu-MUA, probablement due à la dégradation de la surface de cuivre, caractérisée également par une coloration bleue de la solution d'immersion. Les fonctions acides carboxyliques ne sont donc pas activées avec ces 2 méthodes. Lorsque l'activation est effectuée en déposant une goutte d'EDC/NHS pendant 3 heures (Figure 3-Act5), en plus des bandes détectées sur les surfaces de Cu-MUA, apparait une contribution à 1742 cm⁻¹ attribuée aux vibrations d'élongations des C=O des fonctions esters [9] et un doublet à 1785 et 1820 cm⁻¹ attribués aux vibrations symétriques et asymétriques du groupement succinimide [9]. Ces trois bandes confirment la présence du NHS greffé de façon covalente au MUA, le MUA est donc activé. Il est possible de quantifier l'activation en mesurant l'aire de

chacune des bandes liées aux groupements C=O ; le rapport $\frac{C=O_{\text{acides}}}{C=O_{\text{esters}}} = \frac{55}{45}$. Ce

protocole d'activation (Act5) permet donc d'activer environ la moitié des fonctions acides carboxyliques. Nous avons également testé des protocoles de fonctionnalisation de surfaces en utilisant des solutions « mixtes » de MUA (à 25% et à 50%) et de 6-mercaptop-1-hexanol (MHOH) dans l'éthanol afin de diluer les fonctions acides présentes à la surface comme présenté dans des travaux précédents [10-12] (voir Tableau 1). L'étape d'activation, suivant le protocole Act5, sur ces couches mixtes conduit à une désorption partielle des deux molécules thiolées comme l'attestent les spectres PM-IRRAS des couches mixtes et de l'activation (Annexe II-3). Dans la suite du chapitre, nous

détaillerons l'alternative proposée pour réaliser cette dilution : la nanostructuration d'une couche de polymères.

II.2. Caractérisation par XPS

Le spectre XPS général du Cu-MUA (voir Annexe II-4) montre, en plus des pics présents sur les spectres de la surface nue (paragraphe I), un pic attribué au soufre S2p [13], et celui du Cu-MUA-act la présence d'un pic attribué à l'azote N1s [14]. La présence de ces pics confirme l'adsorption du MUA sur le cuivre ainsi que son activation (Figure 4).

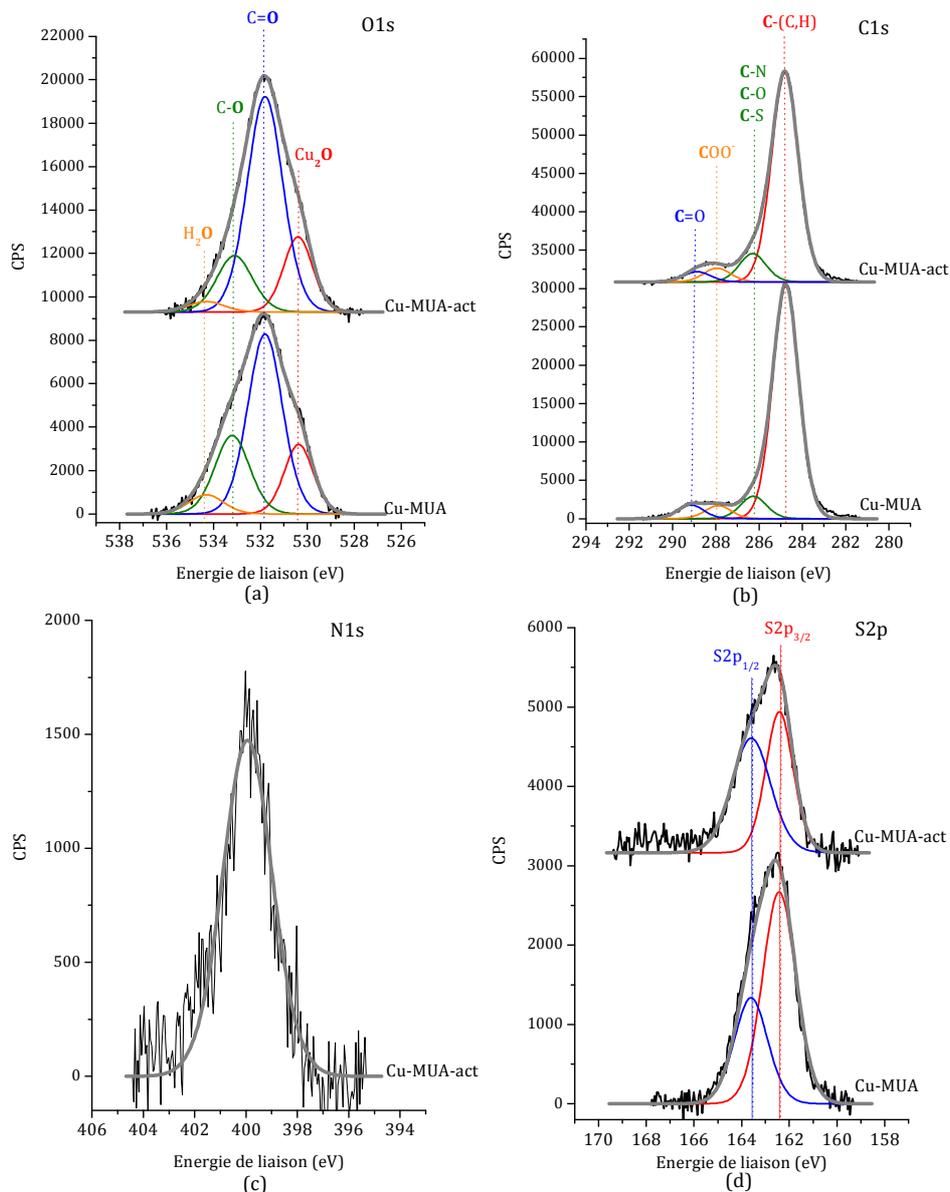


Figure 4 : Spectres XPS haute résolution sur les surfaces Cu-MUA et Cu-MUA-act : (a) O1s, (b) C1s, (c) N1s et (d) S2p.

Le spectre O1s (Figure 4-a) du Cu-MUA est décomposé en 4 contributions : à 530,2 eV se trouvent les atomes d'oxygène impliqués dans l'oxyde de cuivre I en surface [15], les atomes d'oxygène liés doublement au carbone présentent une contribution à 531,8 eV [16] et ceux simplement liés à 533,2 eV [16] ; ces deux contributions confirment la présence des fonctions terminales acides carboxyliques du MUA comme nous avons pu le constater sur le spectre PM-IRRAS (Figure 3). Le pic à 534,3 eV est celui des atomes d'oxygène des molécules d'eau [17, 18]. La présence des contributions liées aux fonctions acides carboxyliques et carboxylates [16, 19, 20] confirme les observations faites sur le spectre PM-IRRAS (Figure 3) quant à la présence simultanée sur la surface de fonctions acides carboxyliques (vibration à 1725 cm⁻¹) et carboxylates (1426 et 1553 cm⁻¹).

Après activation du MUA, seule la fonction acide carboxylique terminale est modifiée : ceci se traduit en théorie par une augmentation de la contribution des C=O, en accord avec la présence de l'ester succinimique en position terminale. Dans le Tableau 4 ci-dessous, nous avons choisi de ne reporter que les pourcentages atomiques « éléments-marqueurs ». Un tableau complet est disponible en Annexe II-5.

Eléments observés	C=O	C-O	C-N, C-O, C-S	COO ⁻	C=O
Energie de liaison	531,8	533,0	286,3	287,9	289,0
Cu-MUA	6,8	3,0	6,4	3,9	3,1
Cu-MUA-act	8,5	2,2	8,5	3,7	4,2

Tableau 4 : Décomposition élémentaire des « éléments marqueurs » de l'activation.

La contribution du pic O1s à 531,8 eV et celle du C1s à 289,0 eV, liées aux liaisons C=O, augmentent en passant de la surface Cu-MUA à Cu-MUA-act et la contribution O1s à 533,0 eV attribuée au C-O diminue confirmant l'activation du MUA adsorbé (Tableau 4). La présence d'un seul pic S2p_{3/2} (Figure 4-d) à 162,5 eV indique que toutes les molécules de MUA s'adsorbent sur le cuivre en formant des liaisons S-Cu [21].

Il est possible d'estimer l'épaisseur moyenne de MUA greffé à la surface des échantillons de cuivre en utilisant la diminution de l'intensité des pics du cuivre et la formule suivante :

$$\frac{I}{I_0} = \exp\left(-\frac{d}{\lambda} \sin\varphi\right)$$

Équation 1 : Calcul de l'épaisseur moyenne d'un film organique à partir de l'atténuation de l'aire du pic des photoélectrons Cu2p.

Avec :

I_0 = intensité du pic Cu2p de l'échantillon Cu nu,

I = intensité du pic Cu2p de l'échantillon Cu-MUA,

d = épaisseur de la couche de MUA,

λ = libre parcours moyen des photoélectrons Cu2p à travers une couche organique, cette valeur est estimée à 35 Å [22],

φ = l'angle entre l'analyseur et la surface (ici, $\varphi = 90^\circ$).

L'épaisseur moyenne de la couche de MUA, calculée grâce à l'Équation 1, est égale à 18 Å, en bon accord avec la longueur de la chaîne de MUA (≈ 15 Å) [23]. Le MUA se greffe donc sur les surfaces de cuivre en formant une monocouche.

II.3. Caractérisation par AFM

Les images AFM nous permettent d'avoir accès à deux informations essentielles. D'une part le signal de topographie informe sur l'homogénéité des couches greffées (présence de « trous », d'agrégats...) et d'autre part, le signal d'adhésion renseigne sur la chimie de la surface.

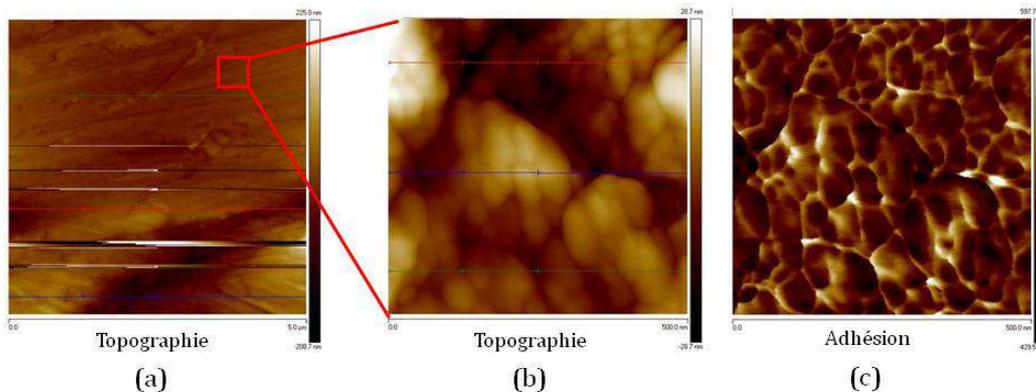


Figure 5 : Images AFM de la surface de Cu-MUA : (a) Topographie (5 µm x 5 µm), (b) Topographie (500 nm x 500 nm) et (c) Adhésion (500 nm x 500 nm).

Les images de topographie (Figure 5-a et Figure 5-b) permettent de calculer la rugosité RMS de la couche de MUA, 0,06 µm. L'image de topographie à 5 µm x 5 µm (Figure 5-a) montre une irrégularité en bas de l'image d'une profondeur d'environ 100 nm (défaut de surface) et celle de l'image à 500 nm x 500 nm (Figure 5-b) met en évidence la présence d'agrégats d'environ 300 nm de largeur et de 15 nm de hauteur. Ces agrégats sont constitués de plusieurs molécules de MUA dont le diamètre moyen est égal à 23 nm, visibles sur l'image de topographie Figure 5-b. Ces mesures sont à moduler en prenant

en compte la convolution de l'ensemble pointe/surface. Néanmoins, les ordres de grandeur sont en accord avec des travaux précédents effectués par Briand *et al.* [24] et Nam *et al.* [25] sur l'adsorption de MUA sur des surfaces d'or. L'absence de variation sur l'image de l'adhésion des couches de MUA (Figure 5-c) indique que la couche de MUA est homogène. Il est possible de distinguer sur l'image à 500 nm x 500 nm (Figure 5-c) les frontières entre les différents clusters de MUA. L'homogénéité des couches de MUA a été largement reportée dans la littérature sur les surfaces d'or [24, 26-28] mais très peu d'études ont été menées sur la caractérisation de ces couches sur les surfaces de cuivre, mises à part quelques unes par microscopie confocale [29] ou microscopie à sonde ionique focalisée (FIB-SIM) [30]. Il est donc intéressant de montrer que la formation de SAMs de MUA sur le cuivre conduit aussi à des monocouches homogènes et assez planes.

III. Adsorption de la couche de HS-PEG-COOH et activation des fonctions acides carboxyliques

Le PEG utilisé dans ces expériences possède une extrémité thiolée et une fonction acide carboxylique terminale. **La chaîne principale est composée de 8 motifs PEG.** Dans la suite du manuscrit cette molécule sera notée HS-PEG-COOH pour la différencier du PEG utilisé sur le titane (voir le Chapitre IV). En utilisant cette molécule dans un protocole de co-greffage, il est possible de cumuler ses propriétés d'espaceur et ses propriétés anti-adhésives [31]. L'adsorption du HS-PEG-COOH a dû être optimisée car le premier protocole testé a conduit à la dissolution partielle de la surface de cuivre (coloration bleue de la solution). Les conditions testées pour optimiser cette étape sont reportées dans le Tableau 5.

N° expérience	Concentration en PEG	Nature du solvant	Atmosphère
PEG1	1 mmol.L ⁻¹	PBS	Ambiante
PEG2	1 mmol.L ⁻¹	Tampon pH 9	Azote
PEG3	2 mmol.L ⁻¹	PBS	Ambiante
PEG4	2 mmol.L ⁻¹	EtOH	Ambiante
PEG5	2 mmol.L ⁻¹	H ₂ O milli-Q	Ambiante
PEG6	2 mmol.L ⁻¹	Tampon pH 9	Ambiante

Tableau 5 : Récapitulatif des différentes optimisations d'adsorption de HS-PEG-COOH.

Les surfaces obtenues après l'adsorption de HS-PEG-COOH sont notées **Cu-PEG**.

Il a été montré que la concentration en EDC et NHS jouait un rôle sur l'activation des fonctions -COOH [32]. Le protocole d'activation des surfaces de Cu-PEG a donc aussi été

optimisé (voir Tableau 6 ci-dessous). Les surfaces de Cu-PEG activées seront dans la suite du manuscrit notées **Cu-PEG-act**.

N° expérience	R_{act}	Solution	Temps de contact
Act1	∞	Immersion EDC	90 min
Act2	0,00	Immersion NHS	90 min
Act6	0,64	Immersion	90 min
Act7	0,32	Immersion	90 min
Act8	0,91	Immersion	90 min
Act9	1,82	Immersion	90 min

Tableau 6 : Récapitulatif des différentes optimisations de l'activation des fonctions carboxyliques sur Cu-PEG. $R_{act} = C^{\circ}_{EDC}/C^{\circ}_{NHS}$.

III.1. Caractérisation par PM-IRRAS de l'adsorption de HS-PEG-COOH

Les spectres PM-IRRAS obtenus après chaque fonctionnalisation par HS-PEG-COOH sont donnés dans l'Annexe II-6. Le protocole choisi après optimisation est le protocole PEG5 : immersion des surfaces de cuivre dans une solution de HS-PEG-COOH dans H₂O milli-Q avec une concentration en HS-PEG-COOH de 2 mmol.L⁻¹ sous atmosphère ambiante. La bande de vibration $\nu(C-O-C)$ à 1110 cm⁻¹, liée au squelette carboné de HS-PEG-COOH, est la plus intense et ces conditions d'accroche de HS-PEG-COOH permettent d'obtenir le meilleur taux de greffage de la Magainine, comme nous le décrirons ci-dessous (Chapitre III-VII).

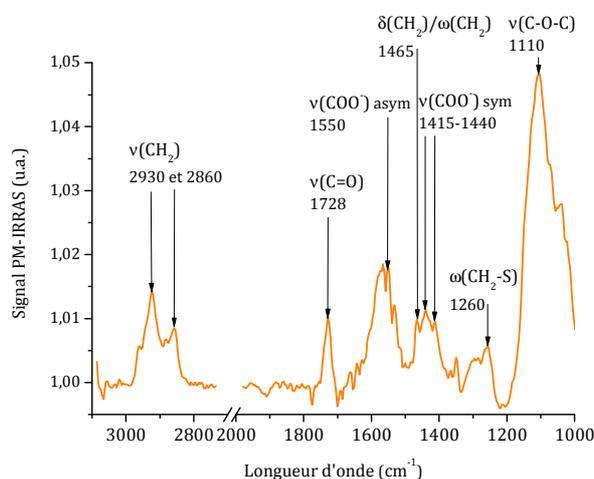


Figure 6 : Spectre PM-IRRAS des surfaces fonctionnalisées par HS-PEG-COOH selon le protocole PEG5.

Sur le spectre PM-IRRAS (Figure 6), les bandes caractéristiques de chaque fonction présente dans la molécule de HS-PEG-COOH sont observées et les attributions sont portées sur la Figure 6 [33] : les bandes de vibrations d'élongation des fonctions acides carboxyliques à 1728 cm⁻¹ et carboxylates à 1550 cm⁻¹ (asymétriques) et à environ 1430

cm^{-1} (symétriques). Il est aussi possible de détecter la vibration de la fonction thiolate ($\omega(\text{CH}_2\text{-S})$) à 1260 cm^{-1} . La détection des bandes de vibration des groupements $-\text{CH}_2$ détectées à 2930 et 2860 cm^{-1} montre que, contrairement aux molécules de MUA, celles de HS-PEG-COOH ne s'adsorbent pas en une structure organisée [7].

III.2. Caractérisation par PM-IRRAS de l'activation des surfaces de Cu-PEG

La Figure 7 présente les spectres infrarouge des surfaces après activation des fonctions acides carboxyliques du HS-PEG-COOH dans les différentes conditions décrites précédemment (Chapitre II-II).

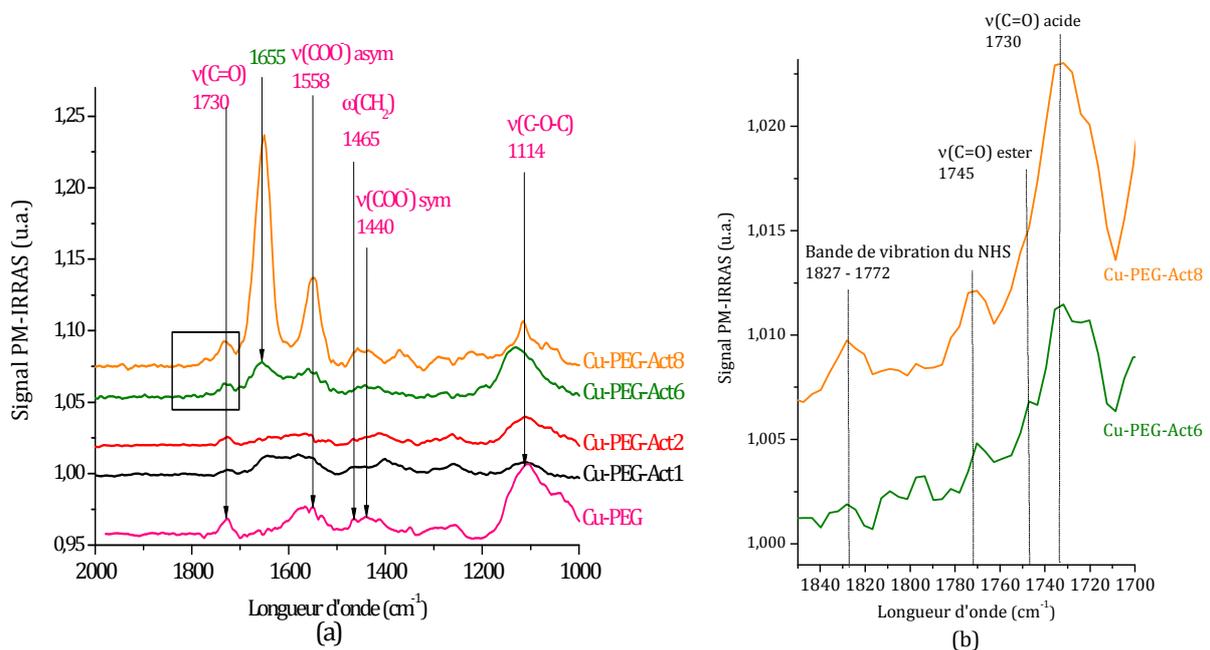


Figure 7 : Spectres PM-IRRAS (a) Optimisation de l'activation des fonctions $-\text{COOH}$ sur Cu-PEG et (b) Grossissement des spectres Cu-PEG-Act6 et Cu-PEG-Act8 entre 1700 et 1850 cm^{-1} .

Après activation dans des solutions ne contenant que l'EDC (Figure 7-a-Act1) ou que le NHS (Figure 7-a-Act2) il n'y a aucun changement observé sur les spectres si ce n'est une diminution de l'intensité de toutes les bandes d'absorption. Comme pour les surfaces de Cu-MUA-Act (Figure 3), cette diminution traduit la désorption d'une partie du HS-PEG-COOH accompagnant une dissolution de la surface de cuivre. Lorsque l'activation se fait par immersion dans une solution contenant EDC et NHS (Figure 7-a-Act6 et Act8), on note l'apparition d'une bande plus ou moins intense à 1655 cm^{-1} , communément attribuée dans la littérature aux vibrations des liaisons $\text{C}=\text{O}$ des fonctions amides (amide I) [34, 35]. Le grossissement des spectres Cu-PEG-Act6 et Cu-PEG-Act8 (Figure 7-b) met en évidence la présence d'une très faible bande de vibration à 1745 cm^{-1} correspondant

aux C=O esters ainsi que deux bandes de vibrations à 1772 et 1827 cm^{-1} liées à l'ester NHS. Ceci suggère la faible activation des HS-PEG-COOH[36]. On peut expliquer la faible intensité de la bande des C=O esters et l'apparition d'une bande à 1655 cm^{-1} par la formation de N-acylurée lors de l'activation des HS-PEG-COOH dû à l'utilisation de fortes concentrations d'EDC et NHS [32, 37].

Dans le reste du manuscrit, les surfaces Cu-PEG sont activées avec le protocole Act6 (immersion des surfaces de cuivre pendant 90 minutes dans une solution de $R_{\text{act}} = 0,64$) car celui-ci permet d'obtenir un bon compromis entre activation des fonctions acides carboxyliques et greffage la Magainine I dans l'étape suivante.

III.3. Caractérisation par XPS

La Figure 8 présente les spectres XPS O1s sur Cu-PEG et Cu-PEG-Act, C1s sur Cu-PEG-Act ainsi que les contributions N1s et S2p sur Cu-PEG-act. La détection du soufre à 162,0 eV [13] et de l'azote à 399,0 eV [14] atteste, respectivement, de l'adsorption du HS-PEG-COOH et de son activation.

La contribution majoritaire des C1s correspondant aux liaisons C-O-C de la chaîne de PEG est attendue à 286,4 eV [33]. Dans notre cas, la contribution majoritaire (71,5% de la totalité du C1s) est celle liée au C-(C, H) à 284,6 eV. De plus, l'évaluation de l'épaisseur moyenne de la couche par la formule de l'Équation 1 donne une valeur de 1,1 Å alors que la longueur du HS-PEG-COOH est évaluée à 21 Å [38].

Ces deux informations indiquent que très peu de HS-PEG-COOH est adsorbé sur les surfaces de cuivre (environ 5% de taux de recouvrement). Le spectre O1s du Cu-PEG a été décomposé en 4 contributions avec une majoritaire à 530,4 eV correspondant aux atomes d'oxygène impliqués dans l'oxyde de cuivre I [15]. Cette forte contribution du cuivre est une preuve supplémentaire du faible taux de recouvrement par le HS-PEG-COOH.

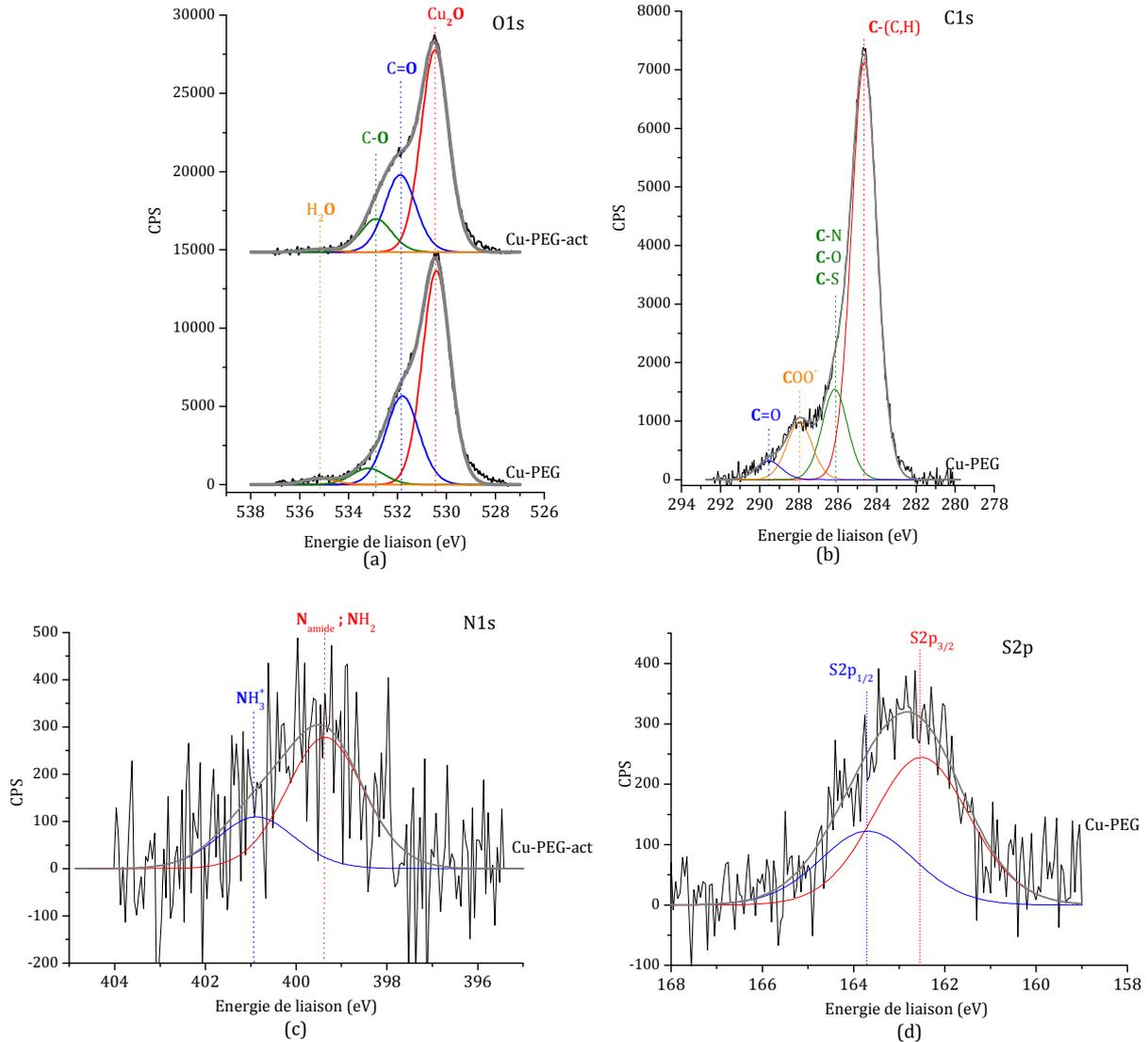


Figure 8 : Spectres XPS haute résolution (a) O1s sur Cu-PEG et Cu-PEG-act, (b) C1s sur Cu-PEG, (c) N1s sur Cu-PEG-act et (d) S2p sur Cu-PEG.

III.4. Caractérisation par AFM

La Figure 9 représente les images AFM de topographie de la surface de Cu-PEG à 5 μm x 5 μm et un agrandissement à 500 nm x 500 nm (topographie et image d'adhésion mécanique) effectué en bordure d'un trou.

Sur la Figure 9-a, on distingue plusieurs inhomogénéités dans la topographie de la couche de HS-PEG-COOH ; notons que d'après les résultats XPS le taux de recouvrement est évalué à 5% ce qui semble être en désaccord avec ce que l'on observe sur l'image AFM. Ceci peut être dû au fait que nous ne présentons qu'une image très locale de la couche de HS-PEG-COOH alors que l'analyse par XPS se fait sur une surface plus grande.

D'autre part, les images AFM se font à l'air, dans ces conditions les chaînes de HS-PEG-COOH sont gonflées d'eau [39], alors que les analyses XPS se font sous ultra haut vide.

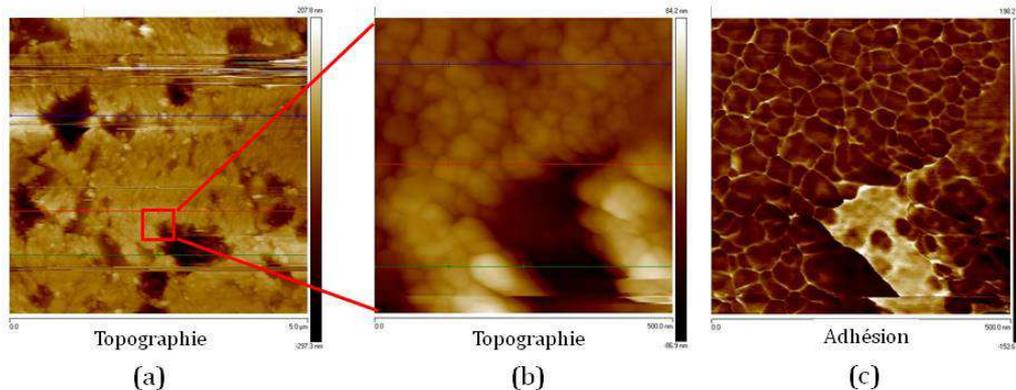


Figure 9 : Images AFM de la surface de Cu-MUA : (a) Topographie (5 µm x 5 µm), (b) Topographie (500 nm x 500 nm) et (c) Adhésion (500 nm x 500 nm).

Sur l'agrandissement de l'image de topographie (Figure 9-b), il est possible de distinguer des agrégats de chaînes de HS-PEG-COOH enroulées sur elles-mêmes dont le diamètre moyen est égal à 40 nm (en prenant en compte la convolution de la pointe). La différence des forces d'adhésion entre les agrégats de HS-PEG-COOH et l'inhomogénéité (Figure 9-c) confirment que cette dernière n'est pas due à un nivellement des couches de HS-PEG-COOH mais à une absence de polymère dans les « trous » et un accès direct à la surface de cuivre. A une concentration de 2 mmol.L⁻¹, le HS-PEG-COOH ne forme pas une couche homogène lors de son greffage [40, 41].

Après nous être intéressés au greffage de deux espaceurs (MUA et HS-PEG-COOH) nous avons greffé sur les surfaces de cuivre des molécules pouvant structurer la couche organique.

IV. Greffage des polymères photosensibles

Nous testons ici une autre méthode pour obtenir des motifs de molécules antibactériennes diluées au sein d'une couche aux propriétés répulsives : nous utiliserons une couche organique pouvant être dégradée partiellement à travers un masque possédant des motifs réguliers. Notre choix s'est porté sur un ensemble de polymères sensibles aux irradiations dans l'UV : les dérivés de poly(méthacrylate de méthyl) ou PMMA (Figure 10).

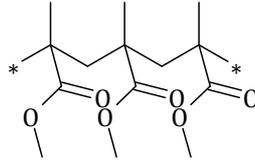


Figure 10 : Représentation semi-développée du PMMA.

IV.1. Caractérisation par PM-IRRAS des différents modes de greffage du PMMA

Plusieurs protocoles de greffage du PMMA ont été testés, les spectres PM-IRRAS des surfaces obtenues après les différents essais et la référence sur or sont présentés dans l'Annexe II-7. La Figure 11 présente le spectre PM-IRRAS après greffage du PMMA sur les surfaces de cuivre selon le protocole retenu pour la suite : intégration de l'espacer PETMP (PentaErythritol-Tetrakis(3-MercaptoPropionate)) dans la synthèse du PMMA qui permet un greffage covalent sur le cuivre. Dans la suite du manuscrit, ces surfaces seront notées **Cu-PMMA**.

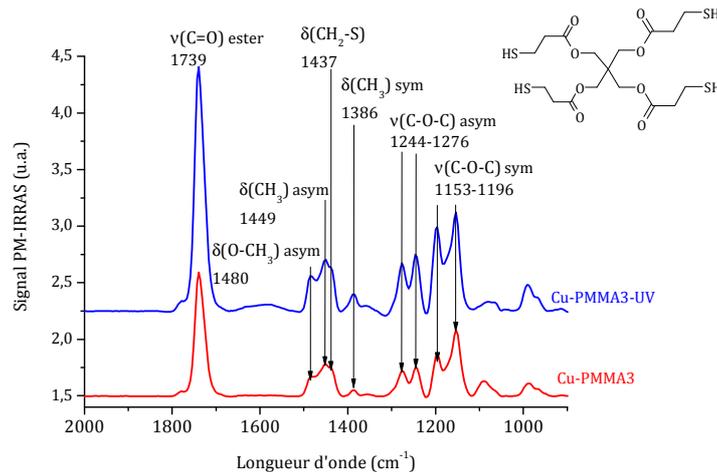


Figure 11 : Spectres PM-IRRAS de Cu-PMMA3 et Cu-PMMA3-UV. Schéma du PETMP.

Sur le spectre InfraRouge (Figure 11, Cu-PMMA3), apparaissent distinctement toutes les bandes de vibrations attendues pour un polymère de PMMA [42-44] : les vibrations d'élongation des liaisons C-O-C ester symétriques entre 1153 et 1196 cm^{-1} et antisymétriques entre 1244 et 1276 cm^{-1} , les déformations du groupements méthyl à 1386 et 1449 cm^{-1} , la déformation de la liaison C-S à 1437 cm^{-1} et la vibration d'élongation de liaison C=O ester à 1740 cm^{-1} . Le PMMA, seul, absorbe les rayons dans l'UV lointain (longueur d'onde inférieure à 308 nm) et très peu à 365 nm (voir Figure 11, Cu-PMMA3-UV), longueur d'onde imposée par la lampe UV utilisée [45]. Il est donc nécessaire d'intégrer un dopant plus sensible comme le 1,3-diphényltriazène ou DPT

[46]. Nous avons donc synthétisé des polymères mixtes PMMA+DPT. Dans un deuxième temps et afin d'intégrer un caractère antiadhésif dans la couche de polymères, nous avons réalisé des copolymères PMMA et PEG (polyéthylène glycol), en conservant l'incorporation du dopant.

IV.2. Caractérisation des polymères « multifonctionnels »

IV.2.a. Caractérisation par PM-IRRAS

Dans un premier temps, un dopant sensible aux irradiations UV (DPT) a été ajouté à la synthèse du HS-PMMA. Les échantillons fonctionnalisés par ce polymère HS-PMMA+DPT sont dans la suite du manuscrit notés **Cu-PMMA3**. La Figure 12 permet de comparer les spectres infrarouge des surfaces Cu-PMMA et Cu-PMMA3.

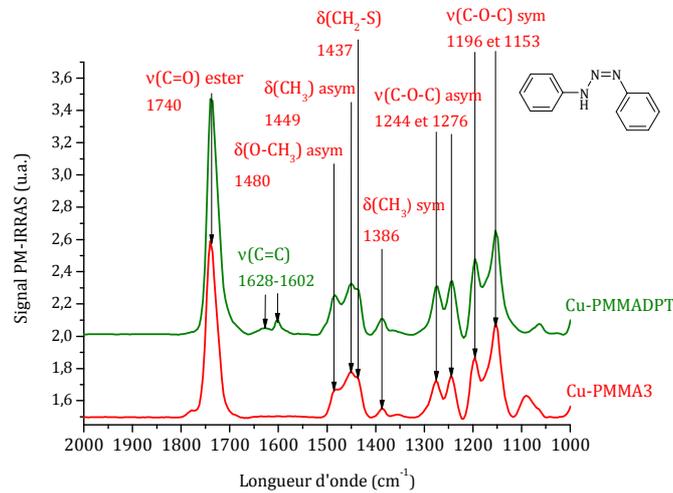


Figure 12 : Spectres PM-IRRAS des surfaces de cuivre fonctionnalisées par HS-PMMA (Cu-PMMA3) et HS-PMMA+DPT (Cu-PMMA3). Schéma du DPT.

Sur le spectre PM-IRRAS des surfaces Cu-PMMA3 (Figure 12) les bandes caractéristiques du PMMA, décrites au paragraphe précédent, sont toutes présentes. Il apparaît deux nouvelles bandes à 1628 cm^{-1} et 1602 cm^{-1} que l'on peut attribuer aux vibrations d'élongation des liaisons doubles C=C aromatiques [47, 48]. La présence de ces deux bandes supplémentaires démontre l'intégration du DPT dans la synthèse du copolymère et l'ensemble du spectre confirme le greffage sur la surface de Cu-PMMA3.

Ensuite, deux PEGs, possédant une extrémité méthacrylate de méthyl (MA-PEG), de différentes longueurs ($n = 4-5$ pour MA-PEG ($M_w = 300 \text{ g.mol}^{-1}$) et $n = 108$ pour MA-PEG ($M_w = 4854 \text{ g.mol}^{-1}$)) ont été copolymérisés avec le PMMA3 (voir conditions dans le

Chapitre II-I). Sur la Figure 13 sont regroupés les spectres infrarouge des surfaces de cuivre fonctionnalisées par les différents copolymères PMMA+MA-PEGs.

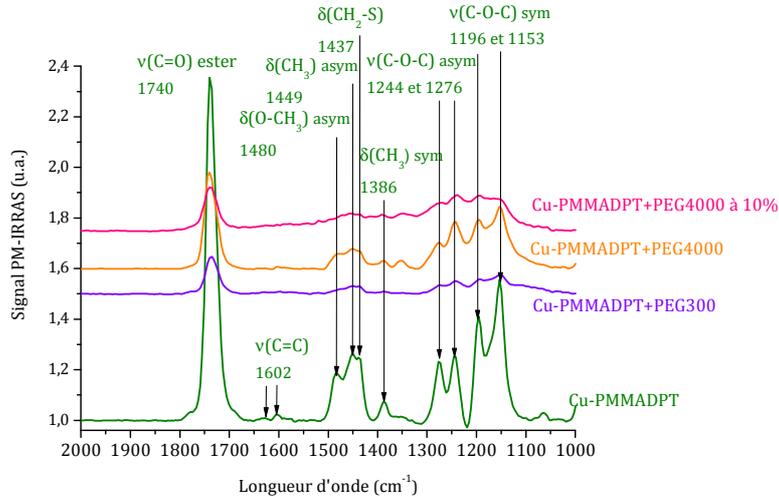


Figure 13 : Comparaison des spectres PM-IRRAS des surfaces de Cu-PMADPT et Cu-PMADPT+MA-PEGs.

Le spectre InfraRouge des échantillons fonctionnalisés par le copolymère PMADPT+MA-PEG ($M_w = 300 \text{ g.mol}^{-1}$) est repéré par la légende **Cu-PMADPT+PEG300** dans la suite du manuscrit. Les spectres du cuivre fonctionnalisé avec le copolymère PMADPT+MA-PEG ($M_w = 4854 \text{ g.mol}^{-1}$) sont labellisés **Cu-PMADPT+PEG4000** pour le copolymère de rapport 1/1 en MMA et MA-PEG et **Cu-PMADPT+PEG4000 à 10%** pour le copolymère de rapport 10/1 en MMA et MA-PEG. Sur les spectres des échantillons fonctionnalisés par les différents copolymères, les bandes caractéristiques des PMADPT sont faibles surtout celles à 1602 cm^{-1} et 1628 cm^{-1} attribuées aux vibrations d'élongation des liaisons C=C du DPT. L'évolution de l'aire des bandes entre 1100 et 1200 cm^{-1} , attribuées aux vibrations d'élongation de la liaison C-O-C, dépend de deux phénomènes opposés : la diminution du nombre de motifs MMA devrait entraîner la diminution de cette bande et l'intégration de MA-PEG une augmentation [38]. La forte diminution de cette bande reflète sans doute la faible intégration des MA-PEGs dans le copolymère. La réduction de l'intensité des bandes C=O_{ester} à 1740 cm^{-1} , qui ne sont présentes que dans les motifs MMA, indique la diminution de la quantité de MMA incorporé dans les copolymères et constitue une première preuve de l'intégration des motifs PEGs. Des mesures d'angle de contact ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de l'intégration des motifs MA-PEGs dans le copolymère.

IV.2.b. Caractérisation par mesure d'angle de contact

Sur la Figure 14 sont comparées les mesures des angles de contact sur les différentes surfaces Cu-PMMADPT+PEGs.

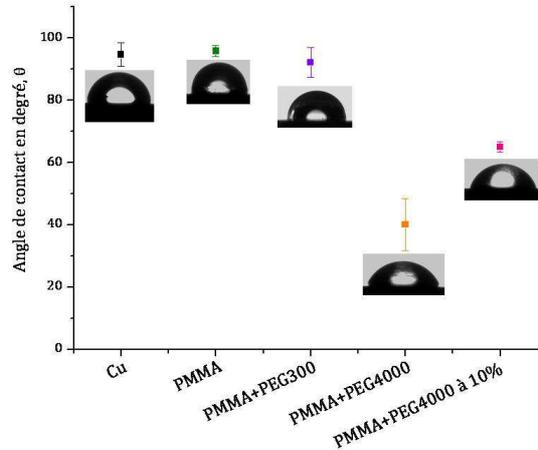


Figure 14 : Comparaison des angles de contact pour les surfaces de Cu nu, Cu-PMMADPT, Cu-PMMA+PEG300, Cu-PMMA+PEG4000 et Cu-PMMA+PEG4000 à 10% (solvant : H₂O milli-Q).

Le solvant utilisé pour ces expériences est l'eau milli-Q, la mesure des angles de contact permet donc de comparer l'hydrophobicité de chaque surface. Plus l'angle de contact est faible, plus la surface présente un caractère hydrophile fort. Les MA-PEGs sont connus pour se gorger d'eau et rendre les surfaces plus hydrophiles que le PMMA, entité hydrophobe et adhésive [49, 50]. L'angle de contact des surfaces Cu-PMMADPT+PEG4000, θ , est égal à $40,0^\circ \pm 3,0^\circ$ et celui des surfaces Cu-PMMADPT+PEG4000-10% à $67,0^\circ \pm 2,0^\circ$. Ces valeurs sont en accord avec les mesures effectuées par d'autres équipes [51, 52] comprises entre 30° et 50° selon la longueur du PEG (30° pour un PEG-5000 et 52° pour un PEG-2000 [51]) et le substrat sur lequel il est déposé (jusqu'à 20° lorsqu'il est greffé sur du poly(éthylène) et 57° sur des échantillons de verre [52]). En comparant avec les mesures effectuées sur les surfaces de cuivre nu ($94,0^\circ \pm 1,2^\circ$), ou les surfaces de Cu-PMMADPT ($97,0^\circ \pm 1,0^\circ$), cette analyse est une nouvelle preuve de l'intégration du MA-PEG4000 dans les deux copolymères. En revanche, les données obtenues sur les surfaces de Cu-PMMADPT+PEG300 ($\theta = 92,0^\circ \pm 2,0^\circ$) montrent que cette surface ne possède pas de caractère hydrophile notable. Ce résultat peut être dû à deux phénomènes indépendants : d'une part, le MA-PEG300 possède une chaîne courte (seulement 4 à 5 motifs). D'autre part, sur le spectre InfraRouge des surfaces Cu-PMMADPT+PEG300 (Figure 13), les intensités des bandes détectées sont très faibles ce qui laisse penser que l'intégration des motifs MA-PEGs courts est encore plus faible que celle des MA-PEGs longs.

Les analyses PM-IRRAS et les mesures d'angle de contact montrent que l'on a pu établir un protocole conduisant à l'incorporation d'un espaceur (PETMP), d'un dopant (DPT) et de motifs antiadhésifs (MA-PEG) dans la synthèse du PMMA. Malgré la faible intégration des motifs MA-PEGS, ceux-ci changent les propriétés de la surface de manière significative.

IV.2.c. Caractérisation par AFM

La Figure 15 permet de faire une comparaison entre les topographies des surfaces de Cu-PMMADPT et Cu-PMMA+PEG4000 à 10% sur des images à 5 μm x 5 μm et 1 μm x 1 μm . Le choix de ces surfaces repose sur leur bonne capacité à se dégrader sous l'effet de l'irradiation UV que nous présenterons dans le paragraphe III-V.

La rugosité RMS des surfaces (calculée à partir des Figure 15-a et Figure 15-b) de Cu-PMMADPT est égale à 0,14 μm et celle de Cu-PMMA+PEG4000 à 10% à 0,06 μm .

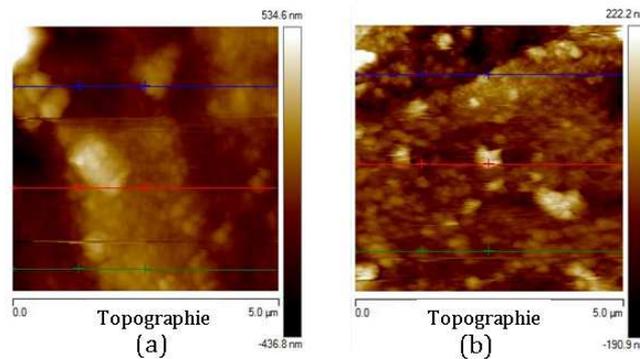


Figure 15 : Image AFM de la topographie (5 μm x 5 μm) : (a) Cu-PMMADPT et (b) Cu-PMMADPT+PEG4000 à 10%.

La comparaison des profils de section montre des variations de hauteur maximales de l'ordre de 500 nm sur Cu-PMMADPT et de seulement 200 nm environ sur Cu-PMMA+PEG4000 à 10%. La diminution de la rugosité, et de la variation de hauteur, sur la surface de Cu-PMMA+PEG4000 à 10% indique que l'intégration de MA-PEG, même faible, dans la structure du polymère mène à des surfaces plus homogènes.

V. Irradiation UV des polymères photosensibles

Dans cette partie, deux méthodes d'irradiation ont été testées : (i) l'irradiation totale des échantillons pour mesurer l'efficacité de l'intégration du dopant et de ce traitement sur la dégradation de la couche de copolymère ; (ii) l'irradiation à travers la grille d'or pour structurer de la couche de copolymère. Les dimensions de cette grille d'or (voir Chapitre

II-I) permettent d'irradier 14% de la surface totale de l'échantillon. Le DPT a une large bande d'absorption entre 300 et 400 nm [46] ; les expériences d'irradiation ont été conduites avec une lampe UV à 365 nm.

Les résultats obtenus après irradiation totale de la surface de cuivre sont présentés comme la différence entre les signaux InfraRouge avant et après irradiation (Figure 16).

Sur la Figure 16, on suit l'évolution de la bande à 1740 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$ ester) caractéristique des PMMA et des deux vibrations à 1628 et 1602 cm^{-1} propres aux liaisons C=C aromatiques du DPT.

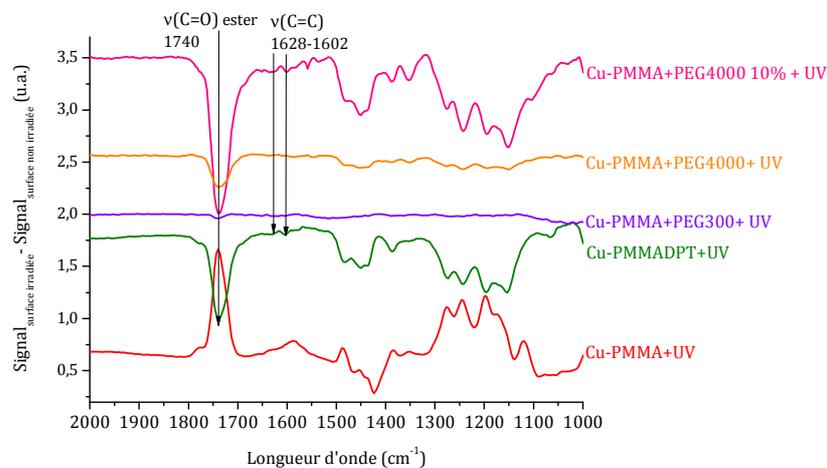


Figure 16 : Spectres infrarouge des surfaces après irradiation et soustraction des spectres avant irradiation : (a) Cu-PMMA, (b) Cu-PMMA+PEG300, (c) Cu-PMMA+PEG4000 et (d) Cu-PMMA+UV à 10%.

Les surfaces de Cu-PMMA+PEG300 sont très peu modifiées après irradiation totale à 365 nm. Cette inertie vis-à-vis de l'irradiation et la faible quantité de PEG300 intégré dans le copolymère (données de l'angle de contact Figure 14) font de ce copolymère un mauvais candidat pour la structuration de la surface de cuivre. En revanche, sur les spectres des surfaces Cu-PMMA, Cu-PMMA+PEG4000 et Cu-PMMA+PEG4000 à 10 % on observe des pics négatifs intenses : ces surfaces se dégradent fortement dans les mêmes conditions. Nous avons vu dans la partie III-IV que les surfaces Cu-PMMA+PEG4000 présentaient le meilleur taux de greffage de copolymère ainsi que le plus fort caractère hydrophile. Cependant, ce copolymère intègre peu de DPT, et donc subit une plus faible dégradation que les deux autres.

Dans la suite du manuscrit, les irradiations et les greffages post-UV se feront uniquement sur les surfaces Cu-PMMA et Cu-PMMA+PEG4000 à 10%.

Ces deux surfaces modifiées ont ensuite été irradiées à travers la grille d'or. La Figure 17 montre les pourcentages de matière dégradée après irradiation totale et irradiation à travers la grille d'or des deux surfaces. L'étude a porté sur la comparaison des aires de la bande ester représentée sur la Figure 16. Les surfaces totalement irradiées sont labellisées « UV » et celles irradiées à travers la grille d'or sont labellisées « grille ».

Sur la Figure 17, on note, comme attendu, une plus grande quantité de copolymère dégradé après irradiation totale qu'à travers la grille : 23% en moyenne de fonctions ester dégradées après irradiation totale et 13% en moyenne après irradiation à travers la grille d'or.

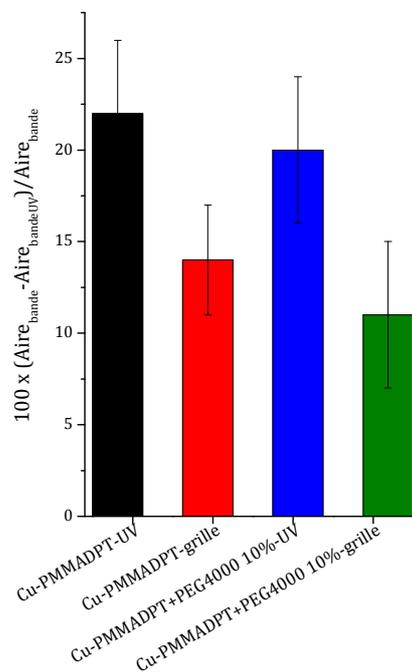


Figure 17 : Pourcentages de matière dégradée après irradiation totale ou à travers la grille d'or, des surfaces Cu-PMADPT et Cu-PMMA+PEG4000 à 10%.

La diminution des aires de bandes mesurées sur Cu-PMADPT-grille et de Cu-PMADPT+PEG4000 10%-grille montrent que malgré la présence de la grille d'or laissant peu de surface accessible (14%) la dégradation est encore efficace. Sur les surfaces irradiées totalement, Cu-PMADPT-UV et CU-PMADPT+PEG4000 10%-UV, nous attendons une dégradation proche de 100% ; or les données expérimentales présentent des résultats très éloignés. Dans les travaux de Bolle *et al.* [46], le DPT est le catalyseur de la dégradation du PMMA : l'irradiation UV entraîne la formation d'un radical benzène qui va ensuite réagir avec les molécules environnantes. La faible quantité de DPT intégré (voir spectre PM-IRRAS Figure 13) ainsi que la dégradation

limitée de celui-ci (voir Figure 16) permettent d'expliquer la différence de résultats entre les données « théoriques » et expérimentales. Enfin, on observe une dégradation du polymère légèrement plus efficace sur les surfaces Cu-PMMA/DPT que sur les surfaces Cu-PMMA/DPT+PEG4000 10%, ceci est lié à un rapport $\frac{\text{PMMA}}{\text{DPT}}$ légèrement différent selon le polymère synthétisé (1,8 dans le PMMA seul et 1,4 dans le copolymère PMMA+PEG4000 10%).

Après irradiation, la rugosité RMS des couches de polymères est abaissée. Pour les surfaces de Cu-PMMA/DPT la rugosité passe de 0,14 μm à 0,09 μm et l'écart maximum des hauteurs observé sur le profil de coupe est de 200 nm sur les surfaces irradiées (500 nm sur les surfaces non irradiées). Cette diminution est due à la dégradation de certains motifs PMMA et au raccourcissement des chaînes de polymères. Pour les surfaces de Cu-PMMA+PEG4000 à 10% le changement de rugosité est moins visible. Ceci est expliqué par la conservation des motifs MA-PEGs qui ne sont pas affectés par l'irradiation UV. L'écart maximum des hauteurs est de 100 nm (300 nm pour les surfaces non irradiées) (voir Annexe II-8).

VI. Adsorption des espaceurs après irradiation UV

Pour faciliter l'accessibilité aux fonctions terminales de l'espaceur quand celui-ci sera greffé, entouré de polymères, une molécule possédant une chaîne carbonnée plus longue que le MUA a été choisie : l'acide 16-mercaptohexadécanoïque (MHA). Cet acide possède une extrémité thiolée qui s'adsorbe directement sur les surfaces de cuivre et une extrémité acide carboxylique pour réagir, une fois activée, avec la Magainine I et l'enzyme HEWL. La Figure 18 représente le spectre PM-IRRAS après greffage du MHA sur les surfaces de cuivre nu. On observe les mêmes bandes de vibrations que sur les surfaces de Cu-MUA : les vibrations d'élongation des acides carboxyliques ($\nu(\text{C=O})$) et des carboxylates ($\nu(\text{COO}^-)$ symétriques et antisymétriques) et les vibrations de la chaîne aliphatique ($\nu(\text{CH}_2)$ et $\delta(\text{CH}_2)$) (voir Figure 3). Deux nouvelles contributions sont détectées, le cisaillement des liaisons $\text{CH}_2\text{-S}$ à 1265 cm^{-1} et la vibration d'élongation des liaisons simples C-O acides à 1130 cm^{-1} .

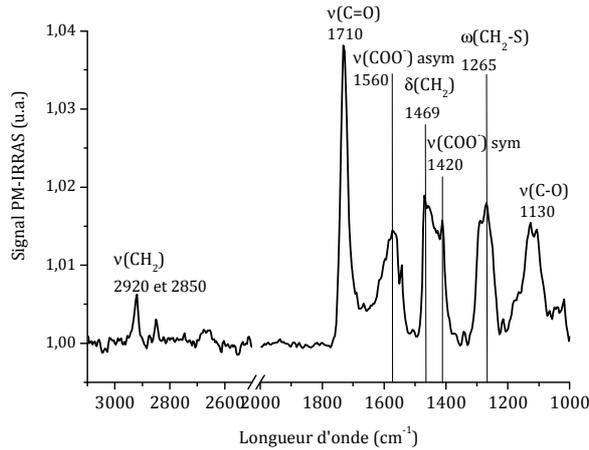


Figure 18 : Spectre PM-IRRAS du Cu-MHA.

Le marqueur du greffage du MHA sur les différentes surfaces est l'aire des bandes $\nu(\text{CH}_2)$ (identifiées sur la Figure 19-a) ; l'évolution des aires de ces bandes infrarouge est représentée sur la Figure 19-b. Les surfaces fonctionnalisées par le MHA seront dans la suite du manuscrit notées **Cu-PMMADPT-MHA** et **Cu-PMMADPT+PEG4000 10%-MHA**.

Les aires des bandes de vibration d'élongation $\nu(\text{CH}_2)$ mesurées sur les surfaces de cuivre fonctionnalisées et irradiées sont comparées à l'aire obtenue sur le cuivre nu : on observe une légère diminution de l'accroche du MHA. Ceci constitue un premier indice sur l'adsorption préférentielle du MHA sur la surface de cuivre.

On observe une diminution de près de 50% du taux de greffage de MHA sur une surface irradiée à travers la grille d'or (PMMA grille), comparé à celui atteint sur une surface irradiée totalement. (PMMA UV). En revanche, l'écart entre l'aire des bandes $\nu(\text{CH}_2)$ mesurée sur « PEG4000 10% grille » et « PEG4000 10% UV » est réduit en raison de la conservation des unités PEGs lors de l'irradiation. D'autre part, la quantité de MHA greffée sur les surfaces Cu-PMMADPT+PEG4000 à 10% est plus importante que sur les surfaces Cu-PMMADPT.

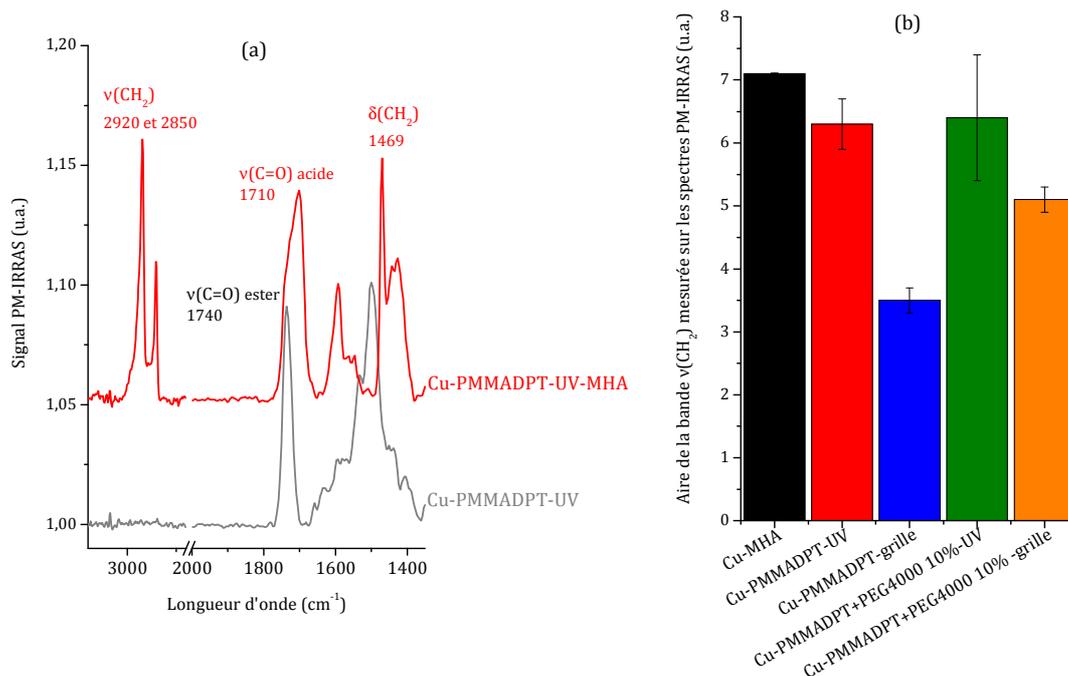


Figure 19 : (a) Comparaison des spectres PM-IRRAS des surfaces Cu-PMMA-DPT-UV avant et après greffage de MHA et (b) Evolution de l'aire de la bande $\nu(\text{CH}_2)$ sur les surfaces irradiées après greffage de MHA.

En comparant ces résultats aux données de la Figure 17, apparaît une corrélation entre la quantité de copolymère retiré et la quantité de MHA greffé. Par contre, il y a en moyenne 2 fois plus de MHA greffé que de copolymère dégradé après irradiation. Il est possible qu'en plus de l'adsorption majoritaire sur la surface de cuivre, les fonctions esters du PMMA restant à la surface réagissent avec l'extrémité thiol du MHA suivant une réaction de transestérification (Figure 20) [53].

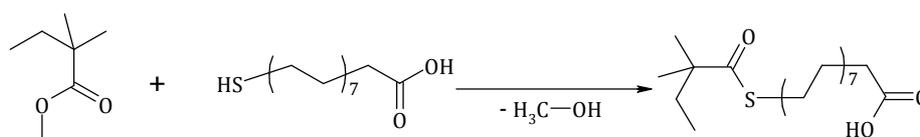


Figure 20 : Réaction de transestérification entre le PMMA et le MHA.

VII. Greffage de la Magainine I et de l'enzyme HEWL sur les surfaces activées

Après avoir greffé et activé les différents espaceurs sur les surfaces de cuivre (Cu-MUA-act, Cu-PEG-act) et préparé les surfaces structurées (Cu-PMMA-DPT-MHA et Cu-PMMA-DPT+PEG4000 10%-MHA irradiées à travers la grille d'or), nous pouvons greffer de manière covalente la Magainine I (Mag) et le lysozyme de blanc d'œuf (HEWL).

VII.1. Greffage covalent de la Magainine I (Mag)

La chimie de chaque surface de cuivre fonctionnalisée dépend de la première couche organique greffée (*i.e.* de l'espaceur utilisé). Nous avons donc adapté le protocole de greffage de la Mag à chaque surface.

VII.1.a. Greffage de la Magainine sur les surfaces de Cu-MUA-act, Cu-MHA et Cu-PEG-act

Le greffage de la Mag sur les surfaces Cu-MUA-act et Cu-PEG-act se fait en déposant une goutte de 100 μL d'une solution de Mag ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) dans H_2O milli-Q pendant 3 heures. Le greffage sur Cu-MHA se fait par dépôt pendant 3 heures d'une goutte de 100 μL de Mag ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) pré-activée avec EDC afin de limiter la dissolution de la surface de cuivre. **Ces surfaces sont notées Cu-MUA-Mag, Cu-PEG-Mag et Cu-MHA-Mag.** Le greffage de la Magainine sur les surfaces de Cu-MHA seul sert de référence pour le greffage de la Magainine sur les surfaces fonctionnalisées avec les copolymères.

VII.1.a.i. Caractérisation par PM-IRRAS

La Figure 21 expose les spectres PM-IRRAS des surfaces de cuivre après greffage de la Mag sur les couches d'espaceurs activés.

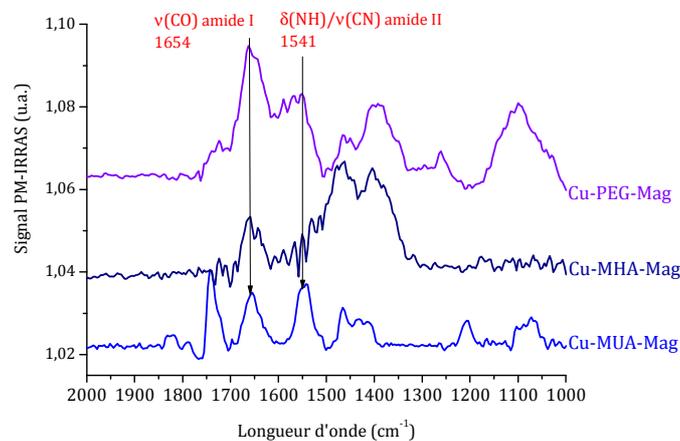


Figure 21 : Spectres PM-IRRAS du greffage de la Magainine I sur les surfaces Cu-MUA-act, Cu-MHA et Cu-PEG-act.

En comparant les spectres PM-IRRAS des surfaces Cu-MUA-act (Figure 3), Cu-PEG-act (Figure 7) et Cu-MHA (Figure 18), on note l'apparition de deux bandes à 1654 cm^{-1} et 1541 cm^{-1} (plus ou moins intenses) respectivement attribuées aux bandes amide I (élongation de $\text{C}=\text{O}$) et amide II (déformation de N-H et élongation C-N) [6, 35, 54, 55] qui confirment le greffage du peptide sur les surfaces Cu-MUA-Mag et Cu-PEG-Mag. La

persistance de la bande de vibration des C=O activés sur Cu-MUA-Mag montre que certaines fonctions activées ne réagissent pas avec la Mag, probablement à cause de l'encombrement stérique des molécules de Mag. En revanche l'intensité de ces marqueurs sur le spectre Cu-MHA-Mag est très faible : il y a très peu de Mag greffée sur les surfaces Cu-MHA. Cette diminution peut être liée par l'augmentation de la longueur de chaîne de l'espaceur qui forme ainsi une couche plus hydrophobe que la couche de Cu-MUA [56].

VII.1.a.ii. Caractérisation par XPS

L'atténuation des signaux relatifs aux éléments cuivre (Cu2p) et soufre (S2p) observée sur les spectres présentés en Annexe II-9 confirme la présence d'une couche supplémentaire à la surface des échantillons. La Figure 22 montre les évolutions des contributions liées aux bandes amides repérées sur le spectre PM-IRRAS (Figure 21).

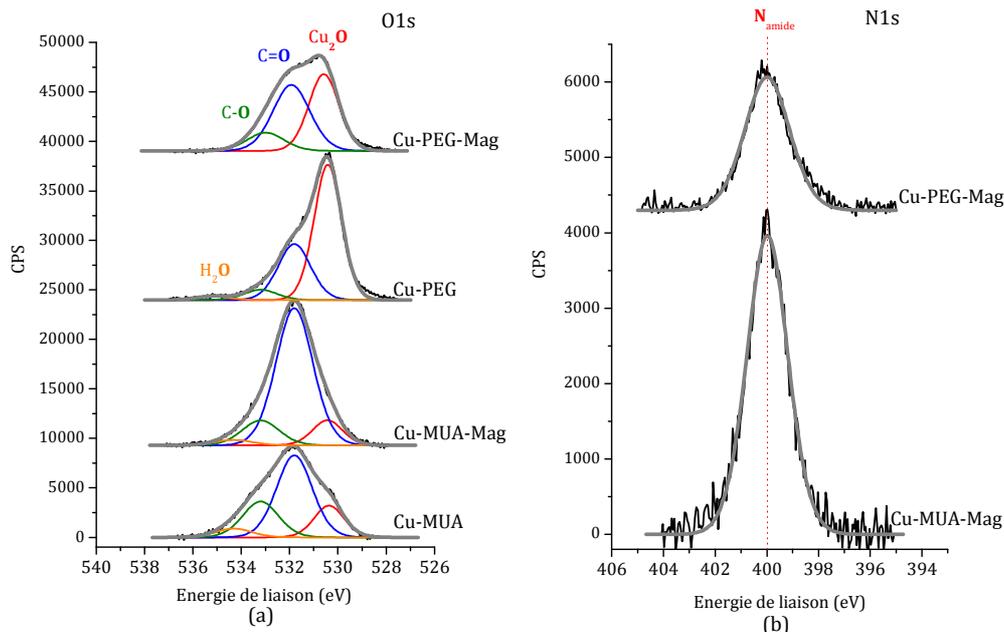


Figure 22 : Spectres XPS haute résolution : (a) Comparaison des spectres O1s avant et après greffage de la Mag et (b) Comparaison des spectres N1s sur Cu-MUA-Mag et Cu-PEG-Mag.

Sur les spectres Cu-MUA-Mag, Figure 22-a, on constate une nette augmentation de la contribution à 532,0 eV (environ 2 fois plus) ainsi que l'apparition du signal des N amides à 400,0 eV [57, 58] (Figure 22-b). Le greffage de la Magainine est attendu par création d'une fonction amide entre la fonction -COOH terminale des espaceurs et une des fonctions -NH₂ latérales du peptide. La création de cette liaison ainsi que les nombreuses liaisons amides de la Magainine doivent augmenter la contribution des C=O

(sur le spectre O1s) détectée à 532,0 eV. Ceci confirme les données InfraRouge et le greffage de la Magainine I sur les surfaces de Cu-MUA.

En comparant les spectres O1s des surfaces Cu-PEG et Cu-PEG-Mag (Figure 22-a), l'augmentation de la contribution des C=O à 532,0 eV est plus mitigée (environ 1,1 fois plus) par contre, on note une forte diminution du signal des atomes d'oxygène dans les oxydes de cuivre à 530,4 eV. Cette diminution traduit sans doute le recouvrement de la surface par des molécules de Magainine. Le greffage de la Mag est aussi confirmé par le signal à 400,0 eV (Figure 22-b) des atomes d'azote des liaisons amides. L'intensité des spectres N1s suggère que la quantité de Magainine I greffée sur les échantillons de Cu-MUA-Mag est environ deux fois plus grande sur Cu-PEG-Mag. En utilisant l'Équation 1, il est possible de déterminer l'épaisseur équivalente de la couche de Mag à 30,2 Å sur les surfaces de Cu-MUA-Mag et à 25,7 Å sur les surfaces de Cu-PEG-Mag. La taille de la Magainine est estimée entre 25 et 30 Å [59] selon la sphère de solvatation, ce qui suggère tout de même la formation d'une monocouche sur les deux surfaces fonctionnalisées.

VII.1.b. Greffage de la Magainine I sur les surfaces de Cu-PMMA-MHA et Cu-PMMA+PEG4000 10%-MHA

Le greffage de la Mag sur les surfaces structurées est réalisé en déposant sur chaque échantillon une goutte de 100 µL d'une solution de Mag contenant de l'EDC pendant 3 heures. **Ces surfaces sont notées Cu-PMMA-(UV ou grille)-MHA-Mag et Cu-PMMA+PEG4000 10%-(UV ou grille)-MHA-Mag.** L'efficacité des greffages est évaluée d'après la comparaison des aires des bandes amides entre 1670 et 1500 cm⁻¹ présentée sur la Figure 23.

La quantité de Mag greffée est plus importante (facteur 2,5 et 1,6) sur les surfaces de Cu-MHA que sur les surfaces fonctionnalisées par des copolymères (Figure 23-b). Sur les surfaces de Cu-PMADPT-MHA, il y a une nette diminution du greffage de la Mag sur les surfaces totalement irradiées et irradiées à travers la grille d'or (50% de moins sur les surfaces irradiées à travers la grille d'or) : ceci est dû à la plus faible quantité d'espaceurs adsorbés sur les surfaces irradiées à travers la grille (Figure 19). Sur les surfaces de Cu-PMADPT+PEG4000-MHA, cette différence est plus faible (environ 10%). La faible quantité de Mag greffée est due à la propriété intrinsèque des motifs MA-

PEGs à piéger de l'eau dans la matrice polymérique [39]. Sous l'effet du gonflement local de ces chaînes, l'accessibilité aux fonctions acides carboxyliques des molécules de MHA est réduite. Enfin, on constate un meilleur taux de greffage sur les surfaces de Cu-PMMADPT-MHA que sur les homologues avec PMMA+PEG4000 à 10% alors que le greffage de MHA est plus important sur les surfaces Cu-PMMA+PEG4000. Cette différence est le résultat de 2 phénomènes : d'une part le gonflement des MA-PEGs décrit précédemment et d'autre part les propriétés adhésives du PMMA qui permet l'adsorption non spécifique de Magainine [60, 61].

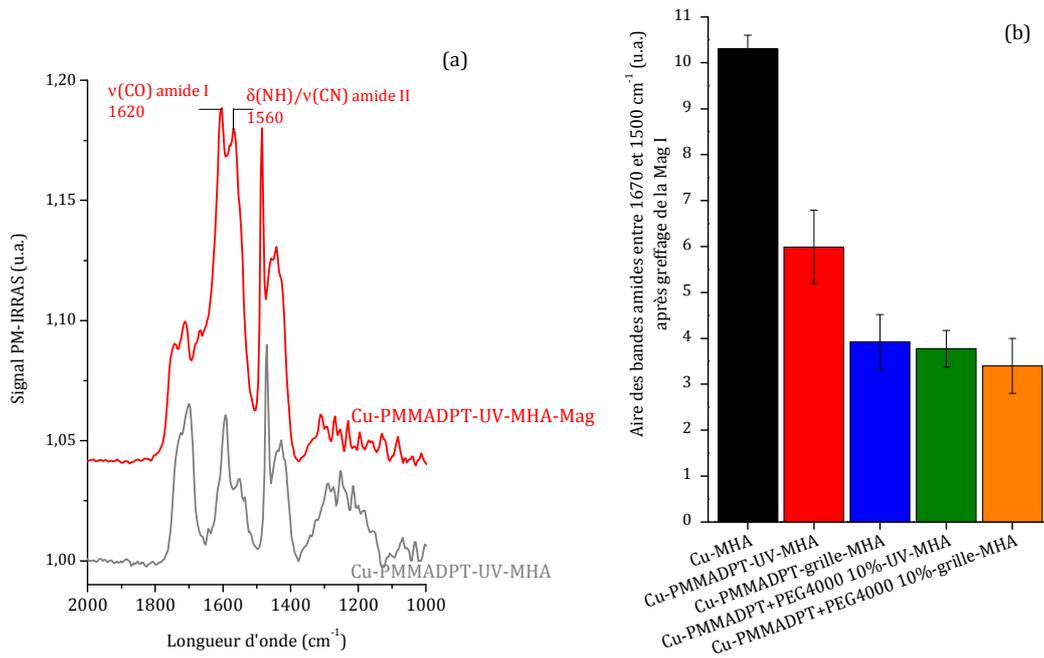


Figure 23 : (a) Comparaison des spectres PM-IRRAS des surfaces Cu-PMMADPT-UV-MHA avant et après greffage de Mag et (b) Evolution de l'aire des bandes amides sur les surfaces fonctionnalisées après greffage de Mag.

Pour remédier à ce problème, il serait opportun de choisir un espaceur similaire aux MUA et MHA mais possédant une chaîne carbonée plus longue et plus rigide afin de conserver une bonne accessibilité aux fonctions terminales.

VII.2. Greffage covalent du lysozyme de blanc d'œuf (HEWL)

Afin de greffer l'HEWL, les différentes surfaces sont immergées pendant une nuit à 4°C dans une solution de HEWL ($C^{\circ}_{\text{HEWL}} = 70 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et EDC ($C^{\circ}_{\text{EDC}} = 35 \text{mmol.L}^{-1}$). Le greffage de l'enzyme a été réalisé sur les surfaces de Cu-PEG et les surfaces fonctionnalisées par les copolymères afin de limiter l'encombrement stérique dû à la présence de fonctions terminales trop proches (*i.e.* les couches de MUA pures).

VII.2.a. Greffage de HEWL sur les surfaces de Cu-PEG

Comme pour les peptides, les principaux marqueurs de la présence d'une enzyme sont les bandes amide I et amide II [62]. Sur le spectre PM-IRRAS des surfaces Cu-PEG-HEWL (Figure 24), apparaissent deux bandes intenses à 1651 cm^{-1} et 1544 cm^{-1} (bandes amide I et amide II) prouvant la présence de l'enzyme HEWL sur les échantillons.

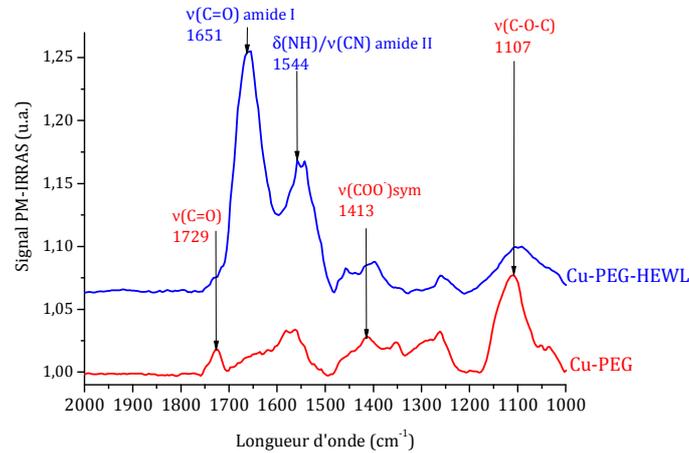


Figure 24 : Spectres PM-IRRAS du Cu-PEG-HEWL.

L'intensité des bandes amides est plus grande que sur les spectres de Cu-PEG-Mag présentés à la Figure 21 d'un facteur 4, en normalisant par rapport à la bande des C-O-C à 1107 cm^{-1} . Cette différence est due au fait que l'enzyme est formée de 129 acides aminés [63] (environ 5 fois plus que la Magainine I [64]). Ce résultat suggère que l'on greffe autant de molécules de Magainine que d'enzyme HEWL.

VII.2.b. Greffage de HEWL sur les surfaces de Cu-PMMA-MHA et Cu-PMMA+PEG4000 10%-MHA

Les spectres obtenus après dépôt de HEWL (présentés Figure 25-a) montrent l'apparition des bandes amides à 1620 cm^{-1} (amide I) et 1560 cm^{-1} (amide II) certifiant la présence de l'enzyme sur les différentes surfaces. Pour une meilleure lisibilité, les données relatives au greffage de HEWL sur les surfaces de Cu-PMMA-MHA et Cu-PMMA+PEG4000-MHA sont représentées sous forme d'histogramme sur la Figure 25-b ci-dessous.

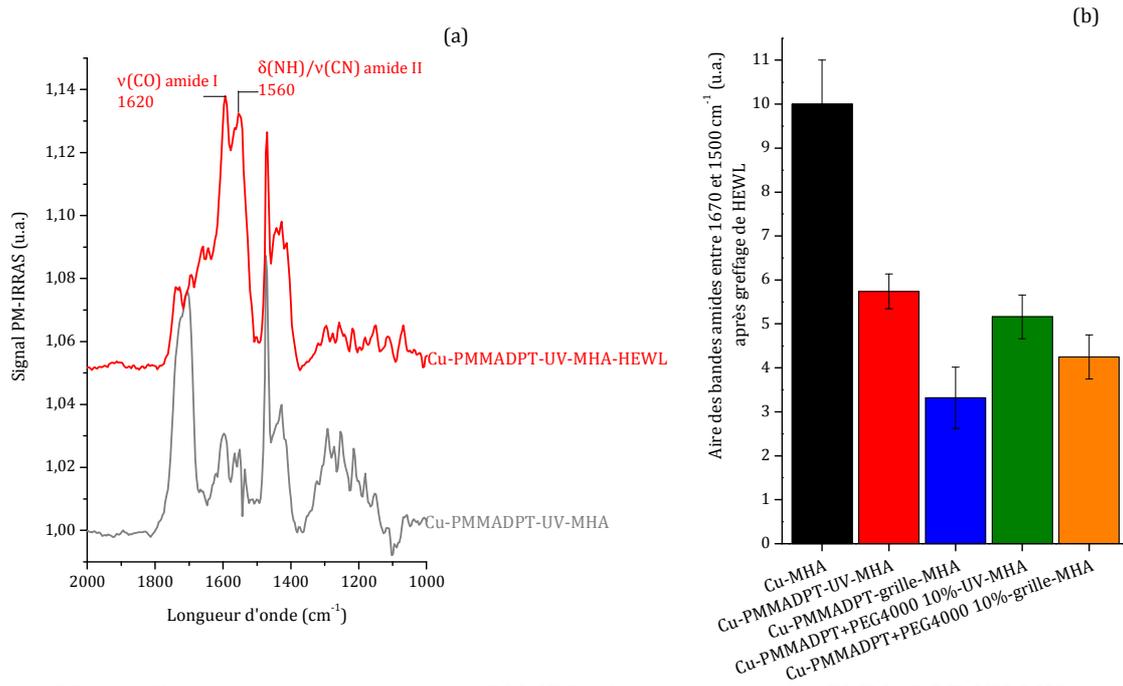


Figure 25 : (a) Comparaison des spectres PM-IRRAS des surfaces Cu-PMMADPT-UV-MHA avant et après greffage de HEWL et (b) Evolution de l'aire des bandes amides sur les surfaces fonctionnalisées après greffage de HEWL.

La quantité maximale de HEWL greffée est obtenue sur les surfaces de Cu-MHA. Sur les surfaces fonctionnalisées par un même copolymère, la quantité de HEWL greffée est plus grande sur les surfaces totalement irradiées. Or, sur ces surfaces, la quantité de MHA greffé est aussi plus importante que sur les surfaces irradiées à travers la grille d'or. D'ailleurs l'évolution du greffage de HEWL est la même que pour l'adsorption du MHA (Figure 19-b). La Figure 25 montre que l'enzyme est aussi moins sensible que la Magainine au gonflement de la chaîne de PEG4000. Ceci est à la fois du à la structure 3D de l'enzyme [65] et à un plus grand nombre d'acides aminés possédant des chaînes latérales aminés (4 pour la Magainine et 27 pour HEWL) permettant à celle-ci de se greffer sur le MHA activé selon plusieurs conformations.

Cette partie VII a permis de mettre en avant la faisabilité du greffage de peptides et d'enzymes sur différentes surfaces. Le taux de Magainine greffée est élevé sur les surfaces de Cu-MUA et plus faible sur Cu-PEG. Sur les surfaces irradiées, le taux de Magainine n'est pas corrélé à la quantité d'espaces adsorbés : la Magainine semble sensible à la chimie et l'organisation de la surface. En revanche, le greffage de l'enzyme est une réussite sur chacune des surfaces étudiées notamment grâce à l'existence de multiples fonctions pouvant réagir avec les fonctions terminales des espaceurs.

VIII. Test d'adsorption de protéines

Le test d'adsorption de protéines est identique pour toutes les surfaces fonctionnalisées : une goutte de 150 μL de BSA est déposée pendant 1 heure sur les surfaces, qui sont ensuite rincées et séchées avant analyse. L'adsorption de la protéine se mesure d'après l'aire des bandes amides entre 1500 et 1670 cm^{-1} , par soustraction du signal de la surface fonctionnalisée à celui de la même surface après dépôt de la goutte de BSA. Ces tests ne sont effectués que sur les surfaces possédant des motifs PEGs connus pour avoir des propriétés antiadhésives.

La Figure 26-a représente les deux spectres PM-IRRAS des surfaces de cuivre nu et de Cu-PEG après immersion dans la solution de BSA et la Figure 26-b permet de comparer les aires des bandes amides mesurées avant et après dépôt de la protéine.

Sur la Figure 26-a, les bandes amides à 1672 et 1548 cm^{-1} sont présentes sur les deux spectres : il y a donc dépôt de BSA sur les deux surfaces. L'adsorption de BSA sur les surfaces de cuivre nu est 3 fois plus forte que sur les surfaces de Cu-PEG (1,53 u.a. pour Cu-BSA et 0,53 u.a. pour Cu-PEG-BSA, Figure 26-b). Ces mesures montrent que le PEG a un effet antiadhésif une fois greffé sur les surfaces de cuivre.

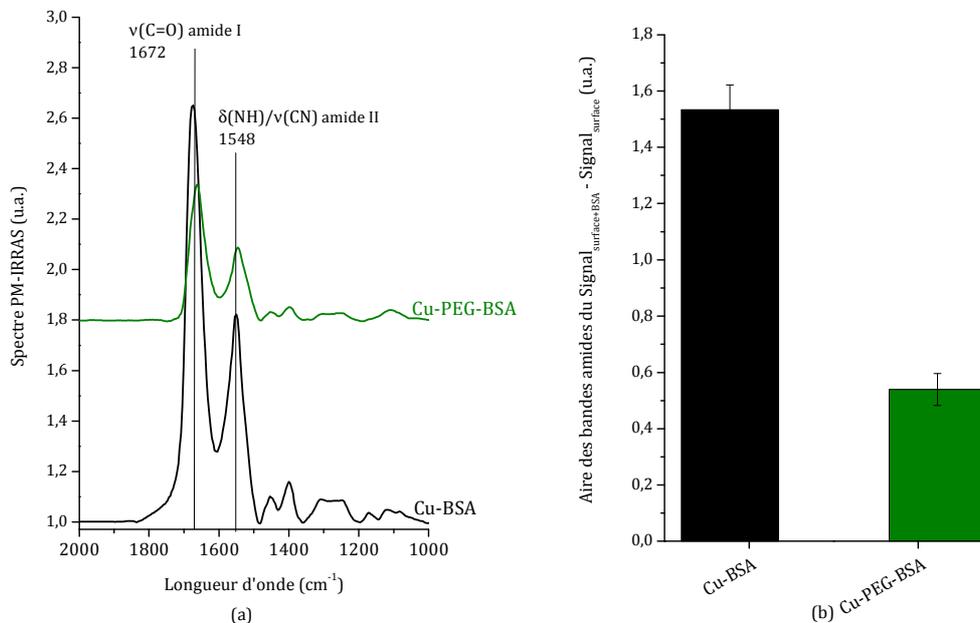


Figure 26 : (a) Spectres infrarouge des surfaces Cu-BSA et Cu-PEG-BSA et (b) Aires des bandes amides sur Cu-BSA et Cu-PEG-BSA.

Comme dans le cas du greffage de la Magainine ou de HEWL sur les surfaces de Cu-PMMA-MHA et Cu-PMMA+PEG4000-MHA, l'adsorption de la protéine est estimée à partir des mesures de l'aire des bandes amides (Figure 27-a). La Figure 27-b représente l'aire des bandes amides mesurées après dépôt de la BSA sur chacune des surfaces de cuivre fonctionnalisées (l'aire de référence est mesurée sur les surfaces de cuivre nu).

Les bandes amides les plus intenses sont observées sur les échantillons de Cu-PMMA ($1,9 \pm 0,1$ u.a.). La BSA s'adsorbe facilement sur ces surfaces en raison du caractère très adhésif des chaînes PMMA [49, 50]. Après irradiation, la couche de PMMA est dégradée et éliminée par le rinçage de la surface ; il y a donc moins de matière adhésive présente sur la surface de cuivre. Ceci se traduit sur la Figure 27, par une diminution de l'aire des bandes amides sur les surfaces Cu-PMMA-UV ($1,3 \pm 0,2$ u.a.). L'aire des bandes amides des surfaces Cu-PMMA-DPT-PEG4000 10%-UV est faible ($0,7 \pm 0,3$ u.a.). Ceci est dû aux propriétés de gonflements des MA-PEGs [39], limitant l'approche et l'adsorption des molécules. Enfin, la mesure d'aire la plus faible est obtenue sur les surfaces de Cu-PMMA+PEG4000-UV ($0,2 \pm 0,01$ u.a.). Cette forte diminution de l'adhésion de la BSA est due à la dégradation du seul motif PMMA et à la conservation des motifs PEGs après irradiation.

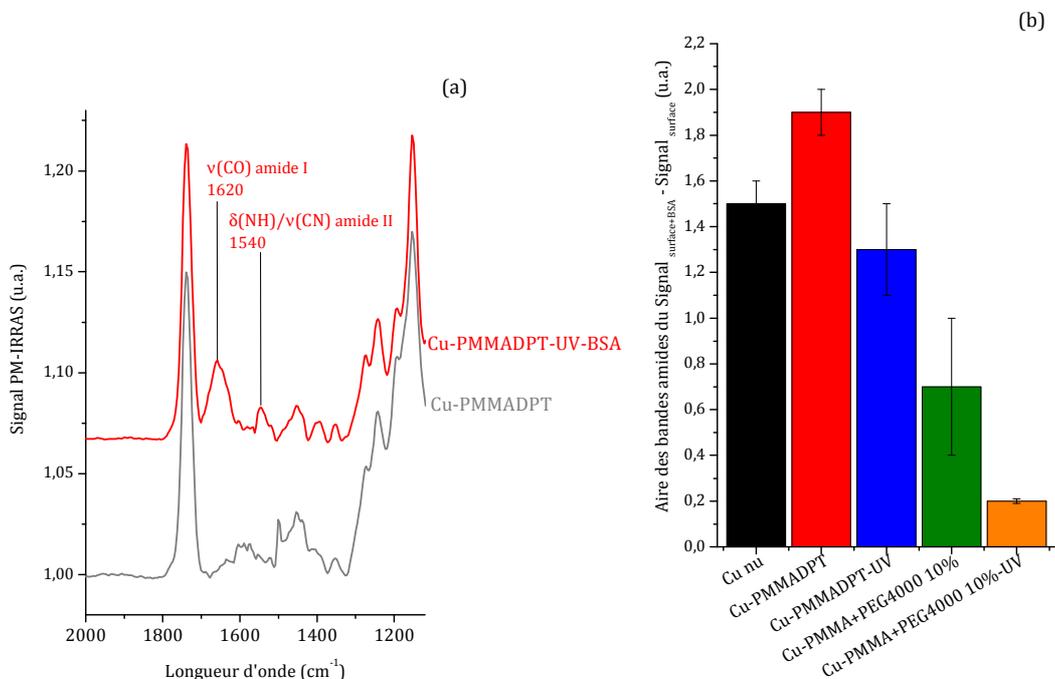


Figure 27 : (a) Comparaison des spectres PM-IRRAS des surfaces Cu-PMMA-DPT-UV-MHA avant et après dépôt de BSA et (b) Evolution de l'aire des bandes amides sur les surfaces fonctionnalisées après dépôt de BSA.

Conclusion

Dans ce chapitre, il des peptides et des enzymes antibactériens ont pu être greffés sur des surfaces de cuivre selon deux protocoles.

La première voie empruntée est celle du greffage successif d'espaceurs et des molécules antibactériennes. Les deux espaceurs choisis sont le MUA, couramment utilisé dans la littérature, et le HS-PEG-COOH qui possède en plus des propriétés antiadhésives. L'adsorption et l'activation de chacun des espaceurs ont été optimisées. Des couches homogènes de MUA, et des couches plus dispersées de HS-PEG-COOH ont été obtenues. Malgré les inhomogénéités des couches de HS-PEG-COOH, l'adsorption de protéines est fortement diminuée sur les surfaces Cu-PEG en comparaison des surfaces de cuivre nu : le HS-PEG-COOH possède un caractère antiadhésif. Après activation des fonctions acides terminales, le greffage de la Magainine et de l'enzyme HEWL sur Cu-MUA sont très satisfaisants ; en revanche le greffage de la Magainine sur Cu-PEG est plus décevant. Afin de réussir à combiner propriétés antiadhésives et greffage de molécules antibactériennes sur les surfaces de cuivre, une seconde stratégie de fonctionnalisation a été mise en place : la création de surfaces structurées par des copolymères photosensibles.

Après optimisation, il a été possible de synthétiser et greffer sur les surfaces de cuivre nu des polymères dérivés du méthacrylate de méthyl (PMMA) possédant à la fois de bonnes propriétés de dégradation par UV (grâce au dopant DPT) et des propriétés antiadhésives (induites par l'introduction de motifs PEGs). Après irradiation à travers une grille d'or de ces polymères, le MHA a été greffé de manière préférentielle sur les espaces laissés vacants après irradiation. Ensuite, le greffage de la Magainine et du HEWL a été mis en évidence par la mesure des aires des bandes amides sur les différentes surfaces. Le gonflement des chaînes MA-PEGs lors du dépôt de la Mag ou de HEWL peut présenter un obstacle au bon greffage des molécules antibactériennes, effet surtout sensible pour la molécule la plus petite, la Magainine.

Lors du test d'adhésion de la BSA, le caractère antiadhésif des unités PEGs à encore une fois été démontré, avec sur les surfaces de Cu-PMMA+PEG4000 10%-UV l'adhésion de la BSA diminuée d'un facteur 7 comparé aux surfaces de cuivre propre.

Dans la dernière partie de cette thèse (Chapitre V) des tests d'adhésion et de croissance bactérienne seront menés. Ces tests permettront de savoir si les surfaces élaborées et étudiées dans ce chapitre ont aussi un effet antiadhésif sur les bactéries et si la Mag et HEWL conservent leur activité antibactérienne une fois greffés de façon covalente aux surfaces de cuivre

Références Bibliographiques

1. K. Ramesh and D. Sastry, *IR and ESR studies of CuO substituted for PbO in eutectic lead vanadate glass system*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2006. **352** p. 5421-5428.
2. N.S. McIntyre and M.G. Cook, *X-Ray Photoelectron Studies on Some Oxides and Hydroxides of Cobalt, Nickel, and Copper*. Analytical Chemistry, 1975. **47** p. 2208-2213.
3. J.P. Tobin, W. Hirschwald, and J. Cunningham, *XPS and XAES Studies of transient enhancement of CuI at CuO surfaces during vacuum outgassing*. Applications of Surface Science, 1983. **16** p. 441-452.
4. G. Moretti and P. Porta, *Application of the Auger parameter in the characterization of small copper particles supported on insulators*. Surface Science, 1993. **287-288** p. 1076-1081.
5. G. Panzner, B. Egert, and H.P. Schmidt, *The stability of CuO and Cu₂O surfaces during argon sputtering studied by XPS and AES*. Surface Science, 1985. **151** p. 400-408.
6. V. Humblot, J.-F. Yala, P. Thebault, K. Boukerma, A. Héquet, J.-M. Berjeaud, and C.-M. Pradier, *The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers*. Biomaterials, 2009. **30** p. 3503-3512.
7. E. Briand, M. Salmain, J.-M. Herry, H. Perrot, C. Compère, and C.-M. Pradier, *Building of an immunosensor: how can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency?* Biosensors & Bioelectronics, 2006. **22** p. 440-448.
8. R.G. Nuzzo, L.H. Dubois, and D.L. Allara, *Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 1. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers*. Journal of the American Chemical Society, 1990. **112** p. 558-569.
9. M. Yang, R.L.M. Teeuwen, M. Giesbers, J. Baggerman, A. Arafat, F.A. De Wolf, J.C.M. Van Hest, and H. Zuilhof, *One-Step Photochemical Attachment of NHS-Terminated Monolayers onto Silicon Surfaces and Subsequent Functionalization*. Langmuir, 2008. **24** p. 7931-7938.
10. E. Briand, M. Salmain, C. Compère, and C.-M. Pradier, *Immobilization of Protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2006. **53** p. 215-224.
11. F. Frederix, K. Bonroy, W. Laureyn, G. Reekmans, A. Campitelli, W. Dehaen, and G. Maes, *Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold*. Langmuir, 2003. **19** p. 4351-4357.
12. N. Patel, M.C. Davies, M. Hartshorne, R.J. Heaton, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, and P.M. Williams, *Immobilization of Protein Molecules onto Homogeneous and Mixed Carboxylate-Terminated Self-Assembled Monolayers*. Langmuir, 1997. **13** p. 6485-6490.

13. A. Galtayries and J. Grimblot, *Formation and electronic properties of oxide and sulphide films of Co , Ni and Mo studied by XPS*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 1999. **99** p. 267-275.
14. R.J.J. Jansen and H. Van Bekkum, *XPS of nitrogen-containing functional groups on activated carbon*. Carbon, 1995. **33** p. 1021-1027.
15. T.L. Barr, *An ESCA study of the termination of the passivation of elemental metals*. Journal of Physical Chemistry, 1978. **82** p. 1801-1810.
16. J.J. Chance and W.C. Purdy, *Fabrication of Carboxylic Acid-Terminated Thin Films Using Poly(ethyleneimine) on a Gold Surface*. Langmuir, 1997. **13** p. 4487-4489.
17. S.D. Gardner, C.S.K. Singamsetty, G.L. Booth, G.-R. He, and C.U. Pittman, *Surface characterization of carbon fibers using angle-resolved XPS and ISS*. Carbon, 1995. **33** p. 587-595.
18. B. Stypula and J. Stoch, *The characterization of passive films on chromium electrodes by XPS*. Corrosion Science, 1994. **36** p. 2159-2167.
19. N. Moncoffre, G. Hollinger, H. Jaffrezic, G. Marest, and J. Tousset, *Temperature influence during nitrogen implantation into steel*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 1985. **7-8** p. 177-183.
20. D. Rats, L. Vandenbulcke, R. Herbin, R. Benoit, R. Erre, V. Serin, and J. Sevely, *Characterization of diamond films deposited on titanium and its alloys*. Thin Solid Films, 1995. **270** p. 177-183.
21. D.G. Castner, K. Hinds, and D.W. Grainger, *X-ray Photoelectron Spectroscopy Sulfur 2p Study of Organic Thiol and Disulfide Binding Interactions with Gold Surfaces*. Langmuir, 1996. **12** p. 5083-5086.
22. P.E. Laibinis, C.D. Bain, and G.M. Whitesides, *Attenuation of photoelectrons in monolayers of n-alkanethiols adsorbed on copper, silver, and gold*. Journal of Physical Chemistry, 1991. **95** p. 7017-7021.
23. A.D. Vogt, T. Han, and T.P. Beebe, *Adsorption of 11-Mercaptoundecanoic Acid on Ni (111) and Its Interaction with Probe Molecules*. Langmuir, 1997. **13** p. 3397-3403.
24. E. Briand, C. Gu, S. Boujday, M. Salmain, J.M. Herry, and C.-M. Pradier, *Functionalisation of gold surfaces with thiolate SAMs : Topography/bioactivity relationship - A combined FT-RAIRS , AFM and QCM investigation*. Surface Science, 2007. **601** p. 3850-3855.
25. Y.S. Nam, K.-W. Park, W.H. Lee, and J.-W. Choi, *Fabrication and electrical characteristics of ferredoxin adsorbed poly-L-lysine/11-MUA hetero-self-assembly layer*. Materials Science and Engineering C, 2004. **24** p. 95-98.
26. S. Ip, J.K. Li, and G.C. Walker, *Phase Segregation of Untethered Zwitterionic Model Lipid Bilayers Observed on Mercaptoundecanoic-Acid-Modified Gold by AFM Imaging and Force Mapping*. Langmuir, 2010. **26** p. 11060-11070.
27. X. Ding, J. Hu, and Q. Li, *Direct electrochemistry and superficial characterization of DNA-cytochrome c-MUA films on chemically modified gold surface*. Talanta, 2006. **68** p. 653-658.
28. J. Stettner, P. Frank, T. Griesser, G. Trimmel, R. Schennach, E. Gilli, and A. Winkler, *A Study on the Formation and Thermal Stability of 11-MUA SAMs on Au (111)/ Mica and on Polycrystalline Gold Foils*. Langmuir, 2009. **25** p. 1427-1433.
29. H.-S. Choi, Y. Kang, H. Lee, and C. Lee, *Photopatterning of gold and copper surfaces by using self-assembled monolayers*. Current Applied Physics, 2007. **7** p. 522-527.

30. Z. Wang, Z. Liu, H. Jiang, and X.W. Wang, *Bottom-up fill mechanisms of electroless copper plating with addition of mercapto alkyl carboxylic acid*. Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures, 2006. **24** p. 803-806.
31. K.D. Park, Y.-S. Kim, D.K. Han, Y.-H. Kim, E.H.B. Lee, H. Suh, and K.S. Choi, *Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces*. Biomaterials, 1998. **19** p. 851-859.
32. S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J.N. Chazalviel, A.C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, N. Gabouze, and S. Djebbar, *Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces*. Langmuir, 2009. **26** p. 809-814.
33. A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, M. Salmain, and C.-M. Pradier, *Grafting of lysozyme and/or poly(ethylene glycol) to prevent biofilm growth on stainless steel surfaces*. Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113** p. 2101-2109.
34. A. Dong, P. Huang, and W.S. Caughey, *Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra*. Biochemistry, 1990. **29** p. 3303-3308.
35. T. Miyazawa and E.R. Blout, *The Infrared Spectra of Polypeptides in Various Conformations: Amide I and II Bands*. Journal of the American Chemical Society, 1961. **83** p. 712-719.
36. J. Spadavecchia, S. Boujday, J. Landoulsi, and C.-M. Pradier, *nPEG-TiO₂ Nanoparticles: A Facile Route to Elaborate Nanostructured Surfaces for Biological Applications*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2011. **3** p. 2637-2642.
37. C. Wang, Q. Yan, H.-B. Liu, X.-H. Zhou, and S.-J. Xiao, *Different EDC/NHS Activation Mechanisms between PAA and PMAA Brushes and the Following Amidation Reactions*. Langmuir, 2011. **27** p. 12058-12068.
38. S. Svedhem, C.A. Hollander, J. Shi, P. Konradsson, B. Liedberg, and S.C. Svensson, *Synthesis of a series of oligo(ethylene glycol)-terminated alkanethiol amides designed to address structure and stability of biosensing interfaces*. Journal of Organic Chemistry, 2001. **66** p. 4494-4503.
39. O.-J. Kwon, S.-T. Oh, S.-D. Lee, N.-R. Lee, C.-H. Shin, and J.-S. Park, *Hydrophilic and flexible polyurethane foams using sodium alginate as polyol: effects of PEG molecular weight and cross-linking agent content on water absorbency*. Fibers and Polymers, 2007. **8** p. 347-355.
40. S. Jo and K. Park, *Surface modification using silanated poly(ethylene glycol)s*. Biomaterials, 2000. **21** p. 605-616.
41. S. Sharma, R.W. Johnson, and T.A. Desai, *XPS and AFM analysis of antifouling PEG interfaces for microfabricated silicon biosensors*. Biosensors & Bioelectronics, 2004. **20** p. 227-239.
42. H. Bi, S. Meng, Y. Li, K. Guo, Y. Chen, J. Kong, P. Yang, W. Zhong, and B. Liu, *Deposition of PEG onto PMMA microchannel surface to minimize nonspecific adsorption*. Lab on a Chip, 2006. **6** p. 769-775.
43. R.H.G. Brinkhuis and A.J. Schouten, *Thin-Film Behavior of Poly (methyl methacrylates). 2 . An FT-IR Study of Langmuir-Blodgett Films of Isotactic PMMA*. Macromolecules, 2000. **24** p. 1496-1504.
44. Z. Kong, Z. Luo, Z. Fu, and Y. Shi, *Synthesis of amphiphilic heteroarm star-shaped polymer by the use of polyfunctional chain-transfer agent via conventional free radical polymerization*. Acta Polymerica Sinica, 2008. **2** p. 102-106.
45. E. Sutcliffe and R. Srinivasan, *Dynamics of UV laser ablation of organic polymer surfaces*. Journal of Applied Physics, 1986. **60** p. 3315-3322.

46. M. Bolle, K. Luther, and J. Troe, *Photochemically assisted laser ablation polymethylmethacrylate*. Applied Surface Science, 1990. **46** p. 279-283.
47. R.A. Ando, A.P.V. dos Santos, M. Hörner, and P.S. Santos, *Bichromophoric behavior of nitrophenyl-triazene anions: a resonance Raman spectroscopy investigation*. Journal of Raman Spectroscopy, 2008. **39** p. 607-610.
48. E. Fereyduni, M.K. Rofouei, M. Kamaee, S. Ramalingam, and S.M. Sharifkhani, *Single crystal structure, spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹H NMR, ¹³C NMR) studies, physico-chemical properties and theoretical calculations of 1-(4-chlorophenyl)-3-(4-nitrophenyl)triazene*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2012. **90** p. 193-201.
49. S. Sihn, Y. Miyano, M. Nakada, and S.W. Tsai, *Time- and Temperature-Dependent Failures of a Metal-to-Composites Bonded Joint with PMMA Adhesive Material*. Journal of Composite Materials, 2003. **37** p. 35-54.
50. A. Schmidt, A. Clifton, W. Ehrfeld, G. Feiertag, H. Lehr, and M. Schmidt, *Investigation of the Adhesive Strength of PMMA Structures on Substrates obtained by Deep X-ray Lithography*. Microelectronic Engineering, 1996. **30** p. 215-218.
51. O. Mert, E. Doganci, H.Y. Erbil, and A.S. Demir, *Surface Characterization of Poly(l-lactic acid)-Methoxy Poly(ethylene glycol) Diblock Copolymers by Static and Dynamic Contact Angle Measurements, FTIR, and ATR-FTIR*. Langmuir, 2008. **24** p. 749-757.
52. E. Kiss, J. Samu, A. Toth, and I. Bertoti, *Novel Ways of Covalent Attachment of Poly(ethylene oxide) onto Polyethylene: Surface Modification and Characterization by XPS and Contact Angle Measurements*. Langmuir, 1996. **12** p. 1651-1657.
53. D.E. Ponde, V.H. Deshpande, V.J. Bulbule, and A. Sudalai, *Selective Catalytic Transesterification, Transthiol esterification and Protection of Carbonyl Compounds over Natural Kaolinitic Clay*. Journal of Organic Chemistry, 1998. **63** p. 1058-1063.
54. S.Y. Venyaminov and N.N. Kalnin, *Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous proteins in α -, β -, and random coil conformations*. Biopolymers, 1990. **30** p. 1259-1271.
55. R.J. Jakobsen, F.M. Wasacz, J.W. Brasch, and K.B. Smith, *The relationship of bound water to the IR amide I bandwidth of albumin*. Biopolymers, 1986. **25** p. 639-654.
56. K. Grundke, S. Zschoche, K. Pöschel, T. Gietzelt, S. Michel, P. Friedel, D. Jehnichen, and A.W. Neumann, *Wettability of Maleimide Copolymer Films : Effect of the Chain Length of n-Alkyl Side Groups on the Solid Surface Tension*. Macromolecules, 2000. **34** p. 6768-6775.
57. C.M. Whelan, F. Cecchet, R. Baxter, F. Zerbetto, G.J. Clarkson, D.A. Leigh, and P. Rudolf, *Adsorption of a Benzylic Amide Macrocycle on a Solid Substrate: XPS and HREELS Characterization of Thin Films Grown on Au(111)*. Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106** p. 8739-8746.
58. Y. Cho and A. Ivanisevic, *TAT Peptide Immobilization on Gold Surfaces: A Comparison Study with a Thiolated Peptide and Alkylthiols Using AFM, XPS, and FT-IRRAS*. Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109** p. 6225-6232.
59. S.J. Ludtke, K. He, W.T. Heller, T.A. Harroun, L. Yang, and H.W. Huang, *Membrane pores induced by magainin*. Biochemistry, 1996. **35** p. 13723-13728.
60. K. Fuchigami, K. Ikemura, and K. Ichizawa, *Novel, multi-purpose, PMMA-type adhesive resin with newly synthesized microcapsule of radical polymerization initiators*. Dental Materials Journal, 2008. **27** p. 35-48.

61. H.-H. Chu, W.-L. Chiang, and K.S. Chuang, *Viscoelastic and adhesive properties of PMMA-b-PtBA with tackifier*. International Journal of Adhesion and Adhesives, 2012. **38** p. 89-94.
62. M. Karayianni, S. Pispas, G.D. Chryssikos, V. Gionis, S. Giatrellis, and G. Nounesis, *Complexation of Lysozyme with Poly (sodium (sulfamate-carboxylate) isoprene)*. Biomacromolecules, 2011. **12** p. 1697-1706.
63. R.E. Canfield and A.K. Liu, *The disulfide bond of egg white lysozyme (muramidase)*. Journal of Biological Chemistry, 1965. **240** p. 1997-2002.
64. H. Duclohier, G. Molle, and G. Spach, *Antimicrobial peptide magainin I from Xenopus skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers*. Biophysical Journal, 1989. **56** p. 1017-1021.
65. C.C.F. Blake, D.F. Koenig, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, and V.R. Sarma, *Structure of hen egg white lysozyme*. Nature, 1965. **4986** p. 757-761.

Chapitre IV :
Fonctionnalisation du
titane et test d'adsorption
de protéines

Afin d'obtenir des surfaces de titane aux propriétés antibactériennes, deux voies de fonctionnalisation ont été explorées : le greffage d'un dérivé silanisé (l'APTES ou (3-aminopropyl)triéthoxysilane) et le greffage d'une couche de catéchol (Cat ou acide 3,4-dihydroxyphenylacétique) puis d'un poly(éthylène glycol) (H₂N-PEG-NH₂). Les deux types de couches adsorbées seront utilisés pour greffer de manière covalente les molécules antibactériennes : le peptide, Magainine I et l'enzyme, HEWL (Hen Egg White Lysozyme). Dans le cas de l'enzyme, une couche supplémentaire a été greffée entre le H₂N-PEG-NH₂ et HEWL : le téréphtalaldéhyde (Téré). Ces deux stratégies sont schématisées sur la Figure 1 ci-dessous.

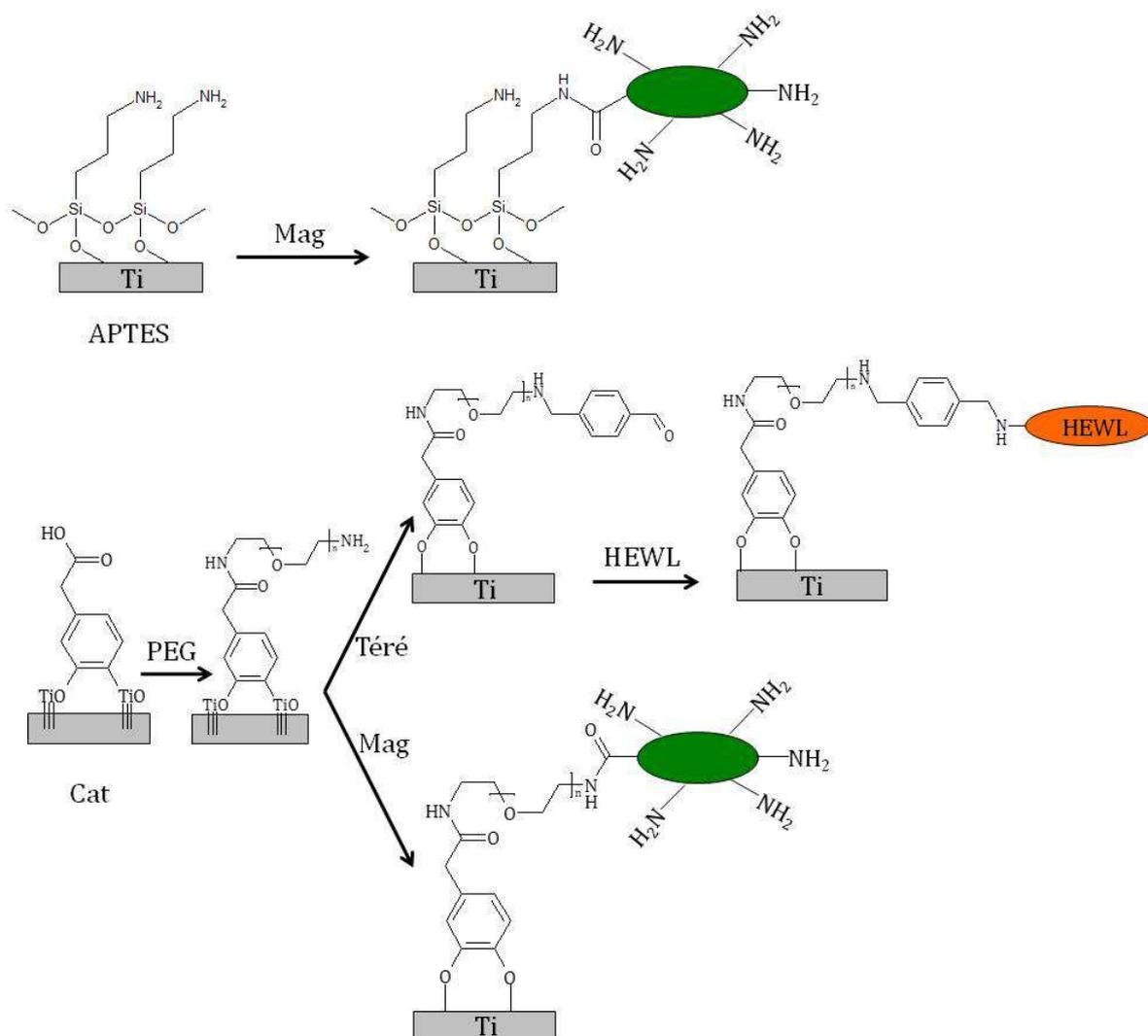


Figure 1 : Résumé des stratégies employées pour la fonctionnalisation des surfaces de titane et schéma des surfaces idéales étudiées.

Dans ce chapitre, les différentes étapes de la fonctionnalisation seront analysées par Spectroscopie InfraRouge en mode Réflexion Absorption à Incidence Rasante (IRRAS), Spectroscopie de Photoélectrons X (XPS) et par Microscopie à Force Atomique (AFM).

Ces analyses permettent d'obtenir des informations sur la composition chimique et l'homogénéité des couches déposées sur les surfaces de titane et ainsi de déterminer les protocoles les plus efficaces.

Dans cette partie seront aussi présentées les analyses effectuées après dépôt de la BSA sur les surfaces fonctionnalisées en comparaison aux données obtenues sur les surfaces de titane nu. Ceci permettra de déterminer de manière semi-quantitative le pouvoir anti-adhésif des couches organiques greffées sur le titane.

I. Caractérisation de la surface de titane oxydée

Pour pouvoir greffer des molécules à la surface des échantillons de titane il est nécessaire d'augmenter la quantité de fonctions hydroxyles disponibles en surface. Quatre protocoles d'hydroxylation ont été testés, regroupés dans le Tableau 1 ci-dessous.

N° expérience	Solution d'oxydation	Temps de contact
Ti1	K ₂ CrO ₄ dans H ₂ SO ₄	20 minutes
Ti2-a	H ₂ O ₂ /H ₂ SO ₄ (1/1)	60 minutes
Ti2-b	NH ₄ OH/H ₂ O ₂ /H ₂ O (1/1/5)	10 minutes
Ti3	H ₂ O puis acétone puis n-dodécane et propan-2-ol	10 minutes par solvant

Tableau 1: Récapitulatif des différents traitements d'oxydation effectués sur le titane.

Les surfaces de titane, après oxydation, seront notées Ti-OH dans la suite du manuscrit. L'efficacité de l'oxydation est déterminée par deux critères : la quantité de fonctions hydroxyles accessibles et la propreté de la surface (contamination organique minimale).

Les spectres InfraRouge obtenus après polissage et oxydation des surfaces de titane sont consultables en Annexe III-1. L'analyse de ces spectres PM-IRRAS permet d'éliminer la méthode Ti1 menant à des surfaces de titane très contaminées en résidus carbonés. Le choix entre les méthodes Ti2 ou Ti3 sera fait après étude des spectres XPS

La Figure 2 présente les spectres XPS du titane Ti2p, de l'oxygène O1s et du carbone C1s après les différents traitements oxydants (spectres N1s en Annexe III-2).

Les spectres Ti2p (Figure 2-a) montrent le doublet Ti2p_{3/2} (458,8 eV) et Ti2p_{1/2} (464,5 eV) de l'oxyde de titane TiO₂ [1, 2] On distingue deux autres contributions sur les spectres Ti2-a et Ti3 à 458,0 eV et 454,5 eV, respectivement attribuées aux espèces Ti-OH [3, 4] et Ti métallique [1] (composante 3/2 du doublet Ti2p).

Sur les spectres O1s (Figure 2-b) apparait une contribution majoritaire à 530,7 eV attribuée aux atomes d'oxygène du dioxyde de titane [2] ; la contribution observée vers 532,0 eV indique la présence de groupements hydroxyles à la surface des échantillons [3] et la dernière à 533,5 eV est due aux résidus organiques aussi mis en évidence sur les spectres PM-IRRAS [5]. Le rapport des contributions Ti-OH/TiO₂ calculée sur Ti2-b est supérieur à celui de Ti2-a ou Ti3, il semblerait donc que la surface Ti2-b expose

davantage de fonctions hydroxyles. Les spectres C1s (Figure 2-c) indiquent en revanche que la surface Ti2-b est la surface la plus contaminée par des hydrocarbures (59% de carbone sur Ti2-b et 35% sur Ti2-a et Ti3). Dans la suite des travaux, la méthode d'oxydation en milieu basique a été abandonnée au profit de traitements menant à des surfaces recouverte d'une quantité moyenne de groupements hydroxyles et peu contaminées.

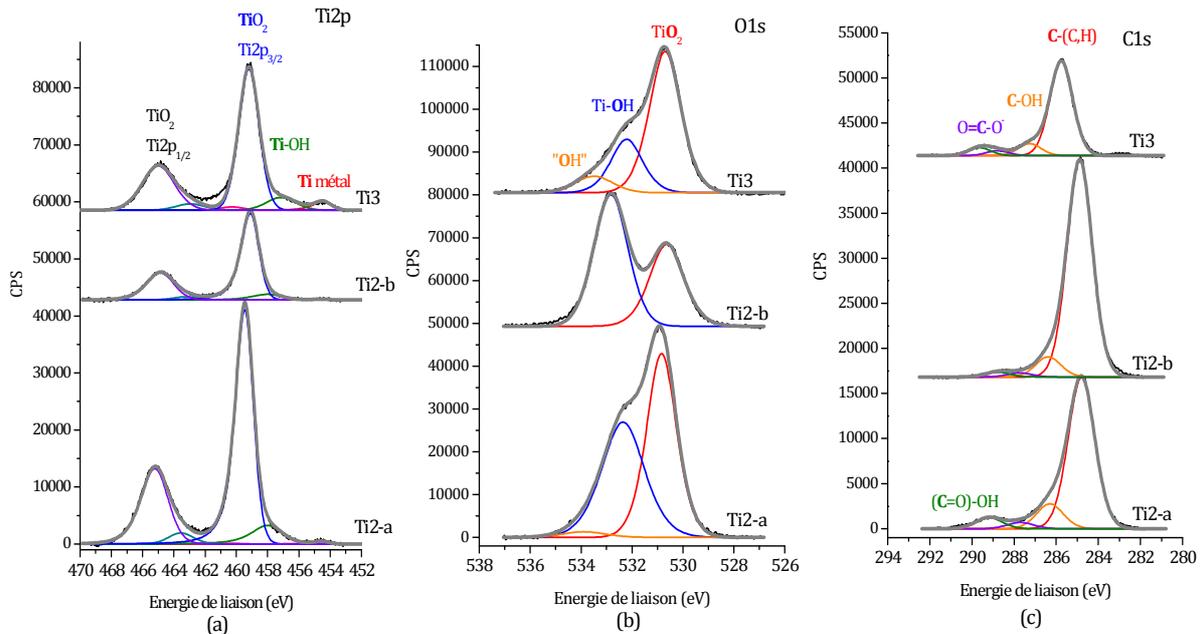


Figure 2 : Spectres XPS haute résolution après oxydation acide (Ti2-a), oxydation basique (Ti2-b) et oxydation par immersion dans plusieurs solvants (Ti3) : (a) Ti2p, (b) O1s et (c) C1s.

Le greffage du silane se fera après oxydation en milieu acide (Ti2-a) et le greffage du catéchol après oxydation par immersion dans plusieurs solvants (Ti3).

Les images AFM des surfaces Ti-OH obtenues après traitement par les protocoles Ti2-a et Ti3 sont présentés sur la Figure 3 ci-dessous.

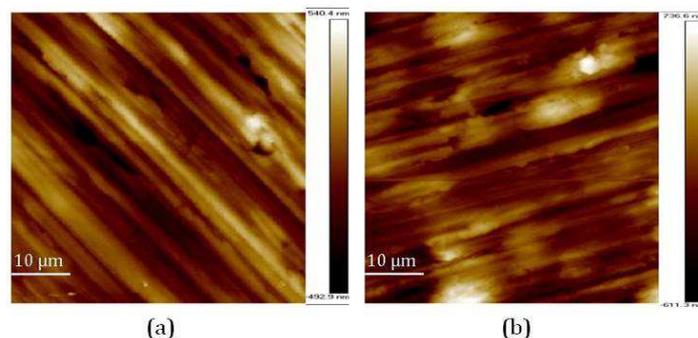


Figure 3 : Image AFM de la topographie des surfaces Ti-OH (50 μm x 50 μm) soumises au protocole (a) Ti2-a et (b) Ti3.

La rugosité RMS des échantillons de Ti-OH avant fonctionnalisation est de 0,15 μm pour les surfaces Ti2-a et 0,18 μm pour Ti3. Les surfaces sont considérées comme des surfaces modèles planes. Les lignes observées sur les deux images de la Figure 3 sont le résultat du dernier polissage [6].

II. Caractérisation du greffage covalent du (3-aminopropyl) triéthoxysilane (APTES)

Pour obtenir des couches homogènes d'APTES et résistantes aux divers rinçages, plusieurs protocoles ont été expérimentés sur les surfaces Ti2-a décrites précédemment. Les conditions de chaque protocole sont rappelées dans le Tableau 2.

N°Expérience	Concentration d'APTES	Solvant	Température	Temps de contact
Ti-Sil1a	2% (v/v)	Acétone	Ambiante	3 heures
Ti-Sil1b	20% (v/v)	Acétone	Ambiante	3 heures
Ti-Sil2	20% (v/v)	Acétone	40°C	Une nuit
Ti-Sil3a	5% (v/v)	Toluène	100°C	4 heures
Ti-Sil3b	10% (v/v)	Toluène	100°C	4 heures

Tableau 2 : Récapitulatif des différents protocoles de greffage de l'APTES sur les surfaces de Ti-OH.

Les spectres PM-IRRAS des surfaces traitées suivant les différents protocoles sont consultables en Annexe III-3. Sur la Figure 4 ne sont présentés que les spectres InfraRouge des deux méthodes menant aux meilleurs taux de greffage d'APTES.

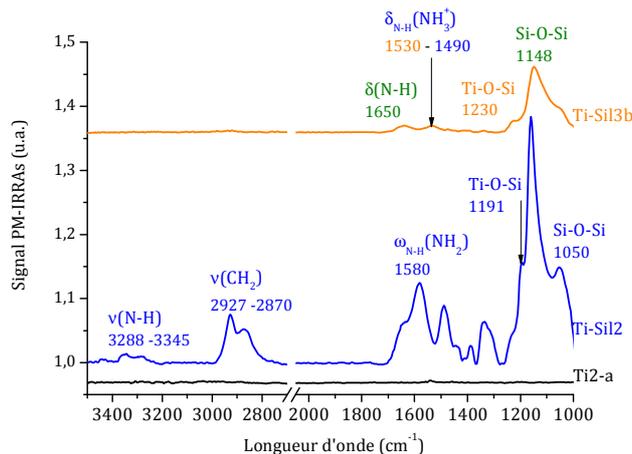


Figure 4 : Spectres PM-IRRAS de Ti2-a et des surfaces obtenues après greffage de l'APTES par les protocoles Ti-Sil2 et Ti-Sil3b.

Les bandes de vibration observées sur les spectres des surfaces Ti-Sil correspondent aux bandes décrites dans la littérature pour le greffage de l'APTES sur des surfaces de

silicium [7, 8] ou des surfaces de titane [9] : présence des bandes des $\nu(\text{Si-O})$ dans la région $1150\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ et les vibrations des groupements NH_2 (1580 cm^{-1}) et NH_3^+ (1490 et 1530 cm^{-1}). L'analyse de ces deux spectres montre la présence d'une plus grande quantité d'APTES sur les surfaces traitées par le protocole Ti-Sil2. Néanmoins, ce protocole est peu reproductible et mène à la formation d'agrégats d'APTES observables par AFM [10]. **Le protocole Ti-Sil3b, bien que conduisant à une quantité d'APTES greffée plus faible, a donc été choisi pour sa reproductibilité en vue du greffage de la Magainine I.**

La Figure 5 présente les spectres O1s, N1s et Si2p de la surface de titane avant et après greffage de l'APTES. Les spectres de l'élément Ti2p sont consultables en Annexe III-4. La forte diminution du signal de l'élément Ti2p et l'apparition de signaux relatifs aux éléments N1s à $400,0\text{ eV}$ et Si2p vers $102,0\text{ eV}$ [9, 11] confirment la présence de la molécule d'APTES sur les surfaces de titane.

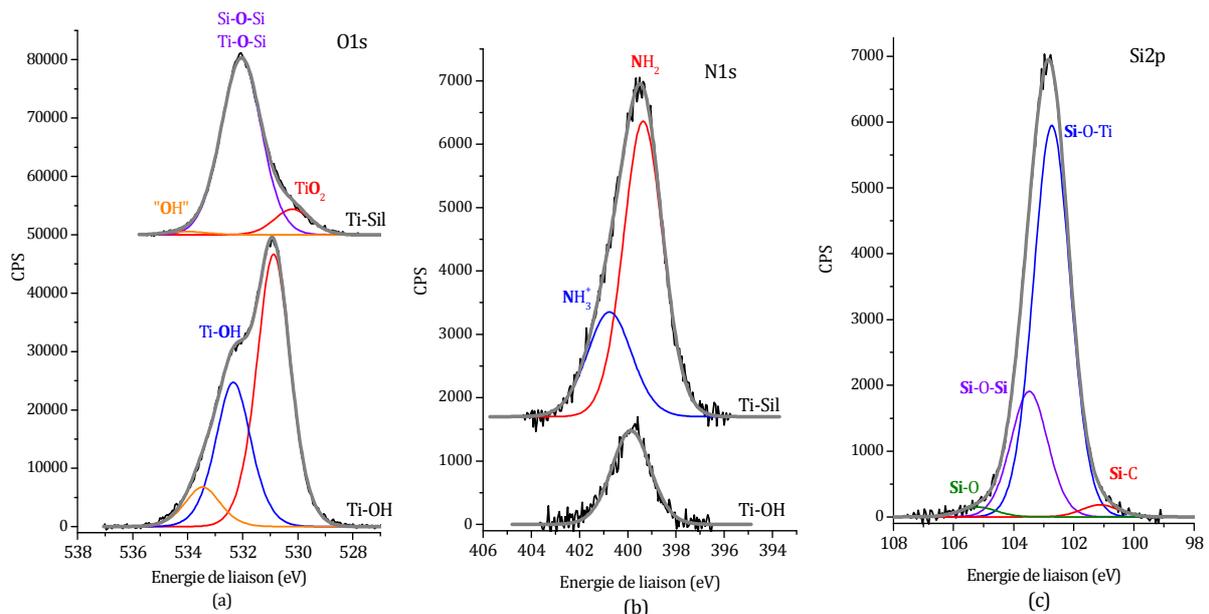


Figure 5 : Comparaison des spectres XPS haute résolution sur Ti-OH et Ti-Sil : (a) O1s, (b) N1s et (c) Si2p.

Sur le spectre O1s (Figure 5-a), l'augmentation de la contribution à $532,0\text{ eV}$ (de $38,8\%$ à $82,8\%$), pouvant être attribuée aux fonctions Ti-O-Si ou Si-O-Si , indique la formation d'une liaison chimique entre l'APTES et la surface Ti-OH [9]. Sur le spectre Si2p la présence d'une contribution à $102,5\text{ eV}$, correspondant aux liaisons Ti-O-Si , confirme le greffage covalent de l'APTES [12]. La contribution à $103,4\text{ eV}$ liée à la formation de liaisons Si-O-Si montre qu'il y a une polymérisation horizontale permettant de lier les

molécules entre elles via les atomes d'oxygène n'ayant pas réagi avec les fonctions Ti-OH (voir cas idéal représenté Figure 1) [12]. Les contributions observées sont en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature [9, 11, 13, 14].

En utilisant l'équation : $\frac{I}{I_0} = \exp\left(-\frac{d}{\lambda} \sin\phi\right)$, l'épaisseur de la couche d'APTES a été estimée, à partir de la diminution de l'intensité du signal de Ti2p, à 13 nm ce qui indique la formation de multicouches, en accord avec d'autres travaux (l'épaisseur d'une monocouche est estimée à 10 Å) [15-17]. La présence d'un faible pourcentage de C-O-Si (contribution à 288,0 eV) confirme que la polymérisation horizontale n'est pas totale et qu'il reste des fonctions éthoxy non hydrolysées (sur la couche d'accroche et dans la multicouche) après greffage de l'APTES sur le titane [18]. Cette multicouche ne permet pas de contrôler l'accessibilité des fonctions amines terminales de l'APTES. Une autre voie de greffage a alors été mise en place, utilisant le catéchol et un PEG diamine.

III. Greffage de la couche de catéchol (Cat) et de PEG diamine (H₂N-PEG-NH₂)

Afin de pouvoir greffer de manière covalente le H₂N-PEG-NH₂, il est nécessaire de former en premier lieu une couche organique réactive vis-à-vis des fonctions amines. Le synthon catéchol (Cat) a été choisi pour sa bonne affinité avec les surfaces de Ti-OH (formation d'un complexe de transfert de charge) [19, 20] et la présence d'une fonction acide carboxylique terminale permettra de former des liaisons amides avec la molécule H₂N-PEG-NH₂ (voir Figure 1).

III.1. Caractérisation par IRRAS

Les spectres IRRAS obtenus après fonctionnalisations successives par le Cat et le H₂N-PEG-NH₂ sont représentés sur la Figure 6 ci-dessous. Le greffage de la deuxième couche organique se fait après activation par EDC/NHS de la couche de catéchol.

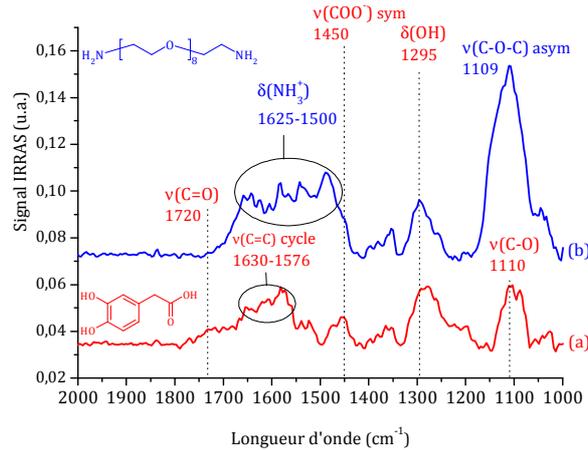


Figure 6 : Spectres IRRAS des surfaces : (a) Ti-Cat et (b) Ti-Cat-PEG

Sur le spectre IRRAS obtenu après greffage de la première couche organique (Figure 6-a), les bandes caractéristiques du catéchol sont observables, i.e. les bandes relatives aux acides carboxyliques, à 1109 cm^{-1} , une bande attribuée à la vibration d'élongation $\nu(\text{C}-\text{O})$ et une à 1720 cm^{-1} attribué à $\nu(\text{C}=\text{O})$. Les fonctions acides ne sont pas toutes protonées comme l'atteste la présence de la bande liée à la vibration d'élongation symétrique, $\nu(\text{C}-\text{O})$, dans les groupements carboxylates (à 1450 cm^{-1}). Enfin, on note la présence d'une bande relative à la déformation $\delta(\text{O}-\text{H})$ à 1295 cm^{-1} et, dans le massif entre 1630 et 1575 cm^{-1} , des bandes de vibration $\nu(\text{C}=\text{C})$ du noyau aromatique [21]. Ces surfaces seront notées dans la suite du manuscrit **Ti-Cat**. Après immersion des surfaces Ti-Cat dans les solutions de $\text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{NH}_2$, la signature des motifs PEGs apparaît sur le spectre infrarouge (Figure 6-b) avec une forte augmentation du massif centré à 1109 cm^{-1} liée à la vibration des liaisons éthers $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ [22]. D'autres éléments permettent de confirmer le greffage du $\text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{NH}_2$, les bandes des vibrations symétriques et antisymétriques, $\delta(\text{NH}_3^+)$, entre 1500 et 1625 cm^{-1} , et les bandes amide I et amide II de la liaison Cat-PEG, à 1548 cm^{-1} et 1656 cm^{-1} [23, 24]. Ces surfaces seront identifiées par la suite sous l'appellation **Ti-Cat-PEG**.

III.2. Caractérisation par XPS

Dans ce paragraphe seront exploités les spectres haute résolution XPS des éléments O1s, N1s et C1s (Figure 7). Les spectres relatifs à l'évolution de l'élément Ti2p sont accessibles en Annexe III-4.

L'intensité du pic Ti2p décroît d'un facteur 3 ce qui constitue une première indication du greffage d'une couche supplémentaire sur les surfaces de Ti-OH.

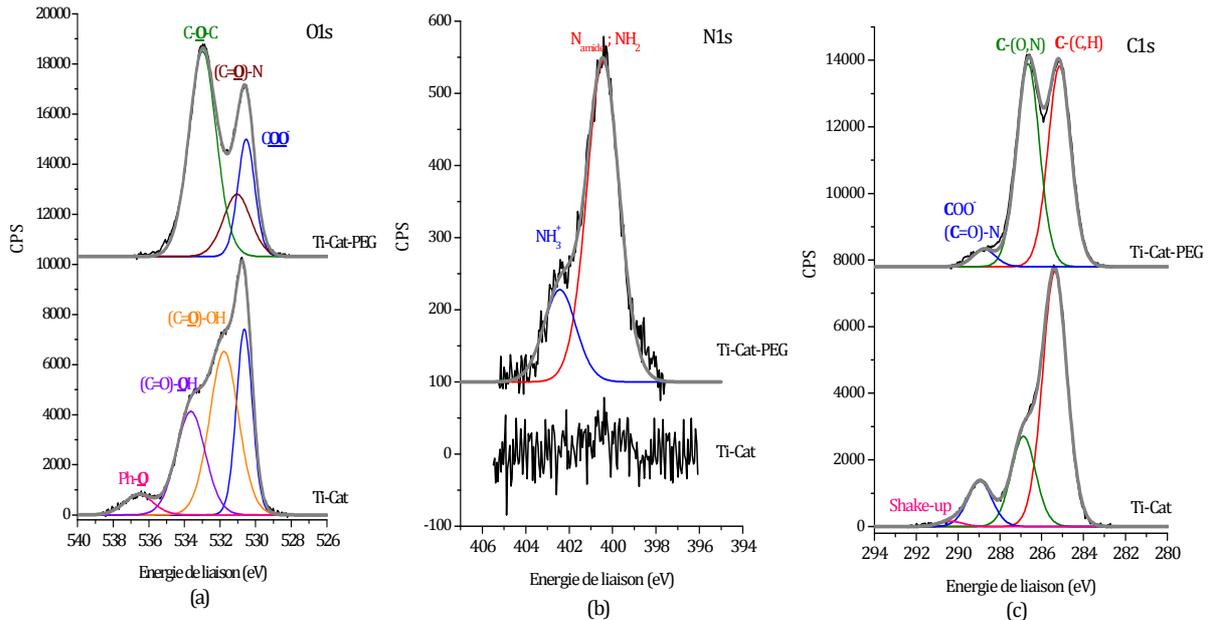


Figure 7 : Comparaison des spectres XPS sur Ti-Cat et Ti-Cat-PEG : (a) O1s, (b) N1s et (c) C1s.

Le pic O1s de la surface Ti-Cat (Figure 7-a) peut être décomposé en 4 contributions, une à 530,6 eV attribuée aux atomes d'oxygène impliqués dans les fonctions carboxylates, et 2 autres contributions à 532,0 eV et 533,6 eV dues à la fonction acide carboxylique terminale de Cat (respectivement C=O et C-OH). La contribution à 536,5 eV, peu souvent observée, peut être attribuée aux atomes d'oxygène en α des groupements phényles [25]. La présence du noyau aromatique est aussi observée sur le spectre de l'élément C1s (Figure 7-c) grâce au pic satellite caractéristique de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du benzyle à 290,2 eV [26-28].

Après immersion dans la solution contenant le $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$, apparaît un signal N1s centré à 400,0 eV (Figure 7-b). Ce signal peut être décomposé en 2 contributions : une majoritaire à 400,5 eV attribuée à l'azote des liaisons amides et amines [29, 30] et la deuxième à 402,3 eV due à la présence d'ion ammonium NH_3^+ [31]. Sur le spectre C1s (Figure 7-c) l'augmentation de la contribution liée à la présence de C-O-C à 286,7 eV [22] (de 23% à 48%) constitue une autre preuve du greffage de $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$. Enfin, sur le spectre O1s, deux nouvelles contributions sont détectées : la première à 531,1 eV, liée aux atomes d'oxygène impliqués dans les liaisons amides entre le Cat et le $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$ [22] et la deuxième à 533,0 eV, attribuées aux atomes d'oxygène du squelette du polymère C-O-C [22].

Le rapport $\frac{\text{C-O-C}}{\text{N-C=O}}$ est égal à 4 ; il devrait être proche de 68 ($n =$

68 pour ce PEG). Ceci est dû à une faible accroche du $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$ et/ou à la formation

de multicouches de catéchol. La diminution du signal de l'élément Ti2p permet d'estimer l'épaisseur de la couche de catéchol à 35 Å. Or dans des travaux récents, Rodenstein *et al.* ont montré que la longueur moyenne d'une molécule de catéchol est de l'ordre de 6 Å [28]. Cela signifie que le catéchol forme, comme l'APTES, une multicouche et, le greffage réussi du H₂N-PEG-NH₂ prouve que les extrémités acides sont toujours accessibles. L'épaisseur estimée de la couche de H₂N-PEG-NH₂ seul est de 22 Å ce qui correspond aux valeurs couramment mesurées dans la littérature pour des surfaces à haute densité en PEG [32, 33].

Les analyses InfraRouge et XPS ont permis de mettre en évidence la réussite du greffage du catéchol en multicouches et du greffage covalent du H₂N-PEG-NH₂ en une monocouche.

III.3. Caractérisation par AFM

La Figure 8 montre les images AFM des surfaces Ti-Cat et Ti-Cat-PEG. On distingue les contours des agrégats pour chacune des couches organiques.

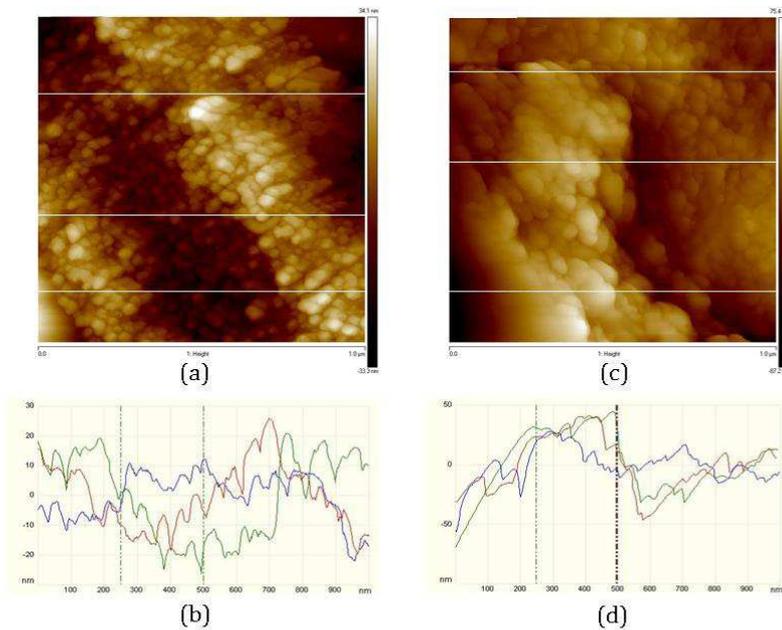


Figure 8 : Images AFM (1 µm x 1 µm) de : Ti-Cat (a) Topographie, (b) Profil de la surface et Ti-Cat-PEG, (c) Topographie et (d) Profil de la surface.

La coupe présentée Figure 8-b montre un écart de hauteur maximal de 50 nm dans la multicouche de Cat et d'après l'image AFM de la topographie de Ti-Cat (Figure 8-a) la rugosité RMS est égale à 11 nm. La largeur des agrégats de Cat est de l'ordre de 30 nm de

diamètre. Des études STM (microscopie à effet tunnel sous ultra-haut vide) sur des couches de DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine), qui est une molécule de même structure que le Cat (Figure 9), ont montré que le diamètre moyen de ces molécules est de 5 Å [34].

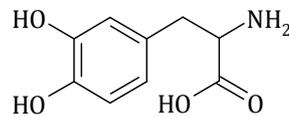


Figure 9 : Molécule de DOPA.

Sur l'image topographique des surfaces de Ti-Cat-PEG (Figure 8-c) la rugosité est de 15 nm et les coupes (Figure 8-d) montrent une profondeur maximale de 100 nm. D'autre part, le diamètre moyen des particules visibles sur la Figure 8-c est de l'ordre de 120 nm. D'après les travaux de Branca *et al.* [35] le rayon d'hydratation d'un PEG ($n = 68$) à température ambiante est de 40 nm environ. La mesure du diamètre des agrégats est sujette à beaucoup d'incertitude car il faut prendre en compte la présence résiduelle de molécules d'eau lors de l'acquisition AFM à l'air (contrairement à la STM) et la convolution de la pointe utilisée : il est donc difficile d'estimer le nombre de molécules formant les agrégats.

Les images AFM apportent une précision supplémentaire sur l'état des surfaces après chaque fonctionnalisation : le catéchol et le H_2N -PEG- NH_2 forment des agrégats et les couches organiques sont homogènes chimiquement (pas de présence de trous donnant accès à la couche inférieure).

Les différentes analyses confirment le greffage du catéchol et du H_2N -PEG- NH_2 en deux étapes successives. D'autres groupes [19, 36] ont essayé de synthétiser le précurseur DOPA directement avec le polymère avant de greffer l'ensemble sur les surfaces-cibles : cette méthode est une bonne manière de contrôler la réaction entre les deux composants mais cela peut rendre l'adsorption sur la surface plus compliquée. **L'avantage du processus en 2 étapes développé dans ce chapitre est la formation de couches de Cat et de H_2N -PEG- NH_2 en utilisant des conditions de réactions douces.** En revanche, cette méthode ne permet pas de modifier la longueur du polymère utilisé.

IV. Greffage de la Magainine sur les surfaces fonctionnalisées de titane

Les surfaces de Ti-Sil et Ti-Cat-PEG sont toutes deux modifiées par des molécules possédant des fonctions terminales aminées. Pour greffer de façon covalente la Magainine I (Mag) sur ces surfaces, le protocole utilisé est le suivant : dépôt pendant 3 heures d'une goutte de Mag activée puis rinçage à l'eau milli-Q (voir Chapitre II-III). Ces surfaces seront par la suite nommées Ti-Sil-Mag et Ti-Cat-PEG-Mag.

Afin de n'observer que la contribution de la Magainine greffée, les spectres présentés sur la Figure 10 sont obtenus après soustraction du signal de la surface avant greffage.

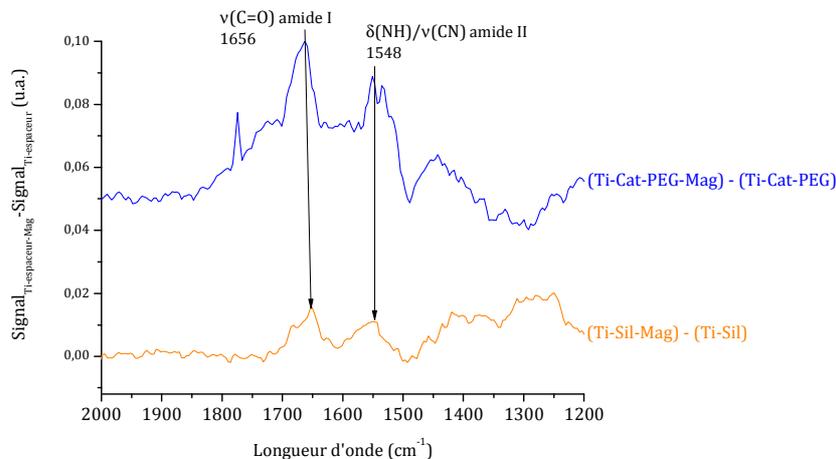


Figure 10 : Spectres IRRAS de (a) Ti-Sil-Mag - Ti-Sil et (b) Ti-Cat-PEG-Mag - Ti-Cat-PEG.

L'apparition des deux contributions à 1548 cm^{-1} et 1656 cm^{-1} , correspondant respectivement aux bandes amide II et amide I des peptides [23, 37], confirme le greffage de la Magainine. Une très faible quantité de peptides est greffée sur les espaceurs et en particulier sur la couche d'APTES.

Cette observation est confirmée par l'analyse XPS de l'évolution des contributions N1s et C1s avant et après greffage de la Magainine (Figure 11).

On constate peu d'évolution entre les spectres de Ti-Sil et Ti-Sil-Mag ainsi qu'entre Ti-Cat-PEG et Ti-Cat-PEG-Mag, si ce n'est une légère augmentation des contributions liées à la présence de fonctions amides : à $400,0 \text{ eV}$ sur les spectres N1s et à $286,3 \text{ eV}$ et $288,0 \text{ eV}$ sur les spectre C1s (respectivement attribuées aux atomes de carbone C-(O,N) et (C=O)-N). Le calcul de l'épaisseur moyenne de la couche de peptides sur chacune des surfaces donne une valeur de $1,3 \text{ \AA}$ sur les surfaces de Ti-Sil-Mag et $20,0 \text{ \AA}$ sur Ti-Cat-PEG-Mag (calculée à partir de l'atténuation du signal Ti2p en passant de Ti-Sil à Ti-Sil-

Mag ou de Ti-Cat-PEG à Ti-Cat-PEG-Mag). Or les dimensions moyennes de la Magainine I sont comprises entre 25,0 et 30,0 Å selon la sphère de solvation environnante [38].

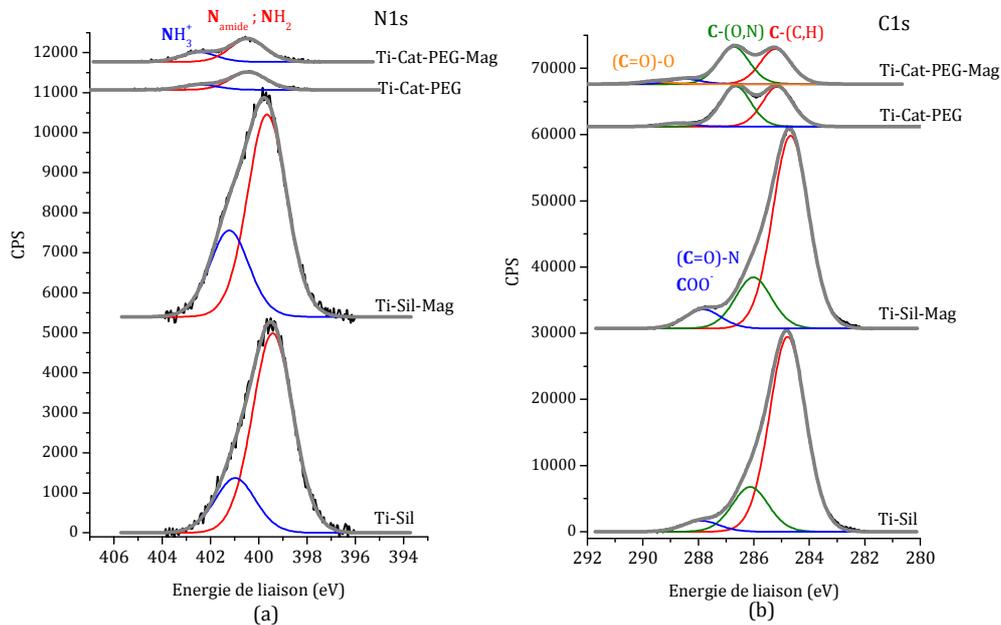


Figure 11 : Evolution des contributions N1s et C1s sur les surfaces Ti-Sil, Ti-Sil-Mag, Ti-Cat-PEG et Ti-Cat-PEG-Mag.

La faible quantité de Magainine greffée sur Ti-Sil-Mag peut venir de la mauvaise accessibilité des fonctions amines terminales de l'APTES (prises dans la multicouche). Cela peut aussi venir du nombre limité de fonctions acides présentes dans la Magainine (un acide glutamique et l'acide terminal) pouvant former une liaison amide avec les fonctions amines terminales de l'APTES ou du $H_2N-PEG-NH_2$.

V. Greffage de HEWL sur la couche de $H_2N-PEG-NH_2$

Les premières étapes de fonctionnalisation sont identiques à celles réalisées pour le greffage de la Magainine sur Ti-Cat-PEG. Dans le cas du HEWL, un des résidus Glu (acide glutamique) joue un rôle dans le site actif de l'enzyme ; sa coordination avec la surface risquerait d'endommager son activité [39, 40]. Une étape supplémentaire a donc été réalisée pour effectuer le greffage de l'enzyme par ses fonctions amines (et non acides carboxyliques) : le greffage d'un dialdéhyde, le téréphtalaldéhyde. Dans un premier temps, la fonction aldéhyde et une des fonctions amines de l'enzyme réagissent pour former une fonction imine qui est ensuite réduite en fonction amine par $NaBH_4$. **Les surfaces fonctionnalisées par le téréphtalaldéhyde (Téré) sont nommées Ti-Cat-PEG-Téré, puis suite au greffage de l'enzyme, Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL.**

La Figure 12 présente les spectres IRRAS des surfaces Ti-Cat-PEG-Téré et Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL, obtenus en leur soustrayant les spectres des étapes précédentes. Les spectres des étapes précédentes (Cat et PEG) sont ceux de la Figure 6.

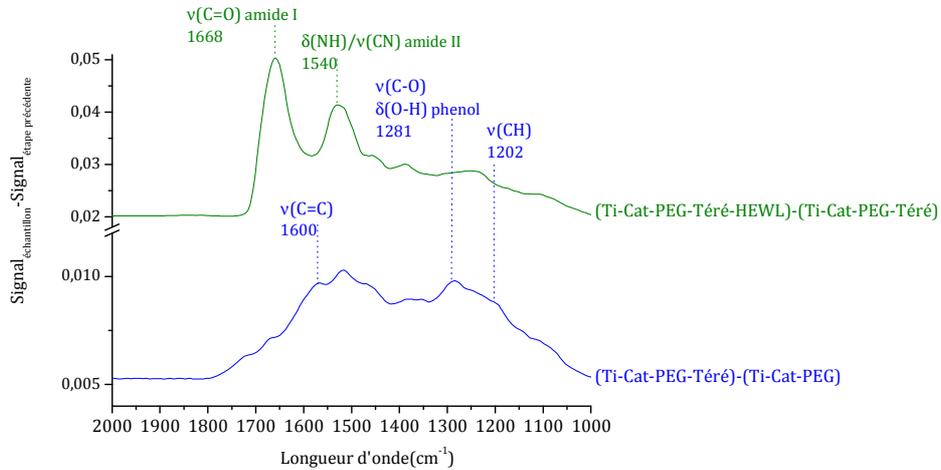


Figure 12 : Spectres IRRAS des différentes étapes de la fonctionnalisation des surfaces de titane : Ti-Cat-PEG-Téré – Ti-Cat-PEG et Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL – Ti-Cat-PEG-Téré.

Sur la Figure 12, les bandes de vibration observées sont caractéristiques de la dernière couche greffée. Sur le premier spectre, à 1600 cm^{-1} se situe la vibration d'élongation du noyau aromatique $\nu(\text{C}=\text{C})$ [41] attestant de la présence du téréphtalaldéhyde sur la surface de titane. En revanche, les bandes de vibrations d'élongation des fonctions aldéhydes $\nu(\text{C}=\text{O})$ entre 1730 et 1750 cm^{-1} [41] sont faibles, peut-être en raison d'une orientation défavorable ; le Téré ne peut pas créer de pont entre deux molécules de catéchol en raison de sa rigidité due à la présence du noyau aromatique (contrairement au glutaraldéhyde plus couramment utilisé [31]). Sur le deuxième spectre, apparaissent deux bandes intenses à 1540 et 1668 cm^{-1} correspondant respectivement aux vibrations d'élongation $\nu(\text{C}-\text{N})$ ou de déformation $\delta(\text{N}-\text{H})$, et aux vibrations d'élongation $\nu(\text{C}=\text{O})$ des fonctions amides, attestant du greffage de HEWL.

Sur la Figure 13 sont représentés les spectres XPS des éléments O1s, N1s et C1s après greffage du téréphtalaldéhyde et de l'enzyme HEWL sur les surfaces de Ti-Cat-PEG. Un fort déplacement des pics ($1,6\text{ eV}$) vers les hautes énergies est observable sur les spectres de Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL. Ce déplacement est probablement dû à la formation d'une couche organique épaisse sur la surface de titane, qui entraîne un léger effet de charge sur l'échantillon. Ceci montre qu'une quantité significative d'enzyme a été greffée.

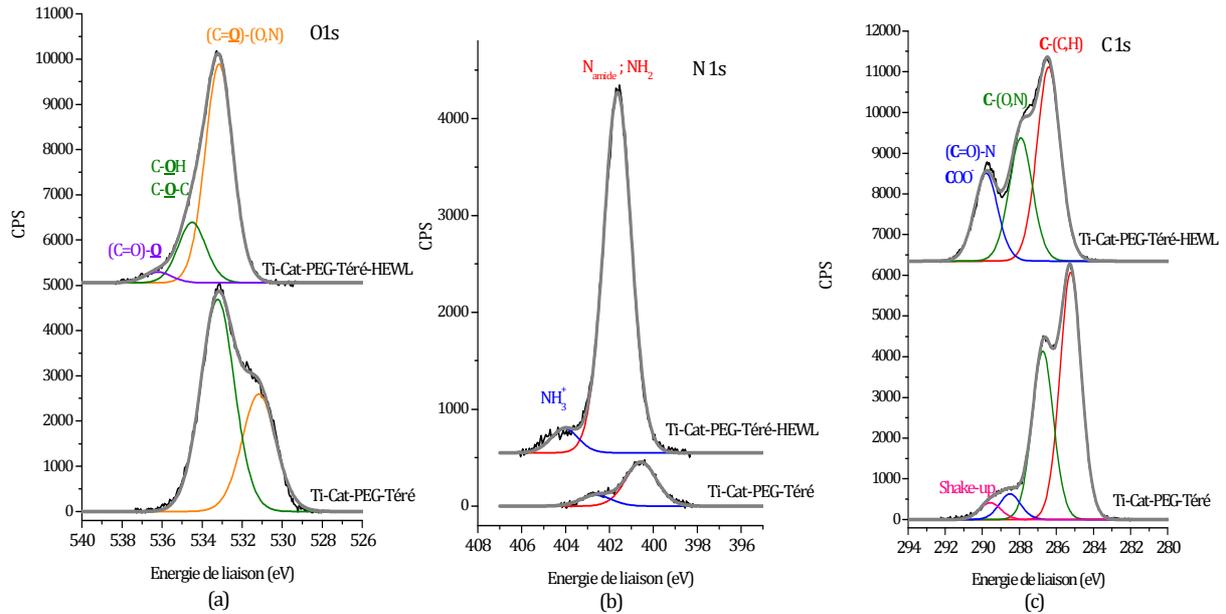


Figure 13 : Evolution des spectres XPS haute résolution des éléments sur les surfaces Ti-Cat-PEG-Téré et Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL : (a) O 1s, (b) N 1s et (c) C 1s.

Contrairement aux spectres IRRAS (Figure 12), les spectres XPS des surfaces Ti-Cat-PEG-Téré (Figure 13) permettent d'identifier la présence du téréphtalaldéhyde greffé notamment avec deux pics liés au noyau aromatique : une contribution à 291,4 eV (Figure 13-c) liée aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ [25, 26]. L'atténuation successive du titane conduit à une estimation de l'épaisseur moyenne égale à 4 Å, en accord avec la longueur de cette molécule (5 Å) [42, 43]. Lors du greffage de HEWL, les contributions liées au polymère diminuent fortement au profit de celles attribuées aux fonctions amides. L'évolution la plus significative est observable sur le spectre N 1s (Figure 13-b) : l'intensité du pic à 400,7 eV des N_{amides} est multipliée par 6. Cette augmentation est due au greffage de l'enzyme. Sur le spectre O 1s (Figure 13-a), on note l'augmentation de la contribution à plus basse énergie attribuée aux atomes d'oxygène impliqués dans des liaisons amides [31]. L'apparition des fonctions amides est aussi confirmée par l'augmentation de la contribution à 288,2 eV sur le spectre C 1s (Figure 13-c) [31].

Sur les surfaces Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL, il n'est plus possible de détecter l'élément Ti 2p ce qui signifie que l'ensemble des couches organiques a une épaisseur supérieure à 3λ (avec $\lambda = 31,5$ Å pour le niveau 2p du titane [44]). On peut donc estimer très grossièrement l'épaisseur moyenne de la couche de HEWL égale au minimum à : $94,5$ (3λ) - 4,0 (Téré) - 22,0 (PEG) - 35,0 (Cat) = 33,5 Å. D'après les données cristallographiques, il est raisonnable de penser que l'enzyme forme une couche

homogène mais dont l'épaisseur est probablement plus grande que l'estimation faite (rappelons que les paramètres cristallographiques de l'enzyme sont $a = b = 79,1 \text{ \AA}$ et $c = 37,9 \text{ \AA}$) [45, 46].

VI. Test d'adsorption de protéines (BSA)

Le test d'adsorption de protéines a été réalisé sur toutes les surfaces de titane fonctionnalisées par les différentes molécules organiques utilisées dans la deuxième voie de fonctionnalisation (*i.e* par Cat). Les spectres étudiés sont obtenus par soustraction des spectres avant interaction avec la protéine (voir exemple Figure 14-a). L'évaluation de l'adhésion de la BSA s'effectue en comparant les aires des bandes amides mesurées après contact avec la solution de BSA (regroupées Figure 14-b).

Sur la surface de titane nu (Figure 14-a), l'adsorption de BSA est forte, en accord avec la biocompatibilité du titane décrite dans plusieurs travaux [47, 48].

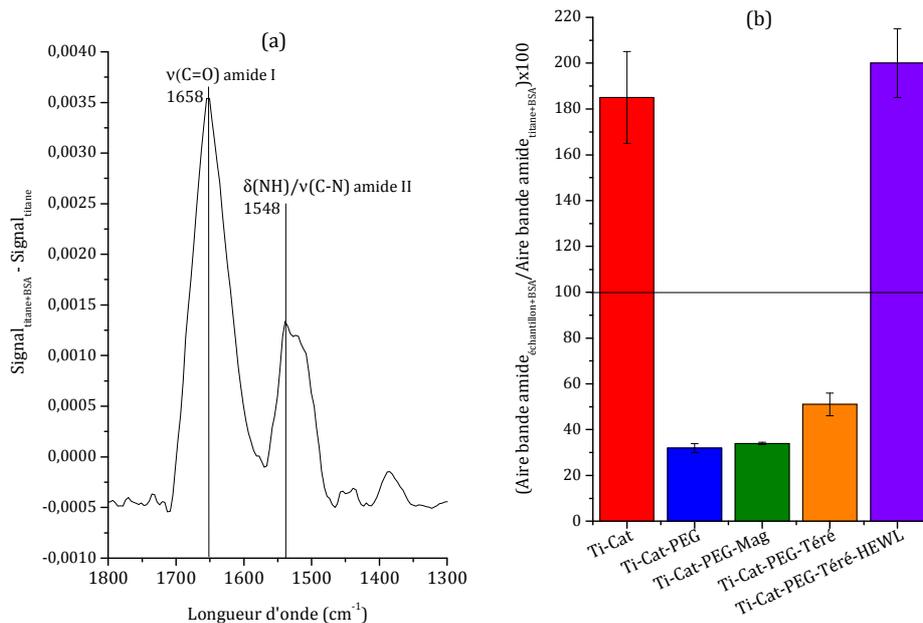


Figure 14 : (a) Spectre IRRAS de la signature de l'adsorption de BSA sur le titane nu et (b) Aire des bandes amides après dépôt de la BSA (100 étant la référence sur le titane nu).

En comparant l'aire des bandes amides mesurées sur les surfaces Ti-Cat-PEG (Figure 14-b), on constate une nette décroissance ($32 \pm 2\%$ d'adhésion par rapport au titane nu) traduisant une faible adsorption de la BSA. Ceci confirme l'effet antiadhésif de la couche de PEG. Cette propriété bien connue est due à la mobilité de la chaîne de $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$, au large volume d'exclusion et à l'important caractère hydrophile de ce polymère [49].

Cependant, la diminution d'adsorption observée est moins importante que celles obtenues dans d'autres travaux sûrement dû à la chaîne relativement courte du H₂N-PEG-NH₂ utilisé dans notre étude [50] ou à la structure du polymère modifié [22]. Après le greffage de la Mag (Figure 14-b), l'adsorption de la BSA est encore diminuée ($34 \pm 0,5\%$ par rapport avec encore des intensités 4 fois plus faible), ce qui peut paraître surprenant. En effet, souvent en présence de peptides sur une surface, l'adsorption de protéines est facilitée grâce à la mise en place d'interactions hydrophiles ou hydrophobes entre les deux biomolécules, comme nous avons pu le voir sur les surfaces de cuivre dans le chapitre III [51]. Dans notre cas, la Mag se greffe en faible quantité (voir résultats IRRAS et XPS) et ne recouvre pas complètement la couche de H₂N-PEG-NH₂ qui peut donc exercer encore son pouvoir antiadhésif vis-à-vis de l'adsorption de protéines. La présence de téréphtalaldéhyde redonne aussi un caractère adhésif pour les protéines (Figure 14-b), les surfaces de Ti-Cat-PEG-Téré restant moins adhésives que le titane nu ($51 \pm 5\%$). En revanche, sur les surfaces de Ti-Cat et Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL (Figure 14-b), on observe une forte adhésion (+85% et +100% d'adhésion) en raison des interactions citées ci-dessus entre les molécules.

Sur ces deux surfaces « antibactériennes », nous observons donc deux effets opposés : les surfaces Ti-Cat-PEG-Mag sont fortement antiadhésives mais possèdent peu de Magainine greffée et les surfaces Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL sont très adhésives mais possèdent au minimum une monocouche d'enzymes. Seuls les tests d'activité biocide pourront nous permettre d'évaluer quelle est la fonctionnalisation la plus efficace.

Conclusion

Ce chapitre visait à fonctionnaliser une surface de titane, en vue de diminuer l'adsorption de protéines, un enjeu de taille si l'on se réfère au caractère biocompatible reconnu de ce matériau.

Nous avons effectué la fonctionnalisation du titane par greffage covalent de l'APTES [9] ou liaison pseudo-covalente du catéchol [19, 20].

Après optimisation, le greffage de l'APTES a permis d'obtenir une multicouche portant des fonctions acides accessibles. Néanmoins, une quantité faible de Magainine I a été greffée sur ces surfaces. C'est pourquoi, une deuxième voie, mettant en jeu le greffage du H₂N-PEG-NH₂ sur le catéchol, a été développée.

Grâce au cycle aromatique apportant de la rigidité, on observe une très bonne accessibilité des fonctions acides carboxyliques et un greffage covalent efficace du PEG aminé, H₂N-PEG-NH₂. Le greffage de la Magainine I et du HEWL a aussi été confirmé. L'enzyme semble former une monocouche homogène alors que la quantité de peptides greffés est faible. Ceci peut être expliqué par la formation de quelques ponts de H₂N-PEG-NH₂ entre deux molécules de catéchol.

Enfin, nous avons testé l'adsorption de protéines sur les différentes surfaces fonctionnalisées après dépôt du catéchol. On note une nette diminution de l'adsorption de la BSA sur les surfaces Ti-Cat-PEG, Ti-Cat-PEG-Mag et Ti-Cat-PEG-Téré par rapport à la référence sur les surfaces de titane nues.

Ce premier test permet de confirmer que, sur les surfaces de Ti-Cat-PEG, Ti-Cat-PEG-Mag et Ti-Cat-PEG-Téré, la première étape de formation d'un biofilm à savoir l'adsorption de protéines est fortement inhibée. L'effet de ces surfaces sur les autres étapes de formation comme l'adhésion de micro-organismes et leur croissance sur la surface sera analysé dans le Chapitre V.

Références bibliographiques

1. L. Ramqvist, K. Hamrin, G. Johansson, A. Fahlman, and C. Nordling, *Charge transfer in transition metal carbides and related compounds studied by ECDSA*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 1969. **30** p. 1835-1847.
2. P.Y. Jouan, C. Peignon, C. Cardinaud, and G. Lempérière, *Characterisation of TiN coatings and of the TiN/Si interface by X-ray photoelectron spectroscopy and Auger electron spectroscopy*. Applied Surface Science, 1993. **68** p. 595-603.
3. T.K. Sham and M.S. Lazarus, *X-Ray photoelectron spectroscopy (XPS) studies of clean and hydrated TiO₂ (rutile) surfaces*. Chemical Physics Letters, 1979. **68** p. 426-432.
4. R.N.S. Sodhi, A. Weninger, J.E. Davies, and K. Sreenivas, *X-ray photoelectron spectroscopic comparison of sputtered Ti, Ti₆Al₄V and passivated bulk metals for use in cell culture techniques*. Journal of Vacuum Science & Technology A, 1991. **9** p. 1329-1333.
5. S. Biniak, G. Szymanski, J. Siedlewski, and A. Swiatkowski, *The characterization of activated carbons with oxygen and nitrogen surface groups*. Carbon, 1997. **35** p. 1799-1810.
6. A. Maranda-Niedbala and R. Nowakowski, *AFM of titanium nitride layers prepared under glow discharge conditions*. Journal of Alloys and Compounds, 2006. **424** p. 272-278.
7. R.M. Pasternack, S. Rivillon Amy, and Y.J. Chabal, *Attachment of 3-(Aminopropyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature*. Langmuir, 2008. **24** p. 12963-12971.
8. G.J. Kluth, M.M. Sung, and R. Maboudian, *Thermal Behavior of Alkylsiloxane Self-Assembled Monolayers on the Oxidized Si(100) Surface*. Langmuir, 1997. **13** p. 3775-3780.
9. G. Tan, L. Zhang, C. Ning, X. Liu, and J. Liao, *Preparation and characterization of APTES films on modification titanium by SAMs*. Thin Solid Films, 2011. **519** p. 4997-5001.
10. N. Aissaoui, L. Bergaoui, J. Landoulsi, J.-F. Lambert, and S. Boujday, *Silane Layers on Silicon Surfaces: Mechanism of Interaction, Stability and Influence on Protein Adsorption*. Langmuir, 2012. **28** p. 656-665.
11. S. Contarini, S.P. Howlett, C. Rizzo, and B.A. De Angelis, *XPS study on the dispersion of carbon additives in silicon carbide powders*. Applied Surface Science, 1991. **51** p. 177-183.
12. Q. Guo, W.S. Oh, and D.W. Goodman, *Titanium oxide films grown on Mo (110)*. Surface Science, 1999. **437** p. 49-60.
13. G.-J. Ji and Z.-M. Shi, *AFM and XPS study of glass surface coated with titania nanofilms by sol-gel method*. Chinese Physics Letters, 2010. **27** p. 1-4.
14. A.S.M. Chong and X.S. Zhao, *Functionalization of SBA-15 with APTES and Characterization of Functionalized Materials*. Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107** p. 12650-12657.
15. R. Flores-Perez and A. Ivanisevic, *Molecular recognition of chromophore molecules to amine terminated surfaces*. Applied Surface Science, 2007. **253** p. 4176-4181.
16. W.L. Leong, P.S. Lee, S.G. Mhaisalkar, T.P. Chen, and A. Dodabalapur, *Charging phenomena in pentacene-gold nanoparticle memory device*. Applied Physics Letters, 2007. **90** p. 042906-1-042906-3.
17. J. Kim, P. Seidler, L.S. Wan, and C. Fill, *Formation, structure and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates*. Journal of Colloid and Interface Science, 2009. **329** p. 114-119.
18. H. Yoshitake, T. Yokoi, and T. Tatsumi, *Adsorption of Chromate and Arsenate by Amino-Functionalized MCM-41 and SBA-1*. Chemistry of Materials, 2002. **14** p. 4603-4610.

19. J.L. Dalsin, L. Lin, S. Tosatti, J. Vörös, M. Textor, and P.B. Messersmith, *Protein resistance of titanium oxide surfaces modified by biologically inspired mPEG-DOPA*. *Langmuir*, 2005. **21** p. 640-646.
20. R. Rodriguez, M.A. Blesa, and A.E. Regazzoni, *Surface Complexation at the TiO₂ (anatase)/Aqueous Solution Interface: Chemisorption of Catechol*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996. **177** p. 122-131.
21. H. Gulley-Stahl, P.A.H. Li, W.L. Schmidt, S.J. Wall, A. Buhrlage, and H.A. Bullen, *Surface Complexation of Catechol to Metal Oxides : An ATR-FTIR, Adsorption and Dissolution Study*. *Environmental Science & Technology*, 2010. **44** p. 4116-4121.
22. N.-P. Huang, R. Michel, J. Vörös, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D.L. Elbert, J.A. Hubbell, and N.D. Spencer, *Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption*. *Langmuir*, 2001. **17** p. 489-498.
23. T. Miyazawa and E.R. Blout, *The Infrared Spectra of Polypeptides in Various Conformations: Amide I and II Bands*. *Journal of the American Chemical Society*, 1961. **83** p. 712-719.
24. R.J. Jakobsen, F.M. Wasacz, J.W. Brasch, and K.B. Smith, *The relationship of bound water to the IR amide I bandwidth of albumin*. *Biopolymers*, 1986. **25** p. 639-654.
25. D.T. Clark and H.R. Thomas, *Applications of ESCA to polymer chemistry. XVII. Systematic investigation of the core levels of simple homopolymers*. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 1978. **16** p. 791-820.
26. S. Fleutot, J.-C. Dupin, G. Renaudin, and H. Martinez, *Intercalation and grafting of benzene derivatives into zinc-aluminum and copper-chromium layered double hydroxide hosts: an XPS monitoring study*. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 2011. **13** p. 17564-17578.
27. S.-C. Li, Y. Losovyj, and U. Diebold, *Adsorption-site-dependent electronic structure of catechol on the anatase TiO₂(101) surface*. *Langmuir*, 2011. **27** p. 8600-8604.
28. M. Rodenstein, S. Zürcher, S.G.P. Tosatti, and N.D. Spencer, *Fabricating chemical gradients on oxide surfaces by means of fluorinated, catechol-based, self-assembled monolayers*. *Langmuir* 2010. **26** p. 16211-16220.
29. I.M. El Nahhal, M.M. Chehimi, C. Cordier, and G. Dodin, *XPS, NMR and FTIR structural characterization of polysiloxane-immobilized amine ligand systems*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2000. **275** p. 142-146.
30. F. Cecchet, M. Pilling, L. Hevesi, S. Schergna, J.K.Y. Wong, G.J. Clarkson, D.A. Leigh, and P. Rudolf, *Grafting of Benzylic Amide Macrocycles onto Acid-Terminated Self-Assembled Monolayers Studied by XPS, RAIRS and Contact Angle Measurements*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2003. **107** p. 10863-10872.
31. A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, M. Salmain, and C.-M. Pradier, *Grafting of lysozyme and/or poly(ethylene glycol) to prevent biofilm growth on stainless steel surfaces*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2009. **113** p. 2101-2109.
32. K.C. Popat, S. Sharma, and T.A. Desai, *Quantitative XPS Analysis of PEG-Modified Silicon Surfaces*. *Journal of Physical Chemistry*, 2004. **108** p. 5185-5188.
33. S. Sharma, R.W. Johnson, and T.A. Desai, *XPS and AFM analysis of antifouling PEG interfaces for microfabricated silicon biosensors*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2004. **20** p. 227-239.

34. M. Weinhold, S. Soubatch, R. Temirov, M. Rohlfiing, B. Jastorff, and F.S. Tautz, *Structure and Bonding of the Multifunctional Amino Acid L -DOPA on Au (110)*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110** p. 23756-23769.
35. C. Branca, S. Magazù, G. Maisano, F. Migliardo, P. Migliardo, and G. Romeo, *Hydration Study of PEG/Water Mixtures by Quasi Elastic Light Scattering, Acoustic and Rheological Measurements*. Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106** p. 10272-10276.
36. B. Malisova, S. Tosatti, M. Textor, K. Gademann, and S. Zürcher, *Poly(ethylene glycol) adlayers immobilized to metal oxide substrates through catechol derivatives: influence of assembly conditions on formation and stability*. Langmuir, 2010. **26** p. 4018-4026.
37. A. Dong, P. Huang, and W.S. Caughey, *Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra*. Biochemistry, 1990. **29** p. 3303-3308.
38. S.J. Ludtke, K. He, W.T. Heller, T.A. Harroun, L. Yang, and H.W. Huang, *Membrane pores induced by magainin*. Biochemistry, 1996. **35** p. 13723-13728.
39. Q. Jian-Xun and J. Fan, *The balance of flexibility and rigidity in the active site residues of hen egg white lysozyme*. Chinese Physics B, 2011. **20** p. 058701-1 - 058701-11.
40. S.J. Li, *Structural Details at Active Site of Hen Egg White Lysozyme with Di and Trivalent Metal Ions*. Biopolymers, 2006. **81** p. 74-80.
41. A. Konopacka, J. Pajak, A. Jezierska, J. Panek, R. Ramaekers, G. Maes, and Z. Pawelka, *Solvent influence on the rotational isomerism in terephthalaldehyde*. Structural Chemistry, 2006. **17** p. 177-188.
42. D. Britton, *Crystal structure of terephthalaldehyde*. Journal of Chemical Crystallography, 1998. **28** p. 601-604.
43. L. Teng and Z. Wang, *A polymorph of terephthalaldehyde*. Acta Crystallographica Section E, 2008. **64** p. 01562-sup1-01562-sup6.
44. S. Tanuma, C.J. Powell, and D.R. Penn, *Calculations of electron inelastic mean free paths. II. Data for 27 elements over the 50–2000 eV range*. Surface and Interface Analysis, 1991. **17** p. 911-926.
45. C.C.F. Blake, D.F. Koenig, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, and V.R. Sarma, *Structure of hen egg white lysozyme*. Nature, 1965. **4986** p. 757-761.
46. R.E. Canfield and A.K. Liu, *The disulfide bond of egg white lysozyme (muramidase)*. Journal of Biological Chemistry, 1965. **240** p. 1997-2002.
47. H. Zeng, K.K. Chittur, and W.R. Lacefield, *Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces*. Biomaterials, 1999. **20** p. 377-384.
48. M. Wilhelmi, C. Müller, C. Ziegler, and M. Kopnarski, *BSA adsorption on titanium : ToF-SIMS investigation of the surface coverage as a function of protein concentration and pH-value*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **400** p. 697-701.
49. K.D. Park, Y.-S. Kim, D.K. Han, Y.-H. Kim, E.H.B. Lee, H. Suh, and K.S. Choi, *Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces*. Biomaterials, 1998. **19** p. 851-859.
50. S. Yuan, D. Wan, B. Liang, S.O. Pehkonen, Y.P. Ting, K.G. Neoh, and E.T. Kang, *Lysozyme-Coupled Poly(poly(ethylene glycol)methacrylate)-Stainless Steel Hybrids and Their Antifouling and Antibacterial Surfaces*. Langmuir, 2011. **27** p. 2761-2774.
51. T. Cserhati and M. Szögyi, *Role of hydrophobic and hydrophilic forces in peptide-protein interaction: New advances*. Peptides, 1995. **16** p. 165-173.

**Chapitre V : Tests
d'adhésion et de
croissance bactérienne
sur cuivre et titane
fonctionnalisés**

La Figure 1 représente les différentes étapes de la formation d'un biofilm. Tout d'abord, il y a adsorption de protéines sur la surface immergée (1). Cet enrichissement en protéines sur la surface représente à la fois une source de nourriture pour les micro-organismes et une couche favorisant l'adhésion (2) [1]. Une fois adhérents, les micro-organismes se divisent et croissent sur la surface colonisée (3-4). Lors de cette multiplication, les micro-organismes adhérents sécrètent un exopolymère [1, 2] permettant de les protéger des attaques extérieures [2-4] mais aussi de faciliter le transport des nutriments aux couches supérieures [2] et les échanges entre les individus d'un même espèce [5] ou d'espèces différentes [6] afin de créer une communauté ; l'ensemble protéines/micro-organismes/exopolymère est appelé un biofilm comme déjà décrit dans le chapitre I [1].

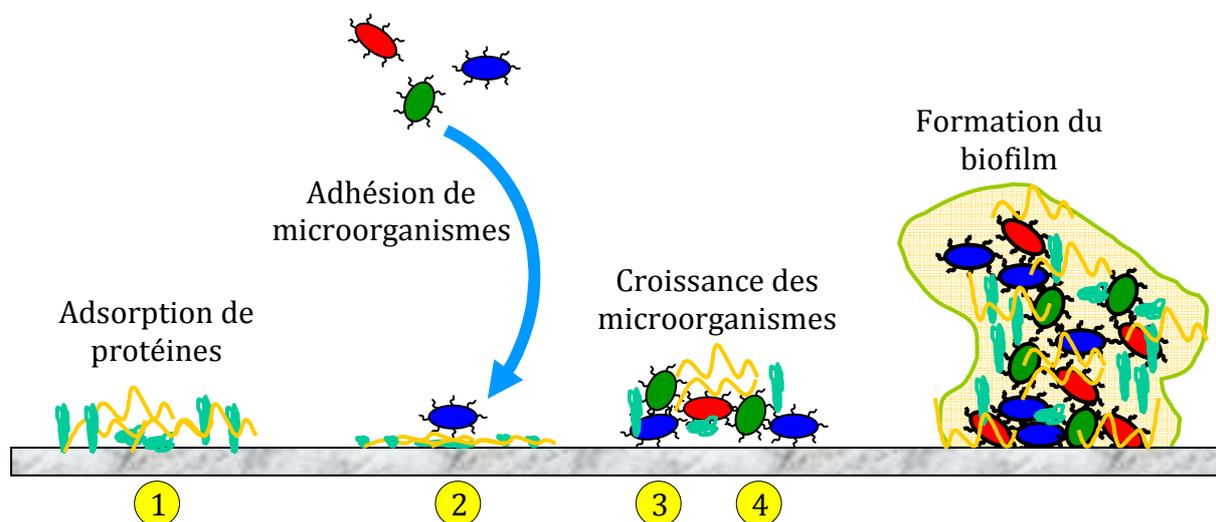


Figure 1 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm.

Dans les chapitres III et IV, nous avons montré qu'il était possible de fonctionnaliser des surfaces de cuivre et de titane de manière covalente avec une couche de polymère contenant des motifs PEGs et un peptide antibactérien, la Magainine I, ou une enzyme, le HEWL. Un premier test d'adsorption a été mené afin d'évaluer l'action antiadhésive des surfaces fonctionnalisées vis-à-vis de l'adsorption des protéines. Ce test permet de mettre en avant l'effet de la fonctionnalisation du cuivre ou du titane sur la 1^{ère} étape de formation du biofilm.

Dans cette dernière partie du travail, trois autres tests ont été menés afin d'étudier l'effet de la fonctionnalisation des surfaces de cuivre et de titane sur les autres étapes de formation du biofilm, Chaque test permet d'évaluer l'action de la fonctionnalisation sur

une étape spécifique de la formation du biofilm (adhésion ou croissance des microorganismes) ; on observera un ralentissement, une inhibition ou une neutralité vis-à-vis de l'action des microorganismes. Dans le cadre de ces travaux, les microorganismes utilisés sont des bactéries non pathogènes : *Listeria ivanovii* et *Listeria innocua*.

Les résultats de ces différents tests ont été analysés à partir des données de spectroscopie InfraRouge, Microscope à Force Atomique (AFM) et du dénombrement des bactéries adhérees sur les surfaces de cuivre et de titane.

I. Protocole des tests

Dans ce paragraphe, sont présentés les protocoles de mise en culture des bactéries en milieu liquide ainsi que les protocoles de mise en place des tests sur les surfaces de cuivre et de titane, nues et fonctionnalisées.

I.1. Culture des bactéries en solution

Avant chaque test, il est essentiel de préparer une culture « fraîche » de bactéries. Pour cela, une solution contenant 0,37 g de BHI (bouillon de culture) dans 10 mL d'H₂O distillée est stérilisée pendant 20 minutes à 120°C puis refroidie sous atmosphère stérile jusqu'à température ambiante. 200 µL d'un aliquot glycérolé de *Listeria* (10^9 bactéries.mL⁻¹) sont ajoutés pour obtenir une concentration finale de 2×10^7 bactéries.mL⁻¹ et incubés à 37 °C pendant une nuit [7]. La suspension obtenue ($S_{\text{mère}}$) est ensuite analysée par spectrométrie UV à 600 nm afin de déterminer la concentration moyenne en bactéries : celle-ci est de l'ordre de 10^9 bactéries.mL⁻¹ ($DO \approx 1$). Selon le test mis en place, nous avons utilisé directement la suspension $S_{\text{mère}}$, ou une suspension diluée appelée S_{fil} . S_{fil} est obtenue en centrifugeant la solution de $S_{\text{mère}}$ pendant 10 minutes à 10 000 g. Le culot est ensuite rincé deux fois avec 10 mL de PBS stérile puis dilué de façon à obtenir une concentration de 10^6 bactéries.mL⁻¹ dans du milieu BHI stérile.

I.2. Test d'adhésion des bactéries (Test 1)

Ce premier test en présence de bactéries permet de connaître l'influence des différentes couches organiques sur la deuxième étape de la formation du biofilm : l'adhésion des bactéries.

Sur chaque surface de cuivre ou de titane, une goutte de 100 µL de $S_{\text{mère}}$ est déposée et laissée pendant 3 heures à température ambiante, sous atmosphère humide et stérile. Les surfaces sont ensuite rincées 6 fois avec 100 µL d'H₂O distillée et séchées délicatement à l'air sec [8]. La quantité de bactéries fixées est évaluée, de façon semi-quantitative, par spectroscopie infrarouge PM-IRRAS.

Il est important de noter que dans ces conditions, les bactéries ne sont pas en mesure de croître ; à température optimale, 37°C, il faut environ 40 minutes aux *Listeria* pour se diviser [9]. Si la température est abaissée d'une dizaine de degrés le temps de division est quasiment triplé.

Les résultats obtenus rendent compte de l'adhésion, ou de la non-adhésion, des bactéries sur les différentes surfaces.

I.3. Test d'endommagement des bactéries (Test 2)

Après adhésion, les bactéries commencent à sécréter un exopolymère servant ensuite à former le biofilm. Seules les bactéries vivantes, ou peu endommagées, peuvent produire cette substance. Ce deuxième test consiste à comparer la viabilité ou l'endommagement des bactéries sur les surfaces de cuivre et de titane nues et sur les surfaces fonctionnalisées avec la Mag et HEWL.

Dans ce cas, comme pour le test précédent, l'attention est portée seulement sur l'état des bactéries ayant adhéré aux surfaces et aucunement sur leur croissance. Le dépôt de bactéries est donc réalisé dans les mêmes conditions que le premier test (3 heures à 25°C). Les renseignements sur la viabilité ou l'endommagement des bactéries sont obtenus grâce à l'observation des bactéries adhérentes en AFM (Microscope à Force Atomique). En effet, sur les images AFM, il est possible de détecter les changements de forme des bactéries. Les images ont été enregistrées à l'air afin d'éviter les effets de capillarité sur la pointe qui peuvent être induits par la présence d'eau [10, 11] et qui perturbent la caractérisation des films bactériens et de la topographie des cellules.

I.4. Test de la croissance des bactéries (Test 3)

Le biofilm prend finalement forme si les bactéries se développent sur la surface et forment des agrégats protégés par des exopolymères. Ce dernier test permet d'évaluer l'action anti-croissance bactérienne que peuvent exercer les polymères (PMMA+PEG et H₂N-PEG-NH₂), la Mag et HEWL.

Sur chaque surface de cuivre et de titane est déposée une goutte de 100 µL de S_{filie} qui est incubée pendant 3 heures à 37°C, sous atmosphère humide et stérile. Dans ces conditions, les bactéries peuvent se multiplier et croître sur les surfaces sur lesquelles elles sont déposées. La goutte de 100 µL est ensuite retirée et les échantillons rincés dans 3 bains de NaCl 0,9 % stérile afin d'éliminer les bactéries n'ayant pas adhéré aux surfaces testées (voir Figure 2). La récupération des bactéries adhérentes s'effectue en sonicant pendant 3 minutes les surfaces de cuivre ou de titane testées dans 2 mL de NaCl 0,9 % stérile. La suspension est ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 10 000 g. 1,8 mL de surnageant sont retirés puis après homogénéisation deux dilutions dans du PBS

stérile sont réalisées : une à 1/10^{ème} et une deuxième à 1/100^{ème}. Ces deux dilutions ont pour but d'éviter de se retrouver avec un trop grand nombre de colonies sur les boîtes de Pétri qui ne pourraient être comptées. En effet, chaque bactérie vivante, non endommagée, déposée sur le milieu BHI gélifié va se multiplier et former une colonie (voir photo de la Figure 2).

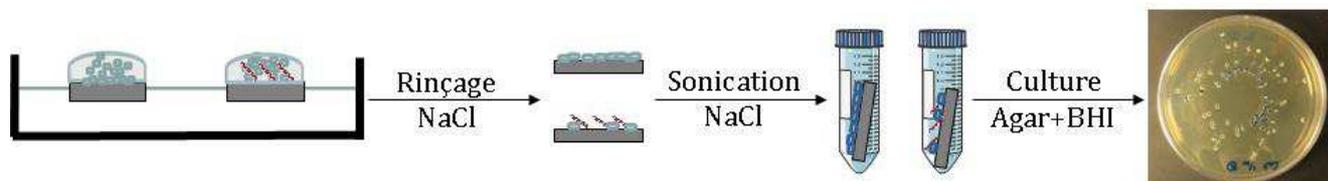


Figure 2 : Mise en place du test de croissance bactérienne ou dénombrement CFU (colony-forming unit).

Pour chaque dilution, deux boîtes de Pétri ont étéensemencées avec 50 µL de suspension bactérienne. Cet ensemencement logarithmique (ou « en spirale ») est automatiquement géré par un automate WASP (AES France). Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à 37°C pendant 40 heures et après incubation le décompte du nombre de colonies sur chaque boîte est effectué à l'aide d'un abaque fournie par le fabricant de l'appareil. Le pourcentage d'inhibition de croissance éventuellement observé est calculé par rapport au nombre de colonies formées (CFU) sur les surfaces de cuivre ou de titane non fonctionnalisées grâce à l'Équation 1 :

$$\% \text{Inhibition} = \left(1 - \frac{\text{CFU}_{\text{échantillon}}}{\text{CFU}_{\text{référence}}} \right) \times 100$$

Équation 1: Calcul du pourcentage d'inhibition de croissance bactérienne.

Remarque : le temps initial d'incubation sur gélose est de 24 heures. Cette durée a été allongée afin d'obtenir des colonies plus développées et faciliter le dénombrement.

II. Tests conduits sur les surfaces de cuivre fonctionnalisées

II.1. Surfaces fonctionnalisées par MUA et PEG

La première série de surfaces de cuivre fonctionnalisées testées est celle issue des protocoles de co-greffage : Cu-MUA, Cu-MUA-Mag, Cu-PEG, Cu-PEG-Mag et Cu-PEG-HEWL. Sur ces surfaces, ont été testés l'adhésion et l'endommagement des bactéries (Test 1 et Test 2). Les tests de croissance bactérienne ont également été menés mais les

résultats sont faussés en raison de la propriété biocide intrinsèque du cuivre et des ions cuivriques [12-14].

II.1.a. Test d'adhésion bactérienne (Test 1)

Les résultats du Test 1 (adhésion bactérienne) sont obtenus en analysant les spectres InfraRouge réalisés après dépôt des bactéries, rinçage et séchage des surfaces. Le spectre infrarouge obtenu après dépôt de bactéries sur la surface d'or nu (Au+*L. ivanovii*) représenté sur la Figure 3-a met en évidence les bandes caractéristiques étudiées.

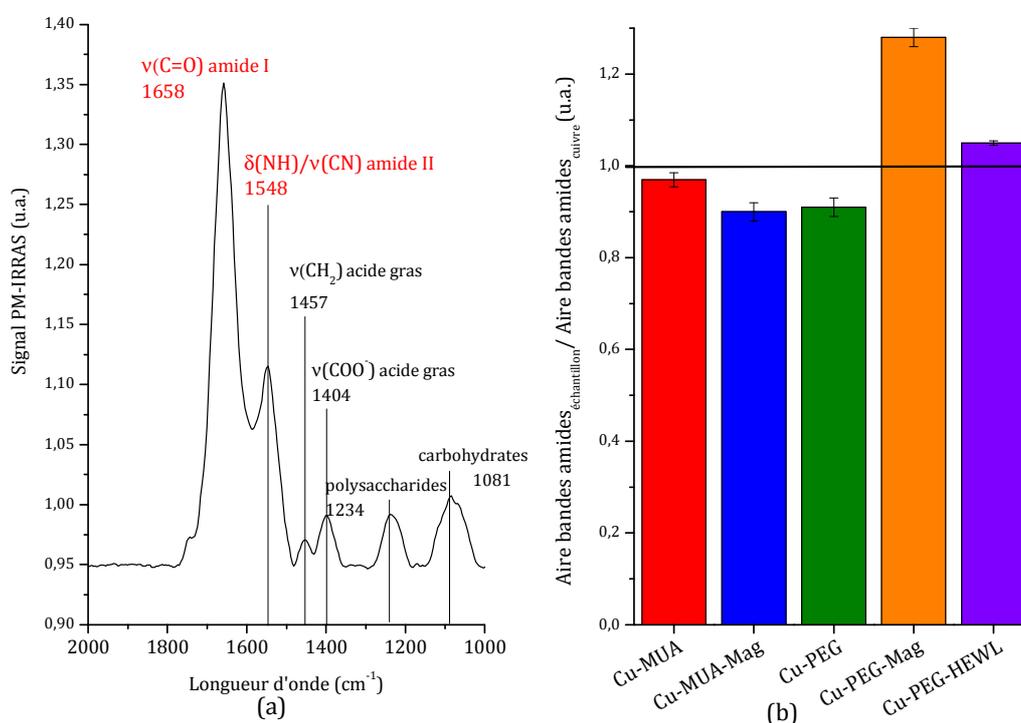


Figure 3 : (a) Spectre infrarouge des surfaces Au+*L. ivanovii* et (b) Rapport entre les aires des bandes amides de Cu-MUA, Cu-MUA-Mag, Cu-PEG, Cu-PEG-Mag et Cu-PEG-HEWL comparées à l'aire des bandes amides sur les surfaces de cuivre nues, après dépôt des bactéries.

Les analyses ont porté plus précisément sur la comparaison de l'aire des bandes amides sur chacun des spectres obtenus après dépôt des bactéries. Afin de faciliter la lisibilité des résultats, la Figure 3-b présente le rapport des aires des bandes amides des bactéries adhérentes sur les surfaces fonctionnalisées en comparaison avec les surfaces de cuivre nues en utilisant le rapport suivant : $\frac{\text{Airebandeamide}_{\text{échantillon}}}{\text{Airebandeamide}_{\text{cuivre}}}$. Le trait à 1,0 u.a.

représente l'aire de référence des bandes amides mesurée sur les surfaces de cuivre nues. En multipliant ce rapport par 100, il est possible de raisonner en pourcentage

d'adhésion. Comparant à l'adhésion sur les surfaces de cuivre propres, 97% des bactéries se déposent sur les surfaces de Cu-MUA et 91% sur les surfaces de Cu-PEG. Il a été montré au Chapitre III-II que le MUA formait une monocouche homogène sur la surface de cuivre et cet espaceur n'est pas connu pour avoir des propriétés antiadhésives [15] ; en prenant en compte les barres d'erreur sur ces mesures, une telle diminution de l'adhésion n'est pas significative. Sur Cu-PEG, si on compare les résultats d'adhésion de bactéries (Figure 3-b) aux résultats d'adsorption de protéines décrits au Chapitre III-VIII, on constate que le pouvoir antiadhésif du HS-PEG-COOH est plus faible (- 9%) vis-à-vis des bactéries que de la BSA (- 34%). Il est pourtant attendu que le polymère limite cette adhésion grâce à sa chaîne PEG [8, 16]. Cet écart est certainement dû à la courte chaîne du HS-PEG-COOH (seulement 8 motifs) ainsi qu'au faible recouvrement de la surface de cuivre par le HS-PEG-COOH (décrit dans le Chapitre III-III). Ces deux facteurs pourraient mener à l'obtention d'une surface possédant un caractère hydrophile faible. Les mesures d'angle de contact effectuées sur cette surface (Cu-PEG) donnent un angle de contact égal à $103,3 \pm 1,5^\circ$ alors que dans la littérature on trouve, pour les chaînes longues, des valeurs autour de 30° [17, 18]. Ces dernières données confirment le caractère assez hydrophobe, donc adhésif [19], de ces surfaces fonctionnalisées avec un PEG court.

Enfin, sur les surfaces Cu-PEG-Mag et Cu-PEG-HEWL on observe une augmentation de l'adhésion par rapport aux surfaces de cuivre nu. Dans le Chapitre III-VII, nous avons montré que le greffage de la Magainine I et de l'enzyme HEWL sur les surfaces de Cu-PEG est assez faible. Cette faible quantité suffit à faciliter l'adhésion des bactéries en raison de la formation de liaisons hydrogènes ou de Van der Waals entre les molécules à activité biologique et les cellules bactériennes [20].

Sur les surfaces de cuivre fonctionnalisées par des molécules antibactériennes, on n'observe pas, ou très peu, d'influence des couches organiques vis-à-vis de l'adhésion des bactéries.

II.1.b. Test d'endommagement des bactéries (Test 2)

Le Test 2 consiste, à partir des images AFM des bactéries adhérentes sur les différentes surfaces, à déterminer leur état : endommagé ou non. Après avoir rincé et séché les surfaces sur lesquelles les bactéries ont été déposées, les échantillons sont analysés avec le microscope AFM (Nanoscope 8) en mode QNM® à l'air.

En comparant l'image MEB de la *Listeria* (Figure 4-a) et l'image AFM de la même bactérie sur les surfaces d'or (Figure 4-b), on remarque que celle-ci conserve sa forme native. Ce résultat montre que les bactéries conservent leur intégrité comme attendu sur l'or, connu pour être biocompatible et souvent utilisé comme vecteur de médicaments [21-23]. Ces deux images permettent d'évaluer les dimensions d'une bactérie vivante : longueur (L) de 2,4 μm , largeur (l) de 1,0 μm et hauteur (H) (entre la surface et la partie supérieure de la bactérie) de 320 nm. L'image de la Figure 4-b sert au contrôle de la bonne croissance et de la viabilité des bactéries avant dépôt sur les surfaces fonctionnalisées. Les changements observés ne seront, de ce fait, dus qu'à l'activité de la couche externe des échantillons et non pas à une pollution lors de la préparation de la suspension bactérienne.

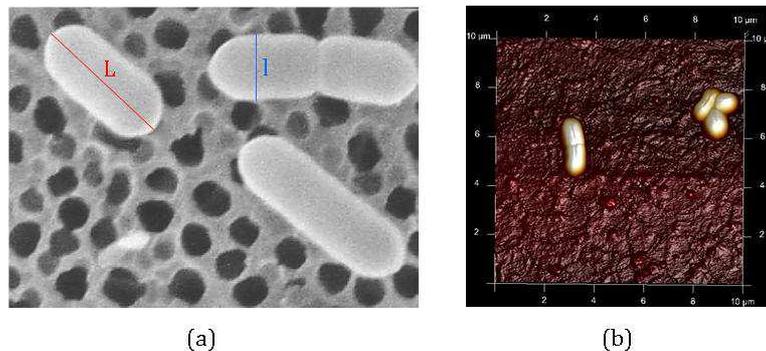


Figure 4 : (a) Image MEB (x 30 000) de *Listeria* non endommagées, extraît de la référence [24] et (b) Image AFM (10 x10 μm) de *Listeria* déposée sur surface d'or nu.

Sur la Figure 5 sont représentées les images AFM après dépôt des bactéries sur la surface de cuivre nu (Figure 5-a) et les surfaces fonctionnalisées (Figure 5-b à f). Pour chacune des images, la forme des bactéries adhérentes ainsi que les dimensions sont comparées aux cellules en suspension (Figure 4-a) et sur les surfaces d'or (Figure 4-b).

La Figure 5-a montre l'image AFM d'une bactérie adhérente sur la surface de cuivre nu. Celle-ci a une forme très éloignée des bactéries de référence présentées à la Figure 4 : on constate un fort affaissement sur le côté gauche de la bactérie ($H = 50 \text{ nm}$). Les autres dimensions de la bactérie sont peu affectées par la présence du cuivre ($L = 2,1 \mu\text{m}$ et $l = 0,7 \mu\text{m}$) mais cet affaissement traduit un endommagement de la bactérie causé par l'activité biocide intrinsèque du cuivre [12, 13]. Par contre, sur les surfaces de Cu-MUA (Figure 5-b) et Cu-PEG (Figure 5-d), les bactéries devraient conserver leur forme native,

ce qui n'est pas le cas dans cette étude ($L = 1,5 \mu\text{m}$, $l = 0,5 \mu\text{m}$ et $H = 140 \text{ nm}$ au maximum sur Cu-PEG et 200 nm sur Cu-MUA). Le MUA, greffé sur des surfaces d'or est connu pour ne pas endommager la paroi cellulaire [25] et, par ailleurs, les dérivés PEGs sont souvent utilisés dans la synthèse de matériaux biocompatibles [26, 27]. Il a été montré au Chapitre III-III que la couche de HS-PEG-COOH n'est pas homogène ; l'endommagement des bactéries est donc sûrement dû à l'accessibilité à la surface de cuivre. De même, il est possible que la couche homogène de MUA (caractérisation au Chapitre III-II) ne soit pas assez épaisse (18 \AA en moyenne) pour masquer la surface de cuivre et donc inhiber l'activité biocide de celui-ci.

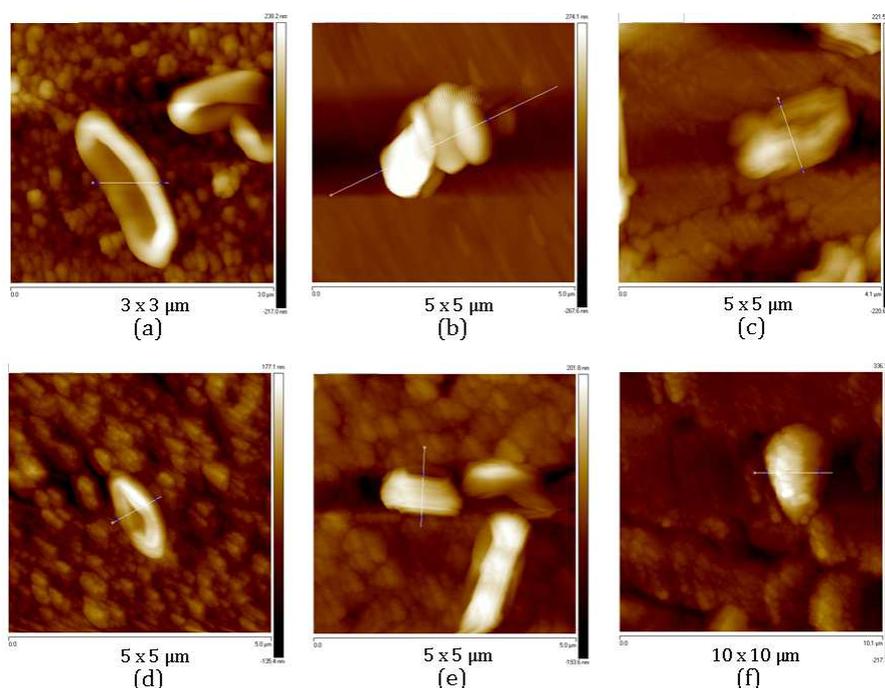


Figure 5 : Images AFM enregistrées après dépôt des *Listeria* sur (a) cuivre nu, (b) Cu-MUA, (c) Cu-MUA-Mag, (d) Cu-PEG, (e) Cu-PEG-Mag et (f) Cu-PEG-HEWL.

Les bactéries en contact avec la Magainine greffée sur Cu-MUA-Mag (Figure 5-c) ou sur Cu-PEG-Mag (Figure 5-e) et avec HEWL (Figure 5-f) présentent aussi de fortes déformations. Sur les surfaces Cu-MUA-Mag, comme sur les surfaces de cuivre nu, il y a un fort affaissement de la bactérie ($H = 150 \text{ nm}$ au maximum) traduisant un endommagement de celle-ci. Sur Cu-PEG-Mag, l'influence de la couche supérieure se visualise par le changement de morphologie de la bactérie (bâtonnet écrasé par rapport aux bactéries sur surfaces d'or). Il est cependant difficile de faire la part entre l'endommagement provoqué par l'activité biocide de la surface de cuivre et l'activité antibactérienne persistante de chacune des molécules greffées.

Ce Test 2 a mis en évidence une inhibition possible des surfaces de cuivre sur la troisième étape de formation d'un biofilm. En effet, toutes les surfaces présentées permettent d'endommager les bactéries adhérentes. Par contre, il est difficile de séparer l'effet biocide intrinsèque de la surface de cuivre et l'activité antibactérienne des molécules greffées sur ces surfaces.

II.2. Tests conduits sur les surfaces fonctionnalisées par des polymères photolabiles

II.2.a. Test d'adhésion bactérienne (Test 1)

Sur la Figure 6 sont comparés les résultats obtenus après le Test 1. Pour chacune des surfaces, les aires des bandes amides dues à la présence de bactéries adhérentes ont été mesurées et comparées à l'aire des bandes amides obtenues après adhésion des bactéries sur les surfaces de cuivre nu. Ceci permet de faire une étude semi-quantitative du pouvoir antiadhésif des différentes couches greffées (le trait à 1,0 u.a. représentant l'aire des bandes amides mesurée sur la surface de référence, Cu nu, après dépôt des bactéries). La différence d'adhésion de bactéries sur les surfaces avant irradiation, et après irradiation et fonctionnalisation, est très importante, mettant en évidence l'intérêt de l'utilisation d'un tel procédé dans la lutte contre la formation de biofilm.

Sur les surfaces de Cu-PMMADPT, on observe une forte augmentation de l'adhésion des bactéries (+40% environ en prenant en compte les barres d'erreur). Dans le Chapitre III-VIII, nous avons montré que l'adsorption de protéines sur les surfaces Cu-PMMADPT était augmentée de 30% par rapport à l'adsorption sur Cu nu, en raison du fort pouvoir adhésif du PMMA [28, 29].

On note une légère diminution après irradiation due à l'élimination d'une partie des motifs PMMA. Cette diminution est plus faible que celle observée lors du test d'adsorption de protéines (Chapitre III-VIII) en raison de la différence de taille entre la protéine de BSA et les bactéries [30].

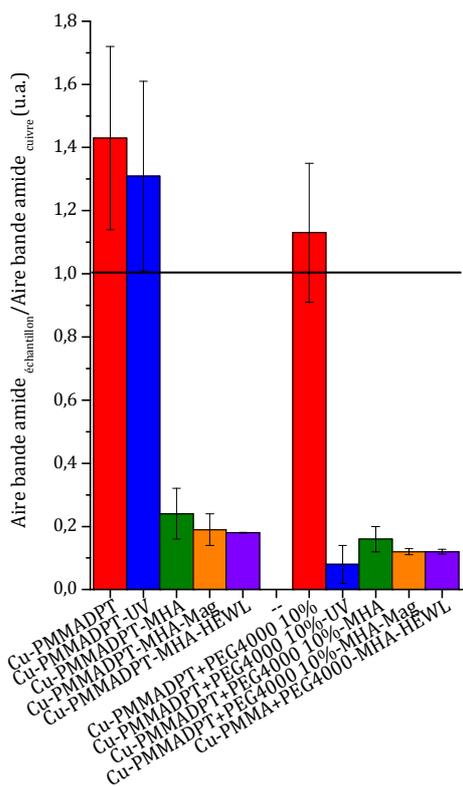


Figure 6 : Rapport entre les aires des bandes amides sur les surfaces fonctionnalisées comparées à l'aire des bandes amides sur les surfaces de cuivre nues., après dépôt des bactéries.

La diminution de l'adhésion bactérienne observée sur les surfaces Cu-PMADPT+PEG4000 à 10% est quant à elle due à la présence des motifs PEGs antiadhésifs présents dans le copolymère, comme déjà observé lors du test d'adsorption de protéines (Chapitre III-VIII). Ce phénomène est fortement amplifié après irradiation des surfaces Cu-PMADPT+PEG4000 à 10% (le rapport des bandes amides est de 0,1 u.a. soit 10% de l'adhésion observée sur le cuivre nu). Comme pour le test d'adsorption de protéines, ceci est dû à la dégradation des motifs PMMA après irradiation, et à la conservation des PEGs. Sur les surfaces fonctionnalisées après irradiation de Cu-PMADPT, l'adhésion est fortement diminuée (le rapport des bandes amides est de 0,2 u.a. en moyenne). Nous avons vu au Chapitre III-VI que le MHA se greffe majoritairement sur la surface de cuivre mais qu'une partie peut réagir avec les motifs PMMA. La diminution de l'adhésion des bactéries peut provenir de l'effet combiné de la perte de motifs PMMA et du recouvrement de certaines unités par des molécules de MHA, moins adhésives que le PMMA. Les surfaces fonctionnalisées après irradiation de Cu-PMADPT-PEG4000 à 10% présentent une quantité de bactéries similaires aux surfaces avant irradiation. Le faible greffage de la Magainine et de HEWL (Chapitre III-VII), induisant une augmentation de l'adhésion des bactéries par formation de liaison

hydrogène ou de Van der Waals, est largement compensé par l'effet antiadhésif des résidus de PEGs après irradiation.

Sur les surfaces fonctionnalisées par des copolymères photosensibles, il est possible de fortement limiter l'adhésion des bactéries par rapport aux surfaces de cuivre non traitées et notamment en utilisant les copolymères PMMA-PEG4000 à 10%. Cette diminution de l'adhésion est conservée après greffage de la Mag et de HEWL.

II.2.b. Test d'endommagement des bactéries (Test 2)

Les images AFM des surfaces de cuivre fonctionnalisées par les dérivés de PMMA, enregistrées après dépôt des bactéries, sont regroupées sur la Figure 7. En raison du caractère adhésif du PMMA et de l'épaisseur des couches de polymères, il est difficile d'obtenir des images nettes des bactéries adhérees. Les bactéries semblent s'enfoncer dans la couche de polymère et on ne peut qu'estimer grossièrement leurs dimensions au sein de ces couches. Les longueurs L et largeurs l des bactéries semblent peu varier au contact de la couche de polymère par rapport aux images de références (L variant de 1,5 μm à 3 μm et l variant de 0,7 μm à 2 μm). En revanche, les hauteurs H mesurées sont comprises entre 500 nm et 1100 nm ce qui laisse supposer la formation d'agrégats de bactéries localisés sur les surfaces fonctionnalisées, ou une différence de comportement sur une surface plus souple. De ce fait, on ne peut avoir accès à l'état de la bactérie en contact direct avec la couche de copolymère.

Les surfaces de cuivre fonctionnalisées par des polymères photosensibles ne sont pas adaptées au Test 2 et aux analyses en AFM en raison de l'épaisseur de la couche organique. Il est donc difficile de connaître l'influence des molécules greffées sur la paroi bactérienne : les bactéries adhérees sont-elles encore viables ou endommagées par la présence de la Magainine et de l'enzyme HEWL ?

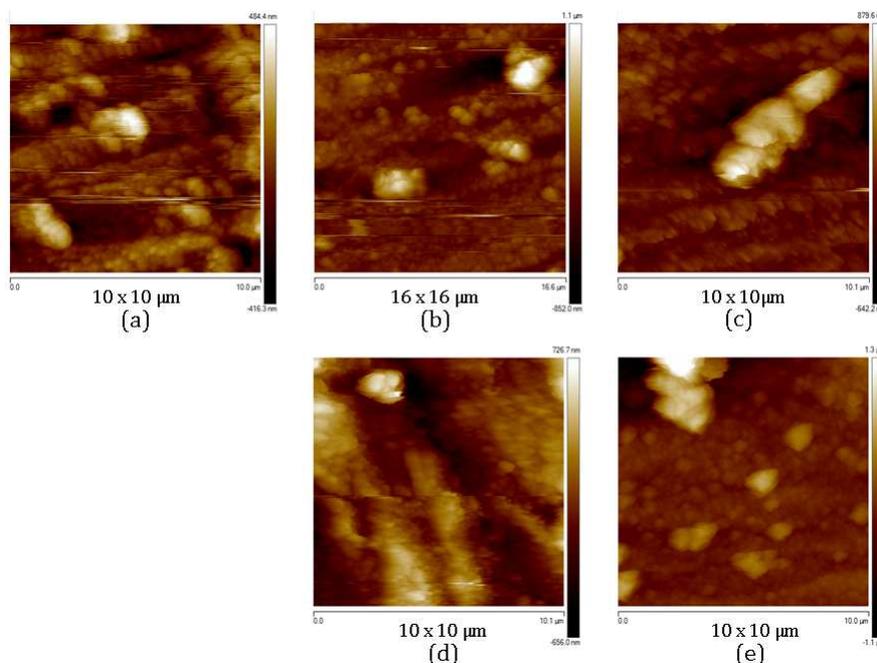


Figure 7 : Image AFM du dépôt de *L. innocua* sur les surfaces : (a) Cu-PMMA ; (b) Cu PMMA-UV-Mag ; (c) Cu-PMMA-UV-HEWL ; (d) Cu-PMMA+PEG4000-UV-Mag, (e) Cu-PMMA+PEG4000-UV-HEWL.

III. Tests conduits sur les surfaces de titane fonctionnalisées

III.1. Test d'adhésion bactérienne (Test 1)

Comme pour les surfaces de cuivre, les tests bactériens ont été menés sur les surfaces de Ti-Cat, Ti-Cat-PEG, Ti-Cat-PEG-Mag, Ti-Cat-PEG-Téré et Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL. Dans un premier temps, l'adhésion bactérienne a été mesurée en comparant l'aire des bandes amides des bactéries adhérentes sur les surfaces fonctionnalisées à celle obtenue après dépôt des bactéries sur le titane nu (représentées Figure 8-a). Ces rapports d'aires sont reportés sur la Figure 8-b.

La Figure 8-b met en évidence les effets adhésifs ou antiadhésifs des différentes couches greffées sur les surfaces de titane. Ces résultats sont à mettre en rapport avec les données obtenues au Chapitre IV sur l'efficacité du greffage des différentes couches et sur leur comportement vis-à-vis de l'adsorption de protéines (Chapitre IV-VI).

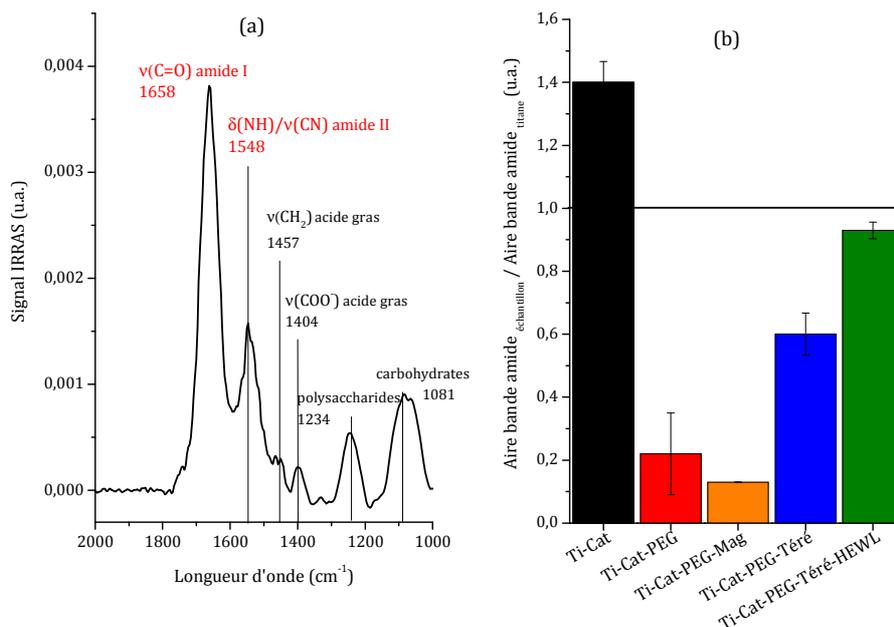


Figure 8 : (a) Spectre infrarouge des surfaces Ti + *L. innocua* et (b) Rapport entre les aires des bandes amides de Ti-Cat, Ti-Cat-PEG, Ti-Cat-PEG-Mag, Ti-Cat-PEG-Téré et Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL comparées à l'aire des bandes amides sur les surfaces de Ti nu, après dépôt des bactéries.

Il apparaît que les surfaces Ti-Cat possèdent un fort pouvoir adhésif vis-à-vis des bactéries en comparaison avec le titane nu (rapport des aires égal à 1,4 u.a.). Nous avons vu au Chapitre IV-III que le catéchol formait des multicouches laissant les fonctions acides carboxyliques accessibles. Cette couche organique est une source de nourriture pour les bactéries et la présence de fonctions acides carboxyliques en surface peut permettre d'augmenter l'adhésion de différentes cellules [31, 32]. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation de l'adsorption de protéines (+80% d'adhésion en moyenne par rapport à Ti nu) observée sur Ti-Cat (Chapitre IV-VI). Après greffage du H₂N-PEG-NH₂, on constate une forte diminution de l'adhésion bactérienne (rapport des aires égal à 0,2 u.a. en moyenne). Le H₂N-PEG-NH₂ forme une monocouche (sans trou) à la surface des échantillons de Ti-Cat-PEG et il possède une chaîne comprenant 68 motifs ($M_w = 3000 \text{ g.mol}^{-1}$), une longueur suffisante pour que les chaînes se gonflent d'eau et empêchent l'adhésion des bactéries [33], [16, 34]. Ce phénomène a également été observé lors du test d'adsorption de protéines décrit au Chapitre IV-VI (-70% d'adhésion en moyenne par rapport à Ti nu). Le greffage de la Magainine sur la couche de H₂N-PEG-NH₂ permet de diminuer encore l'adhésion des bactéries. Les analyses par InfraRouge et XPS ont montré un faible taux de recouvrement de la Magainine sur le H₂N-PEG-NH₂, qui permet de conserver l'effet antiadhésif de la couche de H₂N-PEG-NH₂

en surface. D'autre part, le spectre XPS N1s a montré la présence de fonctions amines protonées à la surface de l'échantillon Ti-Cat-PEG-Mag, connues pour avoir un effet répulsif sur les bactéries [35]. Vis-à-vis de l'adhésion des bactéries, les deux molécules ont un effet coopératif ; ce n'était pas le cas vis à vis de l'adsorption des protéines (-65% d'adhésion en moyenne par rapport à Ti nu) car la Magainine exprime aussi un caractère adhésif en formant des liaisons H et de Van der Waals avec les petites molécules [20]. Lors du greffage du téréphtalaldéhyde, on observe une légère augmentation de l'adhésion bactérienne par rapport aux surfaces Ti-Cat-PEG. La formation d'une monocouche de Téré sur la couche de H₂N-PEG-NH₂ diminue l'action antiadhésive du polymère comme déjà constaté lors du test d'adsorption des protéines (-50% d'adhésion en moyenne par rapport à Ti nu). D'autre part, les molécules de Téré en réagissant avec les fonctions amines terminales contribuent à la diminution de la quantité d'ions ammoniums. L'adhésion des bactéries sur les surfaces Ti-Cat-PEG-Téré est légèrement plus élevée que l'adsorption de protéines car, tout comme le catéchol, le téréphtalaldéhyde représente une source de carbone pour les bactéries. Enfin, la présence de HEWL sur les surfaces Ti-cat-PEG-HEWL induit une légère diminution de l'adhésion bactérienne par rapport au Ti nu (rapport des aires égal à 0,9 u.a. en moyenne) et une forte augmentation par rapport au Ti-Cat-PEG. Cet état est dû à l'expression de deux effets antagonistes. D'une part la présence de fonctions amines protonées induit un effet antibactérien [35]. D'autre part la formation d'une monocouche épaisse de HEWL, mise en évidence par les analyses IRRAS et XPS, masque totalement l'effet antiadhésif du PEG.

Le Test 1 d'adsorption bactérienne a permis de mettre en évidence le rôle primordial de la présence et de l'accessibilité de la couche de H₂N-PEG-NH₂ dans l'expression du caractère antiadhésif et antibactérien des surfaces de titane.

III.2. Test d'endommagement des bactéries (Test 2)

Malgré la forte diminution de l'adhésion sur certaines surfaces, les bactéries adhèrent tout de même aux échantillons et le Test 2 permet de connaître l'effet des différentes couches sur l'endommagement de la paroi bactérienne. Sur la Figure 9 sont regroupées les images AFM obtenues après dépôt des bactéries sur chacune des surfaces.

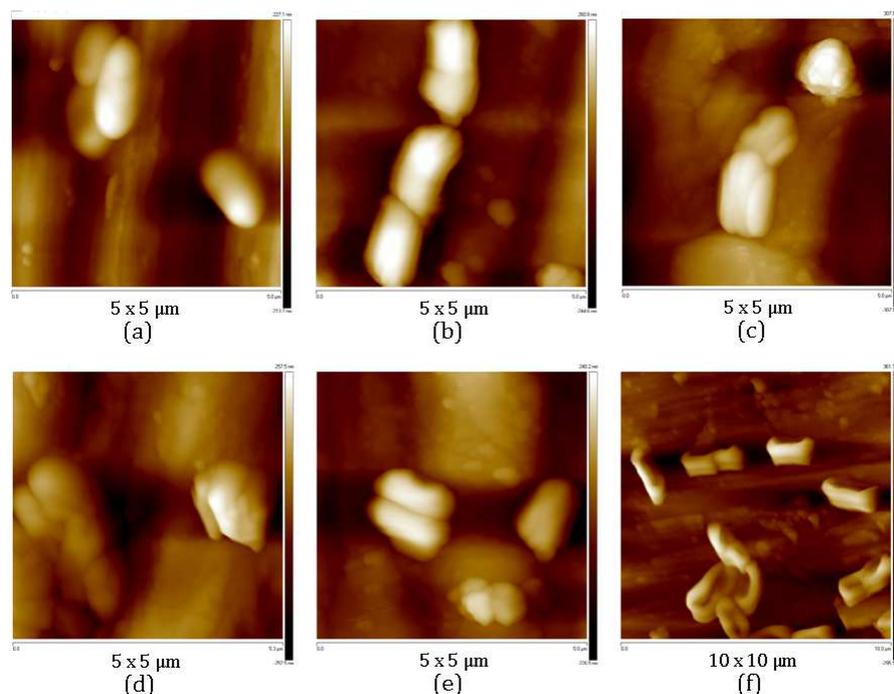


Figure 9 : Image AFM du dépôt de *Linnocua* sur les surfaces : (a) Ti-OH ; (b) Ti-Cat ; (c) Ti-Cat-PEG, (d) Ti-Cat-PEG-Mag, (e) Ti-Cat-PEG-Téré et (f) Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL.

Comme pour les surfaces de cuivre, la forme des bactéries observées sur les images de la Figure 9 est comparée à la forme de celles-ci en suspension (Figure 4).

Sur les surfaces de titane nu (Figure 9-a), les bactéries conservent leur forme native ($L = 2 \mu\text{m}$, $l = 1 \mu\text{m}$ et $H = 300 \text{ nm}$) [36], en accord avec la biocompatibilité connue des surfaces de titane [37, 38]. Les surfaces Ti-Cat (Figure 9-b) et Ti-Cat-PEG-Téré (Figure 9-e) ne semblent pas avoir d'influence sur la forme des bactéries adhérentes ($L = 1,8 \mu\text{m}$, $l = 0,7 \mu\text{m}$ et $H = 300 \text{ nm}$). Ceci n'est pas surprenant car ni le Cat ni le Téré ne sont censés avoir une activité vis-à-vis des bactéries.

Par contre, sur les surfaces Ti-Cat-PEG-Mag (Figure 9-d) et Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL (Figure 9-f) on note un affaissement ($H = 130 \text{ nm}$ sur Ti-Cat-PEG-Mag et 140 nm sur Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL) et une déformation des bactéries. Cette observation confirme que la Magainine et HEWL conservent leur activité antibactérienne une fois greffées [25]. La Magainine I est connue en effet pour créer des pores dans les membranes bactériennes [39] alors que HEWL fait partie de la famille des lysozymes et peut donc lyser la paroi bactérienne [40].

Les images AFM obtenues au cours du Test 2 mettent en évidence la conservation de l'activité antibactérienne de la Magainine et de l'enzyme HEWL après immobilisation sur les couches de $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$.

III.3. Test de croissance bactérienne (Test 3)

Cependant, avec les seules images AFM il n'est pas possible de déterminer si les bactéries sont seulement endommagées ou mortes. Si les bactéries sont juste endommagées, une fois réensemencées sur un milieu de culture, elles peuvent se développer [41]. Le Test 3 a été effectué afin d'évaluer la viabilité des bactéries après leur mise en contact avec les différentes couches organiques.

Le dénombrement des bactéries ayant adhéré sur les surfaces a été effectué à partir de la dilution 1/100^{ème}. En effet, les boîtes obtenues à partir de la dilution au 1/10^{ème} étaient saturées (trop de bactéries dans le culot). Le dénombrement pris comme référence dans l'Équation 1, est celui effectué sur la surface de titane nu (Rappel de l'équation : $\%Inhibition = \left(1 - \frac{CFU_{\text{échantillon}}}{CFU_{\text{référence}}}\right) \times 100$). La Figure 10-a reporte le nombre de colonies observées après dépôt des bactéries sur les surfaces de titane fonctionnalisées et la Figure 10-b présente les résultats sous forme de pourcentage d'inhibition.

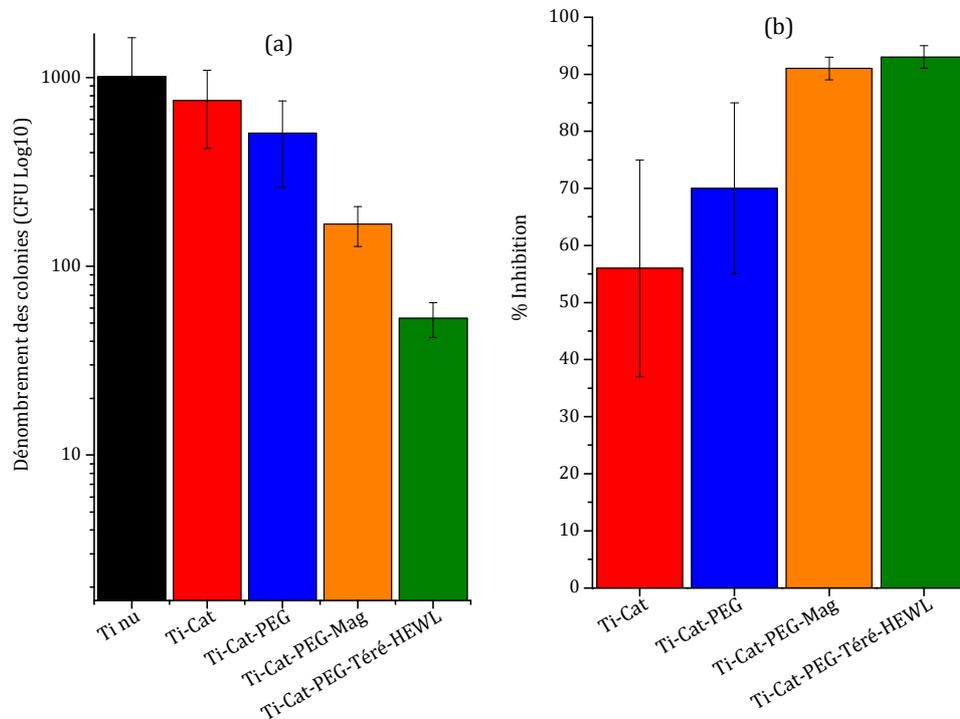


Figure 10 : (a) Dénombrement des colonies et (b) Pourcentage d'inhibition de croissance des bactéries après dépôt sur les échantillons de titane.

Les fonctionnalisations successives entraînent une diminution du nombre de colonies observées. Sur les surfaces de Ti-Cat, l'inhibition de croissance est égale à 55% en moyenne, or le catéchol n'est pas connu pour avoir des propriétés antibactériennes. Le pourcentage d'inhibition de croissance dépend de la quantité de bactéries récupérées après sonication, et de leur viabilité. Dans le cas des surfaces Ti-Cat, nous avons vu que l'adhésion des bactéries était très forte (Test 1) et qu'elles ne subissaient pas de dommage (Test 2). Sur les surfaces de Ti-Cat-PEG l'inhibition va jusqu'à 70% en moyenne. Il a été démontré que l'adhésion des bactéries était fortement limitée grâce à l'action antiadhésive du H₂N-PEG-NH₂ (Test 1) ; l'inhibition observée sur ces surfaces est due à la faible quantité de bactéries ayant réussi à adhérer en premier lieu.

La présence des molécules antibactériennes permet d'obtenir **90% d'inhibition** de croissance en moyenne. Sur les surfaces de Ti-Ca-PEG-Mag, l'adhésion des bactéries est fortement diminuée en raison de l'effet synergique du H₂N-PEG-NH₂ et de la Magainine (Test 1) et les images AFM montrent que malgré le faible taux de recouvrement de la Magainine, les bactéries sont endommagées par le peptide (Test 2). La forte diminution de croissance résulte de la combinaison de deux effets : la faible quantité de bactéries adhérees sur Ti-Cat-PEG-Mag et l'endommagement de ces quelques bactéries dû à la présence de la Magainine. Pour les surfaces de Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL, le test d'adhésion de bactéries (Test 1) a montré que la présence de HEWL permettait de réduire très légèrement l'adhésion. La forte inhibition de croissance obtenue sur ces surfaces est donc entièrement due à l'activité antibactérienne de l'enzyme. Ces résultats sont cohérents avec des études précédentes menées au laboratoire dans lesquelles l'inhibition due à la Magainine sur couche de chitosane était estimée à 75% [42] et à 80% [25] une fois greffée sur le MUA ; dans le cas de HEWL, le greffage sur une couche de copolymère PEI-PEG sur l'acier inoxydable permettait même de conserver 100% de l'activité de l'enzyme [8].

Grâce au greffage covalent de la Magainine ou de HEWL sur la surface de titane il est possible d'inhiber jusqu' 93% de la croissance bactérienne par rapport à la croissance sur titane nu, selon la molécule utilisée.

Conclusion

La fonctionnalisation des surfaces de cuivre par co-greffage du MUA ou du PEG avec la Magainine ou HEWL ne permet pas de limiter l'adhésion des bactéries. En revanche, la présence de Magainine et HEWL sur les surfaces de cuivre semble avoir un effet sur la paroi des bactéries : affaissement ou déformation mais il est difficile de différencier cet effet de l'effet biocide intrinsèque au cuivre. La fonctionnalisation du cuivre par des polymères photolabiles apparait comme une bonne solution car ces couches permettent de diminuer fortement l'adhésion des bactéries (Test 1). Par contre il n'est pas possible de savoir avec le Test 2 si l'effet de la Magainine et de HEWL sur la paroi bactérienne est conservé après greffage sur les dérivés de Cu-PMMA. Il sera intéressant de mener le Test 3 sur ces surfaces car l'épaisseur de la couche de polymère (entre 300 et 500 nm) permettra d'inhiber l'activité biocide du cuivre. Les résultats obtenus seront dus uniquement à l'effet de la Magainine ou de HEWL sur les bactéries.

Les trois tests menés sur les surfaces de titane fonctionnalisées montrent que le greffage de la couche de $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$ et de la Magainine ou de HEWL permet d'influer sur chaque étape de la formation du biofilm. Grâce à l'activité antiadhésive du motif PEG, il y a environ 5 fois moins de bactéries adhérees sur les surfaces Ti-Cat-PEG et jusqu'à 7 fois moins sur les surfaces Ti-Cat-PEG-Mag en ajoutant l'activité antibactérienne de la Magainine. La Magainine et l'enzyme, HEWL, conservent une activité antibactérienne une fois greffés. Le Test 3 indique que les bactéries endommagées visualisées en AFM, sur les surfaces Ti-Cat-PEG-Mag et Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL, sont en majorité des bactéries mortes. Effectivement, **seulement 10% des bactéries adhérees sur Ti-Cat-PEG-Mag et 7% de celles en contact avec Ti-Cat-PEG-Téré-HEWL sont capables de croître lorsqu'elles sont replacées dans des conditions favorables.**

La fonctionnalisation par la Magainine ou de manière générale par un peptide antibactérien semble être la voie la plus prometteuse pour la création de couches antibiofilms sur les surfaces de titane car elle permet de combiner les effets antiadhésif de la couche de PEG et antibactérien du peptide.

Références Bibliographiques

1. R.M. Donlan, *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*. Emerging Infectious Diseases, 2002. **8** p. 881-890.
2. S.K. Hood and E.A. Zottola, *Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems*. International Journal of Food Microbiology, 1997. **37** p. 145-153.
3. B. Joseph, S.K. Otta, I. Karunasagar, and I. Karunasagar, *Biofilm formation by Salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers*. International Journal of Food Microbiology, 2001. **64** p. 367-372.
4. P. Sommer, C. Martin-Rouas, and E. Mettler, *Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination*. Food Microbiology, 1999. **16** p. 503-515.
5. D.G. Davies, M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, and E.P. Greenberg, *The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm*. Science, 1998. **280** p. 295-298.
6. K. Brenner, D.K. Karig, R. Weiss, and F.H. Arnold, *Engineered bidirectional communication mediates a consensus in a microbial biofilm consortium*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104** p. 17300-17304.
7. J. Chen, L. Jiang, C. Qiaomiao, H. Zhao, X. Luo, X. Chen, and W. Fang, *Imo0038 Is Involved in Acid and Heat Stress Responses and Specific for Listeria monocytogenes Lineages I and II, and Listeria ivanovii*. Foodborne Pathogens and Disease, 2009. **6** p. 365-376.
8. A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, M. Salmain, and C.-M. Pradier, *Grafting of lysozyme and/or poly(ethylene glycol) to prevent biofilm growth on stainless steel surfaces*. Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113** p. 2101-2109.
9. E.T. Ryser and E.H. Marth, *Listeria, listeriosis, and food safety*. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.) ; 46. Vol. 1. 1991, New York M. Dekker.
10. M. Binggeli and C.M. Mate, *Influence of capillary condensation of water on nanotribology studied by force microscopy*. Applied Physics Letters, 1994. **65** p. 415-417.
11. A.V. Bolshakova, O.I. Kiselyova, A.S. Filonov, O.Y. Frolova, Y.L. Lyubchenko, and I.V. Yaminsky, *Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes*. Ultramicroscopy, 2001. **86** p. 121-128.
12. Y.-S.E. Lin, R.D. Vidic, J.E. Stout, and V.L. Yu, *Individual and combined effects of copper and silver ions on inactivation of legionella pneumophila*. Water Research, 1996. **30** p. 1905-1913.
13. G. Moore, T.J. Hall, A.P.R. Wilson, and V.A. Gant, *The efficacy of the inorganic copper-based biocide CuWB50 is compromised by hard water*. Letters in Applied Microbiology, 2008. **46** p. 655-660.
14. V.A. Gant, M.W.D. Wren, M.S.M. Rollins, A. Jeanes, S.S. Hickok, and T.J. Hall, *Three novel highly charged copper-based biocides: safety and efficacy against healthcare-associated organisms*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. **60** p. 294-299.
15. C.-C. Wu, P.-K. Tseng, M.-J. Hou, and C.-H. Tsai, *Adhesive density of 11-mercaptopundecanoic acid (MUA) and turnip yellow mosaic virus (TYMV) in microfluidic channels*. in ASME International Design Engineering Technical Conferences/Computers and Information in Engineering Conference 2009. San Diego: ASME.

16. K.D. Park, Y.-S. Kim, D.K. Han, Y.-H. Kim, E.H.B. Lee, H. Suh, and K.S. Choi, *Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces*. *Biomaterials*, 1998. **19** p. 851-859.
17. J. Groll, Z. Ademovic, T. Ameringer, D. Klee, and M. Moeller, *Comparison of Coatings from Reactive Star Shaped PEG-stat-PPG Prepolymers and Grafted Linear PEG for Biological and Medical Applications*. *Biomacromolecules*, 2005. **6** p. 956-962.
18. C. Zhang, N. Luo, and D.E. Hirt, *Surface Grafting Polyethylene Glycol (PEG) onto Poly(ethylene-co-acrylic acid) Films*. *Langmuir* 2006. **22** p. 6851-6857.
19. P.B. Van Wachem, A.H. Hogt, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J.P. Detmers, and W.G. van Aken, *Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge*. *Biomaterials*, 1987. **8** p. 323-328.
20. T. Cserhati and M. Szögyi, *Role of hydrophobic and hydrophilic forces in peptide-protein interaction: New advances*. *Peptides*, 1995. **16** p. 165-173.
21. G.F. Paciotti, L. Myer, D. Goia, N. Pavel, R.E. McLaughlin, and L. Tamarkin, *Colloidal Gold: A Novel Nanoparticle Vector for Tumor Directed Drug Delivery*. *Drug Delivery*, 2004. **11** p. 169-183.
22. G.F. Paciotti, D.G.I. Kingston, and L. Tamarkin, *Colloidal Gold Nanoparticles: A Novel Nanoparticle Platform for Developing Multifunctional Tumor-Targeted Drug Delivery Vectors*. *Drug Development Research*, 2006. **67** p. 47-54.
23. S. Dhar, W.L. Daniel, D.A. Giljohann, C.A. Mirkin, and S.J. Lippard, *Polyvalent Oligonucleotide Gold Nanoparticle Conjugates as Delivery Vehicles for Platinum(IV) Warheads*. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. **131** p. 14652-14653.
24. M. Ritz, J.L. Tholozan, M. Federighi, and M.F. Pilet, *Physiological damages of Listeria monocytogenes treated by high hydrostatic pressure*. *International Journal of Food Microbiology* 2002. **79** p. 47-53.
25. V. Humblot, J.-F. Yala, P. Thebault, K. Boukerma, A. Héquet, J.-M. Berjeaud, and C.-M. Pradier, *The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers*. *Biomaterials*, 2009. **30** p. 3503-3512.
26. N. Kanayama, S. Fukushima, N. Nishiyama, K. Itaka, W.D. Jang, K. Miyata, Y. Yamasaki, U.I. Chung, and K. Kataoka, *A PEG-based biocompatible block cationomer with high buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells*. *ChemMedChem*, 2006. **1** p. 439-444.
27. H.S. Shin, K. Park, J.H. Kim, J.J. Kim, D.K. Han, M.W. Moon, K.R. Lee, and J.H. Shin, *Biocompatible PEG Grafting on DLC-coated Nitinol Alloy for Vascular Stents*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2009. **24** p. 316-328.
28. A. Schmidt, A. Clifton, W. Ehrfeld, G. Feiertag, H. Lehr, and M. Schmidt, *Investigation of the Adhesive Strength of PMMA Structures on Substrates obtained by Deep X-ray Lithography*. *Microelectronic Engineering*, 1996. **30** p. 215-218.
29. S. Sihn, Y. Miyano, M. Nakada, and S.W. Tsai, *Time- and Temperature-Dependent Failures of a Metal-to-Composites Bonded Joint with PMMA Adhesive Material*. *Journal of Composite Materials*, 2003. **37** p. 35-54.
30. M. Tencer, R. Charbonneau, N. Lahoud, and P. Berini, *AFM study of BSA adlayers on Au stripes*. *Applied Surface Science*, 2007. **253** p. 9209-9214.
31. Y. Arima and H. Iwata, *Effects of surface functional groups on protein adsorption and subsequent cell adhesion using self-assembled monolayers*. *Journal of Materials Chemistry*, 2007. **17** p. 4079-4087.

32. D. Bhattacharyya, H. Xu, R.R. Deshmukh, R.B. Timmons, and K.T. Nguyen, *Surface chemistry and polymer film thickness effects on endothelial cell adhesion and proliferation*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010. **94A** p. 640-648.
33. A. Roosjen, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, and W. Norde, *Microbial Adhesion to Poly(ethylene oxide) Brushes: Influence of Polymer Chain Length and Temperature*. Langmuir, 2004. **20** p. 10949-10955.
34. D.K. Han and J.A. Hubbell, *Synthesis of Polymer Network Scaffolds from l-Lactide and Poly(ethylene glycol) and Their Interaction with Cells*. Macromolecules, 1997. **30** p. 6077-6083.
35. L.M. Timofeeva, N.A. Kleshcheva, A.F. Moroz, and L.V. Didenko, *Secondary and tertiary polydiallylammonium salts: novel polymers with high antimicrobial activity*. Biomacromolecules, 2009. **10** p. 2976-2986.
36. M.L. Calderon-Miranda, G.V. Barbosa-Canovas, and B.G. Swanson, *Transmission electron microscopy of Listeria innocua treated by pulsed electric fields and nisin in skimmed milk*. International Journal of Food Microbiology, 1999. **51** p. 31-38.
37. E. De Giglio, M.R. Guascito, L. Sabbatini, and G. Zambonin, *Electropolymerization of pyrrole on titanium substrates for the future development of new biocompatible surfaces*. Biomaterials, 2001. **22** p. 2609-2616.
38. M. Manso, S. Ogueta, P. Garcia, J. Pérez-Rigueiro, C. Jiménez, J.M. Martinez-Duart, and M. Langlet, *Mechanical and in vitro testing of aerosol-gel deposited titania coatings for biocompatible applications*. Biomaterials, 2002. **23** p. 349-356.
39. S.J. Ludtke, K. He, W.T. Heller, T.A. Harroun, L. Yang, and H.W. Huang, *Membrane pores induced by magainin*. Biochemistry, 1996. **35** p. 13723-13728.
40. C.C.F. Blake, L.N. Johnson, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, and V.R. Sarma, *Crystallographic Studies of the Activity of Hen Egg-White Lysozyme*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 1967. **167** p. 378-388
41. J. Farkas, E. Andrassy, L. Mészáros, and D. Bánáti, *Growth of untreated and radiation-damaged Listeria as affected by environmental factors*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 1995. **42** p. 19-28.
42. A. Héquet, V. Humblot, J.-M. Berjeaud, and C.-M. Pradier, *Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011. **84** p. 301-309.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la lutte antibiofilm en milieu marin. Les nouvelles exigences environnementales et l'engouement pour les travaux de « chimie verte » conduisent à interdire les peintures à base d'étain ou le traitement avec un système d'électrochloration, utilisés jusqu'alors. Il est impératif aujourd'hui de trouver des méthodes alternatives de lutte contre le développement de biofilms, en particulier sur des surfaces métalliques immergées en milieu marin.

Les matériaux réels utilisés dans les bâtiments de la Marine sont des alliages constitués majoritairement de titane pour les circuits et les échangeurs de chaleur (TiA6V4 – titane, 6% d'aluminium et 4% de vanadium) et de cuivre notamment pour le revêtement des hélices (cupronickel à 90% ou 70% de cuivre et alliage de cuivre avec 9% d'aluminium, 5% de nickel et 4% de fer). Afin de simplifier, et ainsi mieux comprendre, la réactivité de ces systèmes, nous avons essentiellement travaillé sur des surfaces de titane pur et de cuivre pur.

L'objectif des recherches développées dans ce travail était donc la fonctionnalisation des surfaces métalliques par des molécules capables de diminuer l'adhésion de toute molécule biologique, et même de détruire les microorganismes venant au contact de la surface. Pour cela, différentes stratégies ont été employées dépendant de la nature de la surface métallique de travail et de l'activité finale souhaitée (antiadhésif, antibactérien ou les deux).

Sur les surfaces de cuivre, nous avons exploré deux voies de fonctionnalisations : (i) l'adsorption d'espaceurs, un thiol acide, le MUA, ou une molécule possédant des propriétés antiadhésives, le HS-PEG-COOH. sur lesquels, ont été ensuite de greffer de façon covalente une molécule anti-biofilm ; (ii) la structuration de la surface par une couche de polymères photosensibles, des dérivés de PMMA enrichis en dopant et /ou en MA-PEG. L'enrichissement en dopant augmenta la sensibilité du PMMA à l'irradiation UV. L'incorporation de motifs MA-PEG permit d'ajouter un caractère antiadhésif au copolymère. La formation de la première couche organique sur les surfaces de cuivre, *via* l'une de ces voies, a été établie en utilisant plusieurs techniques complémentaires de caractérisation, le PM-IRRAS, l'XPS et l'AFM. Dans le cas de l'utilisation des copolymères à base de PMMA, il a été démontré que ces couches étaient sensibles aux irradiations UV et qu'il était possible de les structurer en les irradiant à travers une grille métallique.

Nous avons ensuite greffé un peptide, la Magainine I, et une enzyme, le lysozyme HEWL, sur ces couches organiques, et vérifié par PM-IRRAS et XPS que ces accroches sont covalentes.

La fonctionnalisation par les copolymères PMMA-PEG photosensibles permet de limiter l'adhésion des protéines et des bactéries ! Cette méthode est donc une voie intéressante dans l'inhibition des premières étapes de formation d'un biofilm. En revanche, il n'a pas été possible de démontrer de façon significative le rôle antibactérien de la Magainine et de HEWL greffés, en raison de l'activité bactéricide intrinsèque du cuivre.

Sur les surfaces de titane, nous avons testé le greffage de deux « espaceurs » : un amino-silane, l'APTES, et un PEG diamine qui en plus de ses propriétés de réticulation possède une activité antiadhésive. L'APTES a conduit à la formation de multicouches homogènes et stables. Le greffage du PEG diamine a été réalisé après hydroxylation et greffage d'une première couche de catéchol sur la surface de titane. La Magainine I et le lysozyme HEWL ont été greffés de manière covalente avec succès sur ces surfaces PEGylées.

La présence de PEG, avant ou après greffage de la Magainine I, permet de diminuer fortement l'adsorption des protéines et l'adhésion des bactéries : jusqu'à 80% de bactéries adhérees en moins ! De plus, les bactéries adhérees aux surfaces de titane modifiées par la Magainine I ou l'enzyme, subissent une altération que nous avons observée par AFM. Enfin, le dénombrement de colonies, après mises en contact avec les surfaces fonctionnalisées, a permis de vérifier la conservation de l'effet antibactérien du peptide et de l'enzyme même après greffage sur les surfaces de titane.

Ce travail a permis de mettre en place un protocole de fonctionnalisation efficace pour chacune des surfaces métalliques étudiées : le greffage de copolymères PMMA-PEG photosensibles pour les surfaces de cuivre et l'accroche du catéchol et du PEG diamine sur les surfaces de titane. Ces fonctionnalisations mènent à la création de surfaces permettant de ralentir ou d'inhiber chacune des étapes de la formation d'un biofilm. Il y a environ 80% d'adhésion de bactéries en moins les surfaces de cuivre fonctionnalisées par PMMADPT+PEG4000 à 10% et entre 90% et 95% d'inhibition de croissance sur les surfaces de titane fonctionnalisées par la voie du PEG diamine avec la Magainine et/ou le lysozyme HEWL.

Ceci ouvre la voie à de nouvelles perspectives. En premier lieu, il sera intéressant de tester les surfaces de cuivre et de titane fonctionnalisées en conditions réelles : temps d'immersion plus long, écart de température, flux de bactéries et utilisations de bactéries marines... Nous pensons que les greffages covalents confèrent une bonne résistance aux traitements de surfaces effectués.

Il est ensuite nécessaire de contrôler que les séquences de monomères, Cat-PEG-Mag ou Cat-PEG-Téré-HEWL, peuvent être incorporées dans les peintures destinées à recouvrir les alliages à base de titane. Cette incorporation ne doit modifier ni les propriétés de la peinture ni l'activité du peptide ou de l'enzyme.

Les surfaces de cuivre fonctionnalisées avec les copolymères PMMA-PEG, doivent aussi être testées vis-à-vis de la croissance bactérienne. Il est aussi recommandé de faire des essais avec les cupronickels (90/10 ou 70/30) utilisés par la Marine afin d'étudier la transposition du protocole sur cuivre pur aux matériaux réels. Des tests, ou expériences de « validations » de nos stratégies ont été réalisés plus tardivement sur des alliages de cupronickel ; ils n'ont pas été détaillés dans ce manuscrit.

Enfin, ces travaux ont portés sur l'étude d'un peptide et d'une enzyme modèle, un enjeu restant consiste à appliquer ces protocoles au co-greffage d'enzymes et/ou d'autres agents anti-bactériens spécifiques au milieu marin.

Conclusions et perspectives

Annexes

Annexes

Annexe I : Techniques expérimentales

I. Spectroscopie InfraRouge en mode Réflexion Absorption (IRRAS) à incidence rasante

L'IRRAS est une technique de spectroscopie vibrationnelle InfraRouge. De ce fait, les spectres obtenus avec cette technique permettent d'avoir accès aux vibrations des molécules : étirements (symétriques et antisymétriques), cisaillement, bascule, agitation et torsion (Figure 1).

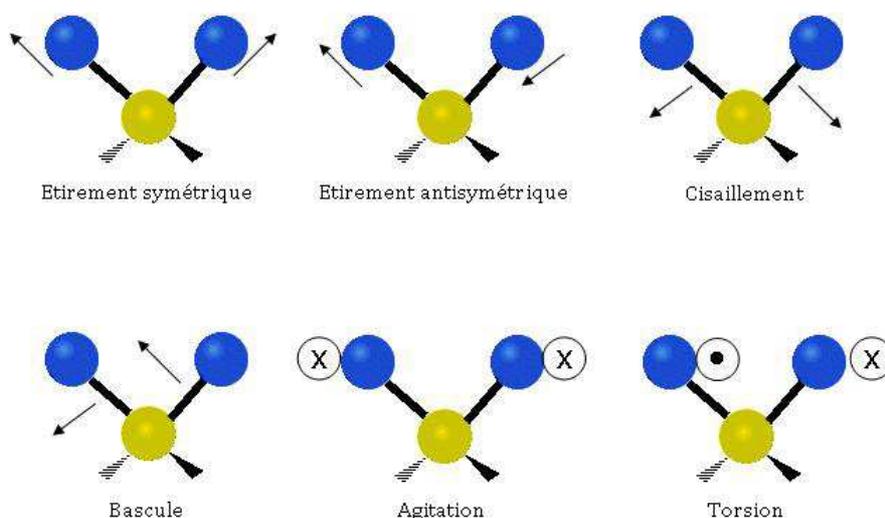


Figure 1 : Schéma des différentes vibrations dans une molécule.

La spectroscopie infrarouge en mode réflexion absorption (IRRAS) est utilisée pour étudier l'orientation et la structure de molécules adsorbées sur une surface métallique. Une molécule adsorbée sur une surface possède un nombre plus limité de mouvements vibrationnels du fait de son interaction avec la surface. Dans le cas de surfaces métalliques, il faut de plus prendre en compte le comportement diélectrique du métal. Cette propriété induit une interaction entre la composante électrique de l'onde incidente, le moment dipolaire de la molécule adsorbée et les électrons du métal. Les études réalisées par Greenler ([1, 2]) ont permis de mettre en avant le rôle prépondérant de l'angle d'incidence du faisceau par rapport à la surface métallique et l'état de polarisation de la lumière. Lorsque qu'une onde électromagnétique est réfléchiée sur une surface métallique, le vecteur champ électrique du faisceau incident subi un

changement de phase. La dépendance entre le changement de phase et l'angle d'incidence est représentés sur la Figure 2

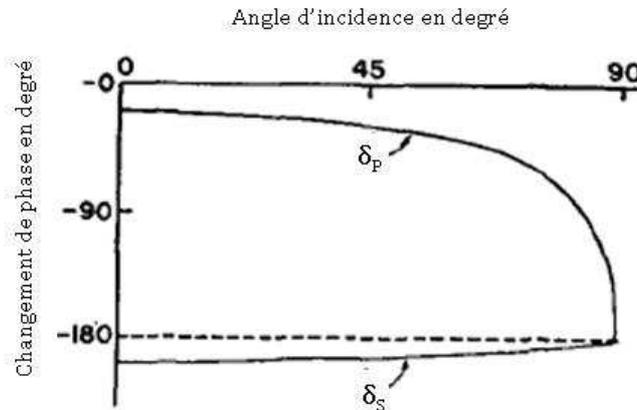


Figure 2 : Changement de phase intervenant dans les composantes parallèles (δ_p) et perpendiculaire (δ_s) au plan d'incidence du signal réfléchi en fonction de l'angle d'incidence [1].

La composante du champ électrique parallèle à la surface (E_s) subit un changement de phase proche de 180° indépendamment de l'angle d'incidence. Par contre, la composante perpendiculaire à la surface (E_p) subit un changement de phase d'autant plus grand que l'angle d'incidence augmente. Si l'angle d'incidence Φ est compris entre 0 et 80° environ la composante E_p n'est que peu déphasée mais dans le cas d'une incidence rasante ($\Phi \geq 80^\circ$) le déphasage est de 90° environ. Il en résulte qu'à incidence rasante à la surface le champ électrique résultant est défini par :

$$E_s^i + E_s^r = 0$$

$$E_p^i + E_p^r = E_p \neq 0$$

A la surface du métal il n'y a donc aucune composante parallèle du champ électromagnétique résultant pouvant interagir avec un moment dipolaire d'un mode de vibration parallèle à la surface : ces vibrations ne sont donc pas visibles avec la technique de l'IRRAS. Par contre, il y a une forte exaltation des vibrations non parallèles à la surface.

La Figure 3 présente la géométrie de la réflexion d'une onde plane sur une surface métallique.

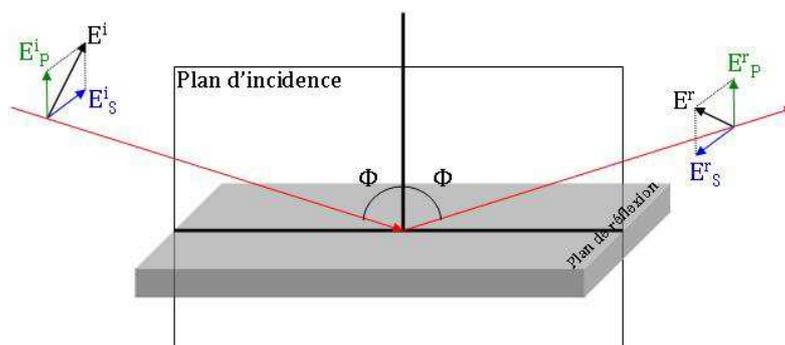


Figure 3 : Schéma de la décomposition du champ électrique avant et après réflexion sur une surface métallique.

Cette technique a été utilisée lors du travail sur les surfaces de titane. Après optimisation, l'angle d'incidence a été choisi, égal à 73°.

Les spectres ont été obtenus en travaillant en lumière non polarisée : le spectre de l'échantillon nu doit être enregistré comme spectre de référence (ou background) puis l'enregistrement des spectres des échantillons modifiés est effectué. Sur les spectres on n'observe que les vibrations de moments dipolaires non parallèles à la surface.

Sur les surfaces de cuivre, une autre technique a été privilégiée : l'IRRAS avec modulation de polarisation ou PM-IRRAS (voir Figure 4).

Cette technique s'appuie sur les mêmes principes que l'IRRAS. Les différences avec l'IRRAS sont, i) le travail en lumière polarisée et ii) la modulation rapide de la polarisation du signal incident [3]. La polarisation de la lumière permet d'acquérir en même temps le spectre de réflectivité du volume au dessus de la surface (noté R_s) et le spectre somme des contributions du volume et de la surface (noté R_p). La modulation du signal et le traitement mathématique des spectres donne accès au signal de réflectivité

différentielle normalisée : $\frac{(R_p - R_s)}{(R_p + R_s)}$. Les spectres obtenus renseignent directement sur

les vibrations non parallèles à la surface de la couche organique adsorbée sur la surface.

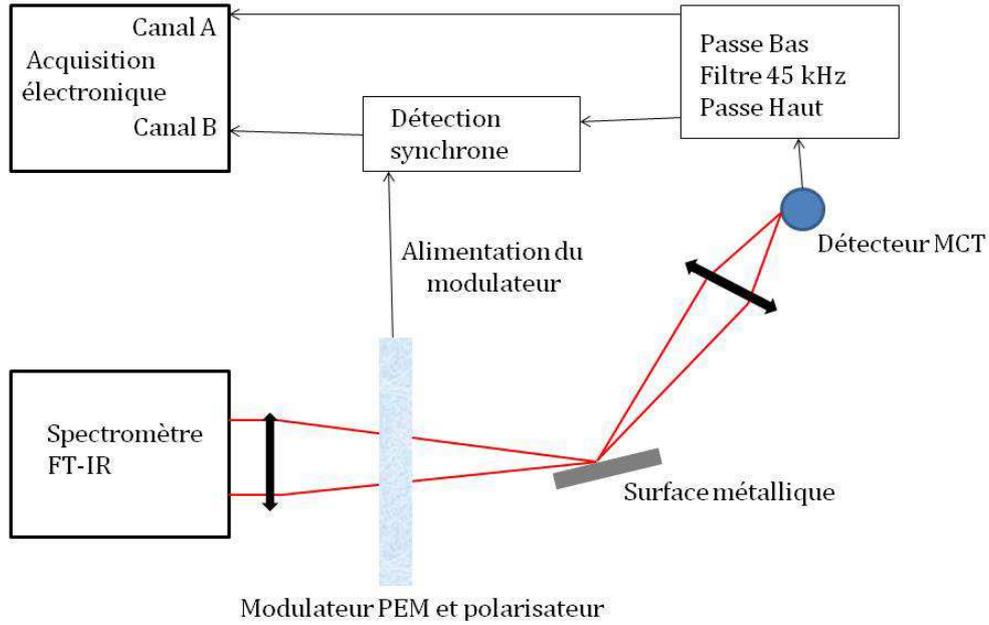


Figure 4 : Schéma du principe du PM-IRRAS.

II. Spectroscopie de Photoélectrons X (XPS)

L'échantillon est irradié par des rayons X monochromatisés qui provoquent l'ionisation de ses atomes par effet photoélectrique (voir Figure 5).

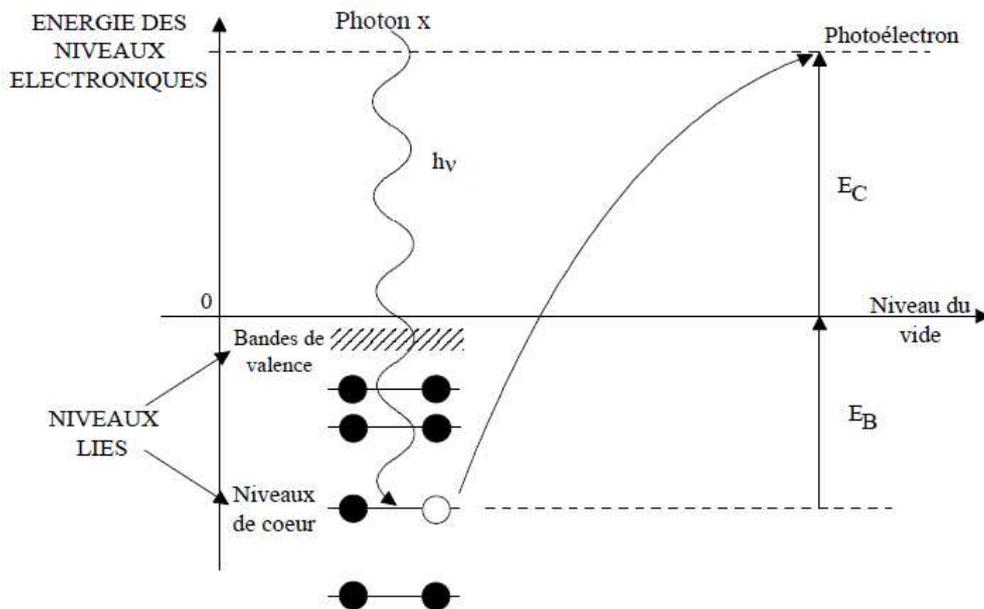


Figure 5 : Diagramme énergétique de la photoémission.

L'énergie cinétique E_c de ces photoélectrons est mesurée (voir Figure 6), ce qui donne un spectre de l'intensité des pics de photoélectrons en fonction de l'énergie mesurée.

Chaque photon X incident a la même énergie $h\nu$, puisque le faisceau est monochromatique (h étant la constante de Planck et ν la fréquence de l'onde lumineuse incidente). Lors de l'interaction avec l'atome, une partie de cette énergie sert à rompre la liaison, c'est l'énergie de liaison, E_L ; le reste est transféré à l'électron sous la forme d'énergie cinétique.

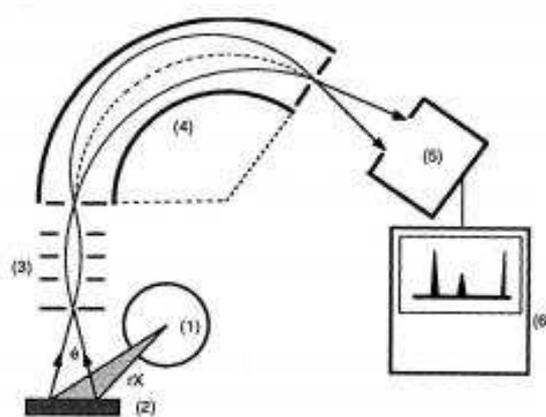


Figure 6 : Schéma d'un spectromètre XPS. (1) Tube à rayons X ; (2) Echantillon ; (3) Système de focalisation électronique ; (4) Spectromètre ; (5) Détecteur à électrons (channeltron) ; (6) Système d'acquisition et de traitement des données.[4]

Le spectre en énergie cinétique présente donc des pics d'émission, et l'on peut déterminer l'énergie de liaison correspondant à chaque pic par la relation d'Einstein :

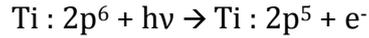
$$E_L = h\nu - E_c - \phi$$

Avec E_L l'énergie de liaison, E_c l'énergie cinétique de l'électron, h la constante de Planck, ν , la fréquence de radiation et Φ , le travail de sortie du spectromètre.

L'énergie du photon X incident est de l'ordre de grandeur de l'énergie d'ionisation des électrons de cœur. Leur émission donne les pics XPS essentiellement caractéristiques, de la nature de l'atome. L'information chimique (surtout le degré d'oxydation) est tirée des déplacements du pic XPS correspondant à la variation d'énergie due à l'environnement de l'atome. Cette variation d'énergie est faible devant celle des rayons X.

Pour certains éléments, le couplage spin-orbite entraîne l'apparition de plusieurs pics correspondant à la même couche d'un élément. Si on prend comme exemple l'orbitale 2p du titane, le processus de photoionisation est décrit par l'équation :

Annexes



En considérant, l'état ionisé du titane $2p^5$ dans l'approximation de Russell-Saunders [5], la configuration $2p^5$ donne deux états qui diffèrent légèrement en énergie : $L = 1, S = 1/2, J = L + S, L - S (3/2, 1/2)$.

$${}^2P_{3/2} g_i = 2 * (3/2) + 1 = 4$$

$${}^2P_{1/2} g_i = 2 * (1/2) + 1 = 2$$

L'état final de la plus basse énergie est celui avec le J le plus grand (puisque la couche est plus qu'à moitié-pleine), c'est-à-dire $J = 3/2$. Les intensités relatives des deux pics reflètent la densité des états finaux. Le pic correspondant à l'état ${}^2P_{3/2}$ est donc 2 fois plus grand que le pic correspondant à l'état ${}^2P_{1/2}$ (voir Figure 7).

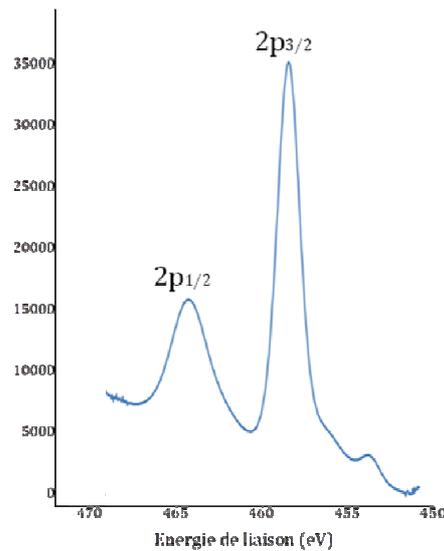


Figure 7 : Région d'un pic Ti2p d'un spectre XPS.

On a finalement accès à la composition chimique de la surface du matériau. Cette analyse porte sur les 10 premiers nanomètres d'épaisseur de la surface. Des analyses quantitatives peuvent être également extraites des spectres XPS normalisés en se basant sur l'intégrale de l'aire des pics. Enfin, il est possible d'estimer des épaisseurs moyennes de couches organiques à partir de l'intensité des pics du Cu2p ou Ti2p en utilisant la formule simplifiée suivante :

$$\frac{I}{I_0} = \exp\left(-\frac{d}{\lambda} \sin\varphi\right)$$

I_0 : intensité du pic métallique sur l'échantillon nu ; I : intensité du pic métallique sur l'échantillon fonctionnalisé ; d : épaisseur de la couche organique ; λ : libre parcours moyen des photoélectrons du métal à travers la couche organique et φ , l'angle entre l'analyseur et la surface (ici, $\varphi = 90^\circ$).

III. Spectroscopie Auger [6]

L'effet Auger a été découvert en 1925 par Pierre Auger alors que celui-ci travaillait dans une chambre de Wilson (ou chambre à brouillard) avec des rayons X. Des trajectoires correspondantes à des électrons éjectés ont été observés dans un faisceau de rayons X [7]. La spectroscopie d'électron Auger (AES) est devenue de nos jours une des techniques d'analyses les plus utilisées afin de connaître la composition chimique d'une surface solide. Les avantages de cette technique sont sa grande sensibilité pour une analyse chimique sur une épaisseur de 1 à 10 nm, l'acquisition rapide des données, la possibilité de détecter tous les éléments au-delà de l'hélium et sa grande résolution spatiale. Ce système a été développé dans les années 1960, quand la technologie du ultra haut vide (UHV) est devenue plus accessible [8, 9].

Quand un électron est éjecté d'une couche de cœur d'un atome, la vacance créée peut être compensée soit par un processus radiatif (émission d'un rayon X) soit par un processus non radiatif (émission d'un électron Auger) (Figure 8-a et b).

Dans la technique d'AES, les niveaux atomiques de cœur sont ionisés par un faisceau d'électrons incident et les électrons Auger résultant de cette ionisation sont détectés par un spectromètre à électrons. L'électron incident, possédant une énergie initiale suffisante, E_p , ionise le niveau de cœur, par exemple le niveau K. La vacance ainsi créée est immédiatement comblée par un autre électron de la couche L1 (Figure 8-c). L'énergie ($E_K - E_{L1}$) libérée lors de cette transition peut être transmise à un autre électron, de la couche L2 par exemple. Cet électron est alors éjecté de l'atome en tant qu'électron Auger (voir Figure 8). L'énergie cinétique de l'électron Auger est donnée par la relation suivante : $E_C = E_K - E_{L1} - E_{L2}$.

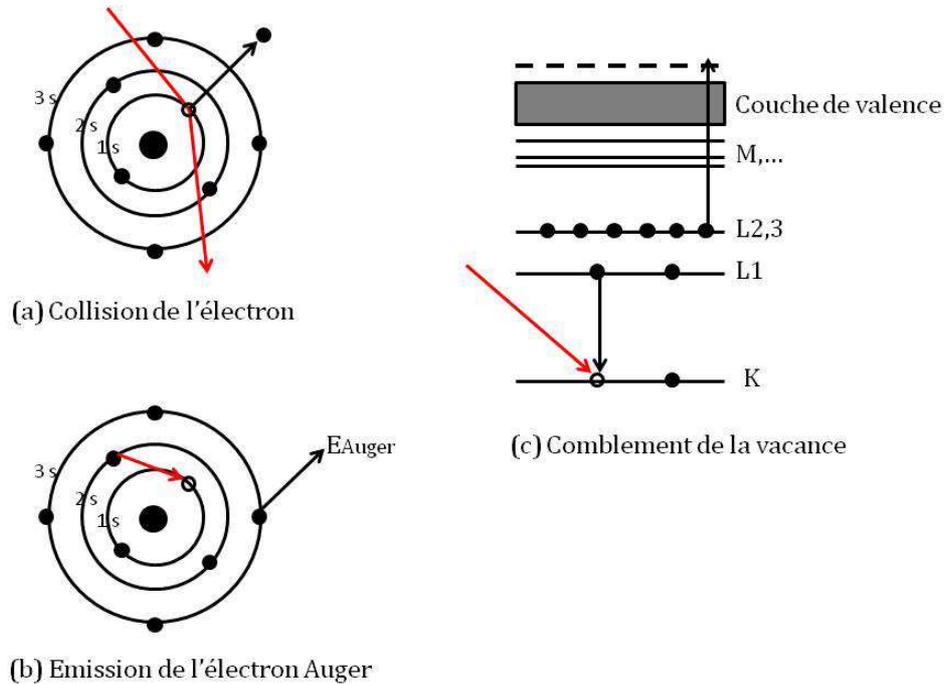


Figure 8 : Schéma de l'émission d'un électron Auger.

Cette excitation est appelée transition Auger KL1L2. Pour qu'il y ait émission d'un électron Auger, l'atome doit posséder au moins 2 niveaux d'énergie et 3 électrons. C'est pourquoi les atomes d'hydrogène et d'hélium ne peuvent pas émettre d'électrons Auger. Les énergies cinétiques des électrons Auger ne dépendent que du matériau cible, sans aucune influence de l'énergie du faisceau incident.

Pour les surfaces métalliques, une deuxième donnée est exploitée pour connaître le degré d'oxydation du métal : le paramètre Auger. Ce paramètre est défini par :

$$\alpha' = E_c(AA'A'') + E_L(A)$$

avec α' le paramètre Auger, $E_c(AA'A'')$ l'énergie cinétique de la transition Auger impliquant les électrons des couches A, A', A'' et $E_L(A)$ l'énergie de liaison du photoélectron issu de la couche A [10, 11].

Dans le cadre des travaux de cette thèse, les électrons Auger ont été observés comme une spectroscopie secondaire lors des analyses d'XPS.

IV. Microscopie à force atomique (AFM)

La technique AFM exploite l'interaction (attraction/répulsion) entre les atomes de l'apex nanométrique d'une pointe et les atomes surfaciques d'un échantillon [12]. Elle permet d'analyser des zones allant de quelques nanomètres à quelques microns de côtés et de

mesurer des forces de l'ordre du nanonewton. Le microscope à force atomique permet donc de balayer la surface d'un échantillon grâce à une pointe très fine, positionnée à l'extrémité libre d'un micro-levier flexible, pouvant se déplacer dans toutes les directions de l'espace, grâce à un tube piézoélectrique (voir Figure 9).

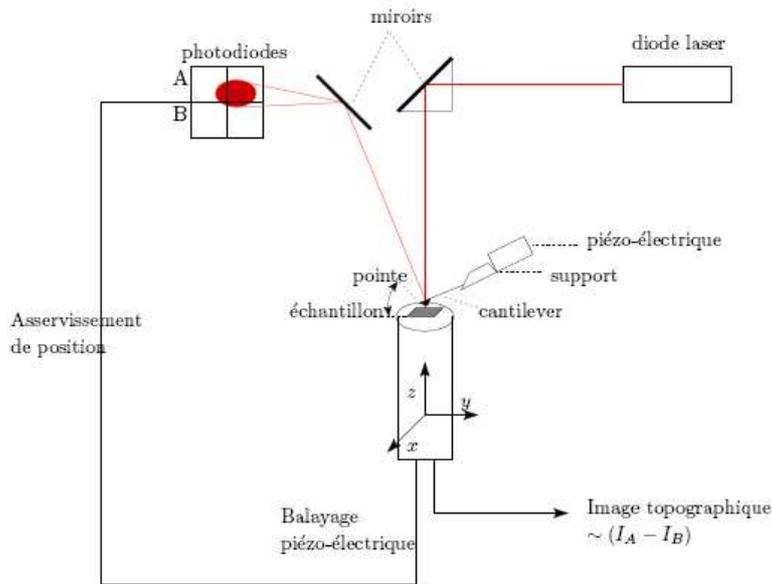


Figure 9 : Principe de fonctionnement d'un AFM.

L'analyse des flexions du micro-levier permet de déterminer l'exact parcours de la pointe, ainsi que la mesure des forces d'interactions intervenant entre elle et l'échantillon. Les acquisitions des images peuvent être effectuées selon plusieurs modes :

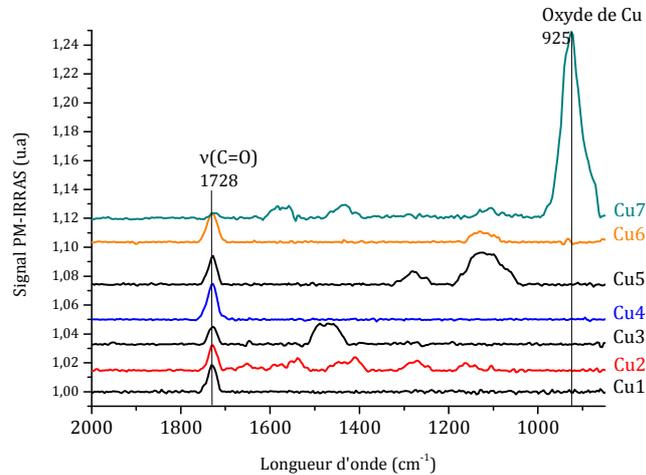
- Le mode contact : dans ce mode, la pointe reste en contact avec la surface et deux modes d'imagerie sont possibles : le mode hauteur et le mode force. Dans le mode hauteur, on applique une force d'interaction constante entre la pointe et la surfaces et la pointe se déplace selon z pour maintenir cette force constante. Dans le mode force, la hauteur de la pointe est fixée et on mesure la déflexion du levier. Ces modes ne sont pas adaptés aux analyses des échantillons fragiles que la pointe peut endommager.
- Le mode non-contact : le levier oscille à sa fréquence de résonance sans jamais toucher la surface. L'amplitude des oscillations est toutefois perturbée par les forces d'interaction entre la surface et la pointe. Ce mode ne permet pas d'avoir une bonne résolution.
- Le mode Tapping® ou contact intermittent : Cela consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance (typiquement de l'ordre de la centaine de kHz), avec une

certaine amplitude. Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude décroît (parce que la fréquence de résonance change). La rétroaction se fait alors sur l'amplitude d'oscillation du levier.

- Le mode QNM® (Quantitative Nanomechanical Property Mapping), à l'air sur les échantillons séchés. Ce mode est une amélioration du mode Tapping® décrit précédemment. Le mode QNM permet de réaliser des images des différentes propriétés mécaniques des surfaces comme par exemple les forces d'adhésion.

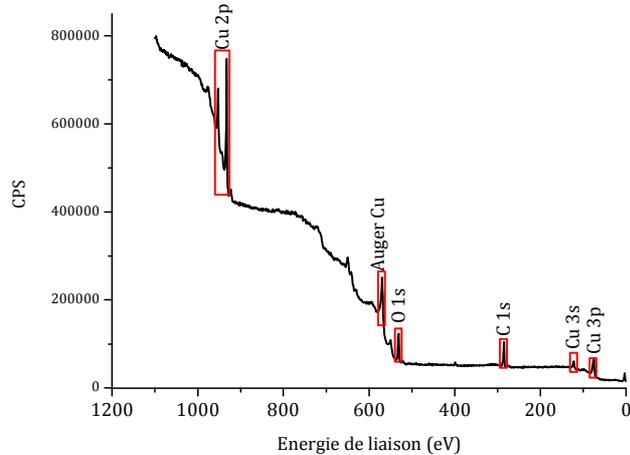
Annexe II : Fonctionnalisation du cuivre

1. Optimisation des protocoles de rinçage des surfaces de cuivre avant et après polissage.



Sur le spectre PM-IRRAS, on constate que les surfaces obtenues après le traitement Cu7 possèdent le moins de résidus organiques identifiés par la vibration à 1728 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$).

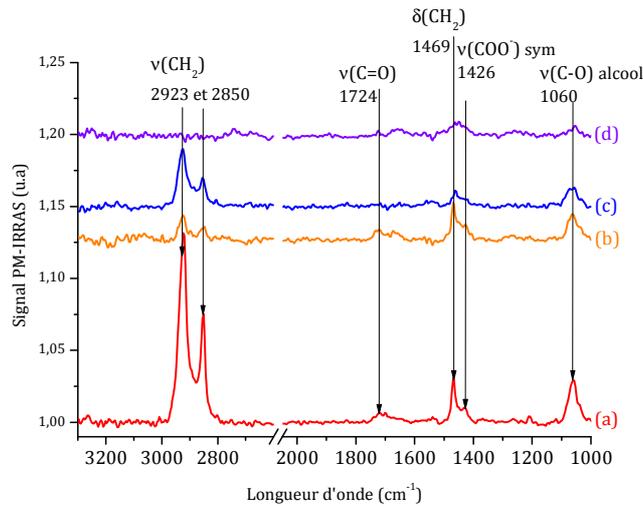
2. Spectre XPS général de la surface Cu nu.



L'élément représenté majoritairement est le cuivre (Cu2p, Cu3s, Cu3p et l'Auger LMM), l'élément oxygène (O1s) et quelques traces de carbone (C1s) sont aussi détectées.

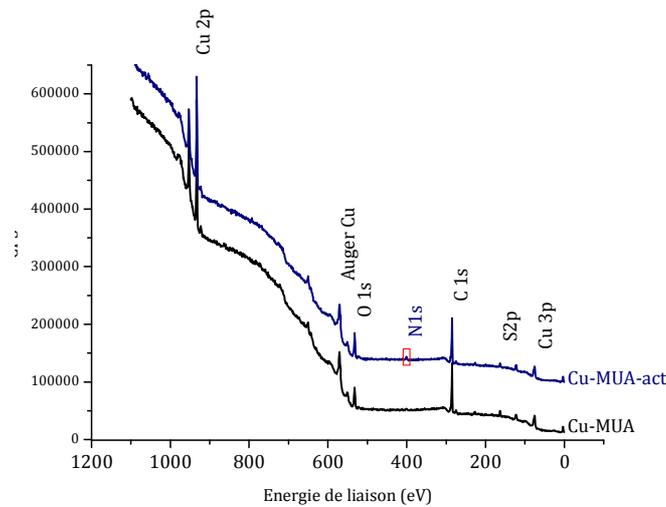
Annexes

3. Spectre PM-IRRAS de l'activation des fonctions -COOH sur les surfaces de Cu-MUA dilué avec MHOH.



La présence de la fonction ester n'est pas détectée ; ce protocole d'activation n'est pas adapté aux surfaces de MUA dilué avec MHOH.

4. Spectres généraux des surfaces Cu-MUA et Cu-MUA-act.



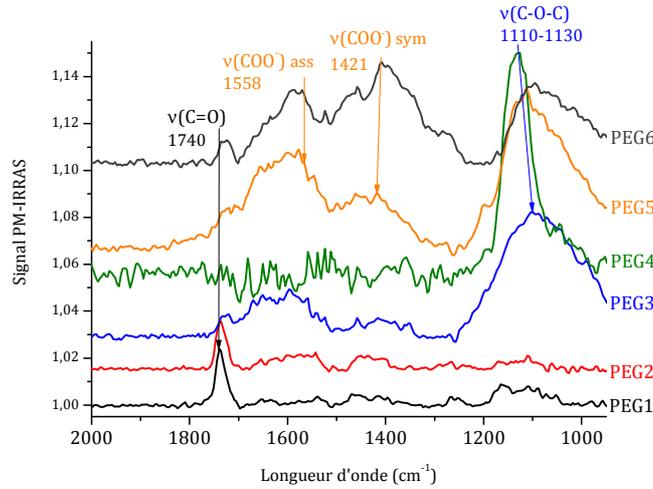
On note une augmentation du signal relatif au carbone C1s ainsi que l'apparition d'un pic attribué au soufre S2p sur Cu-MUA et sur celui du Cu-MUA-act la présence d'un pic attribué à l'azote N1s

5. Tableau complet des contributions XPS sur CU-MUA et Cu-MUA-act.

Eléments	Cu2p	O1s				C1s				N1s	S2p
		E _L (eV)	530,4	531,8	533,0	534,3	284,8	286,3	287,9		
Attribution	Cu ₂ O	Cu ₂ O	C=O	C-O	H ₂ O	C-C,H	C-N,O,S	COO ⁻	C=O	NH ₂ N _{amide}	
Cu-MUA	7,9	2,2	6,8	3,0	0,7	66,8	6,4	3,9	3,1	-	6,1
Cu-MUA-act	7,6	2,4	8,5	2,2	0,4	63,0	8,5	3,7	4,2	2,4	5,1

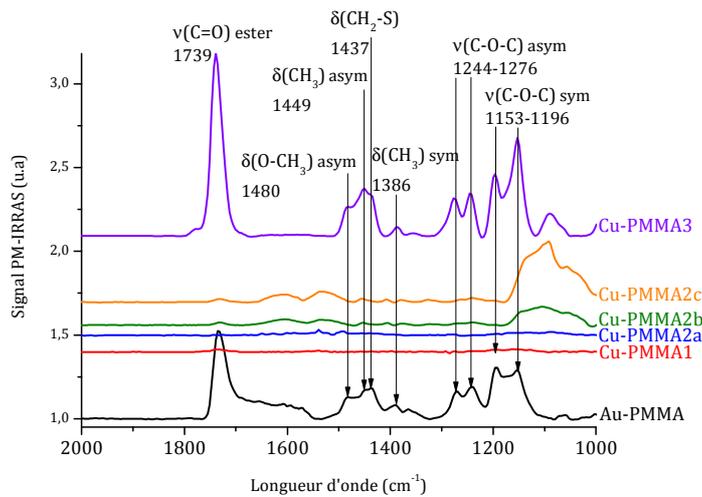
Annexes

6. Spectres PM-IRRAS de l'optimisation du greffage de HS-PEG-COOH sur les surfaces de cuivre nu.



Le protocole choisi après optimisation est le protocole PEG5 car la détection de la bande de vibration $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ à 1110 cm^{-1} , liée au squelette carboné de HS-PEG-COOH, est la plus marquée.

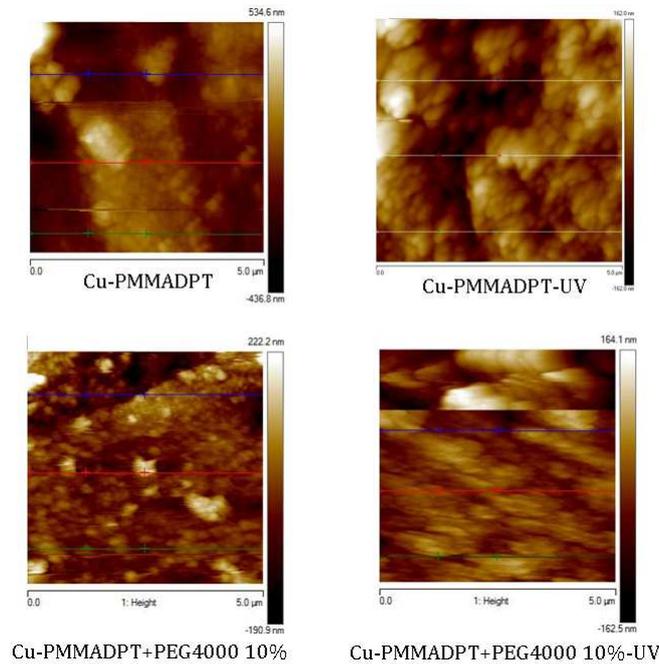
7. Spectres PM-IRRAS de l'optimisation du greffage du PMMA sur les surfaces de cuivre.



Après plusieurs optimisations, le protocole PMMA3 a été choisi car sur le spectre PM-IRRAS apparaissent distinctement toutes les bandes de vibrations attendues pour un polymère de PMMA.

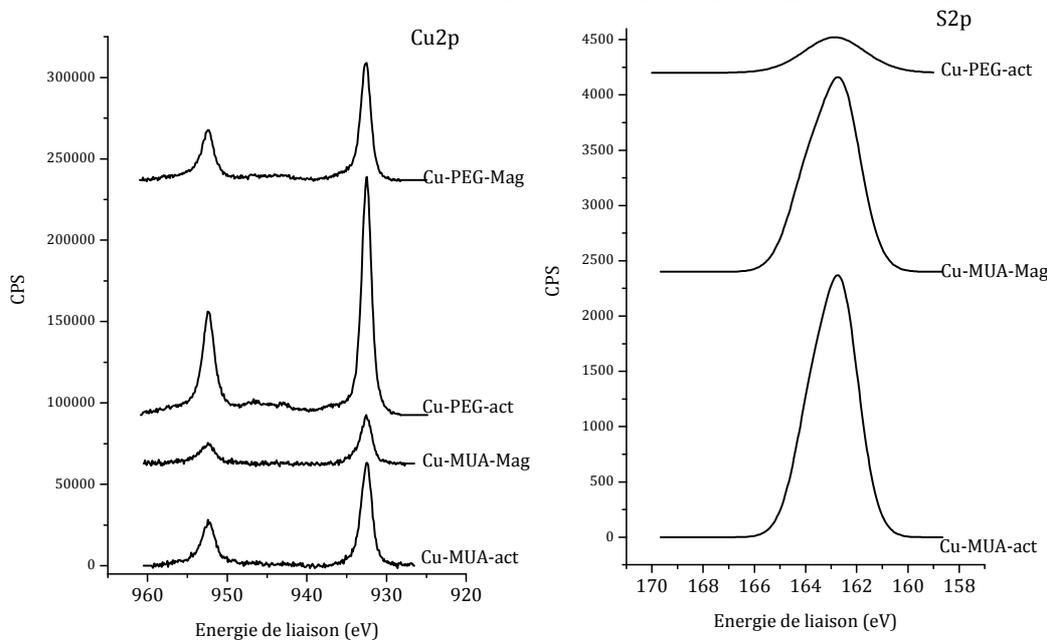
Annexes

8. Comparaison des images AFM sur Cu-PMADPT et Cu-PMADPT+PEG4000 à 10% avant et après irradiation.



Pour les surfaces de Cu-PMADPT la rugosité passe de $0,14 \mu\text{m}$ à $0,09 \mu\text{m}$; sur les surfaces de Cu-PMMA+PEG4000 à 10% le changement de rugosité est moins visible. Ceci est expliqué par la conservation des motifs MA-PEGs qui ne sont pas affectés par l'irradiation UV.

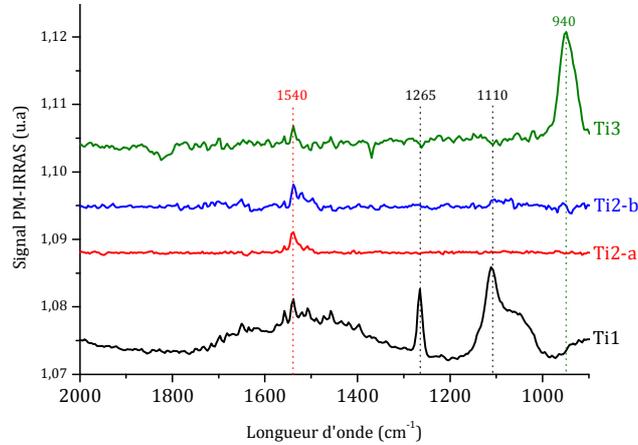
9. Spectres haute résolution de Cu2p et S2p après greffage de la Magainine.



Très peu de changements sont observés après greffage de la Magainine, ce qui confirme le faible taux de greffage du peptide. Le signal S2p, déjà très faible sur Cu-PEG-act, n'est plus détecté après greffage de la Magainine.

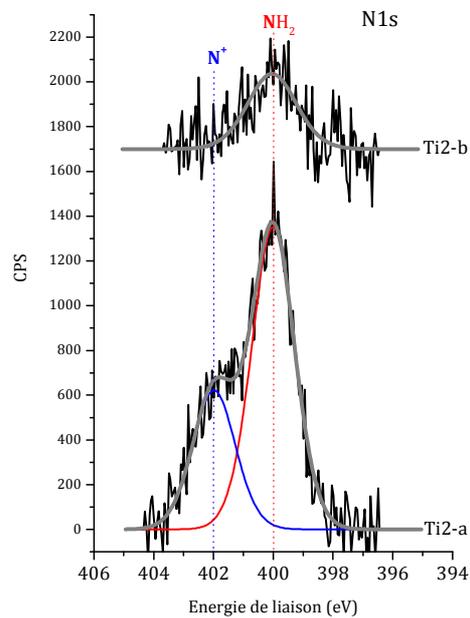
Annexe III : Fonctionnalisation du titane

1. Spectres PM-IRRAS des oxydations effectuées sur les surfaces de titane.



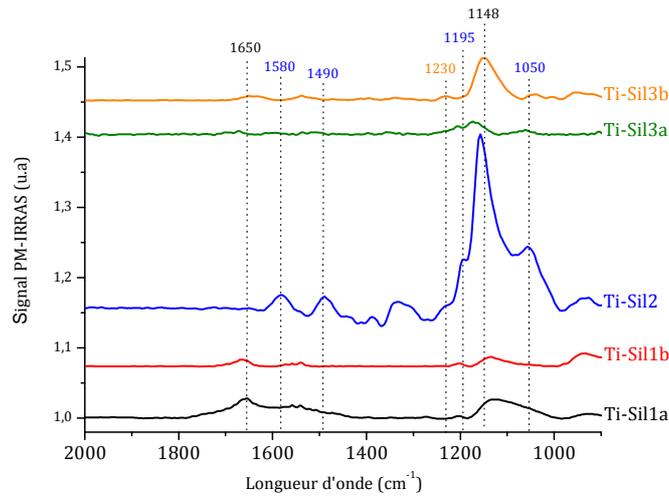
L'analyse de ces spectres PM-IRRAS permet d'éliminer la méthode Ti1 menant à des surfaces de titane très contaminée. Le choix entre les méthodes Ti2 ou Ti3 se détermine après étude des spectres XPS.

2. Spectre haute résolution des éléments N1s et C1s sur les surfaces oxydées par les différents protocoles.



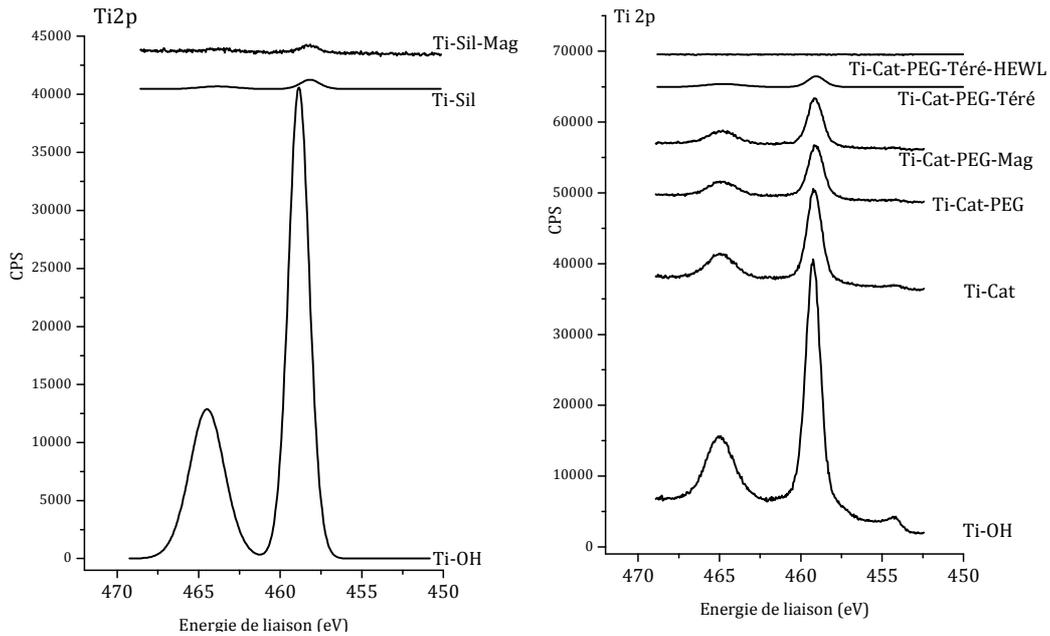
Les surfaces Ti2-a présentent une contamination organique plus importante que les autres surfaces.

3. Spectres PM-IRRAS de l'optimisation de l'APTES sur les surfaces Ti2-a.



Les protocoles Ti-Sil2 et Ti-Sil3b sont ceux présentant le meilleur taux de greffage de l'APTES caractérisé par la bande à 1148 cm⁻¹ correspondant aux vibrations d'élongation des liaisons Si-O-Si.

4. Evolution du signal Ti2p après greffage des différentes couches organiques.



Références Bibliographiques :

1. R.G. Greenler, *Infrared Study of Adsorbed Molecules on Metal Surfaces by Reflection Techniques*. Journal of Chemical Physics, 1966. **44** p. 310-310.
2. R.G. Greenler, *Reflection Method for Obtaining the Infrared Spectrum of a Thin Layer on a Metal Surface*. Journal of Chemical Physics, 1969. **50** p. 1963-1963.
3. T. Buffeteau, B. Desbat, and J.M. Turllet, *Polarization Modulation FT-IR Spectroscopy of Surfaces and Ultra-thin Films : Experimental Procedure and Quantitative Analysis*. Applied Spectroscopy, 1991. **45** p. 380-380.
4. CEA. 2012. Available from:
http://iramis.cea.fr/sis2m/Phoce/Vie_des_labos/Ast/ast_sstechnique.php?id_ast=229.
5. H.N. Russell and F.A. Saunders, *New Regularities in Spectra of the Alkaline Earths*. Astrophysical Journal, 1925. **61** p. 38-69.
6. A.R. Chourasia and D.R. Chopra, *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. 1997, Upper Saddle River. 791-808.
7. P. Auger, *Sur l'effet photoélectrique composé*. Journal de Physique, 1925. **6** p. 205-208.
8. L.A. Harris, *Some Observations of Surface Segregation by Auger Electron Emission*. Journal of Applied Physics, 1968. **39** p. 1428-1431.
9. L.A. Harris, *Analysis of Materials by Electron-Excited Auger Electrons*. Journal of Applied Physics, 1968. **39** p. 1419-1427.
10. G. Moretti, *Auger parameter and Wagner plot in the characterization of chemical states by X-ray photoelectron spectroscopy: a review*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 1998. **95** p. 95-144.
11. C.J. Powell, *Recommended Auger parameters for 42 elemental solids*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 2012. **185** p. 1-3.
12. G. Binnig and C.F. Quate, *Atomic Force Microscope*. Physical Review Letters, 1986. **56** p. 930-933.

Article

Co-Grafting of Amino-Poly-Ethylene-Glycol and Magainin I on a TiO Surface; Tests of Antifouling and Antibacterial Activities

Jessie Peyre, Vincent Humblot, Christophe Méthivier, Jean-Marc Berjeauc, and Claire-Marie Pradier

J. Phys. Chem. B, **Just Accepted Manuscript** • Publication Date (Web): 18 Sep 2012Downloaded from <http://pubs.acs.org> on November 5, 2012**Just Accepted**

“Just Accepted” manuscripts have been peer-reviewed and accepted for publication. They are posted online prior to technical editing, formatting for publication and author proofing. The American Chemical Society provides “Just Accepted” as a free service to the research community to expedite the dissemination of scientific material as soon as possible after acceptance. “Just Accepted” manuscripts appear in full in PDF format accompanied by an HTML abstract. “Just Accepted” manuscripts have been fully peer reviewed, but should not be considered the official version of record. They are accessible to all readers and citable by the Digital Object Identifier (DOI®). “Just Accepted” is an optional service offered to authors. Therefore, the “Just Accepted” Web site may not include all articles that will be published in the journal. After a manuscript is technically edited and formatted, it will be removed from the “Just Accepted” Web site and published as an ASAP article. Note that technical editing may introduce minor changes to the manuscript text and/or graphics which could affect content, and all legal disclaimers and ethical guidelines that apply to the journal pertain. ACS cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these “Just Accepted” manuscripts.



1 Co-Grafting of Amino–Poly(ethylene glycol) and Magainin I on a 2 TiO₂ Surface: Tests of Antifouling and Antibacterial Activities

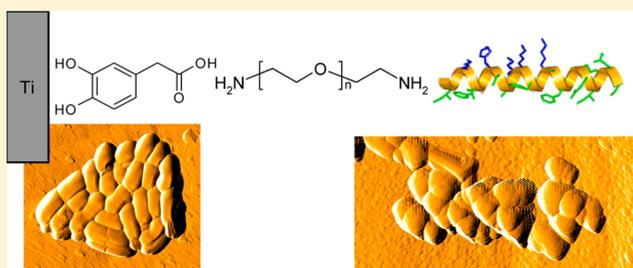
3 Jessie Peyre,[†] Vincent Humblot,[†] Christophe Méthivier,[†] Jean-Marc Berjeaud,[§]
4 and Claire-Marie Pradier^{*,†}

5 [†]CNRS UMR 7197, Surface Reactivity Laboratory, Pierre et Marie Curie University - Paris 6, 3 rue Galilée 94200 Ivry-sur-Seine,
6 France

7 [§]Ecology & Biology Interactions - UMR 7267 CNRS, Poitiers University, IBMIG, 40 avenue du recteur Pineau, 86022 Poitiers Cedex,
8 France

9 **S** Supporting Information

10 **ABSTRACT:** An antimicrobial peptide,¹ Magainin I (Mag),
11 was grafted to a titanium oxide surface, via an antiadhesive
12 poly(ethylene glycol) (PEG) cross-linker. The latter plays a 2-
13 fold part, being antiadhesive, and enabling the covalent
14 immobilization of the peptide. The functionalization was
15 characterized at each step by reflection absorption infrared
16 spectroscopy (RAIRS) and X-ray photoelectron spectroscopy
17 (XPS). The antiadhesive properties of PEG, and antibacterial
18 activity of the anchored Magainin I, were individually tested
19 toward adsorption of bovin serum albumin (BSA) proteins,
20 and against Gram positive bacteria, *Listeria ivanovii*, respectively. The results reveal that adhesion of both proteins and bacteria
21 have been considerably reduced, accompanied by an inhibition of the growth of remaining adhered bacteria. This work thus
22 offers a novel approach to functionalize oxide surfaces against biofilms and to measure the so-obtained properties in each of the
23 successive steps of a biofilm formation.



24 ■ INTRODUCTION

25 In any biological environment, microorganisms have a strong
26 tendency to adhere and grow on solid surfaces. Once bacteria
27 or fungi are attached to a surface, a multistep process starts,
28 leading to the formation of a complex, adhering, microbial
29 community named “biofilm”. The latter involves an initial
30 attachment step for bacteria, followed by the formation of
31 microcolonies, and eventually differentiation of microcolonies
32 into exopolysaccharide-encased, mature biofilms.^{2,3} Biofilms
33 cause damages and considerable costs in different fields such as
34 medicine,⁴ food and marine industries.⁵ In addition, by
35 protecting microorganisms from antimicrobial treatments,
36 biofilms constitute a source of pathogenic infection. The
37 development of this biofilm can be directly associated to the
38 development of nosocomial diseases, food intoxication or
39 biodegradations of materials. Biofilms are also responsible for a
40 loss of hydrodynamic properties of ships, of transport
41 properties of heat exchangers as well as of possible biocorrosion
42 of immersed structures.

43 These few examples show the urgent need for undwelling
44 innovative surface treatments which would prevent, or at least
45 slow down, the development of biofilms.

46 A number of technologies have been developed to protect
47 solid surfaces against biofilm formation. Some rely on the
48 deposit of hydrophilic coatings [poly(ethylene glycol) (PEG)
49 or PEG derivatives] or incorporate biocidal agents or
50 polycations [quaternary ammonium, phosphonium, tertiary

sulfonium] in polymers.⁶ All these strategies are efficient and do
51 prevent colonization; the counterpart being the cost and short
52 duration of these strategies. Strategies, cost-effective and
53 granting a long-term protection of materials, still need to be
54 launched. The most common way is to attach a broad spectrum
55 antimicrobial agent that will impede bacteria growth through
56 usual bacteriostatic or bactericidal mechanisms.^{7–11} Enzymes or
57 other natural bactericidal substances have been used to form
58 antibacterial coatings; they already proved their efficiency in
59 permeabilizing membranes and stop microorganism (see refs
60 12 and 13 and references therein). Other authors proposed to
61 covalently bind antimicrobial peptides [AMPs] on the surface
62 of medical devices. Conversely, to conventional antibiotics that
63 may be toxic, antimicrobial peptides, are natural products that
64 are usually produced by microorganisms, fungi, plants, insects,
65 or even animals.¹⁴ In addition to their nontoxic origin, AMPs
66 offer other advantages such as a broad spectrum antimicrobial
67 activity, an action at very low concentration and, last but not
68 least, they rarely promote a bacterial resistance.¹⁴ Another way
69 to prevent the toxicity of some antibacterial molecules is to
70 graft a polymer layer which exhibits a bactericidal effect at room
71 temperature and becomes cell-repellent only once introduced
72 in the body.¹³

Received: June 7, 2012

Revised: September 13, 2012

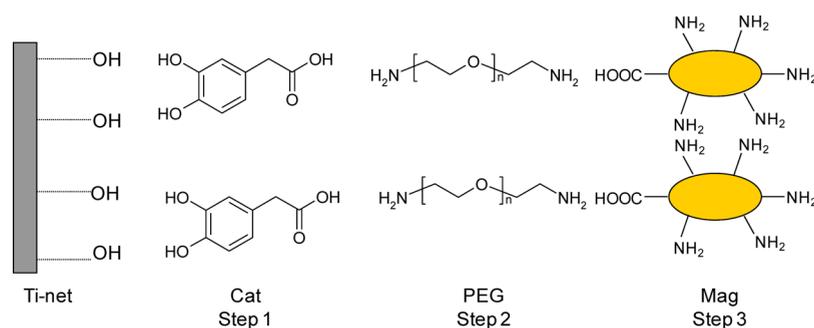


Figure 1. Scheme of the three-step functionalization process.

74 In several previous works, we tested the antimicrobial activity
75 of gold surfaces functionalized by grafted Magainin I (Mag)¹⁵
76 or Gramicidin A,¹⁶ or stainless steel surfaces modified by Nisin
77 A;¹⁷ the two first antimicrobial peptides being produced by an
78 amphibian, *Xenopus laevis* and a microorganism, *Lactococcus*
79 *lactis*, respectively. The procedure indeed permitted 50–80% of
80 the attachment of bacteria to be inhibited; the activity of the
81 grafted peptide was shown to be bacteriostatic, rather than
82 bactericidal, likely because it could not aggregate and form
83 pores across the bacterial membrane.

84 In this paper, we report a multiple step functionalization
85 strategy aiming at grafting an antimicrobial agent, the Magainin
86 I, covalently and coupled to an antiadhesive agent, a modified
87 poly(ethylene glycol) (PEG), on a hydroxylated titanium
88 surface. The PEG molecule, in addition to its antiadhesive
89 properties, acts as a cross-linker between a catechol layer, and
90 the bioactive peptide (Magainin I). This strategy was inspired
91 by Faure et al.'s previous work on stainless steel.¹⁸ The use of
92 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) derivatives as cross-linker
93 was shown to lead to very stable antimicrobial layers. The
94 titanium modified surfaces were characterized step by step by
95 means of reflection absorption infrared spectroscopy (RAIRS)
96 and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Moreover, to
97 evaluate the antimicrobial activity of the grafted Magainin I,
98 and/or the expected antiadhesive properties of the PEG cross-
99 linking layers, four different tests were set up, dedicated to
100 explore each step of the biofilm formation.

101 ■ EXPERIMENTAL METHODS

102 **Materials.** 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (Cat—a catechol
103 derivative, sodium chloride (NaCl), sodium citrate dihydrate
104 (HOC-(COONa)-(CH₂COONa)₂·2H₂O), *N*-hydroxysuccini-
105 mide (NHS, 1-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide
106 hydrochloride (EDC), *O,O'*-bis(2-aminoethyl)poly(ethylene
107 glycol), *M_w* 3000 (H₂N-PEG-NH₂), and Magainin I (Mag)
108 [Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Gly-Lys-Phe-Gly-Lys-
109 Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Lys-Ser] were obtained from
110 Sigma-Aldrich. Antibacterial tests were carried out with the
111 Gram-positive bacteria *Listeria ivanovii* (Li4pVS2), which is
112 known to form biofilms easily on several surfaces.¹⁹ Titanium
113 (Ti 99.6%) coupons (10 mm × 10 mm × 1 mm) were
114 purchased from Goodfellow. All solvents were reagent-grade
115 and were used without any further purification. *L. ivanovii*
116 adhesion was tested at room temperature.

117 **Preparation of Sample Surfaces.** Titanium coupons were
118 polished with an abrasive disk [abrasive grain 1200 nm] for 2
119 min and rinsed 1 min in milli-Q water. Then they were polished
120 down to 1 μm (polishing disk and diamond suspension) for 2
121 min and ultrasonically washed 5 min in milli-Q water.

Eventually, they were polished down to 0.25 μm for 15 min
and successively sonicated 15 min + 10 min in milli-Q water, 10
min in acetone, 10 min in *n*-dodecane, and 10 min in 2-
propanol.²⁰ This preparation is expected to increase the
amount of hydroxyl groups on the surface.

Purification of PEG. The prepared H₂N-PEG-NH₂
polymer showed the presence of some undesired residues,
evidenced on the NMR spectra (spectra not shown). Before
any experiment, H₂N-PEG-NH₂ was purified. The polymer was
diluted in milli-Q water. The solution was acidified with HCl to
pH ~1–2 and extracted with CH₂Cl₂ three times. Finally, the
organic phase was acidified with HCl, dried over MgSO₄ and
concentrated.²¹

Surface Functionalization. A three-step functionalization
strategy was used for the elaboration of antibiofilm surfaces:
first the binding of Cat, expected from the interaction of its
hydroxyl groups with the surface,^{21,22} followed by the
deposition of H₂N-PEG-NH₂, and finally, grafting the
antibacterial peptide onto the terminal groups of the function-
alized PEG (Figure 1).

Cat solutions, at a concentration of 1 mg/mL, were prepared
in a buffer at pH = 6 (2.61 g of NaCl and 1.32 g of sodium
citrate diluted in 15 mL of milli-Q water and pH adjusted with
HCl). EDC and NHS were diluted to 3.5 × 10⁻² and 5.5 ×
10⁻² M in milli-Q water, H₂N-PEG-NH₂ solutions were
prepared in milli-Q water at 2 mg/mL, and Mag was diluted
in milli-Q water at 1 mg/L. These experiments were carried out
at 50 °C.

For each step of surface functionalization, two series of
identical samples were prepared and characterized by reflection
absorption infrared spectroscopy (RAIRS) and X-ray photo-
electron spectroscopy (XPS).

To graft the catechol derivative, titanium samples were
immersed in a Cat solution overnight, washed for 5 min in a
buffer solution and 5 min in milli-Q water, and then dried
under a flow of dried air.²¹ These coupons are named Ti-Cat.

Before grafting the polymer, Ti-Cat substrates were
immersed in 10 mL of an EDC/NHS solution for 90 min
under smooth agitation to transform the catechol carboxylic
groups into reactive ester functions. They were then rinsed in
milli-Q water for 5 min under agitation, leading to coupons
named Ti-Cat-act.

The H₂N-PEG-NH₂ molecule was then grafted onto these
Ti-Cat-act surfaces. Cat-modified titanium surfaces were
immersed in the polymer solution overnight, rinsed 5 min
with milli-Q water and then dried under a flow of dried air.
Resulting coupons are named Ti-Cat-PEG.

Grafting of Magainin I. First, 20 μL of the Mag solution
was diluted in 980 μL of EDC/NHS solution to obtain, after 90

171 min, 1 mL of activated Mag at 20 mg/mL. Grafting of activated
172 Mag was then realized by depositing 100 μ L of solution on Ti-
173 Cat-PEG surfaces. After 3 h, the coupons were rinsed in milli-Q
174 water for 10 min and dried under a flow of dried air. These
175 coupons are named Ti-Cat-PEG-Mag.

176 **Characterization Techniques. Reflection–Absorption**
177 **Infrared Spectroscopy (RAIRS).** RAIR spectra were recorded
178 using a Nicolet Magna 550 FT-IR spectrometer equipped with
179 a liquid nitrogen-cooled MCT wide-band detector (spectral
180 range 4000–650 cm^{-1}). The sample support enabled the
181 incidence angle to be changed. After several tests, an optimal
182 reflection angle of 73° was chosen. All infrared spectra were
183 recorded at 8 cm^{-1} resolution, by coaddition of 256 scans, with
184 a background on clean titanium.²³

185 **X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).** XPS analyses
186 were performed using a PHOIBOS 100 X-ray photoelectron
187 spectrometer from SPECS GmbH (Berlin, Germany) with a
188 monochromated Al K α X-ray source ($h\nu = 1486.6$ eV)
189 operating at $P = 1 \times 10^{-10}$ Torr or less. Spectra were carried
190 out with a 50 eV pass energy for the survey scan and 10 eV pass
191 energy for the C1s, O1s, N1s, and Ti2p regions. High-
192 resolution XPS conditions have been fixed: “fixed analyzer
193 transmission” analyses mode, a 7 \times 20 mm entrance slit, leading
194 to a resolution of 0.1 eV for the spectrometer, and an electron
195 beam power of 150 W (15 kV and 10 mA). A takeoff angle of
196 90° from the surface was employed for each sample. Element
197 peak intensities were corrected by Scofield factors.²⁴ The
198 spectra were fitted using Casa XPS v.2.3.15 Software (Casa
199 Software Ltd.) and applying a Gaussian/Lorentzian ratio G/L
200 equal to 70/30.

201 **Atomic Force Microscopy Imaging (AFM).** AFM images of
202 dried surfaces were recorded using a di Caliber AFM
203 microscope from Bruker Instruments Inc. To avoid tip and
204 sample damages, topographic images were taken in the
205 noncontact dynamic mode also known as tapping. Silicon
206 nitride tips (resonance frequency 280–400 kHz, force constant
207 40–80 N/m) have been used. Images were obtained at a
208 constant speed of 2 Hz with a resolution of 512 lines and 512
209 pixels each. The raw data were processed using the imaging
210 processing software di SpmLabAnalysis v.7.0 from Veeco
211 Instruments Inc., mainly to correct the background slope
212 between the tip and the titanium surface.¹⁵

213 **Tests of Surface Antibiofilm Activity.** The formation of a
214 biofilm is known to occur following several steps (Figure 2).¹ It
215 starts with the adsorption of proteins present in the
216 environment of the metallic surface. Microorganisms then
217 easily adhere on this layer and grow, forming colonies by using
218 these proteins as nutrient. Adhesion and growth of bacterial
219 cells thus constitute two steps to be interrogated. Once the

biofilm is formed, microorganisms are often protected by the
matrix from antibiotic or any other sources of aggression,
resulting in a “stable” biofilm, and this has to be tested as well.²⁵
To evaluate the antibiofilm effect of the new elaborated surface
coating, and to better identify the step that is most inhibited, if
it is, a set of specific tests was designed and conducted as
described here below.

1. **Adsorption of Proteins (Test 1).** The first test aimed at
measuring the effect of H₂N-PEG-NH₂ in preventing protein
adsorption. A bovine serum albumin (BSA) solution in milli-Q
water was prepared at 0.1 mg/mL. Ti, Ti-Cat, and Ti-Cat-PEG
samples were immersed in this solution for 1 h at room
temperature and under agitation. The samples were then rinsed
for 5 min in milli-Q water and dried under a flow of dried air.
The surfaces were then analyzed by RAIRS, and the amounts of
BSA, adsorbed on clean Ti, Ti-Cat, Ti-Cat-PEG, or Ti-Cat-
PEG-Mag surfaces were compared by considering the
intensities of amide bands, the proteins IR fingerprints.

2. **Adhesion of Bacteria (Test 2).** Following protein
adsorption, the process of biofilm formation implies adhesion
of microorganisms. If the latter is inhibited, biofilms will not
grow. Test 2 was thus elaborated to assess the antiadhesive
properties of H₂N-PEG-NH₂ and Mag against microorganisms
in solution.

Nonpathogenic bacteria, *L. ivanovii* Li4pVS2, were first
grown at 37 °C in brain heart infusion (BHI) broth overnight.
The activity of functionalized surfaces against bacteria was
tested following a methodology described in a previous work.²⁶
A 100 μ L drop, containing 10⁸ bacteria, was deposited on Ti,
Ti-Cat-PEG and Ti-Cat-PEG-Mag samples and left for 3 h at
25 °C under a wet atmosphere to avoid evaporation.
Importantly, under these conditions, bacteria cannot grow;
thus only the effect of bacteria adhesion on the surfaces is
tested. Samples were then washed with 6 \times 100 μ L of milli-Q
water and dried under a flow of dried air. The amount of
bacteria adhered on the surface was then controlled by RAIRS.

3. **Viability of Bacteria (Test 3).** In the process of biofilm
formation, after microorganism adhesion, the latter start
excreting exopolymers, and this is only possible when bacteria
remain alive after adhesion. Test 3 thus consists in analyzing
and comparing the viability of bacteria after having been in
contact with either a clean or a Mag-functionalized surface. We
used the same conditions as for Test 2 (3 h at 25 °C) to test
the viability of bacteria once adhered. Bacteria were then
observed by atomic force microscopy, which enables us to
detect possible shape changes or cell wall damages. Note that
AFM images were recorded in the air, after surface drying, and
not in the cell solution; this is compatible with our objective,
sometimes even preferable, when willing to characterize a
bacteria film and observe topographic features on cells, avoiding
capillary effects.^{27,28}

4. **Growth of Bacteria (Test 4).** The final step in the biofilm
formation is reached if bacteria grow and form aggregates. With
the last test (Test 4), the inhibitor activity of H₂N-PEG-NH₂
and Mag on bacteria growth was measured doing a CFU
(colony-forming unit) counting after detachment of the
bacterial layers from surfaces.¹⁵ 100 μ L of culture solution,
containing 10⁸ bacteria, were deposited on Ti, Ti-Cat, Ti-Cat-
PEG, and Ti-Cat-PEG-Mag samples for 3 h at 37 °C under wet
atmosphere. Contrary to test 2 and 3 conditions, these permit
the growth of bacteria; test 4 thus reveals the inhibition, or the
delay, of bacteria growth induced by the presence of organic
layers. Samples were washed three times with physiological

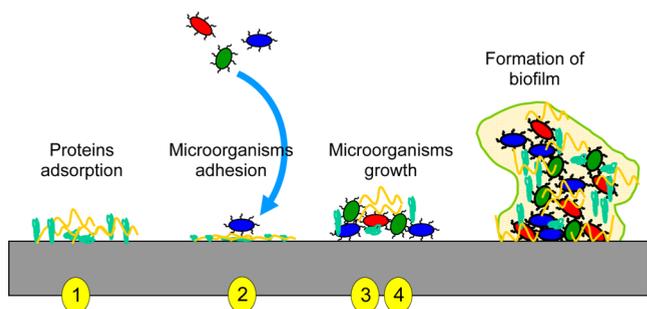


Figure 2. Consecutive steps of the formation of a biofilm on surface.

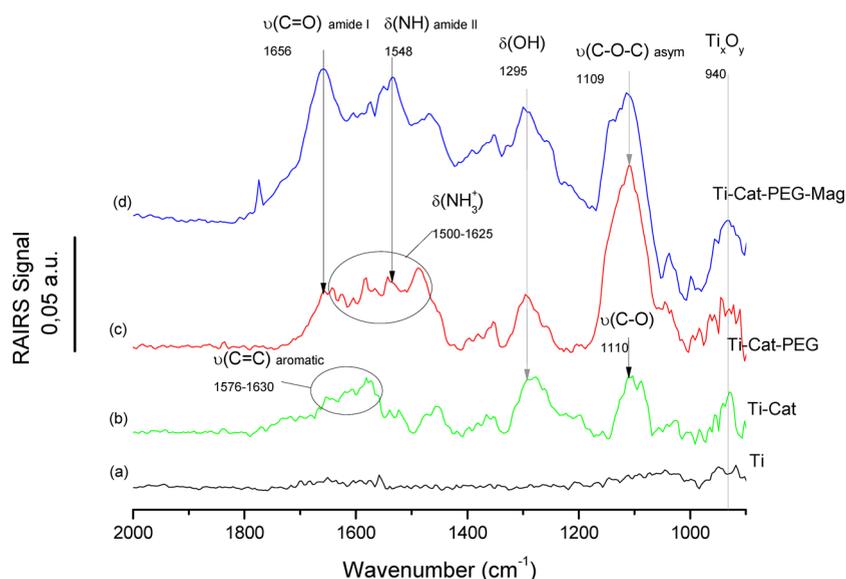


Figure 3. FT-RAIRS spectra after successive steps of functionalization: (a) Ti, (b) Ti-Cat, (c) Ti-Cat-PEG, and (d) Ti-Cat-PEG-Mag.

sterile solution (0.9% NaCl) to remove nonadhered bacteria. Then, they were sonicated in 2 mL of physiological sterile solution for 3 min at 60 W to retrieve nothing but bacteria which have adhered to the surfaces. After sonication, the bacteria were pelleted by centrifugation at 10000 g for 5 min. Then 1.8 mL of supernatant was removed cautiously and the bacteria were resuspended by vortexing. The suspension was then diluted 100 times; 50 μ L of each dilution were deposited on BHI agar plates (15 g/L), in duplicate for each dilution, using a spiral plater WASP [AES, France]. Before counting colonies, the plates were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 24 h. After incubation, we counted the colonies on each plates and calculated a percentage of inhibition of bacteria growth regarding the reference on Ti with the following formula:

$$\% \text{ Inhibition}_{\text{sample}} = \left(1 - \frac{\text{CFU}_{\text{sample}}}{\text{CFU}_{\text{Ti}}} \right) \times 100$$

RESULTS

Step 0: Characterization of Clean Titanium. Before any functionalization, clean titanium surfaces were characterized by RAIRS and XPS. Figure 3a shows a typical RAIRS spectrum collected after polishing and washing Ti samples. Only weak bands related to titanium oxides at 940 cm^{-1} were observed. As for XPS, the Ti 2p_{3/2} peak (see Supporting Information) could be decomposed into two components: a major one at 459.0 \pm 0.1 eV attributed to titanium in TiO₂, and a weak one at 454.0 \pm 0.1 eV attributed to metallic titanium.³⁰ The O 1s peak (Figure 4) confirmed the presence of titanium dioxide; the intense O 1s peak at 530.6 \pm 0.1 eV is attributed to the TiO₂ oxide film;³⁰ some traces of organic contamination are evidenced by a weak peak at 532.0 \pm 0.1 eV attributed to oxygen in C=O bonds.³¹

Step 1: Grafting of Catechol. Figure 3b presents typical RAIRS spectra recorded after treatment in a Cat solution. In comparison with Figure 3a, Figure 3b shows several characteristic bands: a medium $\nu_{\text{C-O}}$ band at 1110 cm^{-1} and a broad δ_{OH} band at 1295 cm^{-1} related to carboxylic acid groups; in addition, a broad massif at 1575–1630 cm^{-1} could be attributed to the C=C stretching band of the catechol

aromatic rings.³² The Ti_xO_y band, at 940 cm^{-1} , was still detectable.

Ti-Cat samples were also analyzed by XPS and the resulting spectra are presented in Figure 4. The O 1s peak was decomposed into three main components, at 530.6 \pm 0.1, 532.0 \pm 0.1, and 533.5 \pm 0.1 eV, easily attributed to oxygen in titanium oxide, in (C=O)—OH, and in (C=O)—OH bonds, respectively; a very weak contribution was observed at 536.5 \pm 0.1 eV, which we already saw on other titanium oxide samples, without explaining it unambiguously; it might also be due to the oxygen atoms in α position of the phenyl.³³ The TiO₂ oxygen peak decreased, compared to that observed on clean samples, whereas the other components evidence the presence of organic molecules on the surface. The carbon C 1s peak was best fitted with four components, a dominant one at 285.3 \pm 0.1 eV corresponding to carbon in C—(C,H) bonds and three smaller ones; one, centered at 286.7 \pm 0.1 eV is attributed to carbon bound to nitrogen or oxygen (C—N and C—O), the second at 288.6 \pm 0.1 eV to carbon in (C=O)—(O,N) groups and the latter at 290.2 \pm 0.1 eV is the satellite peak characteristic of the benzyl $\pi \rightarrow \pi^*$ transition.^{34,35}

Step 2: Grafting of Diamine Poly(ethylene glycol). The grafting of H₂N-PEG-NH₂ relies on the formation of peptidic bonds between the amine group of the polymer and the activated carboxylic acid of Cat.

Figure 3c shows RAIRS spectra recorded after reaction of H₂N-PEG-NH₂ with the surface. The growth of an intense massif centered at 1109 cm^{-1} , easily attributed to the $\nu_{\text{C-O-C}}$ asymmetric band at, and of $\delta_{\text{NH}_3^+}$ bands detected at 1500 and 1625 cm^{-1} , are strong indications of the fixation of H₂N-PEG-NH₂. Additional features, at 1548 and 1656 cm^{-1} , which can be associated respectively to $\nu_{\text{C=O}}$ (amide I) and a combination of δ_{NH} and $\nu_{\text{C=N}}$ (amide II), confirm the covalent grafting of the second PEG layer.³⁶

XPS analysis of Ti-Cat-PEG samples (Figure 4) confirms RAIRS results, with O1s and C 1s peaks characteristic of the organic layer and an intense N 1s signal. When comparing results to the XPS spectra after catechol adsorption, one notes the decrease of the two lower O1s BE contributions, related to the oxide, and to (C=O)—OH groups; at the same time, two

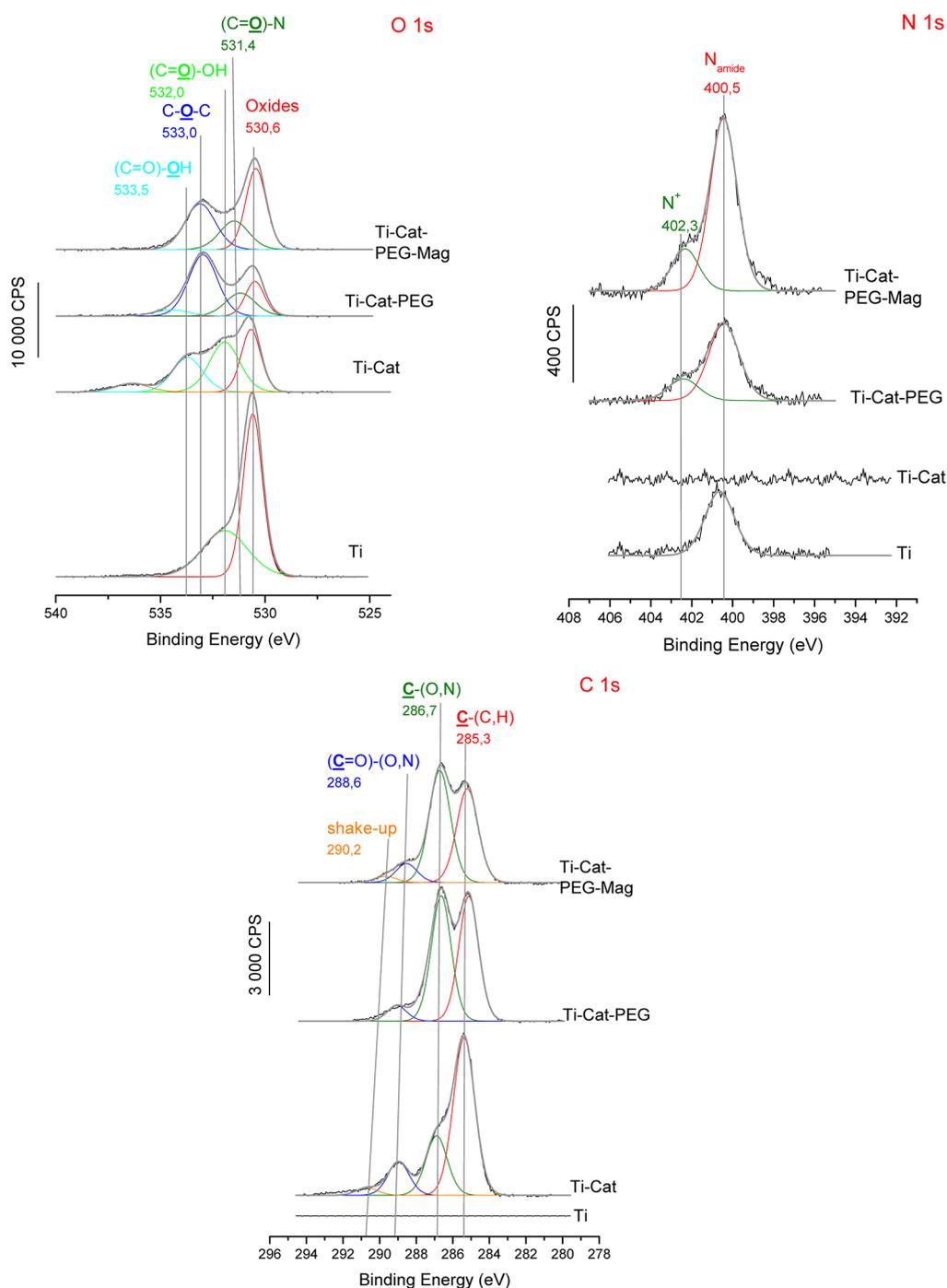


Figure 4. XPS spectra of the O 1s, N 1s, and C 1s regions for (from bottom to top) Ti, Ti-Cat, Ti-Cat-PEG, and Ti-Cat-PEG-Mag.

new peaks show up, at 531.4 ± 0.1 and 533.0 ± 0.1 eV corresponding to oxygen in amide bands $(\text{C}=\text{O})-\text{N}$ and $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ groups, respectively.

A new N 1s signal is detected that could be decomposed in two components: an intense peak at 400.3 ± 0.1 eV attributed to the nitrogen in amide bonds or possibly to NH_2 and a smaller one at 402.3 ± 0.1 eV corresponding to NH_3^+ groups. Eventually, a net increase of the carbon contribution at 286.7 ± 0.1 eV is obviously due to the presence of $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ bonds on the surface. All these data are strong indications of the formation of a $\text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{NH}_2$ adlayer.³⁶

Step 3: Grafting of Magainin I. The grafting of Mag is expected by reaction of an activated Glutamic acid moiety of Mag with adsorbed $\text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{NH}_2$.

Figure 3d displays RAIRES spectra recorded after that step. The $\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$ stretching band at 1109 cm^{-1} is still detected but new bands appear at 1656 and 1548 cm^{-1} , which can be attributed to the amide I ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$) and amide II ($\delta_{\text{NH}} + \nu_{\text{C}-\text{N}}$) signals, respectively. Magainin I is a peptide, constituted of amino acids linked one to the other via peptidic bonds, likely at the origin of these new signals.¹⁵ Absorption signals at ca. 1400 , 1600 , and maybe 1700 cm^{-1} , easily attributed to the symmetric and asymmetric COO^- stretching bands, and to the $\text{C}=\text{O}$

382 stretch, are also present on the spectrum, thus confirming the
383 presence of Mag on top of the PEG layer.

384 The XPS analysis (Figure 4), shows an increase of peaks that
385 can be related to the presence of Mag: the O 1s peak attributed
386 to oxygen in C=O bonds at 531.4 ± 0.1 eV, the N 1s peak
387 related to nitrogen in amide bonds at 400.5 ± 0.1 eV, and the C
388 1s peak due to carbon in (C=O)—N groups at 288.6 ± 0.1
389 eV.¹⁵ We also noticed a slight decrease of the C—O—C peak
390 at 533.0 ± 0.1 eV, explained by an attenuation of the PEG layer
391 by Mag. The average thickness of each layer, d , was calculated
392 from the successive attenuations of the titanium signal, using
393 the following equation:

$$\frac{I}{I_0} = \exp\left(-\frac{d}{\lambda} \sin \varphi\right)$$

394 where I and I_0 are the Ti 4f peak intensity before and after
395 adsorption of a given layer respectively, λ is the mean free path
396 of the Ti 4f electron through an organic layer. The obtained
397 value for the final Mag layer was close to 20 Å thick, whereas
398 the Magainin I medium radius lies between 25 and 30 Å
399 depending on the solvation sphere.³⁷

400 Both RAIRS and XPS analyses confirm the binding of Mag,
401 and also show that the amount of anchored peptides is rather
402 weak, below a complete layer from which much more intense
403 signals, and stronger substrate attenuation would be expected.

404 **Antifouling and Antimicrobial Activities.** Four tests,
405 described in the Experimental Methods, were successively
406 conducted to evaluate the antifouling and antimicrobial
407 activities of the successively grafted layers.

408 **1. Test 1: Antiadhesive Effect of H₂N-PEG-NH₂ Layer**
409 **toward Protein Adsorption.** First, adsorption of proteins was
410 tested using BSA, a protein known to easily adsorb on many
411 types of surfaces.^{38,39} Figure 5 shows the RAIRS spectra, in the
412 region of the protein characteristic amide bands, recorded after
413 deposition of BSA solution and rinsing, on Ti, Ti-Cat, and Ti-

414 Cat-PEG surfaces. Each shown spectrum is the result of a
415 subtraction of the spectra after and before BSA interaction on a
416 given type of surface; thus only changes due to BSA interaction
417 are expected to be present. Indeed, on all spectra, bands at ca.
418 1550 and 1650 cm⁻¹, ascribed to adsorbed BSA, are present.

419 Their intensity, directly related to the amount of adsorbed
420 BSA, is roughly the same on clean titanium and Cat-modified
421 surfaces, whereas it is reduced, by a factor of 4, on the PEG
422 functionalized surface.

423 **2. Test 2: Antiadhesive Effect of H₂N-PEG-NH₂ and Mag**
424 **toward Bacteria Adhesion.** Having shown the antiprotein
425 adsorption activity of H₂N-PEG-NH₂ surfaces, this second test
426 is expected to probe adhesion of bacteria on all functionalized
427 surfaces. To do so, a solution of *L. ivanovii* was deposited on Ti,
428 Ti-Cat-PEG, and Ti-Cat-PEG-Mag samples, as described in the
429 Experimental Methods. After being rinsed and dried, the
430 samples were analyzed with RAIRS; antiadhesive properties of
431 functionalized samples were then compared to those of clean
432 titanium samples.

433 Figure 6a shows the RAIRS spectra of the three types of
434 surfaces, Ti, Ti-Cat-PEG, and Ti-Cat-PEG-Mag, after contact
435 with a solution of bacteria. On the clean titanium surface, one
436 sees intense bands which are indeed bacterial markers, the C—
437 O—C stretching of membrane carbohydrates at 1085 cm⁻¹, the
438 C—O—P stretching of polysaccharides also contained in the
439 membrane, at 1242 cm⁻¹,⁴⁰ bands at 1403, 1556, and at 1662
440 cm⁻¹ can be respectively attributed to the symmetric COO⁻

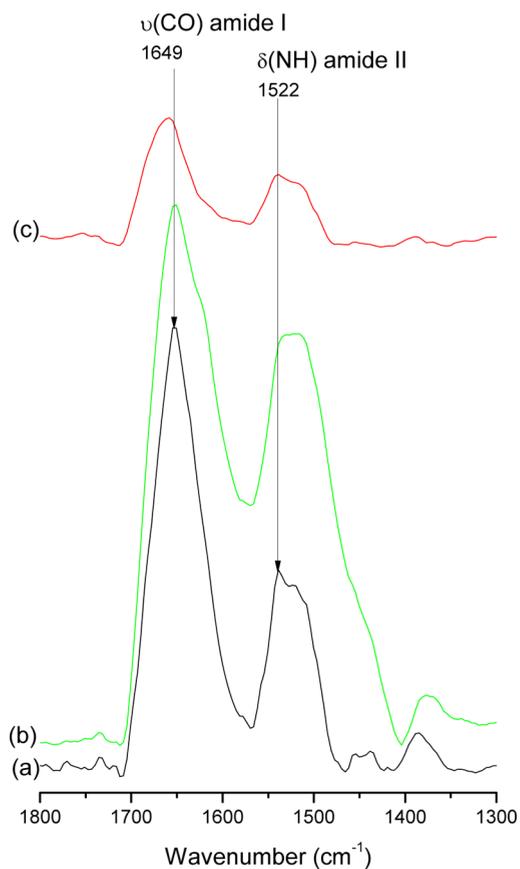


Figure 5. FT-RAIRS spectra of (a) Ti, (b) Ti-Cat, and (c) Ti-Cat-PEG after deposition of BSA.

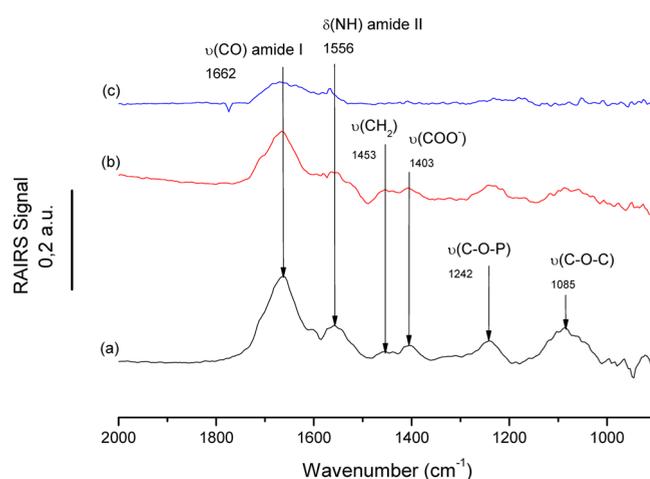


Figure 6. FT-RAIRS spectra of (a) Ti, (b) Ti-Cat-PEG and (c) Ti-Cat-PEG-Mag after bacteria deposition.

441 stretching, ν_{COO^-} , of fatty acids,⁴¹ and to the two amide bands, 441
442 $\delta_{\text{NH}} + \nu_{\text{C-N}}$ (amide II) and $\nu_{\text{C=O}}$ (amide I).⁴² Figure 6b 442
443 shows a net decrease of these intensity bands, by a factor close 443
444 to two. On the Ti-Cat-PEG-Mag surface (Figure 6c), only very 444
445 weak amide bands at 1662 and 1556 cm⁻¹ are still detected. 445
446 The H₂N-PEG-NH₂ and the Mag modified surfaces do have an 446
447 antiadhesive effect toward bacteria. 447

448 **3. Test 3: Viability of Bacteria Adhered on the Surfaces.** As 448
449 deduced from Test 2, Ti-Cat-PEG-Mag surfaces have a 449
450 significant, but not total, inhibiting effect on bacteria adhesion. 450

451 The question is thus whether these adhered bacteria are still
 452 alive and prone to develop on the surface, or significantly
 453 damaged. The followed test thus aims at the observation of
 454 adhered bacteria. After deposition of *L. ivanovii* on Ti, Ti-Cat-
 455 PEG, and Ti-Cat-PEG-Mag surfaces, the latter have been
 456 imaged by AFM. The highest images of Figure 7 show first the

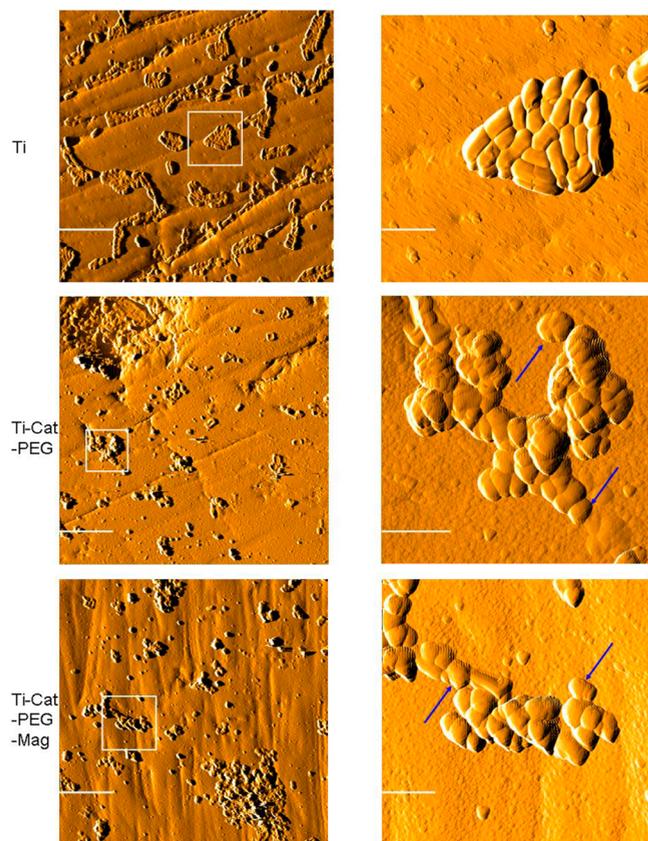


Figure 7. AFM images of Ti, Ti-Cat-PEG, and Ti-Cat-PEG-Mag after bacteria deposition. Left images: scale bar = 10 μm and right images: scale bar = 2 μm .

457 topography of clean Ti surfaces after deposition of bacteria, at
 458 two different scales. One observes that bacteria, adhered to the
 459 surface, form aggregates keeping their elongated and rather
 460 thick native shape.⁴³ Intermediate images of Figure 7, obtained
 461 on Ti-Cat-PEG surfaces after bacteria deposition, again show
 462 aggregation of bacteria; noticeable is their less well-defined
 463 shape as if some bacteria were partially crashed, or
 464 preferentially deposited on top of an already adhered one.
 465 Eventually, in the lowest images of Figure 7, recorded on Ti-
 466 Cat-PEG-Mag surfaces, bacteria have lost their native shapes;
 467 they appear to be crashed and, for some of them (see arrows on
 468 Figure 7), depleted of their contents. These images suggest that
 469 Mag and $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$ have a detrimental effect on bacteria,
 470 by damaging their membranes.

471 **4. Test 4: Inhibition of Bacteria Growth.** Damaging bacteria
 472 membranes does not imply a death of cells; the latter may
 473 recover and develop again when the surrounding conditions
 474 change.⁴⁴ The last test, consisting in counting bacteria after
 475 contact with modified surfaces and treatment in a growth
 476 solution, was thus essential.

477 To do so, about 10^8 bacteria were deposited on clean Ti, Ti-
 478 Cat, Ti-Cat-PEG, and Ti-Cat-PEG-Mag samples; after 3 h at 37

$^\circ\text{C}$, adhered cells were detached from the surfaces by sonication 479
 and the number of CFU per mL counted. We thus measured 480
 and compared the numbers of alive bacteria, after contact with 481
 the variously functionalized surfaces. As shown in Figure 8a, the 482
 number of CFU, after adhesion onto clean Ti, is higher than on 483
 any of the modified surfaces. A slight decrease was observed on 484
 Ti-Cat whereas, on Ti-Cat-PEG, the number of alive bacteria 485
 cells was decreased by a factor of 2. The most severe reduction 486
 has been observed on Ti-Cat-PEG-Mag with ca. 1 order of 487
 magnitude difference compared to the result on Ti. The 488
 comparison is easier by considering the percentages of 489
 inhibition of bacteria growth on the so-elaborated surfaces 490
 (Figure 8b) as compared growth on Ti substrates. We noticed a 491
 decrease of bacteria growth by ca. 70% on Ti-Cat-PEG and 90% 492
 on Ti-Cat-PEG-Mag. We also observed that the Cat moiety 493
 seems to have an effect with a percentage of inhibition around 494
 55%. The results were reproduced by using two different sets of 495
 functionalized samples and culture batches of each strain. These 496
 results demonstrate that, though a possible variability on the 497
 results on Ti-Cat and Ti-Cat-PEG surfaces, there is a clear 498
 inhibition of cell development due to the PEG polymer, and an 499
 even more severe one in the presence of Magainin I. 500

DISCUSSION

501 First, PEG and Magainin I were successfully grafted on titanium 502
 surfaces in a 3-step functionalization process. Step 1 consisted 503
 in the pseudocovalent grafting of a Cat derivative onto titanium 504
 surfaces. This grafting results from the formation of a charge 505
 transfer complex between the two hydroxyl groups of the Cat 506
 molecule and the hydroxyl groups present on the clean titanium 507
 surface.^{21,22} Thanks to the rather rigid aromatic cycle and 508
 associated good arrangement of the organic layer, we expect a 509
 good accessibility of the carboxylic acid groups. Grafting of 510
 $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ on Ti-Cat surfaces was clearly demonstrated 511
 by RAIRS and XPS results. The detection of a C–O–C band at 512
 1109 cm^{-1} , and of NH_3^+ around 1600 cm^{-1} , confirms the 513
 grafting of the polymer and the accessibility of the amine group 514
 for the next step. The increase of the nitrogen N1s peak at 515
 $400.4 \pm 0.1\text{ eV}$, together with the decrease of the titanium Ti 516
 $2p_{3/2}$ peak, after deposition of $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ are another 517
 proof of the PEG grafting. Note that in a previous work, Yuan 518
 et al.⁴⁵ have modified stainless steel surfaces with dopamine, 519
 and they had to modify the latter with an alkyl bromide ATRP 520
 initiator before grafting a PEGMA (poly(ethylene glycol) 521
 methacrylate) macromonomer. Fan et al.²⁰ also used a bromide 522
 modified initiator to achieve a polymerization directly onto 523
 titanium surfaces. Using the direct polymerization permits us to 524
 vary the length of the polymer and to control the grafting of 525
 this molecule on the Cat precursor. Other research groups^{21,46} 526
 synthesized the DOPA initiator together with the polymer 527
 before grafting the whole molecule. This is also a good way to 528
 control the reaction between the two components, but it might 529
 make the anchoring to the surface more difficult. The advantage 530
 of our two-step process is 2-fold: first, an homogeneous, though 531
 likely multilayered, Cat film could be obtained with a single 532
 molecule; second, soft and easy to handle conditions were 533
 sufficient to graft the $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ molecule. It is, however, 534
 true that we could not influence the length of the polymer. 535

Eventually, the grafting of Magainin I on Ti-Cat-PEG 536
 surfaces is confirmed by RAIRS with the increase of amide I 537
 band at 1656 cm^{-1} and the increase of N1s peak at 400.4 ± 0.1 538
 eV in the XPS analysis. We, however, observed a small increase 539
 of C 1s peak related to carbon in amide groups, at 288.6 ± 0.1 540

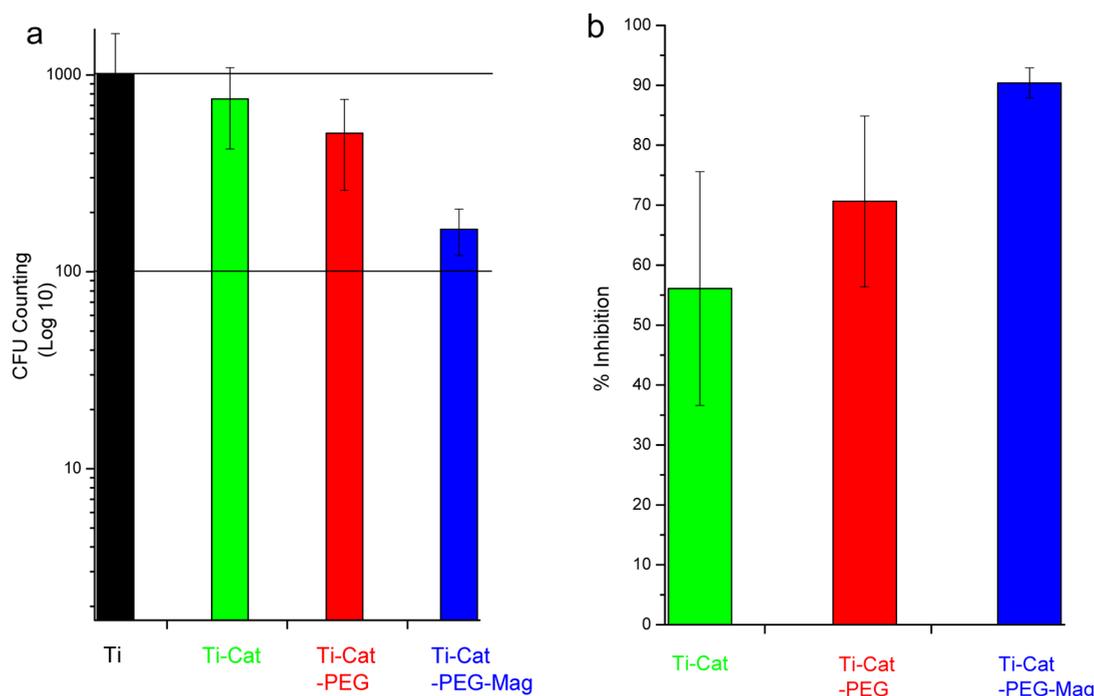


Figure 8. (a) CFU counting of *L. ivanovii* on Ti-Cat, Ti-Cat-PEG, and Ti-Cat-PEG-Mag. Error bars indicate standard deviation from two independent CFU counting. (b) Inhibition of the growth of *L. ivanovii* on Ti-Cat-PEG and Ti-Cat-PEG-Mag surfaces as compared to growth on Ti-Cat substrates. Percentages correspond to $\% = (1 - (\text{CFU}_{\text{sample}}/\text{CFU}_{\text{Ti}})) \times 100$.

541 eV, and a very slight decrease in Ti 2p_{3/2} XPS peak, after
 542 grafting the Magainin I. These small modifications suggests that
 543 a very small amount of Magainin I has been grafted, far from
 544 covering the whole surface. This could be explained by the
 545 formation of a PEG loop between two Cat moieties due to the
 546 bifunctionality of the polymer. We may also have Magainin I
 547 aggregates that would explain the little attenuation of the
 548 titanium XPS signal. Yet, in previous work, Brooks et al.
 549 showed that the antimicrobial activity of a surface was higher
 550 when the chain flexibility is limited, the polymer layer is thick
 551 and most important the peptide density on the surface is high.⁴⁷
 552 There might be a need to improve the amount of immobilized
 553 Magainin molecules. One may think of a four-step process as
 554 reported by Héquet et al.¹⁷ using a dialdehyde cross-linker
 555 between the polymer layer and the Magainin I¹⁷ or try to
 556 functionalize the Magainin I with a more reactive molecule as
 557 Glinel et al. did.⁴⁸ Before trying other protocols, important was
 558 to assess the antibiofilm activity of the successively function-
 559 alized surfaces. This constitutes an innovative part of this work,
 560 setting up various tests to measure the inhibiting effect of the
 561 functionalized surfaces toward one or several steps of the
 562 formation of a biofilm.

563 First, we tested the effect of grafting the PEG toward protein
 564 adsorption. By comparing the intensity of amide bands, we
 565 observed a net decrease of BSA adsorption on PEG-modified
 566 samples. This confirms the antiadhesive effect of a PEG-
 567 containing layer. This well-known property might be due to the
 568 chain mobility of H₂N-PEG-NH₂, a large excluded volume and
 569 high hydrophilicity.⁴⁹ Note, however, that the observed
 570 decrease is smaller than reported in previous studies, likely
 571 due to the smaller chain of the utilized H₂N-PEG-NH₂^{2,45} or to
 572 the structure of the modified polymer.³⁶ This result could be
 573 improved by modifying the length and/or the synthesis of the
 574 H₂N-PEG-NH₂ molecule.

We then tested the influence of PEG and Magainin I on
 575 bacteria adhesion. A significant decrease of bacteria adhesion
 576 was observed on Ti-Cat-PEG, and even more on Ti-Cat-PEG-
 577 Mag. The antiadhesive effect of the Magainin may be due to the
 578 presence of a protonated amine group at the end of the peptide,
 579 positive charges being known to have a repellent properties
 580 against bacteria.⁵⁰ Despite the significant antiadhesive proper-
 581 ties of combined adsorbed PEG and Magainin, the RAIR
 582 spectrum makes clear the presence of some bacteria still
 583 adhering to the surface. AFM images recorded on clean
 584 titanium, and on PEG + Mag-functionalized surfaces, after
 585 bacteria deposition, confirmed that, on clean surface bacteria
 586 keep their native shape whereas on Ti-Cat-PEG-Mag they look
 587 damaged. The final test, consisting in assaying the viability of
 588 adhered bacteria, by CFU counting, is indeed informative ... and
 589 impressive: only 10–30% of the adhered bacteria on function-
 590 alized surfaces can be revived; note that this may be sufficient
 591 to create in fine a biofilm, but probably on a long time frame. 592

593 CONCLUSIONS

This paper reports an innovative route to immobilize
 594 antiadhesive and bactericidal molecules on an oxide surface.
 595 RAIRS and XPS analyses were applied at each step of surface
 596 modification leading to the following conclusion: PEG and
 597 Magainin I can be covalently bound to an oxidized titanium
 598 surface via a catechol derivative layer, making the surface both
 599 protein-repellent and bactericidal. Although the coverage of
 600 Magainin I was low, one observed a significant decrease of
 601 bacteria adhesion, and of the viability of the limited amount of
 602 adhered cells. The established strategy appears to be an
 603 interesting way for combining antiadhesive and antimicrobial
 604 properties on an oxide surface. Such results have implications for
 605 surface coating development for various applications, such as
 606 food preservation or medical instruments for example. 607

608 As a prospective, confocal microscopy could be used to
609 confirm and quantify results about alive or dead bacteria on
610 modified surfaces. Another strategy using enzymes, such as Hen
611 Egg White Lysozyme, instead of antibacterial peptides is under
612 study. Enzymes have a different action mode compared to the
613 action of peptides, for instance, lysozymes hydrolyze the
614 membrane of Gram-positive bacteria, thus enhancing the
615 bactericidal property of the so-modified surface. It would be
616 interesting to compare the antibacterial activities of peptides
617 and enzymes and correlate the results to their mode of
618 operation.

619 ■ ASSOCIATED CONTENT

620 ● Supporting Information

621 XPS spectra of the Ti2p regions for Ti, Ti-Cat, Ti-Cat- PEG,
622 and Ti-Cat-PEG-Mag. This material is available free of charge
623 via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

624 ■ AUTHOR INFORMATION

625 Corresponding Author

626 *E-mail: claire-marie.pradier@upmc.fr. Tel: +33 (0)1 44 27 55
627 33. Fax: +33 (0)1 44 27 60 33.

628 Notes

629 The authors declare no competing financial interest.

630 ■ ACKNOWLEDGMENTS

631 The Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and
632 the Délégation Générale pour l'Armement (DGA) are
633 acknowledged for J.P. Ph.D. funding.

634 ■ REFERENCES

- 635 (1) Sauer, K.; Camper, A. K.; Ehrlich, G. D.; William, J.; Davies, D.
636 G.; Costerton, J. W. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 1140–1154.
- 637 (2) Costerton, J. W.; Zbigniew, L. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*,
638 711–745.
- 639 (3) O'Toole, G.; Kaplan, H. B.; Kolter, R. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**,
640 *54*, 49–79.
- 641 (4) Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P. *Nat. Rev.*
642 *Microbiol.* **2004**, *2*, 95–108.
- 643 (5) Beech, I. B. *Int. Biodeter. Biodeg.* **2004**, *53*, 177–183.
- 644 (6) Kanazawa, A.; Ikeda, T.; Endo, T. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*
645 **1993**, *31*, 335–343.
- 646 (7) Klibanov, A. M. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2479–2482.
- 647 (8) Kohnen, W. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4865–4869.
- 648 (9) Lee, D.; Cohen, R. E.; Rubner, M. F. *Langmuir* **2005**, *21*, 9651–
649 9659.
- 650 (10) Lichter, J. A.; Rubner, M. F. *Langmuir* **2009**, *25*, 7686–7694.
- 651 (11) Tiller, J. C.; Liao, C. J.; Lewis, K.; Klibanov, A. M. *Proc. Natl.*
652 *Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 5981–5985.
- 653 (12) Glinel, K.; Thebault, P.; Humblot, V.; Pradier, C. M.; Jouenne,
654 T. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 1670–1684.
- 655 (13) Laloyaux, X.; Fautré, E.; Blin, T.; Purohit, V.; Leprince, J.;
656 Jouenne, T.; Jonas, A. M.; Glinel, K. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 5024–5028.
- 657 (14) Hancock, R. E. W.; Sahl, H.-G. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1551–
658 1557.
- 659 (15) Humblot, V.; Yala, J.-F.; Thebault, P.; Boukerma, K.; Héquet,
660 A.; Berjeaud, J.-M.; Pradier, C.-M. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3503–3512.
- 661 (16) Yala, J.-F.; Thebault, P.; Héquet, A.; Humblot, V.; Pradier, C.-
662 M.; Berjeaud, J.-M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 623–634.
- 663 (17) Héquet, A.; Humblot, V.; Berjeaud, J.-M.; Pradier, C.-M.
664 *Colloids Surf. B* **2011**, *84*, 301–309.
- 665 (18) Faure, E.; Lecomte, P.; Lenoir, S.; Vreuls, C.; Van De Weerd,
666 C.; Archambeau, C.; Martial, J.; Jérôme, C.; Duwez, A. S.;
667 Detrembleur, C. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 7901–7904.

- (19) Vázquez-Villanueva, J.; Orgaz, B.; Ortiz, S.; López, V.; Martínez-
Suárez, J. V.; SanJose, C. *Zoonoses and Public Health* **2010**, *57*, 402–
669 410.
- (20) Fan, X.; Lin, L.; Messersmith, P. B. *Biomacromolecules* **2006**, *7*,
670 2443–2448.
- (21) Dalsin, J. L.; Lin, L.; Tosatti, S.; Vörös, J.; Textor, M.;
671 Messersmith, P. B. *Langmuir* **2005**, *21*, 640–646.
- (22) Rodriguez, R.; Blesa, M. A.; Regazzoni, A. E. *J. Colloid Interface*
672 *Sci.* **1996**, *177*, 122–131.
- (23) Humblot, V.; Méthivier, C.; Pradier, C.-M. *Langmuir* **2006**, *22*,
673 3089–3096.
- (24) Scofield, J. H. H. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1976**, *8*,
674 129–137.
- (25) Djordjevic, D.; Wiedmann, M.; McLandsborough, L. A. *Appl.*
675 *Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 2950–2958.
- (26) Caro, A.; Humblot, V.; Méthivier, C.; Minier, M.; Salmain, M.;
676 Pradier, C.-M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 2101–2109.
- (27) Binggeli, M.; Mate, C. M. *Appl. Phys. Lett.* **1994**, *65*, 415–417.
- (28) Bolshakova, A. V.; Kiselyova, O. I.; Filonova, A. S.; Frolovab,
677 O. Y.; Lyubchenko, Y. L.; Yaminsky, I. V. *Ultramicroscopy* **2001**, *86*,
678 121–128.
- (29) Guo, Q.; Oh, W. S.; Goodman, D. W. *Surf. Sci.* **1999**, *437*, 49–
679 60.
- (30) Kumar, P. M.; Badrinarayanan, S.; Sastry, M. *Thin Solid Films*
680 **2000**, *358*, 122–130.
- (31) Li, S.-C.; Losovyj, Y.; Diebold, U. *Langmuir* **2011**, *27*, 8600–
681 8604.
- (32) Gulley-Stahl, H.; Hogan, I. P. A.; Schmidt, W. L.; Wall, S. J.;
682 Buhrlage, A.; Bullen, H. A. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 4116–4121.
- (33) Clark, D. T.; Thomas, H. R. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*
683 **1978**, *16*, 791–820.
- (34) Fleutot, S.; Dupin, J.-C.; Renaudin, G.; Martinez, H. *Phys. Chem.*
684 *Chem. Phys.* **2011**, *13*, 17564–16578.
- (35) Rodenstein, M.; Zürcher, S.; Tosatti, S. G. P.; Spencer, N. D.
685 *Langmuir* **2010**, *26*, 16211–16220.
- (36) Huang, N.-P.; Michel, R.; Voros, J.; Textor, M.; Hofer, R.; Rossi,
686 A.; Elbert, D. L.; Hubbell, J. A.; Spencer, N. D. *Langmuir* **2001**, *17*,
687 489–498.
- (37) Ludtke, S. J.; He, K. E.; Heller, W. T.; Harroun, T. A.; Yang, L.;
688 Huang, H. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13723–13728.
- (38) Kelly, S. T.; Zydnev, A. L. *J. Membr. Sci.* **1995**, *107*, 115–127.
- (39) Silin, V.; Weetall, H.; Vanderah, D. J. *Colloid Interface Sci.* **1997**,
689 *185*, 94–103.
- (40) Ojeda, J. J.; Romero-Gonzalez, M. E.; Pouran, H. M.; Banwart,
690 S. A. *Mineral. Mag.* **2008**, *72*, 101–106.
- (41) Jiang, W.; Saxena, A.; Song, B.; Ward, B. B.; Beveridge, T. J.;
691 Myneni, S. C. B. *Langmuir* **2004**, *20*, 11433–11442.
- (42) Heinrich, H. T. M.; Bremer, P. J.; Daughney, C. J.; McQuillan,
692 A. J. *Langmuir* **2007**, *23*, 2731–2740.
- (43) Calderon-Miranda, M. L.; Barbosa-Canovas, G. V.; Swanson, B.
693 *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *51*, 31–38.
- (44) Farkas, J.; Andrassy, E.; Mészáros, L.; Bánáti, D. *Acta Microbiol.*
694 *Immunol. Hung.* **1995**, *42*, 19–28.
- (45) Yuan, S.; Wan, D.; Liang, B.; Pehkonen, S. O.; Ting, Y. P.;
695 Neoh, K. G.; Kang, E. T. *Langmuir* **2011**, *27*, 2761–2774.
- (46) Malisova, B.; Tosatti, S.; Textor, M.; Gademann, K.; Zürcher, S.
696 *Langmuir* **2010**, *26*, 4018–4026.
- (47) Gao, G.; Yu, K.; Kindrachuk, J.; Brooks, D. E.; Hancock, R. E.
697 W.; Kizhakkedathu, J. N. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3715–3727.
- (48) Glinel, K.; Jonas, A. M.; Jouenne, T.; Leprince, J.; Galas, L.;
698 Huck, W. T. S. *Bioconj. Chem.* **2009**, *20*, 71–77.
- (49) Park, K. D.; Kim, Y. S.; Han, D. K.; Kim, Y. H.; Lee, E.; Suh, H.;
699 Choi, K. S. *Biomaterials* **1998**, *19*, 851–859.
- (50) Timofeeva, L. M.; Kleshcheva, N. A.; Moroz, A. F.; Didenko, L.
700 *V. Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2976–2986.