



HAL
open science

Contributions des propriétés physico-chimiques de surfaces de titane sur l'adhérence de microorganismes : application aux chambres implantables

Héloïse Fabre

► **To cite this version:**

Héloïse Fabre. Contributions des propriétés physico-chimiques de surfaces de titane sur l'adhérence de microorganismes : application aux chambres implantables. Physique [physics]. Le Mans Université, 2017. Français. NNT : 2017LEMA1023 . tel-01794576

HAL Id: tel-01794576

<https://theses.hal.science/tel-01794576v1>

Submitted on 17 May 2018

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.

Thèse de Doctorat

Héloïse FABRE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de Le Mans Université
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Matière, Molécules et Matériaux (3M)

Discipline : Physique

Spécialité : Physique et science des matériaux

Unité de recherche : IMMM – CNRS UMR 6283

Soutenue le 27 septembre 2017

Thèse N° : 2017LEMA1023

Contributions des propriétés physico-chimiques de surfaces de titane sur l'adhérence de microorganismes : Application aux chambres implantables

JURY

Rapporteurs : **Marie-Pierre FONTAINE-AUPART**, Directeur de Recherche, Université Paris Sud, Orsay
Irène KRIEDEL, Docteur, Anesthésiste, Institut Curie, Paris

Examineurs : **Karine ANSELME**, Directeur de Recherche, Université Haute Alsace, Mulhouse
Hugues BOURGEOIS, Docteur, Oncologue, Clinique Victor Hugo, Le Mans
Jérôme BRUNELLIÈRE, Docteur, CTTM, Le Mans

Directeur de thèse : **Jean-François BARDEAU**, Directeur de Recherche, Le Mans Université, Le Mans

Co-directeurs de thèse : **Jean-Philippe BOUCHARA**, Professeur des Universités, Université d'Angers, Angers
Nicolas DELORME, Professeur des Universités, Le Mans Université, Le Mans

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Le Mans Université et en particulier l'Institut des Molécules et des Matériaux du Mans de m'avoir accueillie pour réaliser mon doctorat au sein de l'institut.

J'exprime toute ma reconnaissance à Marie-Pierre Fontaine-Aupart, Irène Kriegel, Karine Anselme, Hugues Bourgeois, Jérôme Brunellière, Nicolas Delorme, Jean-Philippe Bouchara et Jean-François Bardeau d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie particulièrement Marie-Pierre Fontaine-Aupart et Irène Kriegel pour leur lecture attentive de mon manuscrit de thèse.

Un grand merci va à mes directeurs de thèse : Jean-François Bardeau, Nicolas Delorme et Jean-Philippe Bouchara qui m'ont encadré durant ces trois années. Je souhaiterais remercier Jean-François Bardeau pour m'avoir fait confiance pour travailler sur ce projet ainsi que pour m'avoir laissé une certaine indépendance tout en m'accompagnant avec nombreux conseils. Merci à Nicolas Delorme pour ses différents conseils tout au long de la thèse et à Jean-Philippe Bouchara pour son accompagnement, notamment sur le volet microbiologique du projet. Je les remercie aussi pour leurs relectures qui ont amélioré la qualité du manuscrit.

Je suis aussi reconnaissante envers les différents partenaires du projet MATINNO qui ont toujours répondu gentiment et positivement à mes demandes. Au CTTM, je pense à Jérôme Brunellière qui m'a expliqué certains principes de microbiologie et aidé à interpréter les résultats, à Kelly Lambert qui a effectué les analyses microbiologiques avec les bactéries. Au GEIHP, je remercie Nathalie Clément qui a réalisé toutes analyses microbiologiques avec les levures et m'a montré comment réaliser les analyses. A la clinique Victor Hugo, je souhaiterais remercier Hugues Bourgeois, Cédrik Lafond ainsi que l'équipe du pôle pharmacie de la clinique Victor Hugo pour m'avoir laissé utiliser la hotte de leur salle blanche ainsi que d'avoir préparé ma venue à chaque fois. Je remercie aussi David Portet de Surfactis Technologie pour avoir mis à disposition les molécules nécessaires pour la réalisation des surfaces.

Je souhaite aussi remercier l'équipe Physico-chimie des surfaces à Chimie ParisTech en particulier Anouk Galtayries et Dimitri Mercier pour avoir réalisé les analyses XPS ainsi que pour m'avoir formé à l'utilisation la microbalance à quartz et pour m'avoir plusieurs fois accueillie au sein de leur laboratoire.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé du point de vue technique à l'IMMM, je pense en particulier à Mathieu pour la partie dépôt de couches minces, Fred pour toutes les petites manip comme les découpes de chambres implantables et à Agnès pour m'avoir aidé à réaliser certaines surfaces.

Je souhaite aussi remercier le personnel administratif, en particulier Alexandra à l'IMMM ainsi Julie, Virginie et Catherine au pôle doctoral pour leur disponibilité, leur sourire et leur aide.

Il est temps aussi de remercier toutes les personnes qui étaient présentes au quotidien et avec qui j'ai eu plaisir à échanger autour d'un café et/ou d'un repas. Merci à toutes l'équipe PIMS (et les quelques-uns du 4ème !) pour leur accueil durant ces trois années.

Merci aux doctorants (et jeunes docteurs) qui ont contribué à la bonne ambiance, en particulier Mathieu, Kenza, Vanessa, Fanon, Maureen, Kevin, Julien et Maël.

Je remercie aussi les chimistes en particulier Amandine (merci pour ton soutien ces derniers mois !), Jérôme, Ana, Marjorie, Anthony, Sandy, Vanessa... C'était toujours sympa de se retrouver pour courir ou autour d'une petite bière en sortant du labo.

Je souhaiterais maintenant remercier ceux qui m'ont soutenu (un peu plus) à distance mes amies de CP : Sophie, Diane, Hafssa et Madeleine et les autres copains ;) avec qui on a pu discuter pendant de nombreuses soirées de nos histoires de thèse respectives (et de plein d'autres sujets !). Merci à mes amis scouts avec qui j'ai pu m'échapper le temps d'un week-end ainsi que mes amis d'Amérique latine : Julio, André, Jesús qui m'ont fait découvrir leurs beaux pays.

Enfin je voudrais remercier mes parents et ma sœur Camille pour leur soutien tout au long de ma thèse ainsi que le reste de ma famille, toujours curieux vis-à-vis de mon sujet de thèse.

Abréviations

ADN	Acide DéoxyriboNucléique
AFM	Atomic Force Microscopy (Microscopie à force atomique)
Ba	Pression de travail (=pression baratron)
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumine de Sérum Bovin)
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CCD (caméra)	Récepteurs à transferts de charge (caméra)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
DLVO	Théorie de Derjaguin, Landau, Verwey, and Overbeek
ECAP	Equal Channel Angular Pressing
EDM	Electrical discharge machining (électroérosion)
EDX	Energy Dispersive X-ray (Analyse dispersive en énergie)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fg	Fibrinogène
Fn	Fibronectine
IUT	Institut universitaire de technologie
KOH	Hydroxyde de potassium
MATS	Microbial Adhesion To Solvents
MEB	Microscopie électronique à balayage
NaCl	Chlorure de sodium
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate-buffered saline (Tampon phosphate salin)
PEG	Polyéthylène glycol
PET	Polyethylene terephthalate
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
QCM-D	Microbalance à quartz avec dissipation
Ra (rugosité)	Rugosité arithmétique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAMs	Self-assembled monolayers (monocouches auto-assemblées)

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
sccm	Standard cubic centimeters per minute
SCIAM	Service commun d'imagerie et d'analyse microscopique (Université d'Angers)
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
SWCNHs	Single-walled carbon nanohorn
Ti	Titane
TiO₂	Dioxyde de titane
TG	Tube germinatif
TMS	Tétraméthylsilane
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra-violet
XPS	X-ray photoelectron spectrometry (Spectrométrie photoélectronique X)
2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
ΔD	Variation de la dissipation
ΔF	Variation de la fréquence

Table des matières

Remerciements	5
Abréviations.....	7
Introduction générale.....	13

Chapitre 1 : Etat de l'art

I. Chambres implantables et infections liées aux soins	19
1. Présentation et utilisation du dispositif	19
2. Infections liées aux soins dans les chambres implantables	22
II. Bactéries, Levures : développement des microorganismes sur une surface	24
1. Bactéries.....	24
2. Levures	26
3. Développement de microorganismes et formation du biofilm	27
III. Mécanismes d'adhésion de microorganismes sur une surface et influence des paramètres extérieurs	29
1. Mécanismes d'adhésion de bactéries sur une surface	29
a- Première étape réversible	29
b- Deuxième étape irréversible	30
2. Facteurs influençant l'adhésion bactérienne.....	30
a- Propriétés de surface.....	31
b- L'environnement	31
IV. Stratégies antibactériennes.....	32
1. Utilisation de revêtements bactéricides	33
2. Méthodes « physiques »	34
a- Rugosité	35
b- Topographie.....	37
3. Méthodes « chimiques ».....	40
a- Surfaces à base de carbone	40
b- Surfaces polymériques.....	40
c- Greffage moléculaire	42

4. Méthodes « biologiques ».....	45
V. Méthodes d'étude des interactions bactéries-matériaux.....	46
1. Méthodes <i>in vitro</i>	46
a- Méthode statique.....	46
b- Méthodes sous flux.....	47
c- Méthodes de dénombrement des bactéries.....	48
d- Mesure de la force de détachement avec une bactérie unique.....	51
2. Méthodes <i>in vivo</i>	52
Conclusion	53
Références.....	55

Chapitre 2 : Elaboration des échantillons

I. Surfaces ultra-lisses de TiO₂.....	63
1. Pulvérisation cathodique.....	63
2. Caractérisation des films déposés.....	65
II. Elaboration de surfaces modèles structurées de TiO₂.....	72
1. Attaque basique de silicium (100).....	72
a- Théorie.....	72
b- Choix du protocole.....	74
2. Etude des surfaces.....	75
a- Techniques d'analyses.....	75
b- Contrôle de la topographie : influence des paramètres expérimentaux.....	80
c- Conditions de réalisation des échantillons.....	81
3. Dépôt d'oxyde de titane sur les échantillons structurés.....	83
III. Modification de la topographie/rugosité de surfaces d'alliage de titane.....	83
1. Polissage mécanique.....	83
a- Description de la technique et préparation des échantillons.....	83
b- Analyse des surfaces.....	85
2. Sablage.....	87
a- Description de la technique et préparation des échantillons.....	87
b- Analyse des échantillons.....	88
3. Electroérosion.....	90
a- Principe de la méthode.....	90
b- Analyse des échantillons.....	91

IV. Fonctionnalisation de surfaces de titane.....	93
1. Mécanisme de greffage.....	93
2. Choix des molécules et protocole de greffage.....	94
3. Analyse topographique et chimique des surfaces	97
Conclusion	103
Références.....	104

Chapitre 3 : Etude de la réponse biologique des échantillons

I. Protocole pour l'analyse de l'adhérence de bactéries et de levures	109
II. Etude de l'adhérence de bactéries et de levures sur des surfaces structurées	112
1. Chambres implantables.....	113
2. Surfaces structurées avec des pyramides	115
3. Surfaces d'alliage de titane structurées par sablage	118
4. Surfaces d'alliage de titane structurées par électroérosion (EDM)	120
5. Comparaison des résultats entre les différentes surfaces et les chambres implantables....	123
III. Etude de l'adhérence de microorganismes et de l'adsorption de protéines sur les surfaces lisses fonctionnalisées	125
1. Adhérence de microorganismes sur les surfaces de TiO ₂ lisses et fonctionnalisées	125
2. Analyse de l'adsorption sur l'adhérence de protéines	128
a- Rôle des protéines plasmatiques dans l'adhérence des microorganismes.....	128
b- Mesure de la quantité de protéines adsorbées par QCM.....	129
c- Résultats obtenus	130
d- Comparaison des capacités d'adsorption des différentes protéines.....	134
3. Adhérence des microorganismes en présence de protéines sur les surfaces lisses.....	138
Conclusion	143
Références.....	145

Chapitre 4 : Application aux chambres implantables

I. Mise en contact de produits de chimiothérapie sur les surfaces lisses fonctionnalisées.....	151
1. Description du protocole	151
2. Analyse des surfaces	152
II. Mise en contact avec la nutrition parentérale.....	159
1. Mise en place du protocole.....	160
2. Analyse des surfaces	160
III. Influence de traces de produits de chimiothérapie ou de nutrition parentérale sur l'adhérence de bactéries.....	162
1. Influence de la présence de produits de chimiothérapie	162
2. Influence de la présence de nutrition parentérale	164
Conclusion	165
Références.....	167
Conclusion générale	169
Annexe 1 : Méthode MATS pour évaluer le caractère acide/base de Lewis et l'hydrophobicité de surface des microorganismes.....	173
Annexe 2 : Essais de cytotoxicité in vitro des molécules BpOH et BpF selon la norme ISO 10993-5 (2010)	174
Annexe 3 : Préparation des échantillons avec les bactéries ou les levures avant l'observation MEB	176

Introduction générale

Les infections nosocomiales aussi appelées infections liées aux soins sont contractées par les patients au sein d'un établissement de santé, 48 h ou plus après leur admission et sont liées au développement de bactéries et/ou de levures. Ces infections peuvent apparaître au cours ou après une hospitalisation et peuvent avoir de graves conséquences pour les patients. L'augmentation du nombre de ces infections en milieu hospitalier est un problème de santé majeur. De ce fait, des réflexions sont menées au sein des comités de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) afin de prendre des mesures pour améliorer les conditions d'hygiène dans les centres de santé afin de prévenir ces infections. Néanmoins le risque reste malheureusement présent lorsqu'il s'agit d'une intervention chirurgicale ou lors de la pose d'un implant. En effet, dès lors qu'un implant médical est introduit dans le corps humain et qu'il est en contact avec des fluides biologiques, des microorganismes pathogènes, provenant de l'environnement extérieur, peuvent coloniser ces implants. La formation d'un biofilm entraîne la survenue d'une infection qu'il est alors plus difficile à combattre en raison de la faible sensibilité des microorganismes vis-à-vis des antibiotiques/antifongiques au sein des biofilms.

Les chambres implantables sont des dispositifs médicaux utilisés lors des traitements de chimiothérapie de longue durée. Ils permettent l'administration de produits de chimiothérapie et parfois de nutrition parentérale. Comme la plupart des dispositifs médicaux implantables, l'intérieur de ces boîtiers est sujet aux infections, et pour des patients atteints d'un cancer, l'apparition d'une infection représente un danger supplémentaire du fait de l'immunodéficience lié à la maladie initiale, éventuellement renforcée par les chimiothérapies.

Pour tenter de limiter ces infections nosocomiales, de nombreux travaux de recherche se focalisent actuellement sur les modifications de surface des implants médicaux, en développant des revêtements bactéricides ou en élaborant des surfaces anti-adhésives. De nombreuses surfaces anti-adhésives ont été étudiées ; elles sont généralement élaborées à partir de polymères, de métaux ou de couches auto-assemblées. Certaines topographies et rugosités de surface ont parfois montré des résultats différents quant à l'efficacité de ces surfaces vis-à-vis des microorganismes. D'autres travaux ont montré que l'hydrophobicité contrôlée des surfaces a souvent montré de bons résultats pour limiter l'adhérence de microorganismes ciblés.

L'intérieur des chambres implantables est très souvent composé d'un matériau à base de titane (titane ou ses alliages). Nous nous sommes donc intéressés dans la thèse à modifier les propriétés physiques et chimiques de surfaces à base de titane afin d'étudier l'effet sur l'adhérence de *Staphylococcus aureus* et de *Candida albicans*, deux microorganismes très souvent retrouvés lors d'infections nosocomiales.

Pour cela différents types d'échantillons ont été étudiés :

- des films minces de TiO₂ de faible rugosité déposés sur des wafers de silicium ;
- des surfaces de TiO₂ fonctionnalisées par un greffage moléculaire à l'aide de fonctions biphosphonate pour modifier le caractère hydrophile / hydrophobe de la surface ;
- des surfaces rugueuses réalisées à partir de surfaces d'alliages de titane (grade 2 et grade 5).

Des analyses microbiologiques *in vitro* ont été réalisées en conditions statiques de manière à étudier l'adhérence primaire des bactéries et des levures, avant la formation du biofilm.

La thèse a été réalisée dans le cadre du projet régional MAT-INNO financé par la région Pays de la Loire. Les objectifs avaient pour but de développer de nouveaux matériaux à base de TiO₂ permettant une réduction du risque d'adhérence des microorganismes et de comprendre l'influence des traitements de chimiothérapie sur la dégradation fonctionnelle des biomatériaux. Pour cela, des partenaires ont été associés au projet : Surfactis Technologies (Angers) pour la synthèse de molécules, le CTTM (Centre de Transfert et de Technologie du Mans) pour les analyses microbiologiques avec les bactéries, le GEIHP (Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène - Angers) pour les analyses microbiologiques avec les levures et la clinique Victor Hugo (Le Mans) pour leur connaissance en oncologie.

Le premier chapitre présentera les risques d'infections nosocomiales sur chambres implantables ainsi que l'adhésion et le développement de bactéries et de levures sur une surface. Il fournira ensuite un état de l'art sur différentes méthodes développées pour rendre les surfaces anti-adhésives vis-à-vis des microorganismes et présentera certaines études concernant les modifications physiques et chimiques de surfaces.

Dans le deuxième chapitre, nous décrirons les procédures mises au point pour réaliser et modifier la surface des échantillons : les surfaces modèles, les structurations de surface et les fonctionnalisations de surface par greffage moléculaire. Nous présenterons ensuite les résultats obtenus par microscopie électronique à balayage, microscopie à force atomique, profilométrie optique, spectroscopie de

photoélectrons X et mesures d'angle de contact afin de caractériser les propriétés physico-chimiques de ces surfaces.

Le troisième chapitre présentera les analyses microbiologiques réalisées sur les échantillons décrits précédemment. Les analyses ont tout d'abord été réalisées sur les surfaces structurées (surfaces modèles de TiO₂ et alliages de titane). L'adhérence de bactéries et de levures a ensuite été testée sur les surfaces lisses fonctionnalisées, pour certaines pré-recouvertes de protéines plasmatiques. Les résultats ont permis de dégager des paramètres influençant l'adhérence de *S. aureus* et *C. albicans* sur des surfaces à base de titane.

Le quatrième chapitre permettra de faire le lien entre les échantillons élaborés et les conditions auxquelles l'intérieur des chambres implantables est soumis, avec les produits de chimiothérapie et la nutrition parentérale. Pour cela, les surfaces lisses et fonctionnalisées seront mises en contact avec quatre produits de chimiothérapie couramment utilisés et avec une solution de nutrition parentérale (solution nutritive) afin d'étudier l'influence de la présence de traces de ces produits sur l'adhérence de bactéries.

Ce travail repose donc sur une approche multidisciplinaire combinant à la fois la mise au point de procédures permettant d'élaborer et modifier les propriétés physiques et chimiques de surfaces, l'utilisation de techniques de caractérisation à différentes échelles permettant de contrôler la qualité des surfaces élaborées et l'analyse de tests microbiologiques pour suivre l'adhérence de bactéries et levures sur ces surfaces.

Chapitre 1

Etat de l'art

I. Chambres implantables et infections liées aux soins

1- Présentation et utilisation du dispositif

Une chambre implantable est un dispositif médical utilisé principalement pour les traitements de chimiothérapie de longue durée. Ce dispositif sous-cutané est généralement implanté au niveau du thorax (Figure 1) [1]. Il est composé d'un réservoir de quelques dixièmes de millilitres fermé par un septum en silicone, qui permet de nombreuses ponctions, et relié à un cathéter central dont l'extrémité est le plus souvent placée dans la veine cave (Figure 1) [2]. Il peut être utilisé pour des perfusions, des transfusions, des prélèvements sanguins ainsi que pour l'administration de nutrition parentérale [3].

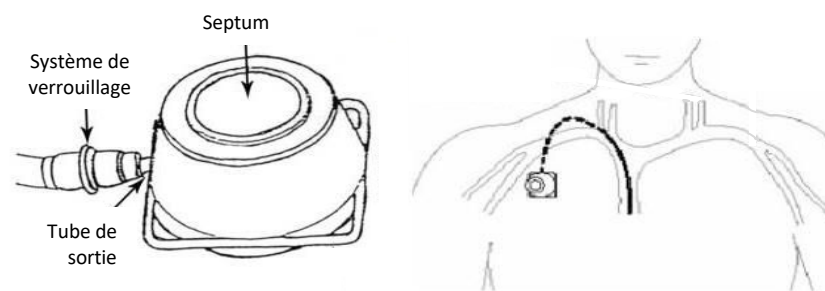


Figure 1: Schémas d'une chambre implantable et de sa position dans le corps (www.imm.fr)

Ce type de dispositif constitue un accès veineux central qui permet de limiter le risque de thrombose (obstruction d'une veine ou d'une artère par un caillot). Pour cela, l'extrémité du cathéter est placée dans une zone de grande turbulence de flux sanguin. Ce dispositif est particulièrement recommandé lors d'une utilisation pour les traitements de chimiothérapie de plus de trois mois pour préserver la paroi interne des veines [4]. Son utilisation permet une diminution du risque d'infections ainsi qu'un confort augmenté pour le patient [5]. En l'absence de complication, les chambres implantables peuvent être laissées en place et utilisées pendant une dizaine d'années. Leur utilisation est croissante dans les hôpitaux car elles participent aussi à une meilleure gestion économique des soins, en ayant un coût modéré, en comparaison du prix global du traitement [6].

Les injections sont réalisées à l'aide d'une aiguille de Huber. Cette aiguille présente une pointe biseautée ce qui permet, lors de son utilisation, de ne pas carotter le septum lors de son retrait (Figure 2). A titre indicatif, le septum est conçu pour résister à plus de 2000 injections. L'aiguille doit

être adaptée à la taille de la chambre implantable et au liquide injecté [4]. Le cathéter est le plus souvent composé de silicone (80% du marché français) ou de polyuréthane.

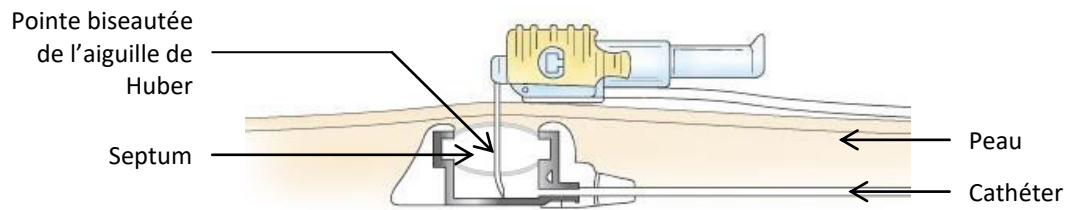


Figure 2: Injection dans une chambre implantable avec une aiguille de Huber (www.perousemedical.com)

L'intérieur de la chambre implantable est très souvent composé de titane, sous forme d'alliage, elle peut cependant parfois être en plastique ou en acier. Il existe différents types d'alliage de titane identifiés par des grades. Les alliages de grade 1 à 4 ne comportent que du titane et leurs propriétés mécaniques différentes s'expliquent par la différence de composition de certains éléments résiduels présents comme l'oxygène, l'azote ou le fer. L'alliage de titane de grade 5 ou Ti6Al4V est composé de titane, d'aluminium et de vanadium. Dans le domaine biomédical, cet alliage est couramment utilisé pour la fabrication de prothèses du fait de son faible module élastique, proche de celui de l'os, et de ses bonnes propriétés mécaniques notamment pour les sollicitations cycliques.


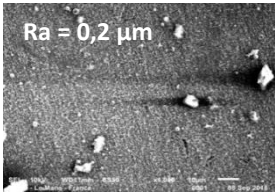

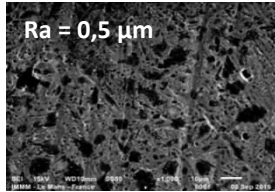

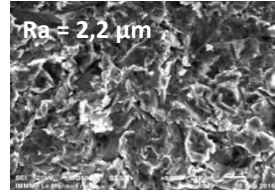

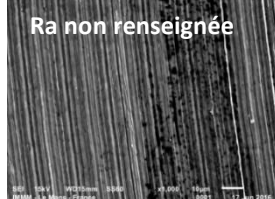
La très bonne biocompatibilité du titane est l'un des facteurs favorisant son utilisation dans les chambres implantables. La biocompatibilité se définit comme étant la capacité d'un matériau à ne pas engager de réaction physiologique négative tout en maintenant sa fonctionnalité initiale dans le corps [7]. Le titane est très résistant à la corrosion et présente une faible toxicité [8]. De plus, l'utilisation d'un métal au lieu d'un plastique pour le fond de la chambre permet de le rendre plus résistant aux éventuels « coups » provoqués par l'aiguille de Huber lors des injections.

L'utilisation de chambres implantables a débuté à la fin des années 1980, mais elle a connu un véritable essor dans les années 2000 [9]. Leur utilisation a permis de limiter grandement celle des cathéters tunnélisés (dispositif similaire, sans le boîtier de la chambre implantable, l'extrémité du cathéter est à l'extérieur du corps, protégé par un pansement), avec lesquels il a été estimé un risque d'infections 12 fois plus important [10]. Aujourd'hui, le nombre de chambres implantées est estimé à 1 million par an dans le monde et à 150 000 en France [4].

Outre la composition chimique qui peut différer d'une chambre à une autre, la topographie à l'intérieur des chambres implantables est aussi différente (Tableau 1). Il existe plusieurs marques de chambres implantables sur le marché français. Les plus connues sont BBraun, Bard, Perouse et

Vygon. La plupart des chambres proposées par ces fabricants sont en titane (alliage ou pur). La topographie d'une surface peut se caractériser par différents paramètres. Le plus souvent, la rugosité arithmétique (notée Ra) est utilisée, elle se définit comme la moyenne arithmétique des écarts entre le profil $h(i, j)$ et une ligne moyenne de ce profil h_{moyen} .

Tableau 1: Présentation de quelques chambres implantables commerciales

Marque	Modèle	Composition	Image de l'intérieur de la chambre (MEB)
BBraun	Celcite 	Ti	 Ra = 0,2 µm
Bard	PowerPort 	Ti grade 5 (Ti6Al4V)	 Ra = 0,5 µm
Perouse	Polysite 	Ti grade 5 (Ti6Al4V)	 Ra = 2,2 µm
Vygon	Minisitimplant 	Ti	 Ra non renseignée

Le Tableau 1 présente la composition chimique de quatre chambres implantables commerciales ainsi qu'une image MEB de la topographie interne des chambres implantables, toutes n'ont pas la même topographie intérieure. Certaines présentent des rayures, d'autres semblent plus lisses. Les valeurs de rugosités Ra varient de 0,2 µm pour la chambre implantable vendue par BBraun à 2,2 µm pour celle vendue par Perouse. Le choix d'une chambre implantable se fait généralement en fonction de sa taille, de son débit autorisé, ... Cependant, comme la topographie de l'intérieur des chambres implantables varie aussi, il est alors important de choisir celle qui pourrait limiter au maximum les infections.

2- Infections liées aux soins dans les chambres implantables

Les infections représentent 0,8 à 7,5% des causes de complication chez les patients porteurs d'une chambre implantable [6]. Ces infections peuvent survenir à différents moments : lors de l'acte chirurgical pour la pose du dispositif ou plus tard pendant l'utilisation de la chambre lors des injections ou des changements de raccord. Des études cliniques ont été effectuées afin d'évaluer les risques associés à l'utilisation de chambres implantables. Ces études ont permis d'identifier les principales souches de bactéries et de levures à l'origine de ces infections et de proposer des protocoles pour limiter et tenter de soigner des infections éventuelles [11-13]. En France, les résultats de ces études sont rassemblés dans un document de la Société Française d'Hygiène Hospitalière afin d'harmoniser les pratiques hospitalières pour la prévention et le traitement de ces infections [14].

Ces infections, à caractère nosocomial et iatrogène, aussi appelées infections liées aux soins sont devenues de plus en plus fréquentes en milieu hospitalier, notamment avec l'augmentation considérable du nombre de prothèses et autres dispositifs médicaux implantables. Une maladie nosocomiale se définit comme une maladie contractée par un patient 48 h ou plus après son admission dans un hôpital ou un centre de santé. La plupart du temps cette infection est liée au développement de bactéries et/ou de levures [15]. L'importance de l'infection dépend d'un grand nombre de facteurs comme l'état de santé du patient, son âge, la fréquence d'utilisation et le temps effectif d'utilisation du dispositif médical, ou encore l'administration ou non de nutrition parentérale [4]. L'infection est le plus souvent provoquée par un manque d'hygiène des mains du personnel soignant ou de stérilité du matériel médical.

Le taux d'infections pour les chambres implantables utilisées uniquement comme moyen de traitement pour la chimiothérapie est compris entre 0,11 et 0,37 pour 1000 jours-cathéter [12]. Le jour-cathéter est une unité de mesure des infections en densité d'incidence dont le dénominateur commun est le nombre de jours de maintien en place du cathéter. Cette unité est souvent utilisée pour caractériser le risque d'infection d'un cathéter ou d'une chambre implantable. En cas d'utilisation du dispositif pour une nutrition parentérale, ce taux augmente pour atteindre 0,33 à 3,20 jours-cathéter [12]. En effet, l'introduction de nutriments dans le réservoir favorise le développement de microorganismes. Après chaque injection, un nettoyage avec une solution de NaCl à 0,9% est réalisé afin d'éliminer le maximum de résidus provenant du produit préalablement injecté. Cependant, l'importante viscosité des produits utilisés permet rarement un nettoyage total même en cas de nettoyage pulsé à l'aide d'une seringue [4].

Les microorganismes les plus couramment retrouvés lors d'infections nosocomiales liées aux dispositifs implantables sont les staphylocoques coagulase négative et le *Staphylococcus aureus* qui est coagulase positive, les bacilles à Gram négatif et la levure *Candida albicans* [12]. Une vaste étude a été menée à l'échelle européenne (151 hôpitaux répartis dans 26 pays) pendant l'année 2000 afin de déterminer le pourcentage d'apparition de microorganismes pathogènes lors de l'utilisation de cathéters (périphériques, centraux, de longue ou de courte durée) [16]. Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2: Principaux microorganismes responsables d' infection liées aux cathéters [16]

Microorganismes		% apparition
Staphylocoques coagulase négative	Bactéries	49,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie	11,9
Entérobactéries (<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterobacter...</i>)	Bactéries	11,9
<i>Candida</i> spp.	Levure	7,2
<i>Pseudomonas</i> spp.	Bactérie	4,9
<i>Acinetobacter</i> spp.	Bactérie	4,2
<i>Enterobacter</i> spp.	Bactérie	4,2
Autres		6,6

Les risques de contamination par ces microorganismes ont lieu principalement durant l'insertion des aiguilles de Huber au travers de la peau. En effet, de nombreuses colonies de bactéries et de levures sont présentes à la surface de la peau et au passage de l'aiguille, ces microorganismes peuvent pénétrer dans le corps et dans le dispositif. Pour cette raison, certains protocoles ont été établis pour désinfecter la peau du patient avec des antiseptiques comme l'alcool à 70%, l'alcool iodé ou le gluconate de chlorhexidine [17].

Si une infection intervient, différents protocoles sont proposés pour limiter une surinfection pouvant dans le pire des cas entraîner le décès du patient. Une première mesure consiste à retirer le dispositif médical (durant une chirurgie) et injecter un traitement antibiotique à l'endroit du dispositif retiré, afin d'éliminer toutes bactéries restantes. L'ablation du dispositif infecté est en général efficace pour éradiquer l'infection [18]. Cependant, dans le cadre d'un traitement de chimiothérapie, il est préférable d'utiliser des antibiotiques spécifiques à un type de microorganisme directement sur le cathéter en place afin de stériliser le dispositif et d'éviter son ablation. En cas de contamination de la chambre implantable seule, un « verrou antibiotique » peut être mis en place, il s'agit pour cela d'injecter à l'intérieur de la chambre implantable une solution d'antibiotique à une concentration

100 à 1000 fois supérieure à la CMI¹ de l'antibiotique vis-à-vis du germe responsable [19]. Si nécessaire un traitement antibiotique par voie systémique (utilisant la circulation sanguine pour atteindre le lieu d'action) peut aussi être utilisé seul ou en complément d'un premier traitement local. Cette deuxième technique a montré des résultats limités dans le cas d'une infection à *Staphylococcus aureus* pour laquelle un taux d'échec compris entre 45 et 60% a été relevé [20, 21].

II. Bactéries, Levures : développement des microorganismes sur une surface

1- Bactéries

Les bactéries sont des microorganismes présents dans tous les milieux. Il s'agit de procaryotes, c'est-à-dire qu'elles ne comportent pas de noyau. Elles mesurent au maximum 2 µm de long et peuvent prendre différentes formes.

Les bactéries peuvent être sphériques (exemple : *Staphylococcus aureus*), en forme de bacille, (exemple : famille des *Pseudomonas*) ou en forme spiralée (exemple : *Borrelia*) (Figure 3). Suivant leur forme et leur taille, les bactéries n'interagissent pas de la même façon avec le milieu ou sur une surface.

Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes selon les propriétés de leur membrane. Les bactéries à Gram négatif, pour lesquelles la membrane externe est composée de lipides et de lipopolysaccharides, et les bactéries à Gram positif, dont la paroi est majoritairement composée de peptidoglycanes et d'acide téichoïque [22]. En contact avec une surface, les bactéries s'organisent en biofilm pour se développer et résister aux antibiotiques.

¹ CMI : Concentration minimale inhibitrice. Cette valeur correspond à la concentration minimale d'une solution antibiotique pour inhiber *in vitro* la croissance d'une souche de bactérie ou de levure.

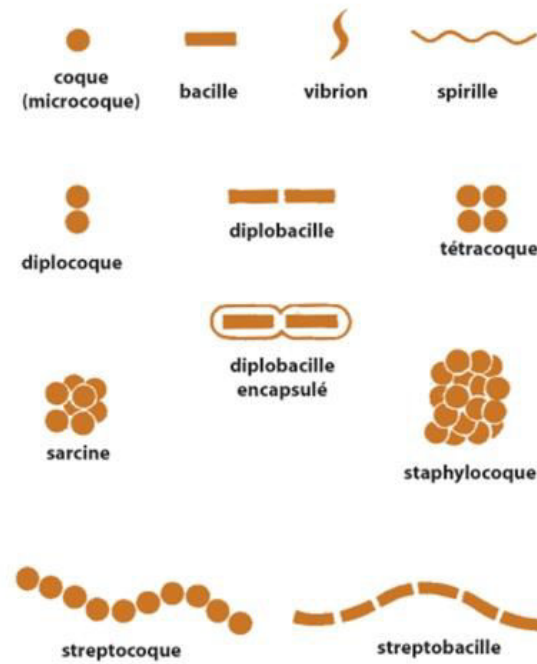


Figure 3 : Différentes formes des bactéries (Larousse)

Staphylococcus aureus est l'espèce la plus pathogène parmi les staphylocoques. Cette bactérie présente une forme globalement sphérique et est souvent disposée en amas (Figure 4). Cette bactérie présente en surface des propriétés basiques et hydrophobes déterminées par la méthode MATS [23] (Annexe 1). Il s'agit d'une bactérie à Gram positif. Une fois dans le corps humain, elle sécrète différentes toxines (entérotoxines, leucocidines, épidermolysines, beta-hénolysines) ainsi que des composés inhibant les systèmes de défense de l'hôte. Elles vont ainsi pouvoir se multiplier et entraîner des infections.

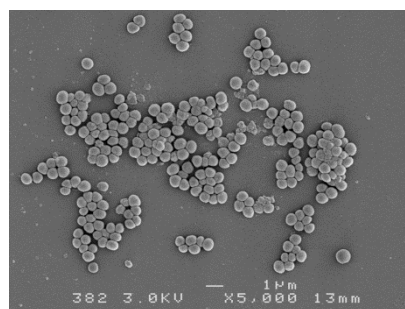


Figure 4 : *Staphylococcus aureus*, observation en microscopie électronique à balayage (MEB X 5000, SCIAM, Université d'Angers)

Les staphylocoques coagulase négative ont aussi une forme de coque et se regroupent également en amas. Ces bactéries sont principalement situées sur le revêtement cutané ou sur les zones les plus humides. Il s'agit de bactéries à Gram positif, mais contrairement à *S. aureus*, elles ne produisent pas de coagulase, une enzyme capable de faire coaguler le plasma. *Staphylococcus epidermidis* et

S. haemolyticus sont les staphylocoques coagulase négative les plus fréquents lors d'infections nosocomiales. Les staphylocoques coagulase négative sont parfois considérés comme moins virulents que *Staphylococcus aureus*. En effet, ces microorganismes sont dits opportunistes c'est-à-dire qu'ils ne deviennent pathogènes que s'il rencontre chez l'hôte un terrain favorable, par exemple si le patient souffre d'un déficit immunitaire, ce qui est souvent le cas pour les patients atteint de cancer [24].

2- Levures

Une levure est un champignon de forme sphérique, de dimensions supérieures à celles des bactéries avec une taille de l'ordre de quelques micromètres habituellement, mais pouvant atteindre 50 μm pour certaines espèces. Il s'agit d'organismes eucaryotes, c'est-à-dire que les levures (comme les champignons filamenteux) possèdent un véritable noyau refermant entre autre les chromosomes. Sur une surface, les levures forment aussi un biofilm pour se protéger des agressions externes.

Candida albicans est la levure la plus fréquemment rencontrée lors d'infections nosocomiales. Cette levure peut se trouver sous deux formes : la forme blastospore, forme levure bourgeonnante, et la forme hyphale ou forme filamenteuse. *In vitro*, cette levure peut passer d'une forme à l'autre en fonction des conditions environnementales (par exemple à 37°C, sous une pression partielle en CO_2 de 5% et en présence de certains acides aminés, la levure passe de la forme blastospore à la forme filamenteuse) [25]. Sous sa forme blastospore, elle mesure environ 4 - 5 μm . (Figure 5-A) Les hyphes sont obtenus par émission d'un tube germinatif, pouvant atteindre 15 - 20 μm , à partir de la forme blastospore (Figure 5-B). Ces deux formes peuvent entraîner la formation de biofilm, même si la forme blastospore est a priori plus retrouvée lors des phases d'attachement primaire et de dissémination et la forme hyphale lors du développement du biofilm [26].

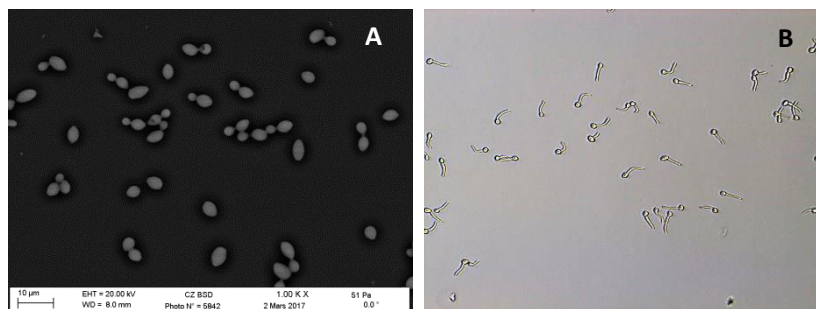


Figure 5 : A : *Candida albicans*, forme blastospore (image MEB, X 1000, SCIAM, Université d'Angers) et B : *Candida albicans*, forme filamenteuse (microscope optique X 20)

Dans la plupart des cas, la levure *Candida albicans* n'entraîne pas d'infection particulière. Cependant, pour les patients immunodéprimés ou souffrant d'un cancer, cette levure représente une cause de mortalité importante (le taux est estimé à 30 à 50% lors d'une septicémie, c'est-à-dire en cas de dissémination de la levure par voie sanguine) [27].

3- Développement de microorganismes et formation de biofilm

En milieu liquide, les bactéries et les levures sont le plus souvent présentes sous forme planctonique (microorganismes libres). Lorsqu'elles sont en présence d'une surface, ces microorganismes adhèrent au support et s'organisent en biofilm. Un biofilm est une communauté structurée de microorganismes entourés d'une matrice extracellulaire qu'ils produisent eux-mêmes [28]. Cette matrice est composée de polymères qui protègent les microorganismes des agressions extérieures et leur permet ainsi de se développer. Grâce à cette matrice extracellulaire composée de protéines, d'ADN et de polysaccharides, l'organisation en biofilm permet aux bactéries et aux levures de se protéger des antibiotiques qui seraient pourtant à des doses suffisamment puissantes pour éliminer le même nombre de bactéries sous forme planctonique [26, 28, 29].

La formation du biofilm se fait en plusieurs étapes (Figure 6).

- La première étape consiste en l'adhérence du microorganisme sur la surface. Celle-ci se décompose en une première phase d'adhésion physique réversible. Des interactions à longue portée (forces de van der Waals, interactions électrostatiques, mouvement brownien) permettent tout d'abord aux bactéries de se rapprocher de la surface. Interviennent ensuite des interactions à faible portée (liaisons covalentes, liaisons ioniques, interactions hydrophobes) qui viennent renforcer l'adhérence. Une deuxième phase correspond à un attachement irréversible de la bactérie sur la surface [15, 30]. Ces étapes seront détaillées dans la partie suivante.
- Le biofilm se développe autour des microorganismes qui se sont regroupés. Le contact avec une surface déclenche l'activation de certains gènes chez les microorganismes (bactéries ou levures) avec pour conséquence la sécrétion de polysaccharides qui enrobent les microorganismes et la formation de cette matrice extracellulaire va permettre l'implantation du biofilm et la protection des microorganismes.

- Enfin, à partir du biofilm, des microcolonies de bactéries (ou de levures) seront libérées afin de coloniser d'autres espaces de la surface et agrandir l'étendue du biofilm.

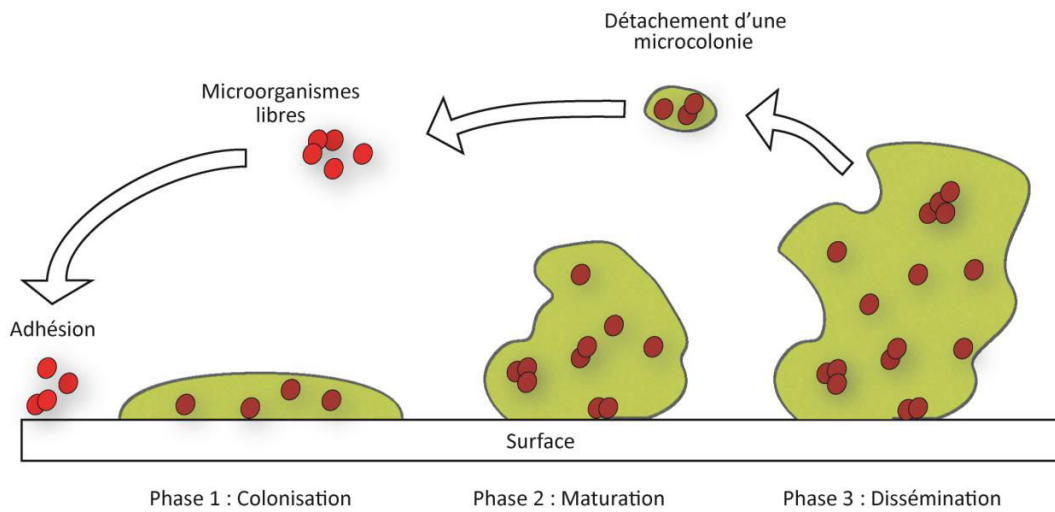


Figure 6 : Schéma expliquant la formation du biofilm

Le développement de microorganismes se fait plus facilement sur une surface qu'en solution. En effet, les nutriments se déposant facilement sur les parois leur permettent de survivre. De plus, la matrice extracellulaire, riche en protéines et en glucides fournit aux microorganismes un environnement favorable à leur développement. La formation du biofilm va notamment leur permettre de se protéger des agressions externes en les rendant environ 1000 fois plus résistants aux antibiotiques [31]. L'intérieur du biofilm est très organisé, des canaux aqueux permettent la transmission des nutriments et de l'oxygène sous l'effet de gradients de concentration. De plus, certaines molécules de signalisation (appelées molécules du "*quorum-sensing*") circulent au sein du biofilm afin d'assurer les communications entre microorganismes ; par ailleurs, la proximité entre les individus au sein du biofilm facilite les échanges de patrimoine génétique, notamment les échanges de plasmides de résistance [32]. Les molécules du *quorum-sensing* existent aussi bien chez les bactéries que chez les levures, bien qu'elles aient été principalement étudiées chez les bactéries. Dans le cas de biofilms mixtes, c'est-à-dire constitués de plusieurs espèces de microorganismes, des communications inter-microorganismes peuvent exister [25].

III. Mécanismes d'adhésion de microorganismes sur une surface et influence des paramètres extérieurs

1- Mécanismes d'adhésion de bactéries sur une surface

Quelques modèles décrivent les phénomènes occurrents durant l'adhérence d'une bactérie sur une surface (l'adhérence de levure se fait selon un processus similaire [26]). L'adhérence bactérienne se fait en deux étapes : une première étape dite réversible et une seconde irréversible.

a- Première étape réversible

Les bactéries se déplacent en milieu liquide grâce au mouvement brownien et peuvent ainsi se rapprocher d'une surface de manière aléatoire. Certaines bactéries possèdent des flagelles sur leur membrane qui peuvent les aider à se déplacer en solution et atteindre plus facilement une surface. L'adhésion bactérienne peut alors être décrite par la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek). Cette théorie, utilisée pour les bactéries du fait de leur taille comparable à celle des colloïdes (0,5 - 2 μm), considère que l'interaction totale agissant sur les bactéries est la somme des interactions de van der Waals (forces attractives s'exerçant sur de longues distances ~ 50 nm) et des interactions électrostatiques (relativement plus importantes à plus faible portée) [33, 34].

A plus faible portée, l'approche thermodynamique est favorisée. Ces interactions vont être considérées quand la bactérie et la surface sont à proximité l'une de l'autre, à moins de 3 nm (Figure 7) [35]. Les interactions hydrophobes, entre des composés non polaires, sont thermodynamiquement favorisées par une enthalpie libre du système négative. Ceci permet de justifier le fait que les bactéries présentant une paroi hydrophobe préfèrent les surfaces hydrophobes [33].

Un modèle étendu de la théorie DLVO doit cependant être considéré afin de pouvoir caractériser à la fois les interactions s'exerçant sur de longues distances et celles s'exerçant dans un champ plus proche relevant des interactions hydrophobes [33].

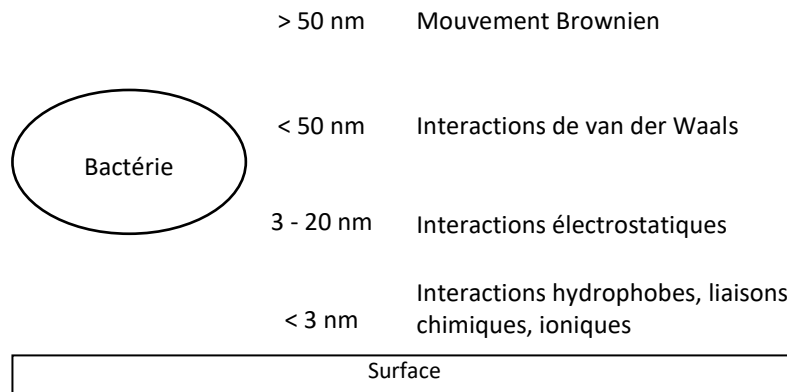


Figure 7 : Schéma représentant les principales interactions en fonction de la distance bactérie - surface.

b- Deuxième étape irréversible

Une fois sur la surface, des liaisons s'établissent entre la bactérie et la surface. Les bactéries produisent différentes substances (comme la matrice extracellulaire) et synthétisent des protéines de surface au rôle d'adhésine qui lui permettent de s'accrocher durablement sur la surface.

Certaines bactéries ont des pili (ou fimbriae) et flagelles sur leur paroi. Ce sont des structures filamenteuses de 0,2 à 20 μm de longueur qui facilitent les adhésions spécifiques sur une surface. Une bactérie en contient généralement entre 100 et 1000 sur sa membrane externe, ces pili sont plus nombreux chez les bactéries à Gram négatif [34, 35].

La matrice extracellulaire est sécrétée aussi bien par les bactéries à Gram positif et que par les bactéries à Gram négatif. Elle est composée principalement de polysaccharides, de protéines et de lipides. Cette matrice extracellulaire favorise l'adhésion par sa capacité à lier physiquement les microorganismes à la surface. Les interactions entre la surface et la matrice étant des liaisons non covalentes (forces électrostatiques, liaisons hydrogène) d'intensité relativement faible, c'est leur nombre important qui permet la force de cohésion [33].

2- Facteurs influençant l'adhésion bactérienne

L'adhésion des bactéries sur une surface dépend d'un grand nombre de facteurs physiques, chimiques et environnementaux [15, 22, 30]. De plus, les caractéristiques intrinsèques des bactéries sont à prendre en compte lors de l'étude de l'adhérence bactérienne. En effet toutes les bactéries ne réagissent pas de la même façon sur une même surface. La composition biochimique de la paroi, et

les propriétés physiques de surface qui en découlent, l'hydrophobicité de la surface cellulaire et la charge électrostatique de surface des bactéries, font partie des critères qui peuvent modifier l'adhérence bactérienne [35].

a- Propriétés de surface

Les propriétés de surface varient en fonction de la topographie, de la rugosité ou encore de la composition chimique de la surface. Certaines de ces propriétés peuvent réduire fortement l'adhérence bactérienne d'un type de bactérie mais l'environnement de la bactérie doit aussi être pris en compte, en raison de son impact possible, direct (modification de la charge ou de l'hydrophobicité) ou indirect (induction ou répression de certaines voies métaboliques et potentiellement la composition de la paroi).

La topographie de surface impacte l'adhérence bactérienne. Il a été montré que certains motifs en surface favorisaient l'adhérence bactérienne. Les bactéries adhèrent préférentiellement dans les irrégularités de surface (comme par exemple des trous ou des stries) qui augmentent les points de contact avec la surface [36]. La formation du biofilm est déclenchée par l'induction de l'expression de certains gènes lorsque la bactérie est au contact d'une surface. Ainsi plus le nombre de points de contact entre une bactérie et la surface est important et plus la formation du biofilm sera favorisée [37].

La composition chimique de surface peut être modifiée par greffage d'une monocouche moléculaire (aussi appelé self-assembled monolayers : SAMs) sur une surface métallique [38, 39], par le dépôt d'un polymère [40, 41] ou la présence de certains éléments comme l'argent [42], par exemple sous forme d'ions emprisonnés dans une matrice polymère. Ces modifications chimiques de surface peuvent se traduire par un changement de l'hydrophobicité, de la charge de surface, ou de la polarité. La présence de groupes fonctionnels particuliers doit également être prise en compte. Il a été plusieurs fois montré qu'une bactérie présentant un caractère hydrophobe préfère adhérer sur une surface hydrophobe [30, 33].

b- L'environnement

Les caractéristiques de la paroi bactérienne ont un impact sur le développement des microorganismes sur une surface. Un changement de pH affecte la paroi de la bactérie qui doit

s'adapter pour survivre, modifiant ainsi ses propriétés d'attachement sur une surface spécifique. De plus, certains processus physiologiques des microorganismes sont dépendants du pH, c'est le cas de la synthèse de la matrice extracellulaire qui ne peut s'effectuer qu'à pH voisin de la neutralité, pour la plupart des bactéries [43]. La force ionique d'une solution modifie la barrière d'énergie que les bactéries, le plus souvent chargées négativement, devront franchir pour adhérer à une surface ayant un potentiel zêta négatif, à pH 7. Ainsi, plus la force ionique est élevée, et plus faible est cette barrière d'énergie [44]. L'adhérence augmente avec le temps de contact des bactéries avec une surface jusqu'à atteindre une valeur de saturation, environ quelques heures pour *S. sanguis* sur une surface de verre par exemple [35]. Cette durée dépend de l'espèce bactérienne considérée, mais aussi des propriétés de la surface. Sous flux, les forces de cisaillement sont un paramètre important à prendre en compte. En effet, plus le flux sera important, plus les forces de cisaillement seront importantes et plus les forces favorisant l'attachement initial de la bactérie ou l'adhérence du biofilm à la surface seront faibles [30].

Les protéines, présentes dans le sang peuvent s'adsorber sur la surface formant une couche intermédiaire nommée film de conditionnement [45] et favoriser ou limiter l'adhérence bactérienne, participant ainsi indirectement à la colonisation de surface [46]. Il a par exemple été montré que la présence d'albumine sur une surface diminue l'adhérence bactérienne [47-49] alors que la présence de fibrinogène, fibronectine ou laminine augmente l'adhérence de bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus* [50-52]. La présence de récepteurs pour ces protéines à la surface des bactéries est à l'origine de ces adhésions spécifiques [50]. Il en est de même de la levure *Candida albicans* qui présente des récepteurs de surface pour la laminine et le fibrinogène et dont l'adhérence à un substrat est facilitée par le conditionnement de la surface par ces protéines [53].

IV. Stratégies antibactériennes

C'est à partir des années 1980 qu'ont été réalisées les premières études en odontologie reliant les propriétés de surface et l'adhérence bactérienne [42]. Skjorland *et al.* [54] ont cherché un éventuel lien entre la porosité (ou la rugosité) et le développement de biofilm pour quinze matériaux composites similaires à l'émail des dents, sans trouver de lien direct.

Les principales stratégies [55, 56] pour limiter la survenue d'infections sur les biomatériaux sont :

- élaborer des surfaces bactéricides qui perturbent et causent la mort des bactéries ;

- développer des revêtements ayant une activité « anti-biofouling », c'est-à-dire des surfaces pouvant résister ou prévenir l'attachement des microorganismes par des propriétés physiques ou chimiques de surfaces non favorables ;
- établir une compétition entre bactéries pour la colonisation de la surface, en utilisant par exemple des bactéries non pathogènes pour protéger la surface et empêcher les bactéries pathogènes d'adhérer ;
- ou utiliser certaines substances comme des enzymes permettant de détruire un biofilm.

1- Utilisation de revêtements bactéricides

Les revêtements bactéricides, souvent composés d'un polymère (ou copolymère) déposé sur une surface, peuvent réduire de façon considérable l'adhérence de microorganismes en libérant par exemple des antibiotiques ou des agents antimicrobiens. L'argent présente des propriétés bactéricides intéressantes. Cet élément, déjà utilisé par les romains pour limiter les contaminations bactériennes, peut être inséré dans des matrices hydrogels ou au sein de chaînes polymères. L'effet bactéricide s'exprime lorsque les ions Ag^+ sont libérés : ils endommagent alors la membrane cellulaire [42]. Cependant, l'accumulation possible d'argent, métal lourd, dans le corps représente un danger pour la santé du patient compte tenu de la toxicité des ions argents pour les cellules de mammifères [57].

Caillier *et al.* [58] ont développé un revêtement actif en mélangeant des tensioactifs composés d'ammoniums quaternaires et de monomères d'acrylates. Ce film a permis de limiter significativement le nombre de bactéries vivantes en surface montrant ainsi des propriétés bactéricides. Les bactéries étant souvent chargées négativement en surface, elles sont fortement attirées par une surface chargée positivement, et se retrouvent piégées en surface avant de mourir [31].

Des silicones modifiés par des biocides cationiques (polyhexaméthylène guanidine dodecylbenzenesulfonate ou 1-dodecyl-3-méthylimidazoliumtétrafluoroborate) ont montré une réduction de plus de 99% de la croissance de microorganismes [59]. La présence de charges positives en surface du polymère permet d'attirer les microorganismes, qui ont généralement une charge de surface négative. Ensuite, les groupements chimiques en surface permettent d'attaquer la membrane cytoplasmique des microorganismes, en interagissant avec les phospholipides, et ainsi de déstabiliser leur équilibre osmotique.

Malgré leur efficacité, ces surfaces bactéricides présentent un important désavantage. En effet, de nombreuses souches majoritairement des bactéries à Gram positif, peuvent devenir résistantes rendant par la suite beaucoup plus difficile la décontamination en cas de prolifération. Certains cas sont connus comme la pénicilline, un antibiotique, utilisée pour la première fois en 1943 et pour laquelle les souches de *S. aureus* ont montré une résistance dès 1946. La même évolution a aussi été remarquée pour la méthiciline (1960 → 1961), la vancomycine (1956 → 1988) ou le zyvox (1990 → 1999). En moyenne une dizaine d'années peuvent suffire à une bactérie pour se montrer résistante à un antibiotique particulier [60]. De nouveaux cas de résistance apparaissent aussi pour les bactéries de Gram négatif. De nouveaux gènes, présents chez les bactéries à Gram négatif, notamment les *Enterobacteriaceae* comme *Echerichia coli*, ont été identifiés comme codant des enzymes rendant les bactéries résistantes à certains antibiotiques, notamment des bêta-lactamases inactivant les antibiotiques de la famille carbapénèmes, souvent utilisés en dernier recours contre les entérobactéries multi-résistantes. L'apparition de ces nouveaux gènes peut être favorisée par la surconsommation d'antibiotiques ou par les voyages internationaux [61]. Par exemple, Kumarasamy *et al.* [61] ont repéré, chez un patient anglais, la présence d'un gène résistant à un antibiotique chez une *Enterobacteriaceae* qui était connu jusqu'alors uniquement en Inde et au Pakistan. Ce gène code une enzyme capable d'inactiver certains antibiotiques de la famille des carbapénèmes.

Compte tenu du risque de sélection que peut représenter la résistance de souches bactériennes ou de levures, l'objectif de ce travail de thèse s'est focalisé sur l'étude de surfaces « anti-biofouling » en utilisant différentes méthodes : physiques, chimiques ou biologiques.

2- Méthodes « physiques »

Les méthodes dites physiques consistent à modifier la topographie ou la porosité d'un matériau. De nombreuses études portent sur le titane comme matériau de choix pour des applications biomédicales en raison de sa bonne biocompatibilité, de sa forte résistance à la corrosion et de sa faible toxicité [62]. Cependant, le titane ne présente pas d'activité antimicrobienne en soi, c'est la modification de ses propriétés de surface qui permet de réduire l'adhérence des microorganismes. D'autres alliages ont aussi montré des capacités d'adhérence bactérienne faible par comparaison avec le titane, c'est notamment le cas de l'oxinium (un alliage de zirconium-niobium oxydé) ou de l'alliage Co-Cr-Mo [63]. Cependant, pour les prothèses, ces deux alliages ne sont pas toujours

recommandés du fait de leur grande rigidité par comparaison avec l'os et de l'existence de réactions allergiques à des métaux comme le cobalt, le chrome ou le nickel [64, 65].

a- Rugosité

La rugosité est un paramètre souvent utilisé pour caractériser et étudier les propriétés de surface limitant l'adhérence de microorganismes. Cependant un grand nombre d'études présentent des résultats contradictoires quant à un effet positif, négatif ou neutre de la rugosité [66] (Figure 8). L'influence de la rugosité sur l'adhérence bactérienne dépend aussi de l'environnement et des conditions de culture [62, 67].

Giordano *et al.* [68] ont modifié la rugosité d'alliages de titane grade 2 et grade 5 par anodisation, diminuant ainsi la rugosité de 0,5 μm à 0,3 μm et augmentant le taux d'anatase en surface. L'adhérence de *Staphylococcus aureus*, après 3 h d'incubation, était moins importante sur les surfaces ayant une rugosité plus faible. Inversement, plusieurs études s'entendent sur le fait que l'augmentation de la rugosité est en lien avec une diminution du nombre de microorganismes adhérents en surface [62, 69, 70]. A titre d'exemple, des topographies de surfaces de titane ont été modifiées par sablage et attaque acide [70]. Dans ce cas, les auteurs ont montré que l'adhérence de bactéries (*S. sanguis* et *S. mutans*) était plus faible après 2 h d'incubation sur les surfaces ayant une rugosité de l'ordre du micromètre que sur les surfaces ayant une rugosité plus faibles (R_a environ 300 nm) [70]. La même tendance a été observée avec des films minces de titane ayant des rugosités comprises entre 0,8 et 1,5 nm avec *Staphylococcus aureus*, [62] l'adhérence de bactéries après 18 h de culture augmentait avec la diminution de la rugosité.

Au contraire, d'autres résultats montrent une augmentation de l'adhérence bactérienne avec la rugosité [28, 71]. L'adhérence de *Staphylococcus epidermidis* était plus faible sur les surfaces de titane grade 5 polies avec une faible rugosité ($R_a = 7$ nm) en comparaison aux surfaces polies ayant une plus grande rugosité ($R_a = 16$ nm) [71]. Des résultats similaires ont été obtenus avec neuf autres espèces bactériennes dont *S. sanguis* sur des films de titane déposés sur des surfaces lisses ($R_a = 30$ nm) ou rugueuses ($R_a = 1,9$ μm) [28].

S. aureus et *S. epidermidis* sont deux bactéries à Gram positif, ayant une forme de coque et se regroupant en amas. Leur taille est relativement similaire, proche de 1 μm . *Streptococcus sanguis* est également une bactérie à Gram positif en forme de coques, mais ayant tendance à se regrouper pour

former des filaments. Ces trois espèces bactériennes sont connues pour être à l'origine de nombreuses infections.

L'augmentation de l'adhérence bactérienne sur les films minces de titane est justifiée par la présence d'une rugosité nanométrique qui permettrait une augmentation des nano points de contact entre la bactérie et la surface [69]. Pour les rugosités plus importantes, l'augmentation de l'adhérence est expliquée par l'augmentation de la surface spécifique et un contact plus important entre les bactéries et la surface [28, 71]. L'analyse des valeurs de rugosité ne permet pas de conclure sur une valeur de rugosité favorable à la diminution du nombre de bactéries adhérentes. Il est à noter que les différences peuvent aussi apparaître du fait des modifications des conditions de culture ou des modifications de la chimie de surface entre les différents échantillons, comme discuté précédemment.

La Figure 8 présente les conclusions des études citées en fonction des valeurs de rugosité. Les flèches représentent l'étendue des valeurs de rugosité pour chaque étude. Les microorganismes testés sont renseignés sur la figure.

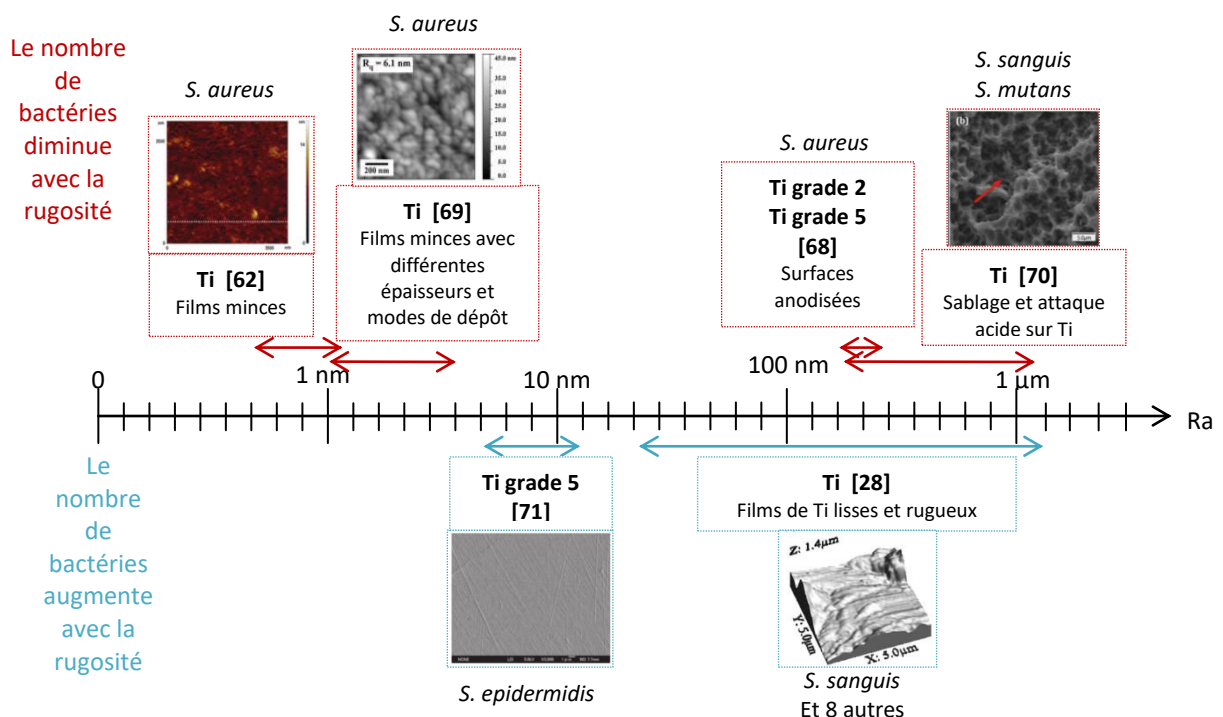


Figure 8 : Effet de la rugosité sur l'adhérence de bactéries

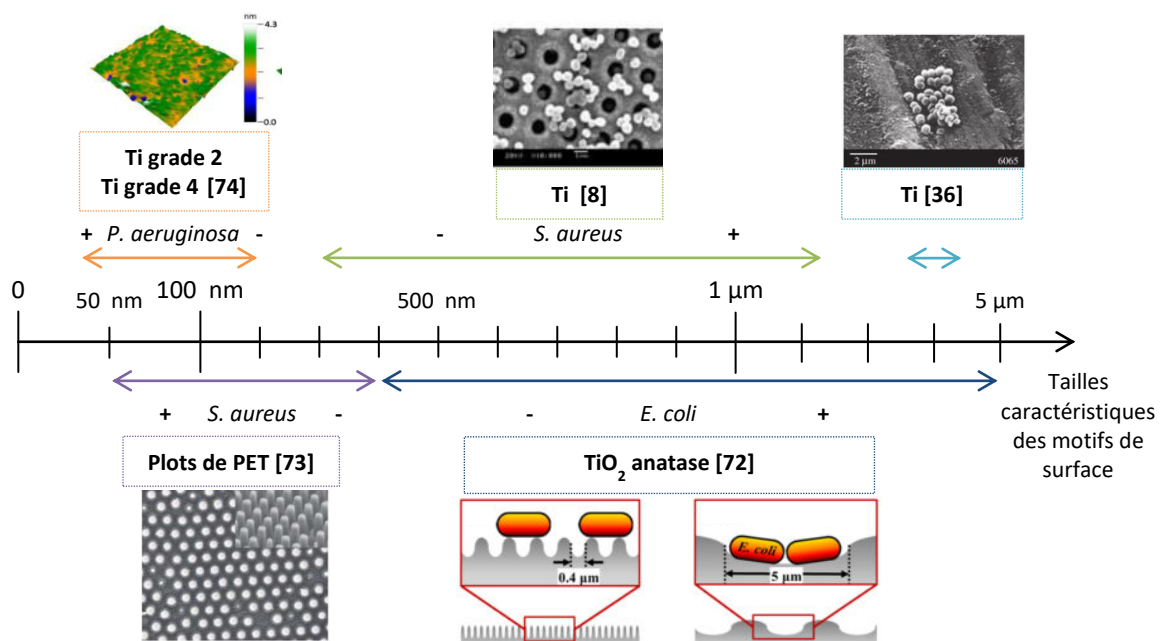
b- Topographie

Face au manque de conclusion claire quant à l'influence de la rugosité sur l'adhésion de bactéries, la topographie de surface est très probablement un paramètre important à prendre en compte. La taille moyenne et la forme des motifs en surface influencent l'adhérence bactérienne en modulant le nombre de points de contact entre une bactérie et la surface (Figure 9). L'augmentation de ces points de contact permet de diminuer la barrière énergétique lorsque les bactéries arrivent sur la surface et de favoriser l'expression de gènes impliqués dans la formation du biofilm [67].

Sur des surfaces dont la taille caractéristique des motifs en surface est de l'ordre de grandeur de la taille des bactéries (environ 1 μm pour les staphylocoques et quelques microns de longueur pour les bacilles), l'adhérence des bactéries est favorisée [37]. Dans ce cas, les bactéries ont tendance à se placer préférentiellement dans les espaces creux (vallées, trous, rayures, ...) pour augmenter le nombre de points de contact avec la surface, ce qui leur permet aussi de se protéger de facteurs extérieurs comme des forces de cisaillement d'un liquide. Ce résultat a été observé par Diaz *et al.* [36] qui ont préparé des surfaces de titane comportant des vallées et des bosses de tailles micrométriques. Les bactéries (*Pseudomonas fluorescens*) se sont placées dans les vallées plutôt que sur le côté ou le haut des bosses (Figure 9). D'autres surfaces d'oxyde de titane ont été structurées de manière à créer des ondulations en surface de différentes tailles : 400 nm et 5 μm de largeur. Il a été montré que les bactéries (*Escherichia coli*) se plaçaient dans les creux lorsque ceux-ci étaient assez grands (5 μm de largeur), et restaient au sommet des ondulations quand la distance entre les crêtes était trop faible (400 nm de largeur) [72]. Whitehead *et al.* [8] ont élaboré des surfaces de titane ayant des trous de différentes tailles en surface (200 nm, 500 nm, 1 μm et 2 μm de diamètre) (Figure 9). L'adhésion de *Staphylococcus aureus* augmentait lorsque la taille des trous était d'au moins 1 μm et était minimale pour les trous de 500 nm. Avec des trous d'un micromètre de diamètre, les bactéries peuvent entrer dans les trous entraînant une augmentation de la surface sur laquelle elles peuvent adhérer. La faible adhésion sur les surfaces présentant des trous de 500 nm de diamètre a été expliquée par l'incapacité des bactéries à entrer dans les trous et par des interactions défavorables des bactéries sur la superficie des trous, de taille inférieure à celle des bactéries. Quant au nombre de levures adhérentes (*Candida albicans*), il restait inchangé sur les quatre types de surface, la taille de la levure étant beaucoup plus grande (environ 4 - 5 μm) que celle des trous : elles pouvaient donc adhérer de la même façon sur les différentes surfaces.

Les motifs de surface ayant une taille caractéristique très inférieure à la dimension des microorganismes peuvent aussi influencer l'adhésion bactérienne. Dans ce cas, il est admis que c'est le nombre de points de contact avec la surface sur laquelle la bactérie repose qui favorise l'adhésion.

Des plots de taille régulière (environ 250 nm de diamètre et 1 μm de hauteur) et d'espacement constant (40 nm, 200 nm et 500 nm) en PET (polytéréphtalate d'éthylène) ont été créés par plasma à couplage inductif. Il a été observé que la quantité de bactéries adhérentes (*S. aureus*) était plus importante sur les surfaces ayant les espacements de plots les plus faibles. Les espacements entre les plots ont été choisis de manière à être inférieurs à la taille d'une bactérie ; plus l'espacement des plots est faible et plus une bactérie posée sur la surface aura de points de contact avec celle-ci [73]. Des surfaces de titane grade 2 et de titane grade 4 ont été modifiées par ECAP (Equal Channel Angular Pressing), qui permet de modifier la taille de grains et fait apparaître des nano-pics en surface. Les études microbiologiques montrent que plus la taille de grains augmente, c'est-à-dire moins la surface est lisse et comporte des petits pics, et plus l'adhérence bactérienne (*P. aeruginosa*) est facilitée [74]. A une échelle plus faible (10 - 40 nm), Lüdecke [69] a montré que la présence de « pics » en surface de films de titane d'épaisseur variable favorisait aussi l'adhérence de *S. aureus* par l'augmentation des points de contact entre la surface et la bactérie.



D'autres topographies particulières ont été élaborées sur des surfaces de titane. Fadeeva *et al.* [75] ont élaboré par ablation laser femto seconde des surfaces de titane ayant une double structuration : des motifs convexes de 10 à 20 μm et une structuration secondaire de l'ordre de 200 nm sur ces premiers motifs. Ces surfaces ont montré des propriétés très hydrophobes avec un angle de contact atteignant 166°.

L'adhérence de *S. aureus* était plus importante sur les surfaces structurées que sur des surfaces lisses de titane. Des nanotubes de titane de différentes tailles ont été réalisés par anodisation électrochimique. En comparant la présence de bactéries (*S. epidermidis*) vivantes sur une surface de titane lisse et une surface comprenant des nanotubes d'environ 100 nm, Kumeria *et al.* [76] n'ont pas mis en évidence de différence significative d'adhérence. Au contraire, Ercan *et al.* [77] ont montré que la présence de nanotubes de diamètre supérieur à 80 nm favorisait l'adhérence bactérienne (*S. epidermidis* et *S. aureus*) en comparaison à des nanotubes de diamètre inférieur (20 nm, 40 nm et 60 nm).

Les méthodes d'élaboration des échantillons peuvent aussi influencer le nombre de bactéries adhérentes. Par exemple, l'utilisation de produits à base de Fluor pour la fabrication de nanotubes de titane n'a pas permis de conclure quant à l'influence de la présence de nanotubes sur l'adhérence bactérienne [78] contrairement aux résultats obtenus dans d'autres études réalisées sur ce même type de topographie [76, 77].

Par conséquent, la taille caractéristique des motifs (largeur/hauteur) de surface est un paramètre pertinent pour comparer les différentes études. Ainsi, lorsque la taille des motifs de surface est comparable à celle des microorganismes, l'adhésion s'effectue plus facilement dans les creux pour un nombre de points de contact maximum. Lorsque cette taille caractéristique est beaucoup plus faible, l'adhésion des microorganismes est favorisée en augmentant les points de contact entre la surface et le microorganisme (Figure 10). Il existe probablement un minimum d'adhérence lorsque ces points de contact sont faibles.

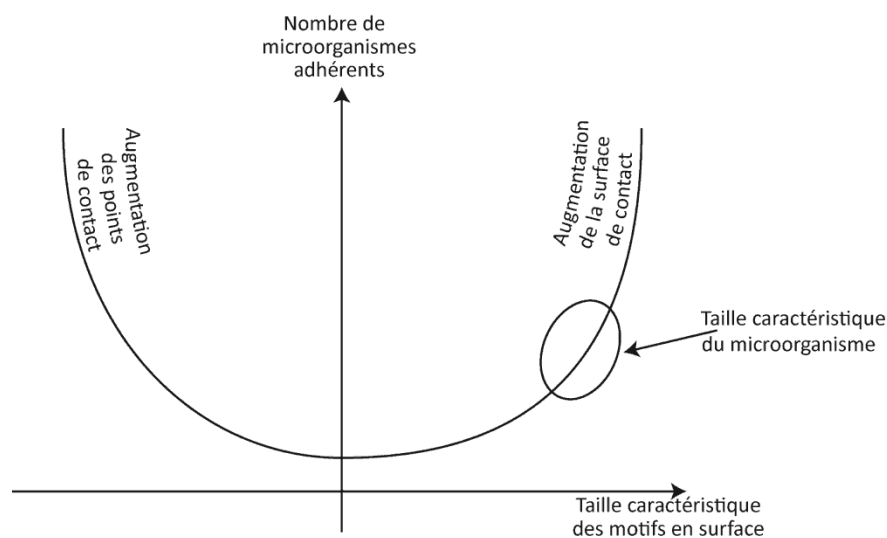


Figure 10 : Evolution de l'adhérence en fonction de la taille caractéristique des motifs en surface

3- Méthodes « chimiques »

La composition chimique de surface joue un rôle important pour l'adhérence de bactéries et de levures puisqu'elle conditionne l'hydrophobicité et la charge électrostatique de surface, de plus la présence de groupements chimiques spécifiques peut avoir un impact.

a- Surfaces à base de carbone

De l'oxyde de graphène et des SWCNHs (graphene single-walled carbon nanohorn), éléments de la famille des nanotubes de graphène, ont été greffés sur des surfaces de silicium afin de modifier l'activité antibactérienne, avec pour conséquence une diminution de l'hydrophobicité. En comparaison au silicium, les surfaces recouvertes d'oxyde de graphène et, de manière encore plus importante sur les surfaces recouvertes de SWCNHs se caractérisent par une réduction de l'adhérence de *S. aureus* [47]. Cela a été expliqué par la diminution de l'angle de contact ($73,2^\circ$ pour le silicium non modifié versus, $54,5^\circ$ pour les surfaces recouvertes d'oxyde de graphène et $47,5^\circ$ pour celles recouvertes de SWCNHs).

D'autres matériaux peuvent aussi être utilisés comme le « carbon-like diamond » déposé sous forme de film. Ce matériau montre de bonnes propriétés antibactériennes et cette propriété est améliorée lorsque des nanoparticules de TiO_2 sont insérées dans le film, le rendant plus hydrophile [79, 80].

b- Surfaces polymériques

Les polymères sont largement étudiés comme biomatériaux, sous forme brute ou déposés en film mince sur une surface (Tableau 3). Certains types de polymères réduisent de manière considérable l'adhérence de bactéries et freine ainsi le développement de biofilm. Les polymères hydrophiles sont souvent cités pour limiter l'adhérence de microorganismes car ils se recouvrent facilement d'un film d'eau qui rend plus difficile l'accès à la surface pour les microorganismes [81]. Il s'agit souvent de polymères à base de poly(éthylène-glycol) (PEG) ou de polymères zwitterioniques (des polymères possédant des charges électriques de signes opposés sur des atomes non adjacents). Un polymère dérivé du PEG, l'Optichem[®], a montré de bonnes propriétés anti-adhérentes vis-à-vis de *S. epidermidis* par rapport au silicone (les deux polymères étant déposés sur une lame de verre) [82]. Le dépôt de hyaluronate de sodium, polymère hydrophile, permet une diminution de l'adhérence de *S. aureus* en comparaison avec une surface de titane brute [66]. En utilisant le format microarray, des

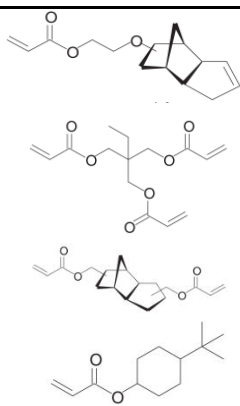

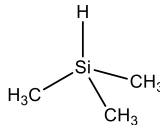
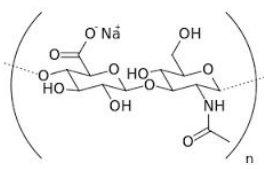
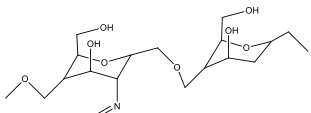
centaines de copolymères ont été déposés sur une lame de verre [40]. Il a été observé que les polymères ayant des groupements hydrocarbonés cycliques ou des groupements ester faiblement polaires (Tableau 3) présentaient une meilleure résistance aux bactéries (*P. aeruginosa* et *S. aureus*). Contrairement à d'autres publications, il a été observé que les polymères contenant des groupements éthylène glycol ou hydroxyle favorisaient l'adhérence bactérienne, probablement du fait de liaisons hydrogène entre les groupements en surface et certains lipides en surface de la bactérie (comme les liposaccharides de la paroi bactérienne ou des exosaccharides). Les résultats obtenus ne montrent cependant aucune relation entre l'hydrophobicité de surface et l'adhérence bactérienne contrairement à ceux reportés antérieurement. Le triméthylsilane, utilisé comme monomère et déposé par plasma, a montré une réduction notable de l'adhérence bactérienne (*S. epidermidis*) par comparaison à une surface d'alliage de titane grade 5 [83]. Ceci est attribué à la présence de groupements hydrophobes en surface.

L'utilisation de polymères bio-inspirés tel que le chitosan greffé sur du titane peut aussi entraîner une diminution de l'adhérence de *S. aureus* et *S. epidermidis* [76, 84]. Il a alors été proposé que les interactions entre la charge positive du chitosan et les charges négatives en surface des bactéries altèrent la perméabilité de la membrane empêchant le transport de solutés essentiels à la survie de la bactérie [84]. Concernant *Candida albicans*, la présence de chitosan entraîne une forte diminution du nombre de levures planctoniques et une altération du biofilm en formation [85].

En conclusion, les surfaces recouvertes de polymère diminuent généralement l'adhérence bactérienne lorsque celles-ci sont hydrophiles. Cependant, certains groupements hydrophobes comme les chaînes hydrocarbonées, peuvent aussi avoir une action spécifique pour réduire l'adhérence de bactéries. Les paramètres topographiques, après dépôt du polymère sur une surface, sont rarement précisés dans ces études, or il a été précédemment montré qu'ils avaient une importance particulière.

Tableau 3 : Description des surfaces polymères testées

Etudes réalisées avec	Groupements chimiques	Caractéristiques de surface	Résultats microbiologiques	Références
Optichem®	Polymère dérivé du PEG $\text{H} \left[\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \right]_n - \text{O} - \text{H}$	Polymère en « brosse »	Adhérence de <i>S. epidermidis</i> divisée par 4 avec Optichem®	Saldarriaga Fernandez 2010 [82]
496 copolymères testés à partir de 22 monomères acrylates	Quelques monomères intéressants pour réduire l'adhérence bactérienne	Copolymérisation par UV sur lame de verre	Diminution maximale de <i>S. aureus</i> de 67 fois avec les	Hook 2012 [40]

Etudes réalisées avec	Groupements chimiques	Caractéristiques de surface	Résultats microbiologiques	Références
		 <p>(chaque point représente un copolymère)</p>	copolymères prometteurs en comparaison avec du silicone	
Triméthyl-silane (TMS)		Dépôt par plasma	Adhérence de <i>S. epidermidis</i> réduite de 2 log en présence de TMS par comparaison à une surface de Ti	Ma 2012 [83]
Hyaluronate de sodium		Revêtement sur une surface de titane	Adhérence de <i>S. aureus</i> réduite de 1 log par comparaison à une surface de Ti	Harris 2004 [66]
Chitosan		Revêtement avec du chitosan sur des surfaces de titane	Environ 2 fois moins de <i>S. aureus</i> sur une surface de titane recouverte de chitosan	Shi 2008 [84]

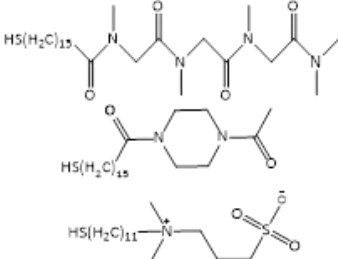
c- Greffage moléculaire

Des fonctionnalisations de surface obtenues par greffage moléculaire ont aussi été développées. Sous forme de chaînes ou de brosses, formées par des composants organiques, les monocouches auto-assemblées (SAMs) permettent d'obtenir une méthode reproductible et contrôlée de la composition, la densité et l'énergie de surface [86]. Les molécules greffées sur la surface créent des liaisons chimiques avec le support et, en fonction, du groupement chimique terminal, il est possible de modifier les propriétés physico-chimiques de la surface. Il est généralement accepté que les SAMs permettant de limiter l'adhérence bactérienne présentent en surface des groupements accepteurs

de liaisons hydrogène, mais non donneurs de liaisons hydrogènes et qu'elles ont une charge générale neutre tout en étant polaires [39].

De nombreuses fonctionnalisations de surface ont été proposées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes. Le groupement chimique permettant la fixation sur la surface est souvent un alkanethiol lorsque le greffage se fait sur de l'or ou un silane lorsque le greffage se fait sur un oxyde. Ostuni *et al.* [39] ont testé 6 SAMs et ont comparé l'adhérence de *S. aureus* et *S. epidermidis* sur ces surfaces fonctionnalisées. Trois de ces SAMs (Tableau 4) ont montré une faible adhésion bactérienne similaire à une SAM d'éthylène glycol, connue pour limiter l'adhérence bactérienne. Sous flux, Katsikogianni [38] a observé une augmentation de l'adhérence de *S. epidermidis* sur des SAMs se terminant par un groupement CH₃ en comparaison à des groupements NH₂ ou OH. Un résultat similaire a été obtenu par Cunliffe [87], les SAMs terminées par un groupement hydrophile éthylène glycol retenaient moins de bactéries (*S. aureus*) que celles se terminant par un groupement CH₃. Cependant l'adhérence de bactéries sur les SAMs hydrophobes se terminant par un groupement CH₃ ou par un groupement perfluorinate CF₃ (krytox) est restée similaire. De la même façon, Tegoulia [52] a montré une augmentation de l'adhérence bactérienne (*S. aureus*) sur des surfaces hydrophobes.

Tableau 4 : Description des SAMs

Etudes réalisées avec	Groupements chimiques	Caractéristiques de surface	Résultats microbiologiques	Références
6 SAMs	Molécules montrant une faible adhérence bactérienne 	Greffage sur des lames de verres	Pour ces trois molécules, adhérence de <i>S. aureus</i> similaire à une surface PEG	Ostuni 2001 [39]
Monocouches d'alkylsilane	Groupements terminaux : CH ₃ , NH ₂ et OH	Dépôt chimique en phase vapeur Angles de contact : CH ₃ : 93 ± 3,2° NH ₂ : 49,1 ± 3,3° OH : 10 ± 2,1°	Sous flux, diminution d'un facteur 2 ou 3 du nombre de <i>S. epidermidis</i> adhérents sur une SAM se terminant par NH ₂ ou OH par comparaison avec CH ₃	Katsikogianni 2010 [38]

Etudes réalisées avec	Groupements chimiques	Caractéristiques de surface	Résultats microbiologiques	Références
11 molécules testées	SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH ₂ SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH-CO-CH ₃ SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH-CO-(CH ₂) ₂ CH ₃ SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH-CO-(CH ₂) ₄ CH ₃ SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH-CO-(CH ₂) ₆ CH ₃ SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH-CO-(CH ₂) ₁₂ CH ₃ SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH-CO-(CF ₂) ₂ CF ₃ SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH-CO-Krytox SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH-CO-EO-3-OCH ₃ SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH-CO-PEO-5000-OCH ₃ SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH-CO-PNMeAM	Greffage sur des surfaces de silicium	Adhérence de <i>S. aureus</i> très faible sur PEO-5000-OCH ₃ en comparaison au krytox (divisé par 3)	Cunliffe 1999 [87]
4 SAMs	Groupes terminaux : Méthyle Hydroxyle Acide carboxilique Tri(éthylène oxide) = EG ₃	Angles de contact : CH ₃ : 100 ± 2° CH ₂ OH : 12 ± 3° COOH : 25 ± 9° EG ₃ : 34 ± 5°	Taux d'attachement de <i>S. aureus</i> sous flux 5 fois plus faible sur EG ₃ que sur CH ₃	Tegoulia 2002 [52]

La présence de peptides et/ou de protéines sur la surface peut aussi modifier l'adhérence bactérienne. L'adsorption d'albumine bovine (BSA) permet une réduction de l'adhérence de *S. aureus* contrairement au fibrinogène qui facilite l'adhérence, car la bactérie *S. aureus* présente des récepteurs de surface pour le fibrinogène [39, 47]. Lorsque le peptide RGD (Arg-Gly-Asp) recouvre du chitosan sur une surface de titane, l'adhésion bactérienne diminue en comparaison à une surface de titane [84].

Les contributions des modifications des propriétés physiques et chimiques de surfaces sur l'adhérence de microorganismes apparaissent très variables d'une étude à l'autre, donnant parfois l'impression de résultats contradictoires. L'adhérence bactérienne ne dépend pas des seules propriétés de surface (rugosité, topographie, hydrophobicité, chimie de surface,...), mais d'un ensemble de paramètres. En effet, les conditions utilisées pour les analyses microbiologiques sont souvent différentes d'une étude à l'autre (temps de mise en contact, méthode de comptage des microorganismes adhérents, ...) mais les microorganismes, ce qui peut modifier les conclusions.

Pour ce travail de thèse, les mêmes conditions expérimentales pour l'évaluation de l'adhérence des bactéries et des levures seront choisies afin de mieux pouvoir comparer les résultats obtenus.

4- Méthodes « biologiques »

D'autres mécanismes dits biologiques sont également envisageables pour lutter contre le développement d'un biofilm. Ces techniques visent la désorganisation du biofilm en cours de formation. Il s'agit d'infiltrer dans le biofilm des agents non bactéricides qui provoquent des dysfonctionnements à l'intérieur du biofilm. Différentes stratégies ont été testées dans ces domaines.

Lorsqu'un biofilm se forme dans un organisme, certaines cellules de l'hôte notamment les polymorphonucléaires neutrophiles qui jouent un rôle majeur dans l'immunité innée, tentent de détruire les bactéries contenues dans un biofilm. Ces cellules sont capables d'entrer dans un biofilm composé par *S. aureus* pour détruire les bactéries par phagocytose. Cependant, les radicaux oxygénés, libérés par ces cellules phagocytaires à la suite du contact avec le microorganisme, peuvent aussi engendrer des dommages pour les tissus environnants. Au contraire, dans un biofilm de *S. epidermidis*, ces cellules ne s'infiltrent pas au sein du biofilm et tuent seulement les bactéries libres et à proximité du biofilm [32].

Dans le domaine alimentaire, une autre stratégie a été proposée pour lutter contre le développement de biofilms de staphylocoques ou de *Candida albicans*. Elle consiste à ajouter une souche bactérienne non pathogène, en l'occurrence *Lactobacillus fermentum* pour lutter contre le développement de biofilms (déjà formés) par des microorganismes pathogènes. La présence de cette souche bactérienne permet la création d'une zone d'inhibition au sein du biofilm pathogène probablement due à la destruction partielle de la membrane cellulaire [88].

Les composants du *quorum-sensing* sont des molécules produites et sécrétées par les bactéries lorsqu'elles sont en communauté et qui induisent de nombreuses réponses cellulaires notamment pour le développement du biofilm. Il a été proposé d'utiliser des inhibiteurs synthétiques, des composants à *quorum-sensing* pour perturber la communication entre les bactéries. En présence d'indole ou d'un dérivé dihalogéné du noyau furanone (3,4-dibromo-2(5H)furanone), mais surtout de 4-nitropyridine-N-oxide, une réduction de la masse du biofilm composé de bactéries marines est observé en microscopie électronique à balayage (MEB). Ces inhibiteurs permettent de modifier le signal ou de dégrader les récepteurs cibles sur les bactéries correspondantes. Deux espèces bactériennes ont été étudiées et cette inhibition dépend fortement de la bactérie étudiée ainsi que de la dose d'inhibiteur utilisée [89].

De nombreux gènes et molécules interviennent dans la formation d'un biofilm. Ces gènes sont différents pour chaque type de microorganismes mais peuvent aussi différer au sein d'une même

espèce, du fait de mutation par exemple [32]. Ces différentes méthodes nécessitent une bonne compréhension des interactions entre bactéries et surfaces et des procédés biologiques régissant la formation du biofilm.

V. Méthodes d'étude des interactions bactéries-matériaux

Plusieurs techniques permettent de caractériser l'interaction entre une ou plusieurs bactérie(s) et un matériau. Les techniques *in vitro* permettent de caractériser les effets des propriétés des matériaux en présence de microorganismes et d'effectuer des mesures simplifiées de l'adhérence de microorganismes. Pour les analyses *in vivo*, les substrats à tester sont sous conditions dynamiques de fluides biologiques et nécessitent l'utilisation d'animaux.

Il existe deux types de tests : certains dits globaux qui permettent de quantifier un nombre de microorganismes adhérents en surface; les autres concernent la manipulation d'un seul microorganisme et vont permettre de caractériser de manière plus spécifique la force de détachement, après adhésion, d'un microorganisme sur une surface [90].

1- Méthodes *in vitro*

a- Méthode statique

La méthode statique d'évaluation du nombre de bactéries adhérentes sur une surface est une méthode relativement simple à mettre en place, peu onéreuse et directe. Pour tester les propriétés antibactériennes ou antifongiques d'une surface, les échantillons sont mis en contact avec une suspension de microorganismes pendant une certaine durée. Les microorganismes non-adhérents en surface sont ensuite éliminés par rinçage et les microorganismes adhérents sont dénombrés. Plusieurs méthodes existent pour dénombrer les microorganismes, elles seront décrites dans la suite du chapitre.

b- Méthodes sous flux

Les méthodes sous flux consistent à mettre la suspension de bactéries ou de levures en mouvement au contact de l'échantillon préparé. Dans le cas idéal, les forces de cisaillement produites par le flux ne doivent pas décrocher les bactéries mais seulement leur permettre de se déplacer jusqu'à ce qu'elles rencontrent des conditions moins favorables et éventuellement se détachent [91]. L'utilisation des méthodes sous flux permet d'éviter les questions liées au rinçage et à la quantité de microorganismes décrochés. Pour cela plusieurs montages expérimentaux ont été développés [30, 90]. Les bactéries ou levures adhérentes en surface sont ensuite dénombrées.

○ Chambre de flux à plaques parallèles

Le fluide contenant les microorganismes est entraîné au travers de la chambre par une pompe. Un des côtés est constitué de l'échantillon à tester et l'autre est souvent constitué d'une lamelle en verre (Figure 11). Le fluide permet de créer une force de cisaillement sur les parois de la chambre. Le flux augmente dans le plan médian entre les deux surfaces.

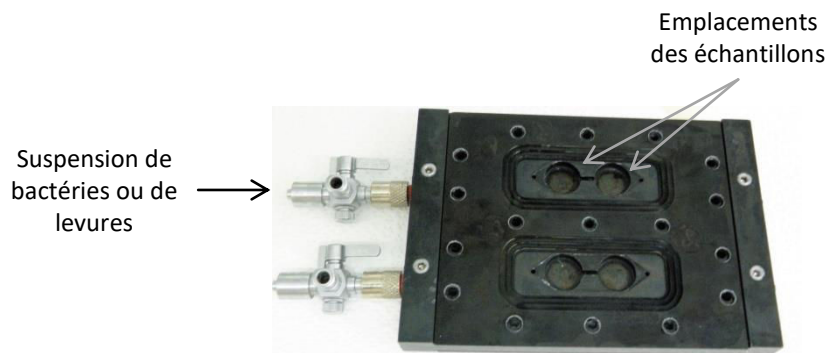


Figure 11 : Photo d'une chambre de flux à plaques parallèles

○ Chambre à flux radial

Dans cette chambre, deux disques plans sont espacés de 200 μm à 300 μm , l'un est fixe et l'autre, composé de l'échantillon à tester, est mis en rotation le long d'un axe perpendiculaire aux disques [52, 92]. Le fluide est inséré au centre et cela crée un gradient de forces de cisaillement qui devient plus faible en périphérie (Figure 12).

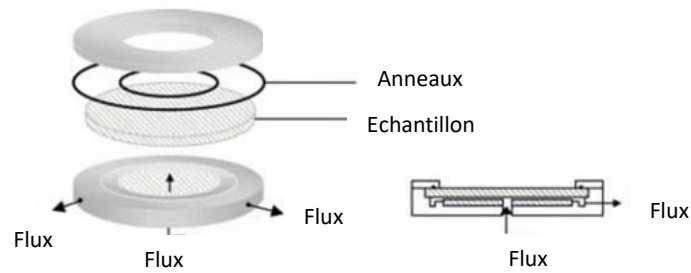


Figure 12: Schéma d'une chambre à flux radial [30]

- Disque en rotation

L'échantillon est placé sur un disque qui est mis en rotation selon un axe vertical. Le tout est immergé dans la suspension de microorganismes (Figure 13). La création d'un flux axial est observée.

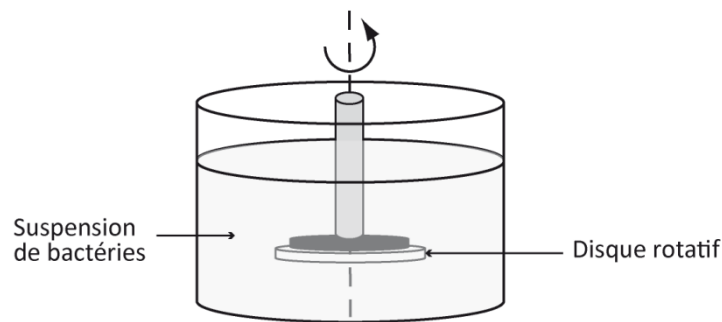


Figure 13: Schéma d'une chambre avec un disque en rotation (d'après [30])

c- Méthodes de dénombrement des bactéries

Il existe plusieurs méthodes de dénombrement de microorganismes qui permettent une estimation globale du nombre de bactéries ou levures présentes sur la surface (adhérentes ou peu adhérentes). Ces techniques s'appliquent après que l'échantillon ait été mis en contact avec une suspension de microorganismes avec l'une des méthodes précédentes (en statique ou sous flux) [30].

- Examen microscopique

Après avoir été mis en contact avec la suspension de microorganismes, les échantillons peuvent être observés en microscopie électronique à balayage (MEB), microscopie d'épifluorescence, microscopie confocale ou encore microscopie à force atomique (AFM). Ces méthodes permettent de vérifier la présence de bactéries et de visualiser leur répartition sur la surface à différentes échelles.

La microscopie électronique à balayage permet d'obtenir une image de la surface à grande échelle et de voir la répartition des microorganismes (vivants ou morts) en surface. Pour cela, une préparation des échantillons est nécessaire. Les échantillons sont d'abord immergés dans une solution de glutaraldéhyde (ou un mélange paraformaldéhyde / glutaraldéhyde) qui permet de fixer les protéines de la membrane des microorganismes afin de conserver leur structure. Les microorganismes sur les surfaces sont ensuite déshydratés dans des bains successifs de solutions d'éthanol de concentration croissante (50% à 100%). Avant l'observation, les échantillons sont recouverts d'un film mince d'or ou de platine pour un meilleur contraste (métallisation). Ces étapes de préparation peuvent cependant éliminer une partie des microorganismes adhérents et fausser le résultat lors du dénombrement [15, 93].

La microscopie par fluorescence permet de visualiser et de distinguer après préparation des échantillons les bactéries vivantes et mortes en surface. Pour cela, le CTC (5-cyano-2,3-ditolyt tétrazolium chloride) peut être utilisé pour marquer les bactéries présentes sur la surface. Il prend deux couleurs différentes : rouge si la bactérie respire (donc viable) et verte dans le cas contraire. La longueur d'onde d'excitation est comprise entre 470 et 490 nm. Par cette méthode, il est possible de dénombrer simultanément les bactéries vivantes et mortes sur l'échantillon [94].

D'autres biomarqueurs spécifiques à un type de microorganismes peuvent être utilisés afin d'en faciliter la détection. Ils peuvent permettre une détection par fluorescence, par bioluminescence, par spectrophotomètre, par détection gamma... [95].

La microscopie confocale est une amélioration en termes de résolution de la microscopie par fluorescence. Elle permet de visualiser les bactéries et le biofilm en volume ou d'obtenir une image en 3D de la surface [96].

Lors de mesures sous flux, si la cellule est équipée d'une fenêtre et qu'une des surfaces est transparente, il est possible d'observer *in situ* les microorganismes en utilisant par exemple un microscope optique inversé. Ces observations permettent alors d'étudier leur comportement au contact de la surface en fonction des conditions expérimentales [92].

La microscopie à force atomique permet l'observation de la topographie de surface à l'échelle nanométrique dans un environnement sec ou humide. Elle permet d'obtenir les propriétés locales de surface ainsi que les forces d'interactions entre un microorganisme et une surface. L'AFM ne permet pas de dénombrer les microorganismes à une grande échelle car les analyses sont limitées par les possibilités des scanners (déplacement d'une centaine de microns).

- Méthode de dénombrement par unité formant colonie

Cette méthode s'appuie sur le développement des bactéries ou levures vivantes. La méthode de dénombrement par unité formant colonie (UFC) est relativement courante par sa facilité de mise en œuvre. Les microorganismes présents sur l'échantillon sont décrochés (ou élués) grâce à une solution de décrochage (solution SCDLP²). La suspension obtenue, contenant les microorganismes décrochés, est ensuite étalée sur gélose nutritive après des dilutions sériées. Après quelques jours de culture, les colonies formées sur la gélose sont dénombrées et, en fonction de la dilution ensemencée, le nombre d'UFC adhérentes par unité de surface peut être déterminé (Figure 14) [38, 97]. Il s'agit d'une méthode de comptage indirecte puisque c'est le nombre de colonies formées à partir des microorganismes déposés qui est déterminé. De plus, si lors de l'ensemencement de la suspension ou de ses dilutions sur la gélose nutritive quelques microorganismes restent agrégés en amas, chaque amas ne formera qu'une seule colonie.

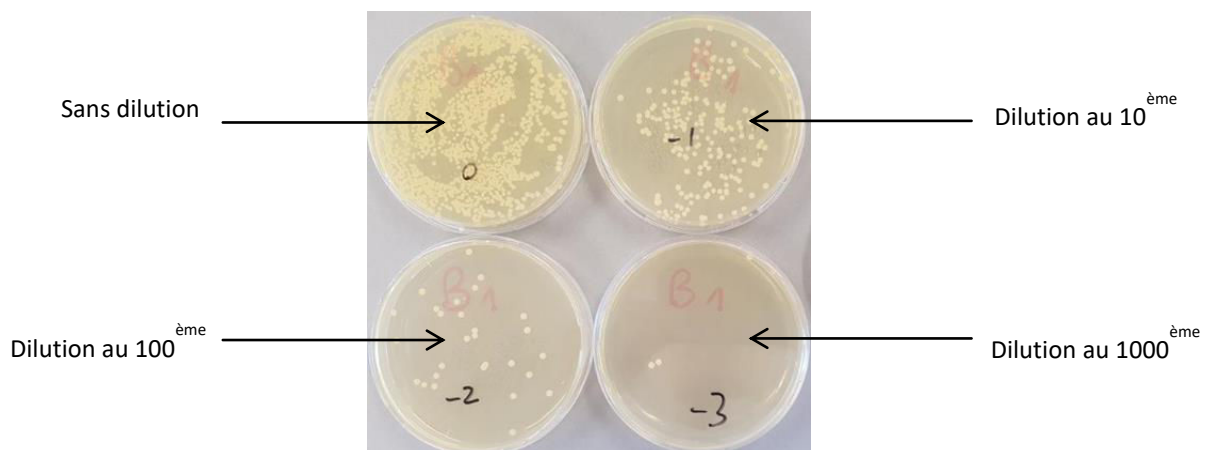


Figure 14 : Dénombrement de levures sur gélose nutritive, à partir des dilutions sériées de dixième en dixième

² SCDLP : Soybean Casein Digest broth with Lecithin and Polyoxyethylene sorbitan monooleate (Peptone de caséine 17 g/L, Peptone de soja 3 g/L, NaCl 5 g/L, Glucose 2,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,5 g/L, Lécithine 1 g/L, Tween 80 7 g/L)

- Autre méthode : compteur Coulter

L'utilisation d'un compteur Coulter permet de compter des microorganismes en fonction de leur taille. Une fois décrochées, les bactéries sont mises en solution. Cette suspension est entraînée par une pompe à l'intérieur du système, doté d'une petite ouverture. Lorsqu'une bactérie passe devant cette ouverture, la résistance entre deux électrodes placées de part et d'autre change. Les impulsions de courant résultantes sont amplifiées et comptées, permettant de retrouver la taille de la particule et leur nombre [98].

- Méthodes d'évaluation du biofilm et de l'exopolymère

Lorsque les bactéries sont en contact pendant un temps suffisamment long avec une surface, elles créent un biofilm. Différentes méthodes permettent d'étudier ce biofilm en termes d'épaisseur, de composition, de densité ou de morphologie. Ces mesures peuvent se faire par microscopie optique, microscopie électronique à balayage ou microscopie confocale.

Certaines de ces techniques présentent des inconvénients. En effet, les tests dits globaux permettent d'obtenir la quantité de microorganismes présents sur la surface, sans différencier les microorganismes adhérents des microorganismes non adhérents qui auraient été retenus sur la surface [30]. Ainsi, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour étudier de manière spécifique l'adhérence d'un microorganisme sur une surface.

d- Mesure de la force de détachement avec une bactérie unique

La microscopie à force atomique permet à l'aide d'une pointe de déterminer la force de détachement d'une bactérie adhérente à une surface. La bactérie peut être fixée sur la pointe ou sur la surface. La force est mesurée en fonction de la distance de la pointe à l'échantillon : la pointe est approchée de la surface et ensuite est éloignée. Cette technique permet de mesurer la force d'attachement de la bactérie à une surface ou entre deux bactéries. Elle permet de mesurer des forces de 10 à 10^4 pN [99].

La pince optique (ou optical tweezer) est une technique qui permet à l'aide d'un laser monochromatique de piéger de petits objets. Pour étudier la force d'interaction entre une surface et une bactérie, la surface, en forme de bille, est piégée dans une pince optique. La bactérie est au

départ attachée entre cette bille et une surface fixe. Par la suite, la pince optique, piégeant la bille, est déplacée lentement jusqu'à rompre la liaison entre la bille et la bactérie. Cette force est mesurée en fonction de la déviation du faisceau. Cette technique permet de mesurer des forces de 0,1 à 100 pN [99, 100].

Ces deux méthodes permettent aussi de déterminer certaines propriétés mécaniques d'une bactérie mais nécessite la fixation de la bactérie sur un support lors de l'étude.

L'utilisation d'une micropipette aspirante permet de déterminer certaines propriétés mécaniques d'une cellule. Cette technique repose sur l'utilisation d'une micropipette à l'aide de laquelle des microorganismes en suspension sont aspirés. En fonction de la pression nécessaire pour aspirer une bactérie, il est possible d'en déduire les propriétés mécaniques [90, 100]. Cependant, les bactéries étant plus petites que les cellules de mammifères (environ dix fois plus petites), d'autres équipements composés de nanotubes ont été mis en place permettant l'étude d'organismes de petite taille, comme les bactéries [101].

Si ces méthodes permettent de déterminer la force de détachement d'une bactérie sur une surface (pour l'AFM et la pince optique) et/ou les propriétés mécaniques des bactéries (pour les trois méthodes présentées), elles ne permettent pas de déterminer le nombre de bactéries en surface.

2- Méthodes *in vivo*

Les tests d'adhérence *in vivo* se font généralement lorsqu'une surface ou un revêtement s'est montré prometteur lors des étapes d'analyses *in vitro*. Il est ainsi possible de se rapprocher des conditions réelles avec la présence de fluides biologiques au sein de l'animal. Pour cela la taille des échantillons doit être adaptée à l'espèce animale choisie. L'animal le plus souvent utilisé, dans un premier temps, est la souris en raison de sa faible taille et de son coût plus faible.

Pendant l'implantation, les souris sont anesthésiées. Les disques ou implants sont implantés au niveau du cou, du flanc ou du dos de la souris après un rasage et une désinfection de la zone. Les souris sont ensuite laissées au repos pendant quelques heures à quelques jours, puis les bactéries sont injectées au niveau de l'implant. Le plus souvent il s'agit de microorganismes bioluminescents comme la bactérie *S. aureus Xen29*, très utilisée car communément à l'origine d'infections sur implants médicaux. Ces microorganismes sont rendus luminescents par intégration dans leur génome de gènes rapporteurs, gènes provenant de microorganismes naturellement luminescents comme *Photobacterium luminescence*, un bacille à Gram négatif de la famille des Entérobactériaceae qui

produit une luciférase. En exprimant le gène de la luciférase ainsi introduits dans leur génome, ces microorganismes modifiés génèrent un signal bioluminescent, si la cellule est métaboliquement active [102]. L'intensité du signal émis par les bactéries est suffisante pour que le signal puisse passer au travers des tissus biologiques. Le signal est détecté par une caméra CCD qui permet une analyse quantitative [40, 102, 103]. Le suivi se fait sur plusieurs jours. Une étude des tissus environnant l'implant peut aussi être effectuée après euthanasie de la souris. Certains organes et/ou l'implant lui-même peuvent ainsi être prélevés, homogénéisés en tampon phosphate salin (PBS) stérile ou lavage de l'implant en PBS stérile. Le dénombrement des bactéries peut être réalisé en utilisant la méthode de dénombrement par UFC ou par fluorescence après marquage des bactéries par un fluorochrome [40, 104].

Ces méthodes d'analyses permettent de suivre le développement des bactéries et/ou de déterminer le nombre de bactéries adhérentes sur certains organes ou implants. La présence de fluides biologiques peut impacter l'adhérence des bactéries observée *in vitro*. De même, les réactions de défense de l'hôte peuvent modifier les résultats. Par ailleurs, dans ces méthodes, plus que l'étape initiale d'adhérence, c'est la capacité de la bactérie ou de la levure à coloniser la surface qui est explorée.

Conclusion

L'adhérence de microorganismes sur une surface est un phénomène complexe mettant en jeu de nombreux paramètres physico-chimiques et environnementaux. De nombreuses analyses microbiologiques ont été réalisées sur des échantillons de différentes topographies, rugosités, chimies de surface mais peu de conclusions claires ont été retenues pour limiter le risque de survenue d'une infection du fait de la grande variété de microorganismes et conditions expérimentales utilisées. Ainsi, le plus souvent pour répondre à une problématique dans un contexte précis, le choix des matériaux, des microorganismes utilisés et aussi de la technique d'analyse microbiologique sont conditionnés.

Ce travail de thèse se place dans le contexte des chambres implantables et des matériaux à base de titane. Lorsque ces dispositifs sont utilisés pour l'administration de nutrition parentérale, il existe un nombre important de colonisation par des microorganismes et donc d'infections. Dans le cadre de ce projet régional associant également des oncologues, des microbiologistes et des chimistes organiciens, nous avons cherché à mieux comprendre l'adhérence primaire de bactéries (*S. aureus*)

et de levures (*C. albicans*) afin de proposer des surfaces aux propriétés contrôlées limitant le risque d'infections dans les chambres implantables.

En prenant en compte les résultats obtenus dans la littérature et le contexte de notre étude, nous avons donc proposé d'étudier des supports à base de titane, ayant des propriétés de surface différentes, en termes de topographie, de rugosité et de chimie de surface, mais présentant des propriétés de surface proches de celles mesurées dans les chambres implantables. La dégradation éventuelle de l'état des surfaces vis-à-vis de certains produits de chimiothérapie sera aussi étudiée.

Des échantillons modèles d'oxyde de titane ont dans un premier temps été élaborés avec différentes topographies pour étudier leurs impacts sur l'adhérence de microorganismes. Le greffage de monocouches moléculaires a ensuite permis de fonctionnaliser les surfaces pour étudier l'effet de certaines fonctions chimiques sur l'adhérence de protéines, de bactéries et de levures. Enfin des alliages de titane ont été utilisés pour se rapprocher des matériaux actuellement utilisés en milieu hospitalier. L'adhérence de deux microorganismes très fréquemment à l'origine d'infections nosocomiales: *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* a été évaluée.

Le deuxième chapitre décrira l'élaboration des échantillons à base d'oxyde de titane ou d'alliage de titane et les fonctionnalisations de surface réalisées. Les différentes techniques de caractérisation de surface seront détaillées ainsi que les résultats obtenus. Le troisième chapitre développera les analyses microbiologiques réalisées sur les différents types d'échantillons. Les effets de la rugosité et de la topographie seront d'abord étudiés sur des surfaces modèle d'oxyde de titane et des surfaces d'alliages de titane grade 2 et grade 5. L'impact de la présence de groupements chimiques en surface sur l'adhérence de microorganismes et sur l'absorption de protéines sera ensuite analysé. Enfin, le quatrième chapitre montrera l'effet de produits utilisés lors des traitements de chimiothérapie sur les surfaces en termes de dégradation éventuelle ou de traces laissées en surface. Il s'intéressera aussi à l'effet de la présence de ces produits ou de résidus de nutrition parentérale sur l'adhérence des microorganismes.

Références

- [1] P. Longuet, Prise en charge des infections sur cathéters à chambre implantable, *Réanimation*, 12 (2003) 214-220.
- [2] Évaluation de la qualité de l'utilisation et de la surveillance des chambres à cathéter implantables, in: *Évaluation des pratiques professionnelles, Rapport de l'expérimentation nationale*, Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé, 12/2000.
- [3] Audit clinique ciblé appliqué aux chambres à cathéter implantables in: *Évaluation des pratiques professionnelles*, Haute Autorité de la Santé, 06/2006.
- [4] C. Dupont, *Guide pratique des chambres à cathéter implantables*, 2012.
- [5] M.R. Mallaret, F. Olive, J. Fauconnier, A. Bosseray, J.P. Brion, J. Croze, M. Micoud, Totally implanted venous access: Method and results of infection surveillance, *Med Maladies Infect*, 26 (1996) 752-756.
- [6] U.K. Teichgräber, R. Pfitzmann, H.A.F. Hofmann, Central venous port systems as an integral part of chemotherapy, *Deutsches Ärzteblatt International*, 108 (2011) 147-154.
- [7] F. Lopez-Huerta, B. Cervantes, O. Gonzalez, J. Hernandez-Torres, L. Garcia-Gonzalez, R. Vega, A.L. Herrera-May, E. Soto, Biocompatibility and surface properties of TiO₂ thin films deposited by DC magnetron sputtering, *Materials*, 7 (2014) 4105-4117.
- [8] K.A. Whitehead, J. Colligon, J. Verran, Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 41 (2005) 129-138.
- [9] A. Zahal, M. Khalife, D. Mukherji, N. El Majzoub, A. Shamseddine, J. Hoballah, G. Marangoni, W. Faraj, Update on totally implantable venous access devices, *Surg Oncol*, 21 (2012) 207-215.
- [10] J.S. Groeger, A.B. Lucas, H.T. Thaler, H. Friedlanderklar, A.E. Brown, T.E. Kiehn, D. Armstrong, Infectious morbidity associated with long-term use of venous access devices in patients with cancer, *Ann Intern Med*, 119 (1993) 1168-1174.
- [11] D. Lebeaux, B. Larroque, J. Gellen-Dautremer, V. Leflon-Guibout, C. Dreyer, S. Bialek, A. Froissart, O. Hentic, C. Tessier, R. Ruimy, A. Pelletier, B. Crestani, Clinical outcome after a totally implantable venous access port-related infection in cancer patients a prospective study and review of the literature, *Medicine*, 91 (2012) 309-318.
- [12] D. Lebeaux, N. Fernandez-Hidalgo, A. Chauhan, S. Lee, J.M. Ghigo, B. Almirante, C. Beloin, Management of infections related to totally implantable venous-access ports: challenges and perspectives, *Lancet Infect Dis*, 14 (2014) 146-159.
- [13] N. Barbetakis, C. Asteriou, A. Kleontas, C. Tsilikas, Totally implantable central venous access ports. Analysis of 700 cases, *J Surg Oncol*, 104 (2011) 654-656.
- [14] SF2H, *Prévention des infections associées aux chambres à cathéter implantables pour accès veineux*, in, 2012.
- [15] O. Seddiki, C. Harnagea, L. Levesque, D. Mantovani, F. Rosei, Evidence of antibacterial activity on titanium surfaces through nanotextures, *Appl Surf Sci*, 308 (2014) 275-284.
- [16] E. Bouza, R. San Juan, P. Munoz, J. Pascau, A. Voss, M. Desco, A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility *Clinical microbiology and infection*, 10 (2004) 838-842.
- [17] N.P. O'Grady, M. Alexander, L.A. Burns, E.P. Dellinger, J. Garland, S.O. Heard, P.A. Lipsett, H. Masur, L.A. Mermel, M.L. Pearson, I.I. Raad, A.G. Randolph, M.E. Rupp, S. Saint, Hicpac, Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections, *Clin Infect Dis*, 52 (2011) E162-E193.
- [18] L.A. Mermel, B.M. Farr, R.J. Sherertz, I.I. Raad, N. O'Grady, J.S. Harris, D.E. Craven, Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections, *Clin Infect Dis*, 32 (2001) 1249-1272.
- [19] OMÉDIT, *Verrou antibiotique et infection d'une chambre implantable*, in, Région Centre 2012.
- [20] N. Fernandez-Hidalgo, B. Almirante, R. Calleja, I. Ruiz, A.M. Planes, D. Rodriguez, C. Pigrau, A. Pahissa, Antibiotic-lock therapy for long-term intravascular catheter-related bacteraemia: results of an open, non-comparative study, *J Antimicrob Chemoth*, 57 (2006) 1172-1180.

- [21] I.D. Maya, D. Carlton, E. Estrada, M. Allon, Treatment of dialysis catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia with an antibiotic lock: a quality improvement report, *Am J Kidney Dis*, 50 (2007) 289-295.
- [22] C. Desrousseaux, V. Sautou, S. Descamps, O. Traore, Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation, *J Hosp Infect*, 85 (2013) 87-93.
- [23] M.N. BellonFontaine, J. Rault, C.J. vanOss, Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells, *Colloid Surface B*, 7 (1996) 47-53.
- [24] Institut, Pasteur, Satphylocoques, <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/staphylocoque>.
- [25] P.E. Sudbery, Growth of *Candida albicans* hyphae, *Nat. Rev. Microbiol.*, 9 (2011) 737-748.
- [26] C. Tsui, E.F. Kong, M.A. Jabra-Rizk, Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm, *Pathog. Dis.*, 74 (2016) 13.
- [27] D. Williams, M. Lewis, Pathogenesis and treatment of oral candidosis, *Journal of Oral Microbiology*, 3 (2011).
- [28] A. Almaguer-Flores, L.A. Ximenez-Fyvie, S.E. Rodil, Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: effect of surface roughness and culture media, *J Biomed Mater Res B*, 92B (2009) 196-204.
- [29] T. Bjarnsholt, N. Hoiby, G. Donelli, C. Imbert, A. Forsberg, Understanding biofilms - are we there yet?, *FEMS Immunology and medical microbiology*, 65 (2012) 125-126.
- [30] M. Katsikogianni, Y.F. Missirlis, Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions, *European Cells & Materials*, 8 (2004) 37-57.
- [31] H.J. Busscher, H.C. Van der Mei, How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state?, *Plos Pathog*, 8 (2012).
- [32] C.R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, J.W. Costerton, Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials, *Biomaterials*, 33 (2012) 5967-5982.
- [33] K. Hori, S. Matsumoto, Bacterial adhesion: from mechanism to control, *Biochem Eng J*, 48 (2010) 424-434.
- [34] M.A. Daeschel, J. McGuire, Interrelationships between protein surface adsorption and bacteria adhesion, in: T. Francis (Ed.) *Biotechnology and Genetic engineering review*, 1998, pp. 413-438.
- [35] Y.H. An, R.J. Friedman, Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces, *J Biomed Mater Res*, 43 (1998) 338-348.
- [36] C. Díaz, M. Cortizo, P. Schilardi, S.G.G.d. Saravia, M.A.F.L.d. Mele, Influence of the nano-micro structure of the surface on bacterial adhesion *Materials Research*, 10 (2007) 11-14.
- [37] D. Siegismund, A. Undisz, S. Germerodt, S. Schuster, M. Rettenmayr, Quantification of the interaction between biomaterial surfaces and bacteria by 3-D modeling, *Acta Biomater*, 10 (2014) 267-275.
- [38] M.G. Katsikogianni, Y.F. Missirlis, Interactions of bacteria with specific biomaterial surface chemistries under flow conditions, *Acta Biomater*, 6 (2010) 1107-1118.
- [39] E. Ostuni, R.G. Chapman, M.N. Liang, G. Meluleni, G. Pier, D.E. Ingber, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells, *Langmuir*, 17 (2001) 6336-6343.
- [40] A.L. Hook, C.Y. Chang, J. Yang, J. Lockett, A. Cockayne, S. Atkinson, Y. Mei, R. Bayston, D.J. Irvine, R. Langer, D.G. Anderson, P. Williams, M.C. Davies, M.R. Alexander, Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment, *Nat Biotechnol*, 30 (2012) 868-875.
- [41] P. Kaali, E. Strömberg, S. Karlsson, Prevention of biofilm associated infections and degradation of polymeric materials used in biomedical applications, in: M.A. Laskovski (Ed.) *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science, In Tech*, 2011.
- [42] L. Rizzello, R. Cingolani, P.P. Pompa, Nanotechnology tools for antibacterial materials, *Nanomedicine-Uk*, 8 (2013) 807-821.

- [43] T.R. Garrett, M. Bhakoo, Z.B. Zhang, Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, *Prog Nat Sci*, 18 (2008) 1049-1056.
- [44] N. Hori, F. Iwasa, T. Ueno, K. Takeuchi, N. Tsukimura, M. Yamada, M. Hattori, A. Yamamoto, T. Ogawa, Selective cell affinity of biomimetic micro-nano-hybrid structured TiO₂ overcomes the biological dilemma of osteoblasts, *Dent Mater*, 26 (2010) 275-287.
- [45] J. Strauss, Y. Liu, T. Camesano, Bacterial adhesion to protein coated surfaces: an AFM and QCM-D study, *JOM*, 61 (2009) 71-74.
- [46] C. Scotchford, C. Gilmore, E. Cooper, G. Leggett, S. Downes, Protein adsorption and human osteoblast-like cell attachment and growth on alkylthiol on gold self-assembled monolayers, *J Biomed Mater Res A*, 59 (2002) 84-99.
- [47] C. Nune, W. Xu, R.D. Misra, The impact of grafted modification of silicone surfaces with quantum-sized materials on protein adsorption and bacterial adhesion, *J Biomed Mater Res A*, 100 (2012) 3197-3204.
- [48] A. Alcheikh, G. Pavon-Djavid, G. Helary, H. Petite, V. Migonney, F. Anagnostou, PolyNaSS grafting on titanium surfaces enhances osteoblast differentiation and inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion, *J Mater Sci-Mater M*, 24 (2013) 1745-1754.
- [49] S. Schuster, W. Yu, M. Nega, Y.-Y. Chu, S. Zorn, F. Zhang, F. Götz, F. Schreiber, The role of serum proteins in *Staphylococcus aureus* adhesion to ethylene glycol coated surfaces, *International Journal of Medical Microbiology*, 304 (2014) 949-957.
- [50] M. Herrmann, P.E. Vaudaux, D. Pittet, R. Auckenthaler, P.D. Lew, F. Schumacher-Perdreau, G. Peters, W. F.A, Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material, *Journal of Infectious Diseases*, 158 (1988) 693-701.
- [51] A. Fleer, C. Timmerman, J. Besnier, A. Pascual, J. Verhoef, Surface proteins of coagulase-negative *staphylococci*: their role in adherence to biomaterials and in opsonization, *Journal of biomaterials applications*, 5 (1990) 154-165.
- [52] V.A. Tegoulia, S.L. Cooper, *Staphylococcus aureus* adhesion to self-assembled monolayers effect of surface chemistry and fibrinogen presence, *Colloids and Surfaces B - Biointerfaces* 24 (2002) 217-228.
- [53] G. Tronchin, J.P. Bouchara, V. Annaix, R. Robert, J.M. Senet, Fungal cell-adhesion molecules in *Candida albicans*, *Eur. J. Epidemiol.*, 7 (1991) 23-33.
- [54] K.K. Skjorland, A. Henstenpettersen, D. Orstavik, K.J. Soderholm, Tooth colored dental restorative materials - porosities and surface-topography in relation to bacterial adhesion, *Acta Odontol. Scand.*, 40 (1982) 113-120.
- [55] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials*, 34 (2013) 8533-8554.
- [56] J. Hasan, R.J. Crawford, E.P. Lvanova, Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials, *Trends Biotechnol*, 31 (2013) 31-40.
- [57] K.G. Neoh, E.T. Kang, Combating bacterial colonization on metals via polymer coatings: relevance to marine and medical applications, *Acs Appl Mater Inter*, 3 (2011) 2808-2819.
- [58] L. Caillier, E.T. de Givenchy, R. Levy, Y. Vandenberghe, S. Geribaldi, F. Guittard, Synthesis and antimicrobial properties of polymerizable quaternary ammoniums, *Eur J Med Chem*, 44 (2009) 3201-3208.
- [59] S. Ghamrawi, J. Bouchara, O. Tarasyuk, S. Rogalsky, L. Lyoshina, O. Bulko, J. Bardeau, Promising silicones modified with cationic biocides for the development of antimicrobial medical devices, *Materials Science & Engineering C*, 75 (2017) 969-979.
- [60] S.R. Palumbi, Evolution - Humans as the world's greatest evolutionary force, *Science*, 293 (2001) 1786-1790.
- [61] K.K. Kumarasamy, M.A. Toleman, T.R. Walsh, J. Bagaria, F. Butt, R. Balakrishnan, U. Chaudhary, M. Doumith, C.G. Giske, S. Irfan, P. Krishnan, A.V. Kumar, S. Maharjan, S. Mushtaq, T. Noorie, D.L. Paterson, A. Pearson, C. Perry, R. Pike, B. Rao, U. Ray, J.B. Sarma, M. Sharma, E. Sheridan, M.A. Thirunarayan, J. Turton, S. Upadhyay, M. Warner, W. Welfare, D.M. Livermore, N. Woodford,

- Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study, *Lancet Infect. Dis.*, 10 (2010) 597-602.
- [62] E.P. Ivanova, V.K. Truong, J.Y. Wang, C.C. Berndt, R.T. Jones, I.I. Yusuf, I. Peake, H.W. Schmidt, C. Fluke, D. Barnes, R.J. Crawford, Impact of nanoscale roughness of titanium thin film surfaces on bacterial retention, *Langmuir*, 26 (2010) 1973-1982.
- [63] T. Shida, H. Koseki, I. Yoda, H. Horiuchi, H. Sakoda, M. Osaki, Adherence ability of *Staphylococcus epidermidis* on prosthetic biomaterials: an *in vitro* study, *Int. J. Nanomed.*, 8 (2013) 3955-3961.
- [64] P. Thomas, L.R. Braathen, M. Dorig, J. Aubock, F. Nestle, T. Werfel, H.G. Willert, Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and peri-implant T-lymphocytic inflammation, *Allergy*, 64 (2009) 1157-1165.
- [65] Y. Niki, H. Matsumoto, T. Otani, T. Yatabe, M. Kondo, F. Yoshimine, Y. Toyama, Screening for symptomatic metal sensitivity: a prospective study of 92 patients undergoing total knee arthroplasty, *Biomaterials*, 26 (2005) 1019-1026.
- [66] L.G. Harris, R.G. Richards, *Staphylococcus aureus* adhesion to different treated titanium surfaces, *J Mater Sci Mater Med*, 15 (2004) 311-314.
- [67] K. Anselme, P. Davidson, A.M. Popa, M. Giazzon, M. Liley, L. Ploux, The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale, *Acta Biomater*, 6 (2010) 3824-3846.
- [68] C. Giordano, E. Sainob, L. Rimondini, M. Pedferria, L. Visaib, A. Cigadaa, R. Chiesaa, Electrochemically induced anatase inhibits bacterial colonization on Titanium Grade 2 and Ti6Al4V alloy for dental and orthopedic devices, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88 (2011) 648-655.
- [69] C. Ludecke, M. Roth, W. Yu, U. Horn, J. Bossert, K.D. Jandt, Nanorough titanium surfaces reduce adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* via nano adhesion points, *Colloid Surface B*, 145 (2016) 617-625.
- [70] A.F. Han, X.L. Li, B.X. Huang, J.K.H. Tsoi, J.P. Matinlinna, Z.F. Chen, D.M. Deng, The effect of titanium implant surface modification on the dynamic process of initial microbial adhesion and biofilm formation, *Int J Adhes Adhes*, 69 (2016) 125-132.
- [71] I. Yoda, H. Koseki, M. Tomita, T. Shida, H. Horiuchi, H. Sakoda, M. Osaki, Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion, *BMC Microbiol.*, 14 (2014).
- [72] M. Lorenzetti, I. Dogsa, T. Stosicki, D. Stopar, M. Kalin, S. Kobe, S. Novak, The influence of surface modification on bacterial adhesion to titanium-based substrates, *Acs Appl Mater Inter*, 7 (2015) 1644-1651.
- [73] L. Jin, W. Guo, P.H. Xue, H.N. Gao, M. Zhao, C. Zheng, Y.L. Zhang, D. Han, Quantitative assay for the colonization ability of heterogeneous bacteria on controlled nanopillar structures, *Nanotechnology*, 26 (2015).
- [74] V.K. Truong, V.T.H. Pham, A. Medvedev, R. Lapovok, Y. Estrin, T.C. Lowe, V. Baulin, V. Boshkovikj, C.J. Fluke, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Self-organised nanoarchitecture of titanium surfaces influences the attachment of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99 (2015) 6831-6840.
- [75] E. Fadeeva, V.K. Truong, M. Stiesch, B.N. Chichkov, R.J. Crawford, J. Wang, E.P. Ivanova, Bacterial retention on superhydrophobic titanium surfaces fabricated by femtosecond laser ablation, *Langmuir*, 27 (2011) 3012-3019.
- [76] T. Kumeria, H. Mon, M.S. Aw, K. Gulati, A. Santos, H.J. Griesser, D. Losic, Advanced biopolymer-coated drug-releasing titania nanotubes (TNTs) implants with simultaneously enhanced osteoblast adhesion and antibacterial properties, *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 130 (2015) 255-263.
- [77] B. Ercan, E. Taylor, E. Alpaslan, T.J. Webster, Diameter of titanium nanotubes influences antibacterial efficacy, *Nanotechnology*, 22 (2011).
- [78] C. Perez-Jorge, A. Conde, M.A. Arenas, R. Perez-Tanoira, E. Matykina, J.J. de Damborenea, E. Gomez-Barrena, J. Esteban, *In vitro* assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO₂ nanotubes on Ti-6Al-4V alloy, *J Biomed Mater Res A*, 100A (2012) 1696-1705.

- [79] F.R. Marciano, D.A. Lima-Oliveira, N.S. Da-Silva, A.V. Diniz, E.J. Corat, V.J. Trava-Airoldi, Antibacterial activity of DLC films containing TiO₂ nanoparticles, *J Colloid Interf Sci*, 340 (2009) 87-92.
- [80] F.R. Marciano, L.F. Bonetti, J.F. Mangolin, N.S. Da-Silva, E.J. Corat, V.J. Trava-Airoldi, Investigation into the antibacterial property and bacterial adhesion of diamond-like carbon films, *Vacuum*, 85 (2011) 662-666.
- [81] O. Sanni, C.Y. Chang, D.G. Anderson, R. Langer, M.C. Davies, P.M. Williams, P. Williams, M.R. Alexander, A.L. Hook, Bacterial attachment to polymeric materials correlates with molecular flexibility and hydrophilicity, *Adv. Healthc. Mater.*, 4 (2015) 695-701.
- [82] I.C. Saldarriaga Fernández, H.C.v.d. Mei, S. Metzger, D.W. Grainger, A.F. Engelsman, M.R. Nejadnik, H.J. Busscher, *In vitro* and *in vivo* comparisons of staphylococcal biofilm formation on a cross-linked poly(ethylene glycol)-based polymer coating, *Acta Biomater*, 6 (2010) 1119-1124.
- [83] Y.B. Ma, M. Chen, J.E. Jones, A.C. Ritts, Q.S. Yu, H.M. Sun, Inhibition of staphylococcus epidermidis biofilm by trimethylsilane plasma coating, *Antimicrob Agents Ch*, 56 (2012) 5923-5937.
- [84] Z.L. Shi, K.G. Neoh, E.T. Kang, C. Poh, W. Wang, Bacterial adhesion and osteoblast function on titanium with surface-grafted chitosan and immobilized RGD peptide, *J Biomed Mater Res A*, 86A (2008) 865-872.
- [85] Y. Pu, A.B. Liu, Y.Q. Zheng, B. Ye, *In vitro* damage of *Candida albicans* biofilms by chitosan, *Exp. Ther. Med.*, 8 (2014) 929-934.
- [86] L.D. Renner, D.B. Weibel, Physicochemical regulation of biofilm formation, *Mrs Bull*, 36 (2011) 347-355.
- [87] D. Cunliffe, C. Smart, C. Alexander, E.N. Vulfson, Bacterial adhesion at synthetic surfaces, *Applied and environmental microbiology*, 65 (1999) 4995-5002.
- [88] O.V. Rybalchenko, V.M. Bondarenko, O.G. Orlova, A.G. Markov, S. Amasheh, Inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum* on microbial growth and biofilm formation, *Arch. Microbiol.*, 197 (2015) 1027-1032.
- [89] C.Y. Yang, G.J. Song, Q. Zhu, S.J. Liu, C.H. Xia, The influence of bacterial quorum-sensing inhibitors against the formation of the diatom-biofilm, *Chem. Ecol.*, 32 (2016) 169-181.
- [90] Y.F. Missirlis, A.D. Spiliotis, Assessment of techniques used in calculating cell-material interactions, *Biomol. Eng.*, 19 (2002) 287-294.
- [91] H.J. Busscher, H.C. van der Mei, Microbial adhesion in flow displacement systems, *Clin. Microbiol. Rev.*, 19 (2006) 127-141.
- [92] R.B. Dickinson, J.A. Nagel, R.A. Proctor, S.L. Cooper, Quantitative comparison of shear-dependent *Staphylococcus aureus* adhesion to three polyurethane ionomer analogs with distinct surface properties, *J Biomed Mater Res*, 36 (1997) 152-162.
- [93] K.M. Kruszewski, L. Nistico, M.J. Longwell, M.J. ;, M.J. Hynes, J.A. Maurer, L. Hall-Stoodley, G. E.S., Reducing *Staphylococcus aureus* biofilm formation on stainless steel 316L using functionalized self-assembled monolayers, *Materials Science and Engineering C*, 33 (2013) 2059-2069.
- [94] L. Boulos, M. Prevost, B. Barbeau, J. Coallier, R. Desjardins, LIVE/DEAD (R) BacLight (TM): application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water, *J. Microbiol. Methods*, 37 (1999) 77-86.
- [95] M. Zaborowska, K. Welch, R. Branemark, P. Khalilpour, H. Engqvist, P. Thomsen, M. Trobos, Bacteria-material surface interactions: methodological development for the assessment of implant surface induced antibacterial effects, *J Biomed Mater Res B*, 103 (2015) 179-187.
- [96] V.K. Truong, R. Lapovok, Y.S. Estrin, S. Rundell, J.Y. Wang, C.J. Fluke, R.J. Crawford, E.R. Ivanova, The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium, *Biomaterials*, 31 (2010) 3674-3683.
- [97] C.M. Tîlmaciu, M. Mathieu, J. Lavigne, K. Toupet, G. Guerrero, A. Ponche, J. Amalric, D. Noël, H. Mutin, *In vitro* and *in vivo* characterization of antibacterial activity and biocompatibility: A study on silver-containing phosphonate monolayers on titanium, *Acta Biomater*, 15 (2015) 266-277.
- [98] E.M. Swanton, W.A. Curby, H.E. Lind, Experiences with the Coulter counter in bacteriology, *Applied microbiology*, 10 (1962) 480-485.

- [99] K.C. Neuman, A. Nagy, Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy, *Nat. Methods*, 5 (2008) 491-505.
- [100] R.M. Hochmuth, Micropipette aspiration of living cells, *Journal of Biomechanics*, 33 (2000) 15-22.
- [101] X.H. Sun, W.D. Weinlandt, H. Patel, M.M. Wu, C.J. Hernandez, A microfluidic platform for profiling biomechanical properties of bacteria, *Lab Chip*, 14 (2014) 2491-2498.
- [102] A.F. Engelsman, H.C. van der Mei, K.P. Francis, H.J. Busscher, R.J. Ploeg, G.M. van Dam, Real time noninvasive monitoring of contaminating bacteria in a soft tissue implant infection model, *J Biomed Mater Res B*, 88B (2009) 123-129.
- [103] N.A. Kuklin, G.D. Pancari, T.W. Tobery, L. Cope, J. Jackson, C. Gill, K. Overbye, K.P. Francis, J. Yu, D. Montgomery, A.S. Anderson, W. McClements, K.U. Jansen, Real-time monitoring of bacterial infection in vivo: Development of bioluminescent staphylococcal foreign-body and deep-thigh-wound mouse infection models, *Antimicrob Agents Ch*, 47 (2003) 2740-2748.
- [104] R. Chen, M. Willcox, K. Ho, D. Smyth, N. Kumar, Antimicrobial peptide melimine coating for titanium and its *in vivo* antibacterial activity in rodent subcutaneous infection models, *Biomaterials*, 85 (2016) 142-151.

Chapitre 2

Elaboration des échantillons

L'utilisation du titane pour l'élaboration des échantillons a été privilégiée car les boîtiers des chambres implantables sont très souvent à base de titane. Afin d'étudier les effets des propriétés physiques et chimiques des surfaces sur l'adhérence de microorganismes, plusieurs types d'échantillons ont été élaborés.

Des échantillons, lisses ou rugueux, ont été élaborés par différentes techniques. Des surfaces ultra-lisses de TiO_2 ont été préparées par dépôt de titane sur une surface de silicium ayant une rugosité très faible. Plusieurs types de surfaces rugueuses ont été obtenus : des surfaces de TiO_2 structurées présentant des pyramides et des surfaces d'alliage de titane avec des topographies et des rugosités différentes. Ces surfaces rugueuses ont été élaborées de manière à encadrer les valeurs de rugosité mesurées à l'intérieur de chambres implantables commerciales.

L'étude de l'influence de la chimie de surface sur l'adhérence de microorganismes a été réalisée après avoir fonctionnalisé des échantillons d'oxyde de titane, permettant d'obtenir des surfaces hydrophiles ou hydrophobes.

I. Surfaces ultra-lisses de TiO_2

Des films minces de TiO_2 ont été déposés par pulvérisation cathodique sur des wafers de silicium afin d'obtenir, en surface, un matériau biocompatible et similaire à celui retrouvé dans les chambres implantables. L'utilisation de wafer de silicium comme substrat a été privilégiée pour sa très faible rugosité de surface (inférieure à 0,5 nm).

1. Pulvérisation cathodique

Le dépôt d'un film mince d'oxyde de titane par pulvérisation cathodique se fait grâce à une cible de titane dans un environnement contrôlé, riche en oxygène.

La pulvérisation cathodique permet de déposer sur un support un matériau sous forme d'une espèce ionisée dans une phase plasma.

Cette technique nécessite l'utilisation d'une cible, composée du matériau que l'on souhaite déposer, ici le titane. Après avoir créé un vide dans le bâti, un gaz neutre (argon) est introduit avec, au besoin, un gaz réactif (ici l'oxygène). Une différence de potentiel est appliquée entre la cible, placée à la

cathode et le substrat sur lequel on veut déposer le matériau, à l'anode. Les ions Ar^+ , créés lors de la décharge, sont accélérés et acquièrent de l'énergie. Attirés par la charge négative de la cible, les ions Ar^+ vont décrocher des atomes de la cible. Les atomes pulvérisés se condensent ensuite sur le substrat. La pression de gaz est maintenue constante durant le dépôt et une atmosphère riche en gaz neutre est conservée. Les échantillons sont déposés sur une platine tournante permettant un dépôt homogène. Le principe de fonctionnement est schématisé sur la Figure 1.

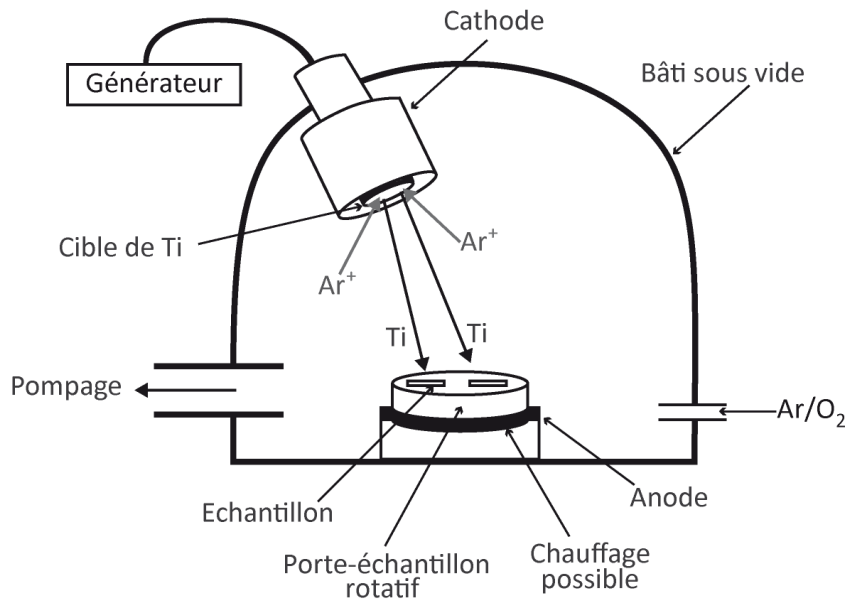


Figure 1 : Principe de fonctionnement de la pulvérisation cathodique

Pour maîtriser les caractéristiques de la couche déposée, il est nécessaire de contrôler différents paramètres :

- la puissance électrique lors du dépôt qui permet de modifier la compacité et la topographie de la surface [1],
- la tension électrique de l'alimentation qui impacte notamment la vitesse de dépôt,
- la pression de travail du gaz utilisé qui influence la qualité du plasma et la vitesse de dépôt,
- la durée du dépôt qui influence l'épaisseur et la rugosité de surface,
- et la température du substrat qui permet, sous certaines conditions, de modifier la phase cristallographique du matériau déposé.

Pour obtenir des films minces d'oxyde de titane TiO_2 ayant une rugosité inférieure au nanomètre, ces paramètres ont dû être optimisés.

Avant chaque dépôt, les substrats (wafers de silicium (100)) ont été nettoyés avec de l'éthanol dans un bain à ultrasons pendant 10 min, puis séchés à l'air comprimé filtré (filtrage de l'huile et des particules).

2. Caractérisation des films déposés

Une fois les films déposés, les échantillons ont été caractérisés par réflectivité des rayons X, spectroscopie photo électronique X (XPS) et microscopie à force atomique (AFM) afin de déterminer respectivement l'épaisseur, la composition chimique, la rugosité et l'état de surface.

Contrôle de l'épaisseur du film mince et de la rugosité

Une augmentation de la puissance imposée lors du dépôt augmente la différence de potentiel entre la cathode et l'anode. Ceci est à l'origine d'une modification de la vitesse de dépôt qui entraîne, tous les autres paramètres restant constants, une augmentation de l'épaisseur et, dans une moindre mesure, de la rugosité (Figure 3). L'épaisseur de la couche mince d'oxyde de titane déposée a été mesurée par réflectivité des rayons X.

La réflectivité des rayons X est une technique de diffusion permettant de déterminer la variation de densité électronique perpendiculairement à la surface, l'épaisseur des couches déposées et un ordre de grandeur des rugosités aux interfaces. L'analyse quantitative des courbes de réflectivité ne peut se faire que sur des substrats faiblement rugueux (R_a inférieure à la dizaine de nanomètres). Cette condition étant satisfaite, cette technique permet d'atteindre des précisions allant jusqu'au nanomètre.

La technique de réflectivité des rayons X est basée sur un phénomène d'interférence. Un rayonnement de photons X est envoyé sur un échantillon avec un angle θ . Pour des angles θ très faibles (en dessous d'un angle critique θ_c), le rayonnement se réfléchit totalement sur la surface. Lorsque cet angle θ augmente et dépasse l'angle critique, des photons pénètrent dans la première couche et par différence de densité électronique, ils se réfléchissent au niveau de l'interface si la rugosité à l'interface est assez faible ($R_a < \text{quelques nm}$) (Figure 2). L'intensité du rayonnement réfléchi diminue fortement à partir de cet angle critique. Les rayons réfléchis, sur la surface et à l'interface entre deux couches, donnent naissance à des interférences et sur le réflectogramme, à des franges de Kiessig.

La réflectivité absolue $R(\theta)$ est définie comme étant le rapport $\frac{I(\theta)}{I_0}$ où $I(\theta)$ représente l'intensité du faisceau réfléchi en fonction de l'angle θ et I_0 l'intensité du faisceau incident. Pour des raisons pratiques, la réflectivité absolue est représentée en fonction de la norme du vecteur d'onde de transfert \vec{Q} [2]. La norme du vecteur d'onde de transfert \vec{Q} est inversement proportionnelle à l'épaisseur de la couche et est reliée à θ par la formule $Q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$ où λ est la longueur d'onde du faisceau incident.

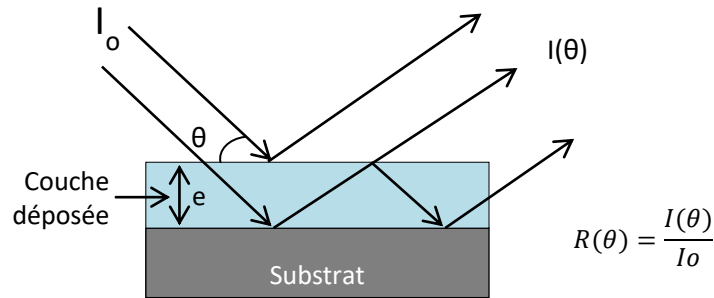


Figure 2 : Principe de fonctionnement de la réflectivité des rayons X (pour $\theta > \theta_c$)

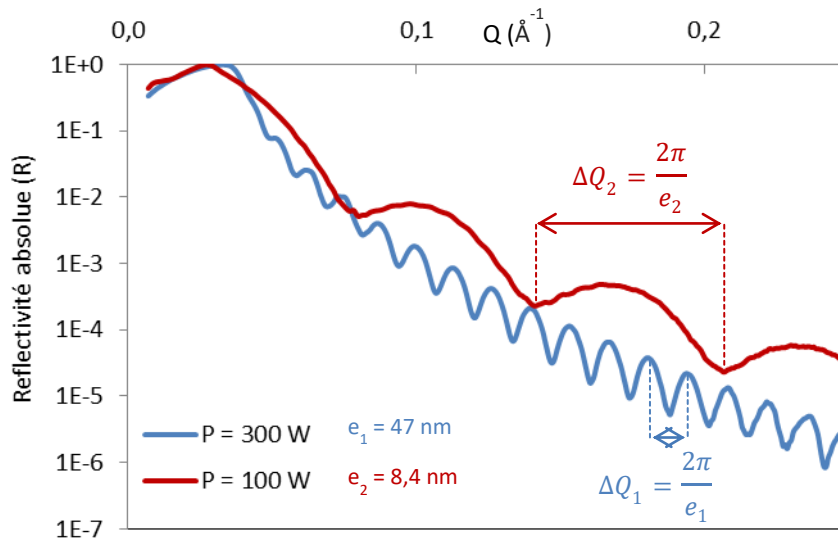


Figure 3 : Réflectogrammes de deux films d'oxyde de titane déposés avec différentes puissances :
 P = 100 W en rouge et P = 300 W en bleu

La valeur de l'épaisseur peut être mesurée graphiquement à partir du réflectogramme en utilisant la formule liant la variation de la norme du vecteur d'onde (Q) et l'épaisseur (e) : $\Delta Q = \frac{2\pi}{e}$.

Ces courbes peuvent être modélisées par la méthode matricielle. Un programme Matlab développé par A. Gibaud (Le Mans Université) et G. Vignaud (Université Bretagne-Sud) permet de modéliser le

profil de densité électronique de la surface par une superposition de couches de densité uniforme. Chacune de ces couches est paramétrée par sa densité électronique, sa rugosité et son épaisseur.

Ici, seule la superposition de deux couches a été prise en compte : la couche de silicium et la couche d'oxyde de titane déposée.

L'épaisseur des films déposés à différentes tensions a donc été déterminée par réflectivité des rayons X (Figure 4). L'augmentation de l'épaisseur de la couche est proportionnelle à la tension pour un temps de dépôt constant (30 min). Les différences d'épaisseur du TiO₂ sur le silicium entraînent un changement de couleur visible à l'œil nu: marron clair (environ 30 nm) pour les films les plus minces à bleu (environ 50 nm) pour les plus épais en passant par une couleur violette (environ 40 nm).

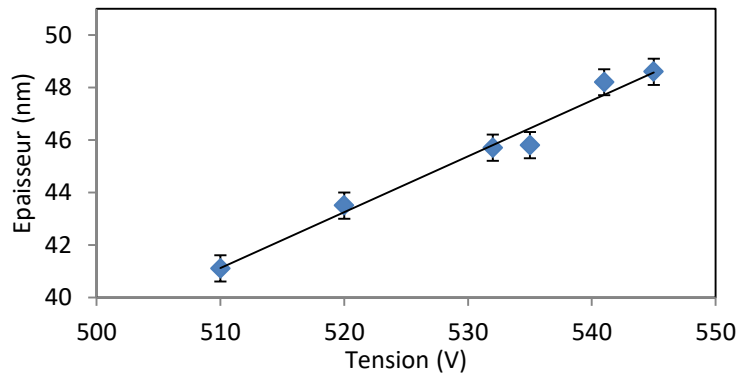


Figure 4 : Evolution de l'épaisseur en fonction de la tension appliquée

La mesure de la rugosité a été réalisée par microscopie à force atomique (AFM). Ce microscope à sonde locale permet d'obtenir la topographie de surface à l'échelle nanométrique. L'analyse des mouvements d'une pointe se déplaçant sur la surface permet de déterminer la hauteur z pour chaque point. Un faisceau laser irradie l'extrémité du microlevier, le faisceau se réfléchit et le signal est récupéré sur une photodiode. Le mode dit tapping (oscillations avec contact intermittent) a été utilisé pour réaliser les images de la surface. Pour cela, la pointe vibre à sa fréquence propre de résonance. Lorsque la hauteur sur l'échantillon change, l'amplitude de la pointe diminue (si la hauteur de l'échantillon augmente, sinon ce sera l'inverse) du fait de l'interaction entre la pointe et les atomes en surface, entraînant un changement de position du faisceau sur la photodiode. Une rétroaction permet de garder l'amplitude de la pointe constante grâce au mouvement d'un scanner piézoélectrique dans la direction verticale (Figure 5).

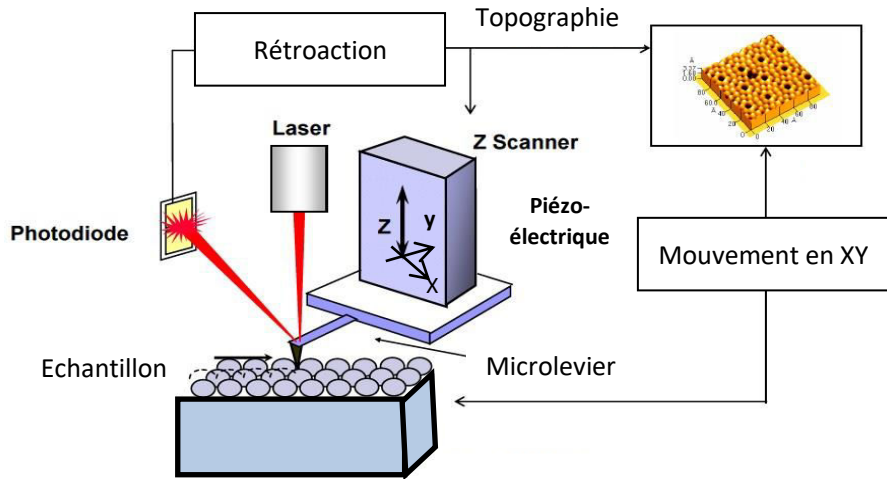


Figure 5 : Principe de fonctionnement de l'AFM à pointe balayée (hosting.umons.ac.be)

Lorsque le temps de dépôt augmente, l'épaisseur augmente aussi. Avec l'augmentation de l'épaisseur, la rugosité de la couche mince d'oxyde de titane, mesurée par AFM, augmente légèrement (Tableau 1 et Figure 6).

Tableau 1: Influence du temps de dépôt sur l'épaisseur et la rugosité

Puissance	P = 300 W	P = 300 W
Tension	t = 30 min	t = 60 min
Epaisseur (nm)	55 ± 1	86 ± 1
Rugosité Ra (nm)	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,1

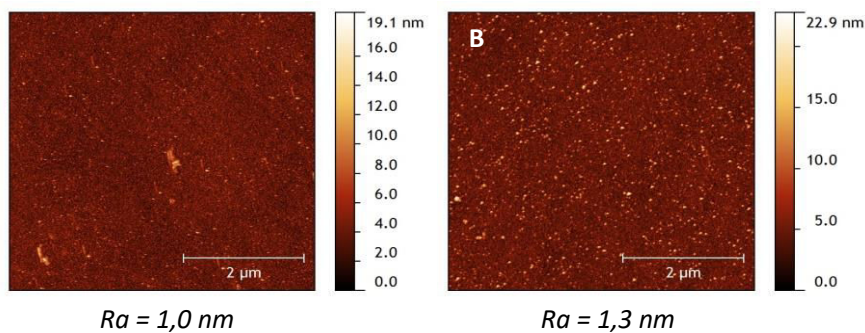


Figure 6 : Images AFM de deux dépôts de TiO₂ pendant A : 30 min et B : 60 min

Lors du dépôt, une diminution de la pression de travail (Ba) entraîne une augmentation de l'épaisseur (en gardant les autres paramètres constants) (Figure 7). Lorsque la pression de travail diminue, la quantité de gaz diminue à l'intérieur de l'enceinte, ce qui entraîne une augmentation du

libre parcours moyen des atomes de titane libérés, dans le plasma. En diminuant le nombre de collisions, les atomes pulvérisés perdent moins d'énergie cinétique et se concentrent sur la surface entraînant une augmentation de l'épaisseur. Cependant, lorsque la pression en gaz diminue, il y a aussi moins d'ions Ar^+ qui sont susceptibles de détacher des atomes de titane par collision sur la cible, compensant ainsi légèrement le premier effet décrit.

Avec une pression de travail de 0,01 mbar, l'épaisseur de la couche de TiO_2 obtenue a été de 47 nm alors que lorsque la pression de travail augmente, l'épaisseur mesurée de la couche a diminué à 19 nm (Figure 7).

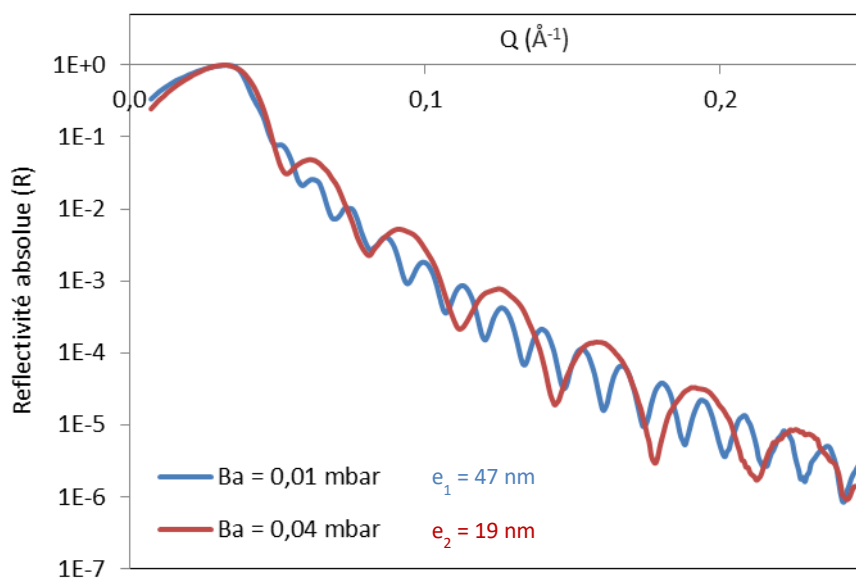


Figure 7 : Réflectogrammes de deux films d'oxyde de titane déposés avec différentes pressions de travail : Ba = 0,01 mbar (en rouge) et Ba = 0,04 mbar (en bleu)

Contrôle de la composition chimique de la couche déposée

L'augmentation de la proportion d'oxygène dans le bâti augmente la teneur en oxygène de l'oxyde de titane déposé, jusqu'à une certaine valeur. La composition chimique de la couche d'oxyde de titane a été évaluée par spectrométrie photo-électronique X (XPS). Deux ratios de gaz ont été testés lors des dépôts d'oxyde de titane : $\text{Ar}/\text{O}_2 = 30/15 \text{ sccm}^1$ et $\text{Ar}/\text{O}_2 = 60/10 \text{ sccm}$.

La spectroscopie XPS permet d'accéder à la composition chimique d'un matériau sur une épaisseur d'environ 10 nm. L'échantillon à analyser, placé dans une chambre sous vide, est irradié par des photons X provenant d'une source monochromatique, par exemple par une anode d'aluminium dont

¹ **sccm** : Standard cubic centimeter per minute. Il s'agit d'une unité permettant de quantifier un débit volumique de gaz.

l'énergie du rayonnement $K\alpha$ est de 1486,6 eV. La dissipation des photons X dans la matière provoque l'éjection d'électrons par effet photoélectrique. Un analyseur hémisphérique permet de séparer les photoélectrons émis en fonction de leur énergie cinétique. En utilisant la relation décrivant l'effet photoélectrique, $h\nu = E_{cin} + E_l$ (où h est la constante de Planck, ν la fréquence du rayonnement X, E_{cin} l'énergie cinétique d'un électron et E_l l'énergie de liaison d'un électron), il est possible de déterminer l'énergie de liaison de chaque électron, qui est caractéristique de son orbitale (moléculaire ou de valence). Ainsi, un spectre de photoélectrons résulte de l'enregistrement de l'intensité d'un courant électrique (en coups par seconde) en fonction des énergies de liaison. La plage d'énergie de liaison balayée peut aller de 0 eV à des valeurs proches de $h\nu$, ce qui constitue le spectre général (ou Survey en anglais). Il est aussi possible de se limiter à des énergies de quelques dizaines d'eV pour améliorer la qualité du signal, par exemple de 282 à 300 eV pour le carbone 1s (électrons ayant une énergie correspondant à l'orbitale 1s du carbone) ou 450 à 470 eV pour le titane 2p (électrons ayant une énergie correspondant à l'orbitale 2p du titane).

Sur les spectres centrés sur les énergies de liaison du Ti 2p, deux pics à 459,5 eV et 465,2 eV, caractéristiques d'un titane IV associé à du TiO_2 sont visibles [3]. Malgré le changement des proportions d'oxygène et d'argon, les deux dépôts sont composés en surface d'une couche de TiO_2 (Figure 8). Dans la suite des travaux, un ratio de gaz $Ar/O_2 = 30/15$ sccm a donc été choisi pour s'assurer d'un taux d'oxygène assez élevé.

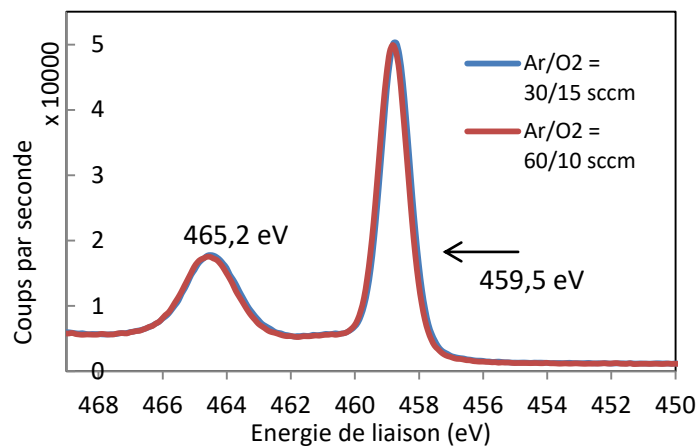


Figure 8 : Spectres centrés sur Ti 2p pour deux dépôts, effectués avec des ratios de gaz différents (P = 300 W, Ba = 0,02 mbar et t = 30 min)

Contrôle de la phase cristallographique

Lors du dépôt, la modification de la température des substrats permet de modifier la cristallinité de la couche de TiO_2 déposée. A température ambiante, une phase amorphe d'oxyde de titane est

obtenue alors que lorsque la température du substrat est maintenue à 400°C pendant le dépôt, une phase anatase (une des phases cristallisée de TiO₂) est obtenue. Ce résultat a été vérifié par spectroscopie Raman avec l'apparition d'un pic intense à 148 cm⁻¹ caractéristique du mode de vibration symétrique O-Ti-O de la phase anatase du TiO₂ [4-6]. En effet, la spectroscopie Raman permet de mettre en évidence des vibrations moléculaires de groupements chimiques présents dans la zone sondée et d'identifier localement la ou les structures chimiques d'un échantillon. L'épaisseur de la couche de TiO₂ étant faible, le pic intense à 520 cm⁻¹ et la bande large vers 900 - 1000 cm⁻¹ proviennent du substrat de silicium (Figure 9).

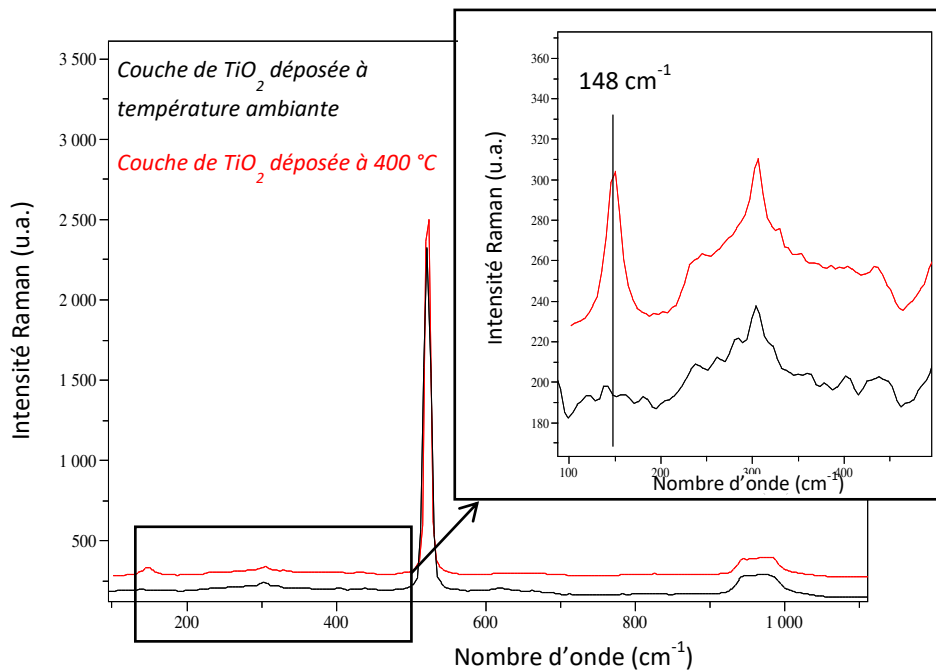


Figure 9 : Spectres Raman de deux couches de titane déposées à température ambiante (en noir) et à 400 °C (en rouge)

Choix des paramètres de dépôt

Les paramètres retenus pour obtenir un film de TiO₂, de rugosité inférieure au nanomètre et d'épaisseur 45 nm environ sont donnés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Paramètres choisis pour les dépôts de TiO₂

Puissance	Pression de travail	Composition des gaz	Temps de dépôt	Température
300 W	0,01 mbar	Ar/O ₂ 30/15 sccm	30 min	Température ambiante (pour obtenir une phase amorphe)

II. Elaboration de surfaces modèles structurées de TiO₂

Afin de préparer des surfaces dont la rugosité et la topographie de surface peuvent être contrôlées à partir des conditions expérimentales, des substrats de silicium orientés (100) ont été attaqués par une solution basique d'hydroxyde de potassium (KOH). Ce traitement basique permet d'attaquer sélectivement certains plans cristallographiques et permet la formation de pyramides en surface dont la taille et le nombre sont déterminés par les conditions expérimentales (Figure 10).

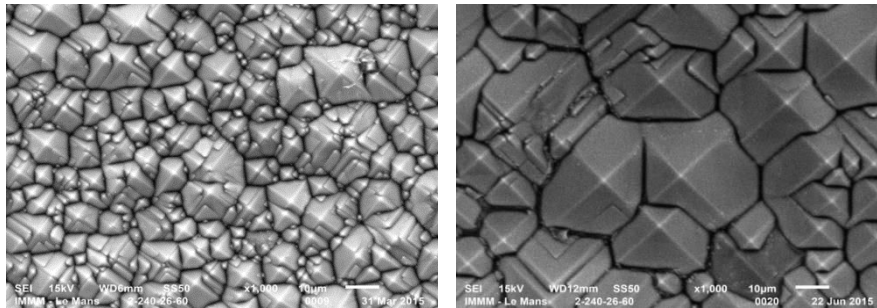


Figure 10 : Images MEB obtenues après attaque basique de substrats de silicium orientés (100)

1. Attaque basique de silicium (100)

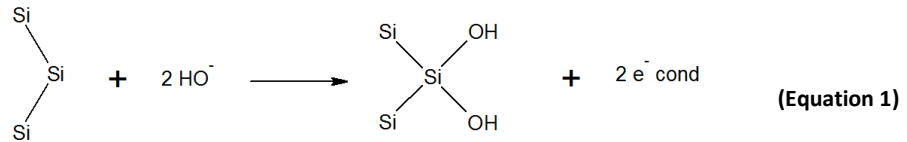
a. Théorie

Le mécanisme d'attaque chimique du silicium par une solution basique a fait l'objet de nombreuses études [7-10], mais la formation des pyramides n'est toujours pas totalement expliquée.

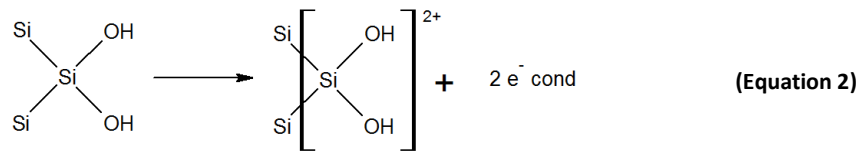
Cette attaque chimique est généralement effectuée dans un récipient en « boucle fermée », en présence ou non d'agitation, et avec chauffage.

Palik *et al.* [7] ont étudié la réaction du KOH sur le silicium orienté (100) par spectroscopie Raman *in situ*. Ils ont montré qu'un des principaux réactifs lors de la réaction est l'ion $\text{SiO}_2(\text{OH})^{2-}$ qui a tendance à polymériser dans la solution. A partir de ce résultat et de leurs observations, Seidel *et al.* [8] ont proposé un mécanisme d'oxydo-réduction pour l'attaque chimique du silicium.

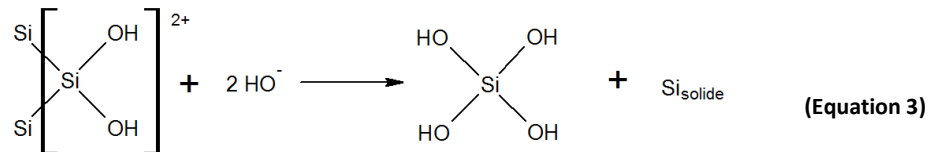
Avec les deux liaisons laissées libres à la surface du silicium orienté (100), deux ions HO^- de la solution peuvent se lier au silicium. Cette réaction libère deux électrons dans la bande de conduction du silicium (Equation 1). Ces électrons restent localisés à proximité de la surface et la probabilité de recombinaison est faible.



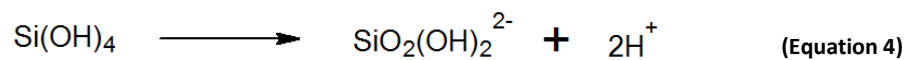
La force de liaison Si-Si est réduite à cause de la forte électronégativité des atomes d'oxygène. Ces atomes de surface peuvent alors participer à la formation d'un complexe à base de silicium, qui est soluble (Equation 2). Cette rupture de liaisons Si-Si en surface est aussi favorisée par l'excitation thermique.



Afin de se détacher totalement de la surface, deux ions HO^- se lient sur le silicium (Equation 3). Ces nouvelles liaisons sont favorisées grâce au pH très élevé de la solution (généralement supérieur à 12). L'oxyde de silicium se détache de la surface sous la forme $\text{Si}(\text{OH})_4$.



Le composé $\text{Si}(\text{OH})_4$ quitte la surface du silicium par diffusion. A cause du pH élevé de la solution, cette espèce neutre n'est pas stable dans l'électrolyte et forme le complexe stable $\text{SiO}_2(\text{OH})_2^{2-}$ (Equation 4), observé en spectroscopie Raman *in situ* par Palik [7].



Les quatre électrons libérés dans la bande de conduction au cours de la réaction peuvent ensuite se recombiner avec des molécules d'eau localisées à proximité de la surface pour former des ions hydroxyde et du dihydrogène, (Equation 5) ce qui explique la présence de bulles observées lors de l'expérience.



La force principale dirigeant la réaction est la différence d'énergie entre les liaisons Si-O (plus forte : 398 kJ/mol) et Si-Si (plus faible : 222 kJ/mol).

Ce mécanisme permet d'expliquer en partie le caractère anisotropique de la réaction. En effet, toutes les faces d'un cristal de silicium ne présentent pas le même nombre de liaisons libres en surface, sur lesquelles peuvent se lier les ions hydroxyde. Par exemple, les faces (100) et (110) présentent deux liaisons libres alors que la face (111) n'en présente qu'une seule, ceci permet d'expliquer la faible vitesse d'attaque sur cette dernière face lors de la formation des pyramides dont les faces sont formées par des plans (111) [8]. Cependant, pour des temps d'immersion plus longs (quelques heures), une attaque des arrêtes a pu être observée [11].

L'isopropanol, utilisé dans la solution, ne perturbe pas le mécanisme de réaction puisque celui-ci ne rentre pas dans l'équation de la réaction. Cependant, selon sa concentration, il peut se comporter comme un masque sur la surface de silicium et ainsi favoriser la création de pyramides. Zubeil [12] a ainsi montré que pour de faibles concentrations d'isopropanol, des agrégats micellaires formaient des micro-masques en surface, facilitant la formation de pyramides. Au contraire, pour des concentrations plus élevées, la surface restait lisse car elle était attaquée uniformément.

Les bulles de dihydrogène libérées lors de la réaction peuvent elle aussi former de micro-masques. Il a ainsi été montré que l'utilisation d'un bain à ultrasons ne permettait pas la formation de pyramides à cause du décrochage des bulles de la surface [13, 14].

b. Choix du protocole

Des wafers de silicium (100) ont été utilisés comme substrats pour l'attaque chimique. Ces derniers ont été préalablement lavés avec un bain à ultrasons pendant 10 min dans une solution d'éthanol à température ambiante. Pour éliminer la couche native d'oxyde se déposant naturellement sur les surfaces de silicium, les substrats ont été immergés dans une solution d'acide fluorhydrique (HF) 1% pendant 2 min. Ils ont ensuite été rincés avec de l'eau distillée et séchés à l'air comprimé.

Un montage à reflux a été utilisé afin de conserver les mêmes quantités de réactifs tout au long de la réaction. La température a été réglée par un bain marie munie d'une agitation magnétique afin de contrôler et homogénéiser la température à l'intérieur du tricol (Figure 11). Chaque substrat a été immergé, un par un, à l'intérieur du ballon à l'aide d'une pince auto-serrante. La solution était composée d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (KOH) et d'isopropanol. Pour chaque expérience, la concentration d'isopropanol a été fixée à 5% w/v et le volume d'eau à 150 ml. Une fois la réaction terminée, une trempe a été réalisée dans de l'eau distillée pour stopper la réaction. Le substrat a ensuite été séché à l'air comprimé.

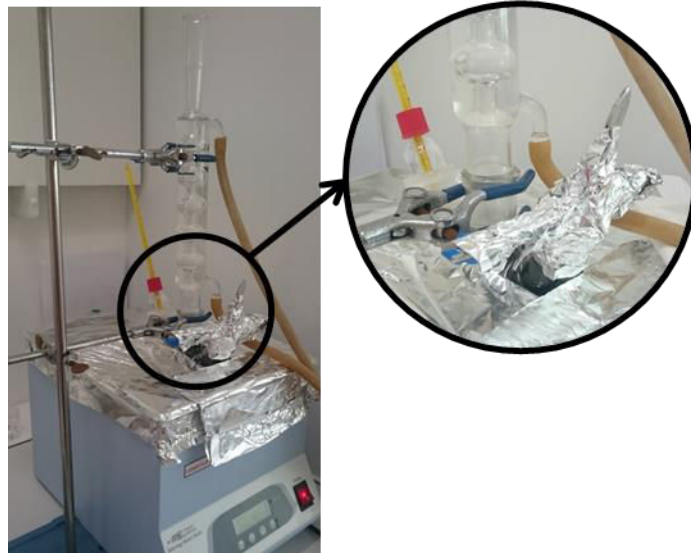


Figure 11 : Photo du montage expérimental avec un zoom sur le col non étanche

Différentes conditions expérimentales ont été testées afin de comprendre l'influence relative des paramètres : concentration en KOH (variant de 5% w/v à 20% w/v) et des temps d'attaque (15 min et 30 min) avec une température de 80°C.

Bien qu'un montage à reflux ait été utilisé lors de l'expérience pour garder les mêmes proportions de réactifs dans le ballon, il est très probable qu'il y ait eu des pertes d'isopropanol lors de l'introduction des échantillons dans le ballon et durant la réaction par le col non étanche contenant la pince (fermé par du papier aluminium) (Figure 11). En effet, la température d'ébullition de l'isopropanol est proche de la température de travail. Afin de garder la même concentration dans la solution de KOH, la solution a été renouvelée régulièrement.

Pour les concentrations de 10% w/v à 20% w/v, l'étude des surfaces par MEB a montré que l'utilisation de la même solution ne garantissait plus la reproductibilité des échantillons. Par conséquent, pour des concentrations élevées, la solution a donc été changée après chaque échantillon.

2. Etude des surfaces

a. Techniques d'analyses

La microscopie à force atomique (AFM), la microscopie électronique à balayage et la profilométrie optique ont été utilisées pour caractériser les surfaces obtenues. Certaines de ces techniques ont montré des limites dans leur utilisation avec ce type particulier de surface.

La microscopie à force atomique permet d'obtenir des images de quelques centaines de nm² à 1000 μm² sur des échantillons présentant des variations de hauteur inférieures à la dizaine de micromètres verticalement. Dans notre cas, seules les surfaces ayant de très petites pyramides ont pu être imagées à cause des limites de déplacement vertical du scanner piézoélectrique (quelques micromètres).

La profilométrie optique paraissait une méthode prometteuse pour l'observation de motifs de tailles micrométriques en surface. En effet, cette méthode basée sur un phénomène d'interférence, permet pour chaque point (x, y) de la surface de déterminer la valeur de la hauteur z. Pour cela, un faisceau lumineux est divisé en deux, une partie est envoyée sur l'échantillon et l'autre vers un miroir de référence. Lorsque l'échantillon est situé à la distance focale, la recombinaison des faisceaux donne une figure d'interférence permettant de déterminer la hauteur du point. Un balayage vertical est effectué pour trouver la meilleure recombinaison des faisceaux. Cependant, la géométrie particulière des pyramides avec des faces lisses faisant un angle de 54,7° avec la base n'a pas permis de renvoyer correctement le faisceau de lumière sur le récepteur et ainsi d'obtenir une image de la surface. L'image en 3D obtenue ne laissait apparaître que les bases carrées des pyramides et les espaces entre les pyramides (Figure 12).

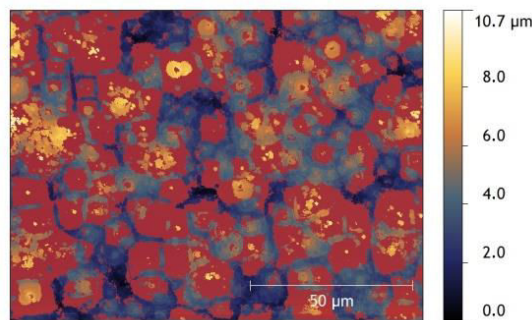


Figure 12 : Image obtenue par profilométrie optique d'une surface avec des pyramides

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet d'obtenir des images de la surface avec des grossissements compris entre X 10 à X 50000 (et plus pour les meilleurs appareils). Les images ont généralement une bonne résolution, de plusieurs nanomètres, et une grande profondeur de champ. L'enceinte, dans laquelle sont réalisées les observations, est dans un vide ordinaire (de l'ordre de 10⁻⁶ - 10⁻⁷ mbar). Le MEB utilisé est un modèle JSM-6510 de marque JEOL. Un faisceau d'électrons, émis par un filament de tungstène, est envoyé sur la surface, il est focalisé en un spot très fin (maximum 200 Å) grâce à des lentilles et des diaphragmes. Ce faisceau est ensuite déplacé point par point et ligne par ligne sur l'échantillon grâce à des bobines électromagnétiques. Pour éviter que des

électrons parasites s'accumulent sur la surface, les échantillons doivent être conducteurs où ces électrons puissent s'écouler vers la masse sur le porte-échantillon. En chaque point, l'interaction entre les électrons et la surface de l'échantillon génère des électrons de basses énergies (électrons secondaires) qui sont ensuite accélérés vers un détecteur, chargé positivement, qui amplifie le signal (Figure 13). L'intensité du signal électrique en chaque point permet d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

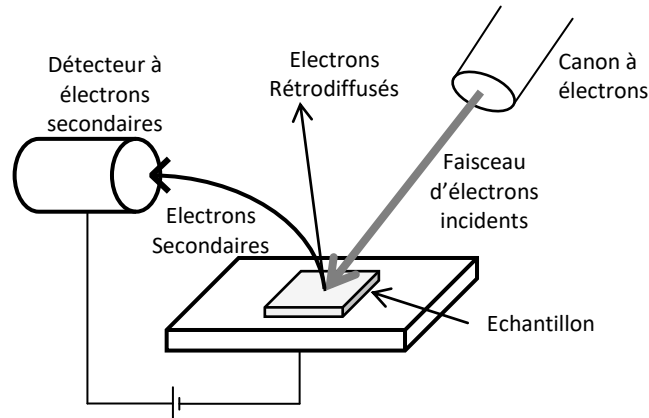


Figure 13 : Principe de fonctionnement de l'imagerie MEB en électrons secondaires

Pour nos analyses, la microscopie électronique à balayage est donc apparue comme la technique d'observation permettant d'obtenir une image de la surface. Cependant, les images obtenues sont en deux dimensions et ne permettent pas de déterminer les paramètres topographiques tels que la rugosité moyenne de surface.

L'homogénéité de chaque échantillon a toutefois été vérifiée par MEB après l'élaboration des surfaces. En effet, l'attaque chimique est réalisée de manière anisotrope et aléatoire sur la surface, mais les différentes images d'un même échantillon (à différents endroits de l'échantillon) montrent que le nombre et la taille des pyramides restent similaires (Figure 14).

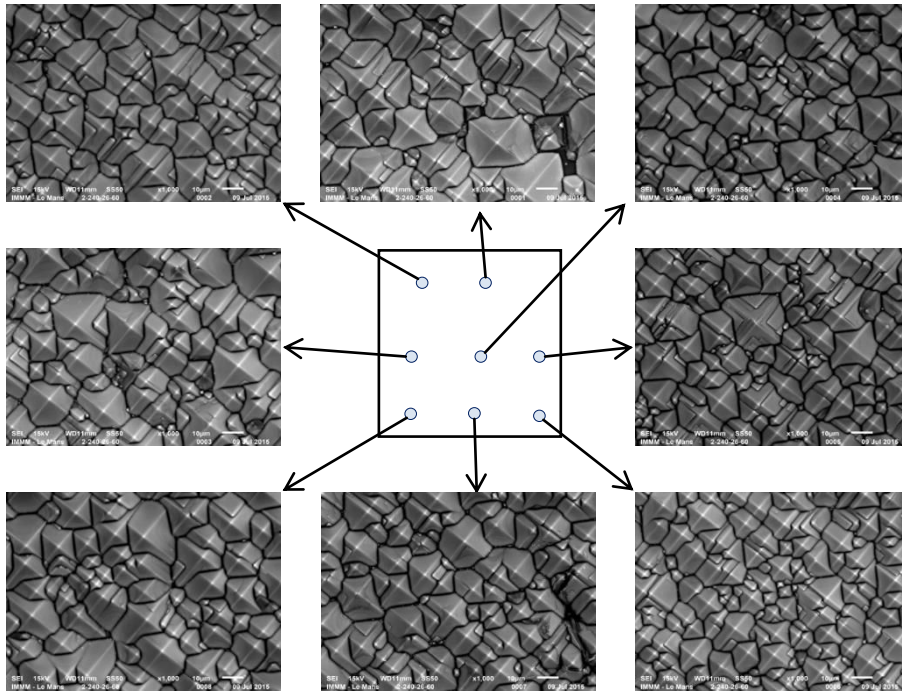
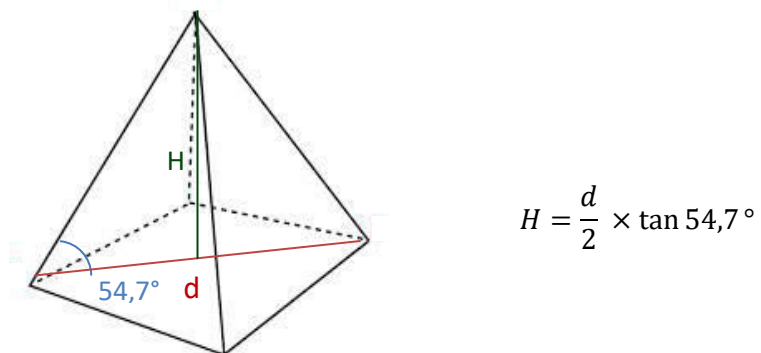


Figure 14 : Etude de l'homogénéité de la surface. Images MEB obtenues en plusieurs points de la surface. Les barres d'échelle représentent 10 μm .

La géométrie particulière des pyramides permet de calculer la hauteur des pyramides à partir des dimensions de la base (Figure 15). En effet, les faces des pyramides sont formées par les plans (111) et le plan de base par le plan (100). L'angle entre une des faces de la pyramide avec la base est de $54,7^\circ$ [15]. Ces mesures sont facilitées lorsque les pyramides sont isolées, néanmoins il est possible d'effectuer ces mesures même lorsque les pyramides sont jointes, par la même méthode.



$$H = \frac{d}{2} \times \tan 54,7^\circ$$

Figure 15 : Géométrie d'une pyramide isolée

Pour obtenir les paramètres topographiques des surfaces, il est possible d'obtenir une image en 3D à partir de la reconstruction stéréoscopique de deux images en 2D. Pour cela, deux images MEB d'une même zone sont nécessaires, l'une avec une rotation de $-\alpha$ et l'autre avec un angle de α (Figure 16). Plusieurs logiciels proposent des algorithmes de reconstruction, ils sont aussi décrits dans la littérature [16].

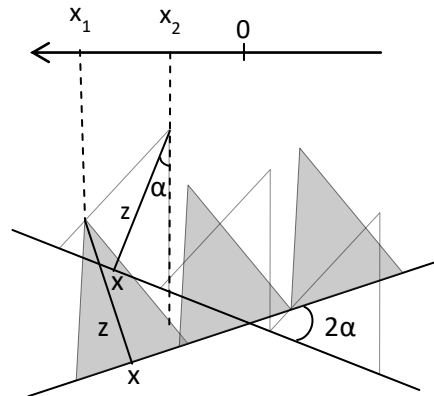


Figure 16 : Projection dans le plan xOz de 2 images MEB en 2D pour effectuer la reconstruction 3D

Les coordonnées d'indice 1 correspondent aux coordonnées d'un point de l'image tiltée d'un angle $-\alpha$ et ceux d'indice 2, aux coordonnées d'un point de l'image tiltée d'un angle α . Les coordonnées (x, y, z) sont les coordonnées du point correspondant de la reconstruction.

Lors d'une rotation de l'échantillon selon l'axe y , pour un point donné, les valeurs de y avant et après la rotation restent les mêmes, soit $y = y_1 = y_2$. Il reste donc à déterminer les valeurs de x et z de la reconstruction stéréoscopique. Ils peuvent être déterminés à partir des coordonnées x_1 et x_2 (déterminés à partir des images en 2D), d'un point identique sur chacune des images tiltées.

$$x_1 = x \cos \alpha - z \sin \alpha$$

$$x_2 = x \cos \alpha + z \sin \alpha$$

Les valeurs de x et z sont donc données par les relations suivantes :

$$x = \frac{x_1 + x_2}{2 \cos \alpha} \text{ et } z = \frac{x_1 - x_2}{2 \sin \alpha}$$

Il est ainsi possible de déterminer, pour chaque point de l'image, les coordonnées (x, y, z) et de reconstruire une image en trois dimensions. A partir de cette reconstruction, des paramètres topographiques tels que la rugosité et la distribution des hauteurs peuvent alors être déterminés (Figure 17).

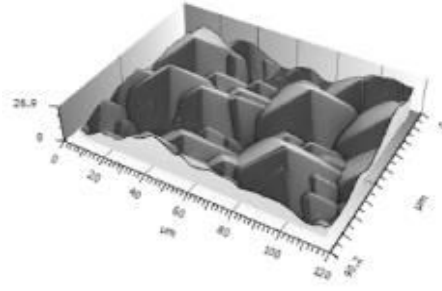


Figure 17 : Image en 3D obtenue après reconstruction stéréoscopique de deux images MEB

b. Contrôle de la topographie : influence des paramètres expérimentaux

La concentration en KOH et le temps de réaction ont un impact important sur la taille, le nombre ou la densité de pyramides sur les surfaces de silicium.

Influence de la concentration en KOH

Afin d'optimiser les paramètres expérimentaux, des concentrations en KOH allant de 5% w/v à 20% w/v ont été utilisées. De manière qualitative, les images MEB montrent une augmentation de la taille des pyramides avec la concentration en KOH (Figure 18).

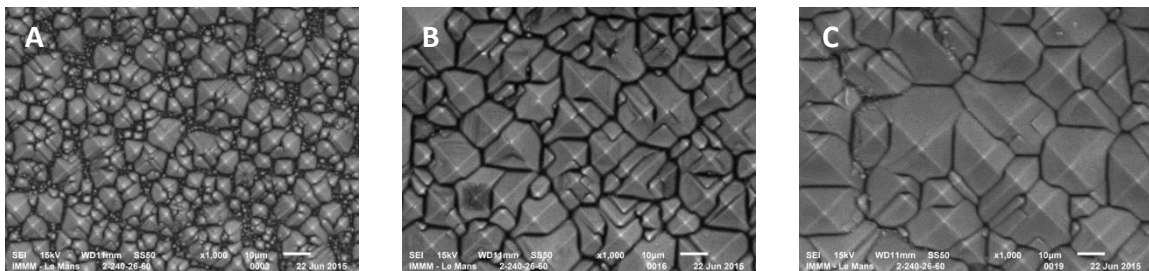


Figure 18 : Images MEB. Surfaces de silicium structurées par attaque basique avec différentes concentrations de KOH pour une même durée d'attaque (30 min), A : 5% w/v KOH, B : 10% w/v KOH et C : 15% w/v KOH. Les barres d'échelle représentent 10 µm.

En augmentant la concentration de KOH, la proportion d'isopropanol diminue dans la solution ce qui entraîne une diminution du nombre de micro-masques en surface, à l'origine de la formation de pyramides. De plus, l'augmentation d'ions HO^- permet une attaque du silicium plus rapide et de manière plus importante, entraînant la formation de pyramides de plus grandes dimensions.

Influence de la durée de la réaction

En fonction de la durée de l'attaque chimique, des différences topographiques sont aussi observables par MEB. En effet, la formation des pyramides se fait progressivement. Pour des temps courts, de petites pyramides sont majoritairement observées en surface contrairement aux temps plus longs. La Figure 19 montre l'évolution de la topographie de surface pour deux temps de réaction.

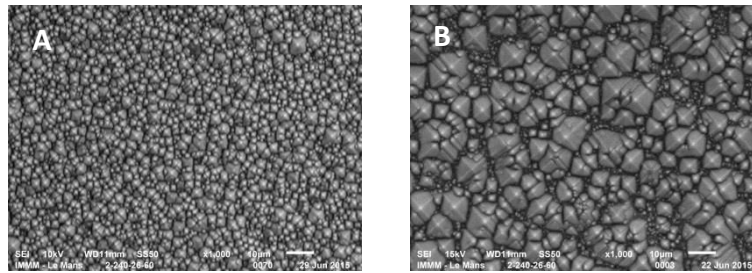


Figure 19 : Images MEB. Surfaces de silicium structurées par attaque basique pendant des durées d'attaque différentes : A : 15 min et B : 30 min (5% w/v KOH). Les barres d'échelle représentent 10 µm.

L'évolution de la taille des pyramides en fonction du temps d'attaque basique peut s'expliquer à l'aide des schémas de la Figure 20. En effet, si l'échantillon reste plus longtemps dans la solution, alors les ions HO^- ont plus de temps pour attaquer la surface de silicium.

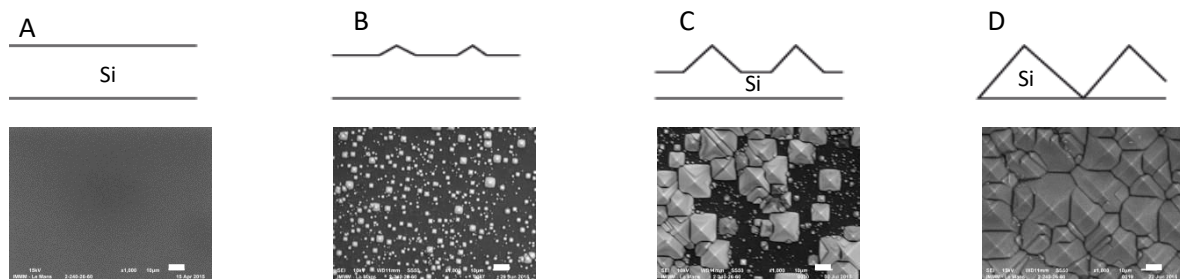


Figure 20 : Hypothèse pour le mécanisme de formation de pyramides en fonction de la durée de la réaction : augmentation du temps d'attaque de A vers D. Les barres d'échelle représentent 10 µm.

c. Conditions de réalisation des échantillons

Lors de l'élaboration des échantillons, la solution alcaline a été changée régulièrement (tous les deux échantillons pour les solutions à 5% KOH ou pour chaque échantillon pour les solutions les plus concentrées) de manière à s'affranchir d'éventuels problèmes de non-reproductibilité. Les conditions résumées dans le Tableau 3 ont été choisies pour réaliser des surfaces homogènes avec des pyramides ayant quatre tailles différentes.

La reconstruction 3D à partir de deux images MEB en 2D a permis d'obtenir les rugosités associées aux surfaces structurées de silicium (Figure 21).

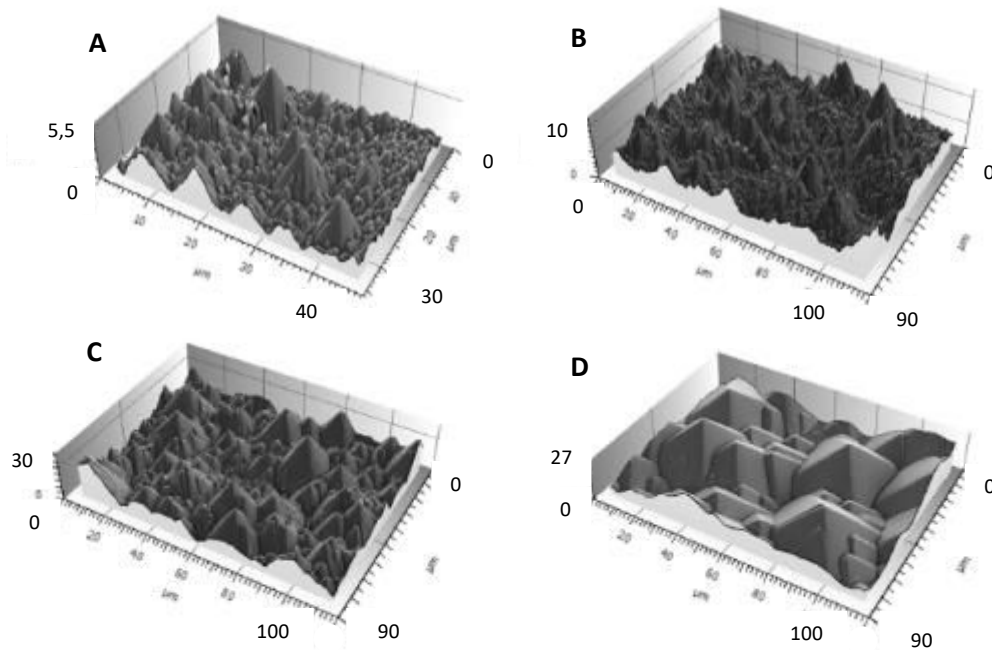


Figure 21 : Reconstructions 3D de surfaces de silicium structurées (Les unités des axes sont en μm).

A : Taille 1, B : Taille 2, C : Taille 3 et D : Taille 4

La hauteur des pyramides reportée dans le Tableau 3 est une moyenne de dix mesures par image, sachant que huit images ont été prises sur un échantillon, soit 80 valeurs par échantillon. Seules les dix plus grandes pyramides de chaque image ont été prises en compte. Les valeurs de rugosités ont été obtenues à partir des reconstructions 3D.

Tableau 3 : Conditions de réalisation des échantillons et paramètres topographiques

	Concentration en KOH	Temps de réaction	Température	Taille des pyramides	Rugosité Ra
Taille 1	5% w/v	15 min	80°C	$3,6 \pm 1,2 \mu\text{m}$	0,6 μm
Taille 2	5% w/v	30 min	80°C	$6,8 \pm 1,7 \mu\text{m}$	1,1 μm
Taille 3	10% w/v	30 min	80°C	$12,4 \pm 3,4 \mu\text{m}$	1,8 μm
Taille 4	15% w/v	30 min	80°C	$20,8 \pm 6,7 \mu\text{m}$	4,3 μm

Les valeurs des rugosités pour ces quatre types d'échantillons sont proches des valeurs de rugosité des chambres implantables commerciales (Ra entre 0,2 et 2,2 μm , cf. Chapitre 1).

3. Dépôt d'oxyde de titane sur les échantillons structurés

Le silicium n'est pas considéré comme un biomatériau. Pour les analyses de microbiologie, un film mince d'oxyde de titane a donc été déposé sur les surfaces structurées dans les conditions décrites précédemment (cf. Partie I.2).

Pour chaque dépôt réalisé sur un échantillon structuré, un échantillon lisse de silicium a aussi été intégré dans le bâti pour vérifier la qualité du dépôt en termes d'épaisseur et de chimie de surface.

Le dépôt d'oxyde de titane n'étant que de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur, la couche déposée ne modifiait pas la topographie ni la hauteur des pyramides précédemment mesurées.

III. Modification de la topographie/rugosité de surfaces d'alliage de titane

L'intérieur des chambres implantables commerciales est généralement composé d'alliage de titane grade 2 ou grade 5.

Afin de comparer les propriétés anti-adhérentes des échantillons élaborés et ceux utilisés dans les chambres implantables. Des échantillons d'alliage de titane grade 2 et grade 5 sous forme de disques de diamètre 1 cm et de hauteur 2 mm (ou 5 mm) ont été fournis par la société Eukamed (Allemagne) et leurs surfaces ont été modifiés par plusieurs méthodes : par polissage mécanique, par sablage et par électroérosion (Electrical discharge machining : EDM, en anglais). Chacune de ces techniques permet de modifier de façon différente l'état de surface des échantillons.

1. Polissage mécanique

a. Description de la technique et préparation des échantillons

Le polissage consiste à rendre une surface plus lisse par l'utilisation de disques abrasifs. Pour cela, les disques abrasifs (souvent composé de SiC) sont mis en rotation à vitesse constante et les échantillons sont mis en contact avec ces disques avec une certaine force. Deux types de polissage existent : manuel ou automatique. Pour le polissage manuel, les disques abrasifs sont mis en rotation et l'utilisateur exerce une force sur l'échantillon. Pour le polissage automatique, un porte-échantillon

maintient les échantillons avec une force connue pendant que les disques abrasifs sont mis en rotation. La pression exercée sur les échantillons, le temps de polissage, la vitesse de rotation des disques abrasifs et leur matériau sont des facteurs influençant les propriétés topographiques. Le polissage s'effectue en commençant par les papiers les plus abrasifs ayant de gros grains (papier SiC avec un numéro faible) vers des papiers abrasifs ayant des grains de plus petite taille (papier SiC avec un numéro élevé).

Avant le polissage, les échantillons ont été enrobés dans une résine acrylique (Figure 22). Trois à quatre échantillons ont été mis dans une même résine, pour appliquer les mêmes conditions expérimentales.

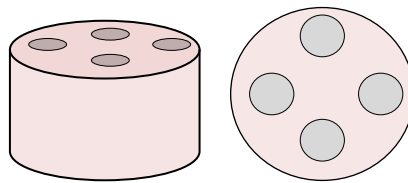


Figure 22 : Schéma des échantillons dans la résine (vue de côté et vue de haut)

Le polissage mécanique des surfaces a été utilisé dans deux cas :

- pour rendre la surface suffisamment homogène (pour éliminer des stries de découpe très marquées) en limitant les rayures pour que les traitements ultérieurs puissent être reproductibles,
- pour rendre la surface lisse avec une rugosité R_a inférieure à une centaine de nanomètres.

Dans le premier cas, les échantillons d'alliage de titane enrobés ont été polis sur un appareil à polissage manuel. Plusieurs papiers abrasifs ont été successivement utilisés : SiC 180, SiC 320 et SiC 800. Le numéro correspond à la densité de grain par unité de surface. Ce mode de polissage ne permet pas un polissage parfait, mais il permet de rendre la surface homogène.

Dans le second cas, l'objectif a été de mettre au point un protocole permettant d'obtenir de manière répétable une rugosité inférieure à une centaine de nanomètres. Pour cela, un appareil de polissage automatique (Struers) a été utilisé afin de maîtriser la force, le nombre de tours par minute et le temps.

Les paramètres indiqués dans le Tableau 4 ont été choisis pour cette méthode de polissage.

Tableau 4 : Protocole utilisé pour polir les échantillons de manière automatique

Papier SiC	Force (N)	Vitesse de rotation (tours/min)	Temps (s)
320	20	300	120
800	20	300	120
1200	20	300	120
4000	20	300	120

b. Analyse des surfaces

Les surfaces élaborées ont été observées par AFM et par profilométrie optique. L'AFM ne permet d'observer que des surfaces de taille réduite ($< 40 \times 40 \mu\text{m}^2$). Elle a permis d'observer avec une plus grande résolution la surface en cas de faible rugosité (hauteurs limitées à quelques micromètres). La profilométrie optique a été privilégiée pour les surfaces plus rugueuses, pour observer des zones plus grandes (de l'ordre de $0,23 \times 0,17 \text{ mm}^2$) et en déduire la rugosité moyenne de surface.

Le polissage manuel d'un échantillon d'alliage de titane grade 5 permet d'aplanir la surface (Figure 23). Les rayures présentes sur la surface sont de relativement faible profondeur (inférieure à $2 \mu\text{m}$) par comparaison avec les différences de hauteur sur l'échantillon brut (environ $25 \mu\text{m}$). Après un polissage manuel, la rugosité Ra était d'environ $0,3 \mu\text{m}$ pour l'alliage de titane grade 5 et de $0,2 \mu\text{m}$ pour les alliages de grade 2.

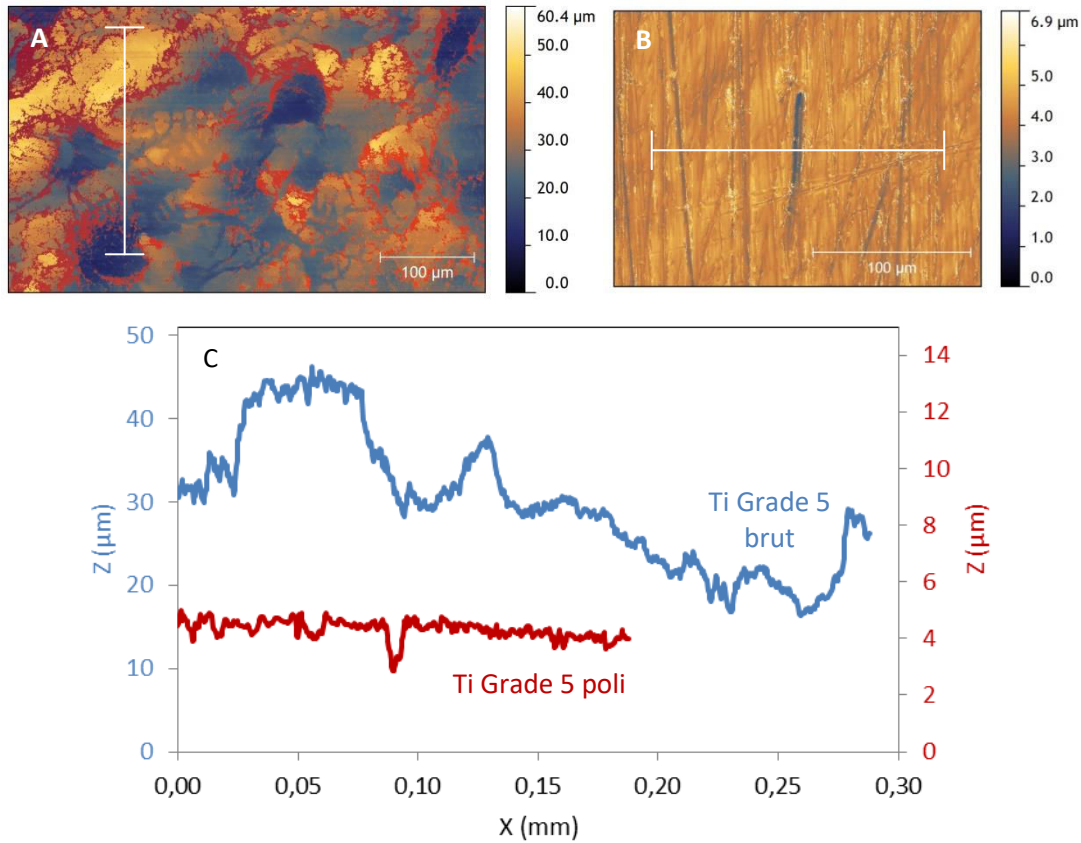


Figure 23 : Images obtenues par profilométrie optique d'une surface de Ti grade 5 :
 A : Sans modification de surface (brut) ($R_a = 7 \pm 0,5 \mu\text{m}$), B : Surface polie manuellement ($R_a = 0,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$) et
 C : Profils de hauteurs des segments des images A et B

Après le polissage automatique, une observation AFM a été réalisée du fait de la faible rugosité de surface des échantillons. Trois images ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) d'une même surface ont été prises afin de mesurer la valeur moyenne de la rugosité sur la surface. Les surfaces d'alliages de titane grade 2 et grade 5 présentent bien une rugosité inférieure à 100 nm (Figure 24).

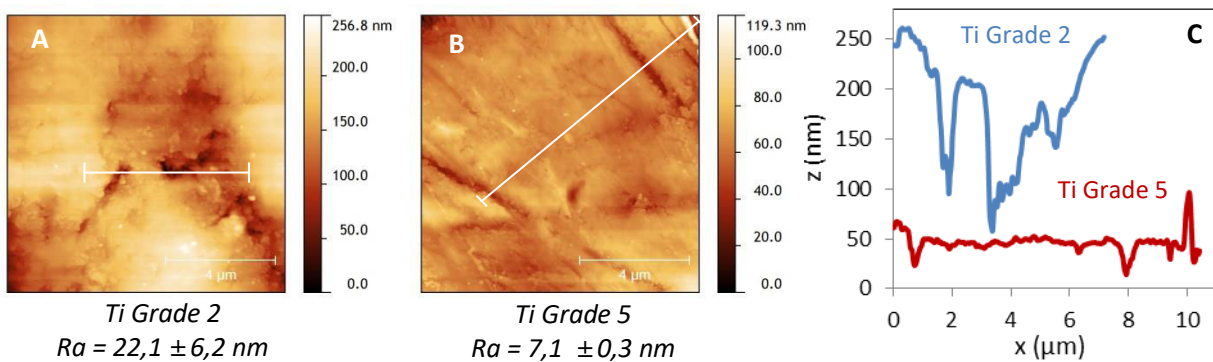


Figure 24 : Images AFM ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) des surfaces polies d'alliages de titane A : grade 2 et B : grade 5 et
 C : Profils de hauteurs pour les segments des images A et B

2. Sablage

Le sablage a été réalisé à l'IUT Génie Mécanique & Productique du Mans sur un appareil « maison » développé par un groupe d'étudiants.

a. Description de la technique et préparation des échantillons

La méthode de sablage permet de modifier la topographie d'une surface en envoyant à haute pression un matériau abrasif. Ce matériau, sous forme de poudre, peut avoir différentes compositions et tailles. Ainsi, plusieurs paramètres tels que la pression à laquelle le matériau est envoyé, la distance entre le pistolet de sablage et l'échantillon, le temps de sablage et la composition du matériau abrasif modifient les propriétés topographiques de surface.

Le sablage a été réalisé sur les échantillons d'alliage de titane et grade 5 préalablement polis, de manière à éliminer la topographie initiale (les échantillons d'alliage de titane grade 2 ne présentait pas une topographie marquée). La pression de l'appareil étant fixe, seule la durée de sablage a été optimisée de manière à obtenir des états de surface reproductibles. Les mesures de rugosité ont été effectuées avec un rugosimètre mécanique (Mitutoyo, modèle SJ-410). A partir d'une certaine durée de sablage, la rugosité de l'échantillon n'évolue plus (Figure 25). Le temps de sablage par échantillon a donc été fixé à 1 min par échantillon de manière à se situer sur ce plateau de rugosité maximum. Pour obtenir des valeurs de rugosité différentes pour un même alliage, deux matériaux abrasifs ont été utilisés : des billes de silice et des billes de garnet (30/60 Mesh, 600-200). Ce dernier est un minéral présentant des propriétés abrasives plus importantes que la silice.

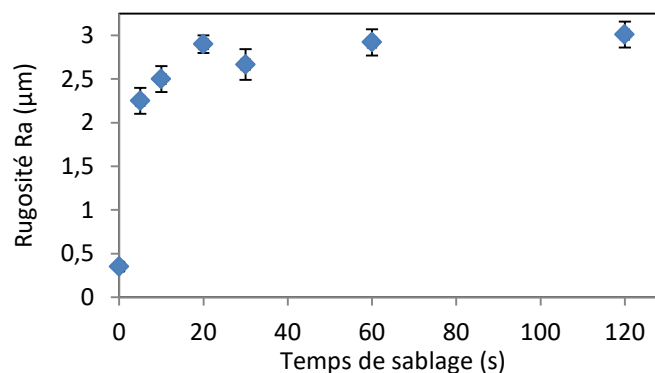


Figure 25 : Evolution de la rugosité en fonction du temps de sablage (Ti grade 5 - Garnet)

b. Analyse des échantillons

Les surfaces d'alliage modifiées par sablage ont été observées en microscopie électronique à balayage (Figure 26) et par profilométrie optique pour obtenir les paramètres topographiques de surface (Figure 27).

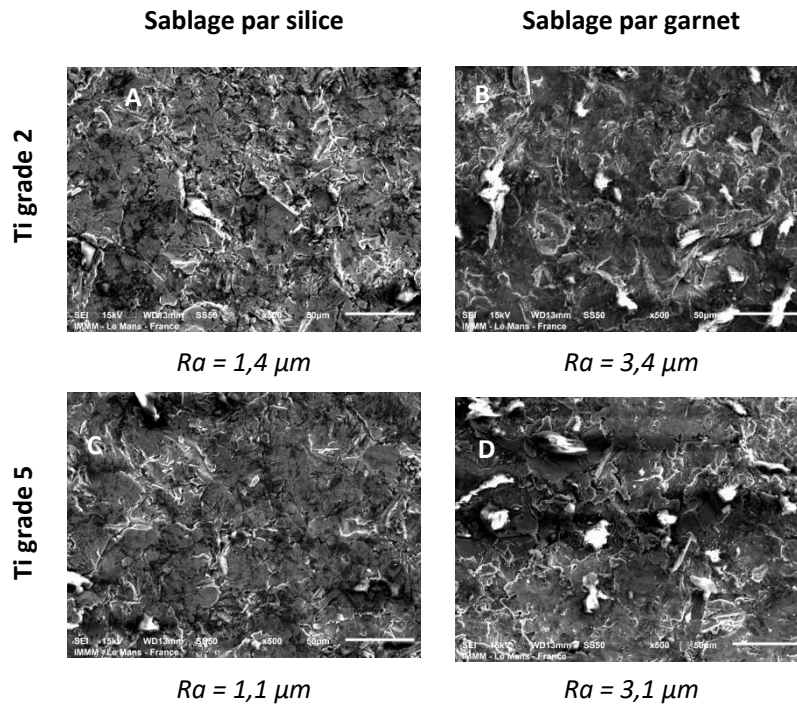


Figure 26 : Images MEB des surfaces d'alliage de titane sablées : Ti grade 2 (A et B) et Ti grade 5 (C et D)

L'alliage de titane grade 5 a une dureté plus importante comparé à l'alliage de titane grade 2 (respectivement 300 VHN contre 200 VHN, dureté Vickers). D'après les valeurs de rugosité obtenues, pour un même matériau abrasif, la rugosité est légèrement plus faible sur les échantillons de titane grade 5, du fait de sa plus grande résistance face aux matériaux abrasifs.

Les échantillons de titane grade 5 et grade 2 ont été répartis en deux groupes en fonction de leur rugosité : ceux avec une rugosité faible de $1,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ et ceux avec une rugosité plus importante de $3,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Ces rugosités mesurées sont de l'ordre de grandeur de celles obtenues avec les échantillons ayant des pyramides en surface.

Les images enregistrées par profilométrie optique permettent de comparer les topographies de surface et les variations de hauteur pour les surfaces polies et les surfaces sablées avec les billes de silice et avec les billes de garnet (Figure 27).

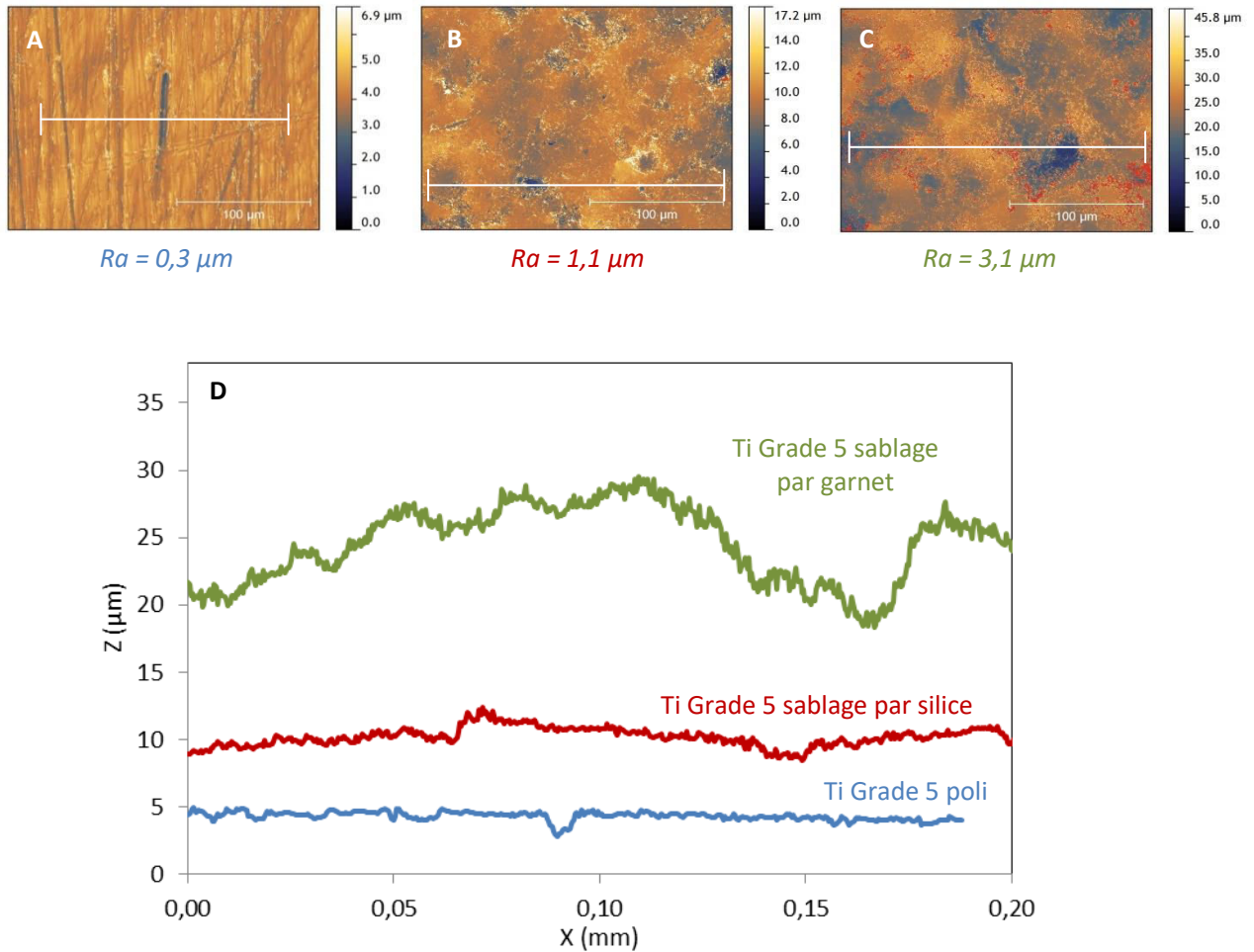


Figure 27 : Images obtenues par profilométrie optique pour des surfaces de titane grade 5. A : surface polie, B : surface sablée par silice, C : surface sablée par garnet et D : profils de hauteurs des segments des images A, B et C

Les variations de hauteur de la surface polie et de la surface sablée par les billes de silice sont similaires (inférieure à 3 μm), bien que leur rugosité et leur topographie soient différentes. Sur la surface polie, le maximum de profondeur est obtenu pour une seule rayure, alors que sur la surface sablée, les trous de cette profondeur sont répartis de manière aléatoire sur la surface. La surface de titane sablée avec du garnet montre des différences de hauteur plus importantes (environ 10 μm) (Figure 27). La largeur des trous en surface est de l'ordre de 3 à 5 μm pour la surface polie et la surface sablée par la silice. Elle est plus importante sur la surface sablée avec des billes de garnet, de l'ordre de 10 μm.

Sur une épaisseur moyenne de 1 μm, l'analyse dispersive d'énergie (EDX) couplée au MEB permet de procéder à une analyse chimique. Lorsque les électrons émis interagissent avec la surface, des photons X sont aussi générés. Le détecteur EDX permet de trier les photons en fonction de leur énergie et comme chaque valeur d'énergie des photons est caractéristique d'un niveau d'énergie

d'un élément chimique, il est ainsi possible de déterminer les éléments chimiques présents dans le volume sondé.

Une analyse EDX des échantillons d'alliage de titane grade 5 a été réalisée après sablage par la silice et le garnet afin d'étudier un potentiel changement de composition chimique. La proportion d'oxygène présente est relativement faible sur la surface brute de titane grade 5 (environ 4%), elle augmente lorsque le sablage est réalisé avec de la silice (21%) et avec le garnet (42%). Dans le même temps, la proportion de titane diminue lorsque celle d'oxygène augmente. Ainsi, quand l'échantillon est attaqué par sablage, alors une couche d'oxyde de titane de plus en plus épaisse se forme en surface. Cette couche d'oxyde est d'autant plus importante que le sablage est abrasif (proportion d'oxygène plus importante après un sablage par garnet que par silice). La proportion d'aluminium, provenant de l'alliage, diminue de moitié après sablage par du garnet alors que la proportion de vanadium reste constante.

3. Electroérosion

Les modifications de topographie par électroérosion ont été réalisées à l'école des Arts et Métiers d'Angers (ENSAM) en collaboration avec Etienne Pessard.

a. Principe de la méthode

L'électroérosion est un procédé d'usinage qui permet d'enlever de la matière d'un échantillon, le plus souvent conducteur, par des décharges électriques.

Pour la réalisation des échantillons, une électrode, un bain contenant un liquide diélectrique et la pièce à usiner sont nécessaires. Une tension est imposée entre l'électrode et la pièce conductrice à usiner ; lorsque cette tension devient supérieure à la tension de claquage, le diélectrique va laisser passer le courant, en certains points. Ce courant est transformé en chaleur et le matériau à usiner s'échauffe fortement en ces points. L'apport de courant est ensuite arrêté et, en ces points, le métal en fusion s'évapore, laissant un petit cratère de quelques μm^2 (Figure 28). Ce procédé permet d'obtenir de manière précise et répétable un état de surface et permet d'éviter toute action mécanique. La modification de la tension et du temps d'usinage permet de modifier la rugosité de surface obtenue.

Pour obtenir une topographie déterminée, il est possible d'usiner l'électrode de manière à ce qu'elle reproduise petit à petit sa forme, en négatif, sur le matériau à usiner. Ce procédé nécessite néanmoins d'usiner préalablement l'électrode, en utilisant des matériaux plus facilement usinable. L'usinage des pièces par ce procédé est cependant relativement lent, avec une consommation électrique élevée.

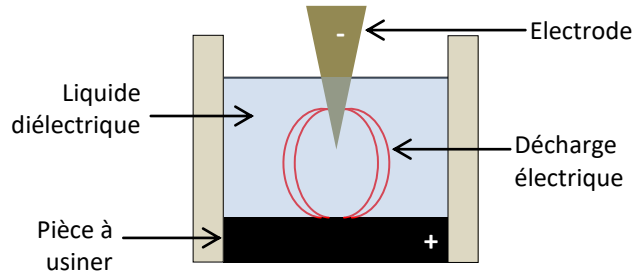


Figure 28 : Principe de fonctionnement de l'électroérosion

b. Analyse des échantillons

La microscopie électronique à balayage a été utilisée pour obtenir des images des surfaces. L'analyse topographique des échantillons a été réalisée par profilométrie optique afin d'obtenir certaines caractéristiques dimensionnelles des surfaces modifiées.

Les échantillons d'alliage de titane grade 5 ont été classés en cinq groupes en fonction de leur rugosité. Les images MEB des différents types d'échantillons obtenus par EDM sont présentées en Figure 29. Les échantillons ont été obtenus à partir d'échantillons de titane grade 5 bruts.

La rugosité de chaque groupe est donnée dans le Tableau 5. Les profondeurs et les largeurs maximales moyennes ont été calculées à partir des valeurs obtenues venant de quatre profils de hauteurs sur un échantillon de chaque groupe (moyenne de 5 à 12 valeurs). La Figure 30 présente un profil de hauteurs pour chaque groupe d'échantillons.

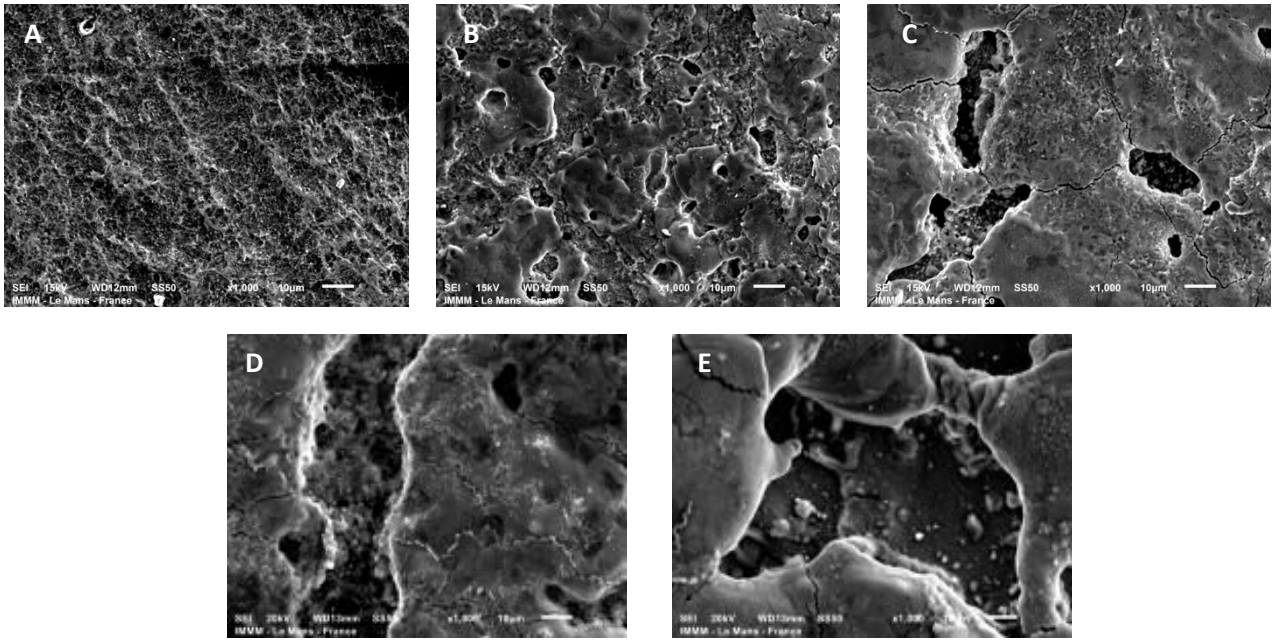


Figure 29 : Images MEB des surfaces électro-érodées. A : Surface brute, B : Taille 1, C : Taille 2, D : Taille 3 et E : Taille 4. Les barres d'échelle représentent 10 µm.

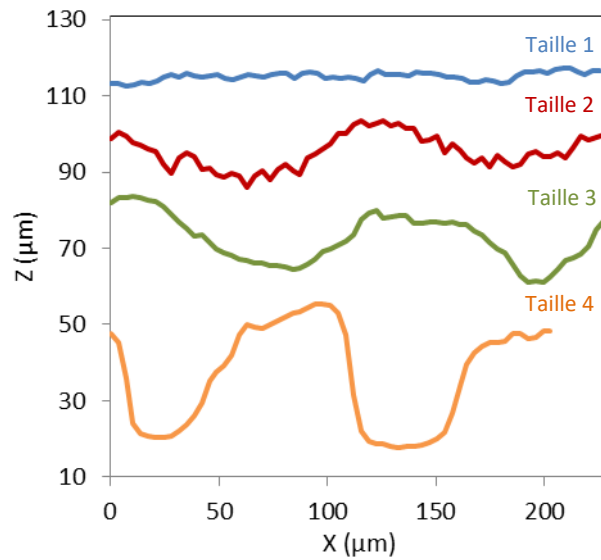


Figure 30 : Profils de hauteurs pour une section d'un des échantillons de chaque groupe

Tableau 5 : Paramètres topographiques pour chaque groupe d'échantillons

Groupe	Rugosité (µm)	Profondeur moyenne des trous (µm)	Largeur maximale moyenne des trous (µm)
Surface brute	0,54 ± 0,05	-	-
Taille 1	1,3 ± 0,1	4,2 ± 1,2	30,9 ± 12,1
Taille 2	2,2 ± 0,2	10,7 ± 2,1	96 ± 12
Taille 3	3,6 ± 0,3	18,9 ± 2,7	96,7 ± 22
Taille 4	5,1 ± 0,4	25,7 ± 1,7	79 ± 6,5

La mesure des hauteurs et largeurs moyennes des trous présents sur les surfaces électro-érodées a été déterminée à partir des images de profilométrie optique. Plus la rugosité augmente et plus la profondeur des trous augmente, de 4 μm pour la taille 1 jusqu'à 26 μm pour la taille 4 (Tableau 5 et Figure 30). La largeur maximale des trous est relativement faible (environ 31 μm) pour les échantillons de plus faible rugosité alors qu'elle atteint une valeur plus élevée (presque 100 μm) dès que la rugosité augmente.

IV. Fonctionnalisation de surfaces de titane

La fonctionnalisation de surface a permis de modifier le caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces. Un greffage moléculaire a été réalisé sur des surfaces d'oxyde de titane par des fonctions biphosphonates. Deux types de molécules ont été utilisées : l'un ayant une extrémité perfluo(poly)éther et l'autre se terminant par un groupement poly(éthylène-glycol) (PEG).

1. Mécanisme de greffage

La fonction phosphonate a déjà été utilisée pour des fonctionnalisations sur de l'oxyde de titane et a montré un bon greffage, avec une meilleure accroche que d'autres groupements comme les fonctions carboxylique ou éther [17].

Plusieurs mécanismes de greffage ont été proposés pour expliquer l'accroche du groupement phosphate sur des surfaces d'oxyde : monodenté, bidenté ou tridenté [18, 19] (Figure 31).

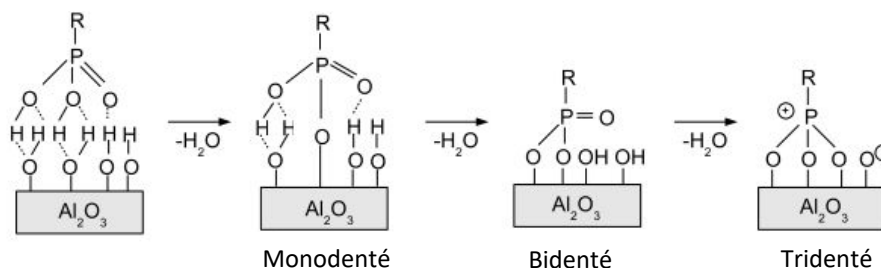


Figure 31 : Schéma du mécanisme de greffage du groupement phosphonate sur un oxyde métallique [18]

Selon ce mécanisme, les groupements phosphonate sont dans un premiers temps adsorbés en surface avant que des liaisons covalentes se forment entre les fonctions hydroxyle de la surface et les groupements phosphonate. La Figure 31 résume ce mécanisme sur un oxyde d'aluminium, similaire à

celui sur du TiO₂. Le mode de greffage a été mis en évidence par RMN du phosphore et par spectroscopie infra-rouge [18, 19]. Ainsi selon les molécules et les substrats, les trois différents types de greffage ont pu être observés.

Une préparation des substrats est nécessaire pour augmenter la quantité de fonctions hydroxyle (M-OH) en surface et ainsi activer la surface. Différents protocoles ont été proposés dans la littérature pour oxyder la surface :

- Oxydation par chauffage à 400°C pendant 30 min [20],
- Oxydation par UV-O₃ [21, 22],
- Immersion dans une solution NH₃/H₂O₂ et rinçage à l'eau [23].

La fonctionnalisation des échantillons se fait ensuite par immersion dans la solution contenant la molécule dissoute. Plusieurs protocoles existent dans la littérature qui se différencient par la durée, la température ou la méthode d'immersion (par exemple, retirer l'échantillon de la solution ou laisser la solution s'évaporer) [20, 21, 23, 24].

2. Choix des molécules et protocole de greffage

Choix des molécules

Les molécules utilisées ont été synthétisées par la société Surfactis Technologies (Angers). Deux types de molécules ont été utilisés : les molécules 08-201 et 08-202 (respectivement BpF et BpF-2) comportant un groupement perfluoré (Figure 32), donnant un caractère hydrophobe à la surface une fois ces molécules greffées et les molécules 11-201 et 11-204 (respectivement BpOH-1 et BpOH) comportant des groupements éthylène glycol (Figure 33) qui rendent les surfaces hydrophiles. Des essais de cytotoxicité ont été réalisés selon la norme ISO 10993-5:2010 et n'ont montré aucun effet cytotoxique potentiel de ces molécules dans les conditions de l'étude (Annexe 2).

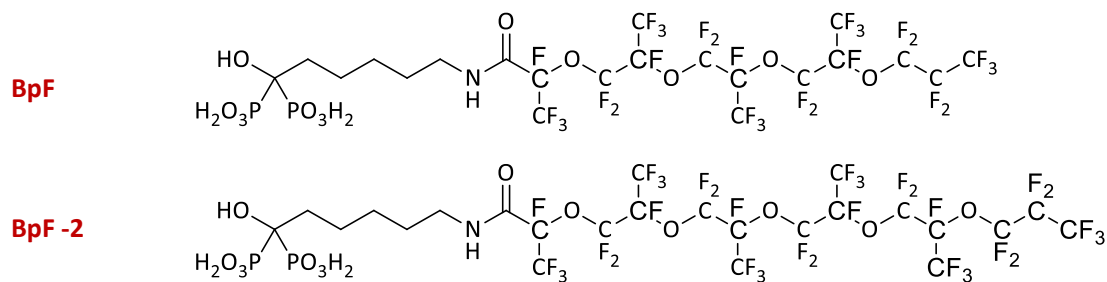


Figure 32 : Formules chimiques des molécules fluorées BpF et BpF-2

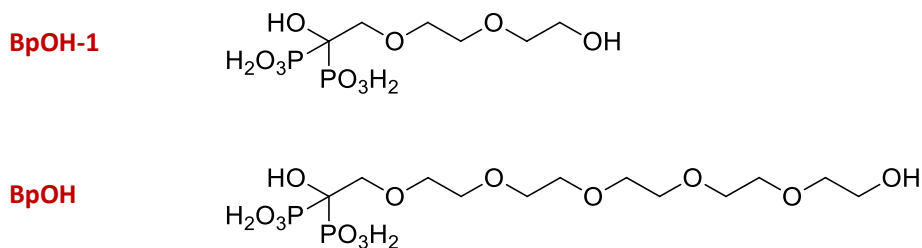


Figure 33 : Formules chimiques des molécules portant les groupements éthylène glycol BpOH-1 et BpOH

Protocole de greffage

Le greffage a été effectué sur des substrats de silicium recouverts d'une couche mince de TiO_2 déposée par pulvérisation cathodique.

L'activation des surfaces a été réalisée par irradiation UV-Ozone. Plusieurs temps d'irradiation ont été testés afin de déterminer la durée optimale pour créer le maximum de liaisons OH en surface (la surface devient plus hydrophile). Pour cela, l'angle de contact a été mesuré après chaque temps d'irradiation. Plus le nombre de fonctions OH en surface est élevé et plus l'angle de contact sera faible et la surface plus hydrophile. Un tel traitement est aussi intéressant car il permet d'éliminer les espèces organiques physisorbées en surface. [21]

La valeur de l'angle de contact décroît fortement après quelques minutes d'irradiation UV jusqu'à atteindre un palier en dessous de 10° . Ce résultat ne dépend pas de l'intervalle de temps entre deux irradiations. Pour activer les surfaces avant fonctionnalisation, un temps d'irradiation de 10 min a été choisi pour obtenir un angle de contact inférieur à 10° (Figure 34).

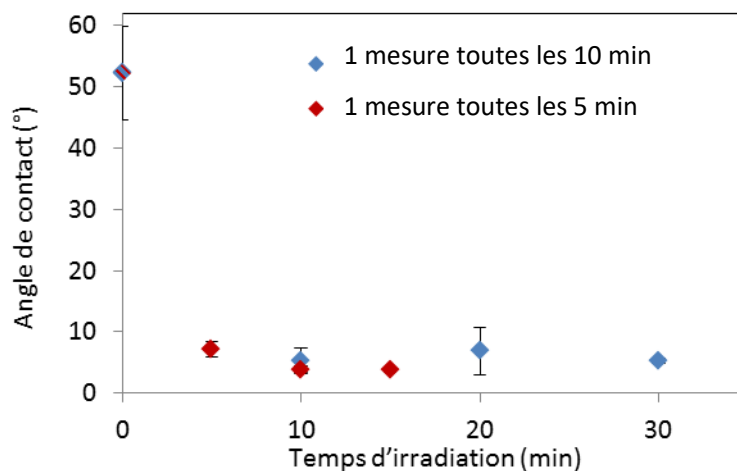


Figure 34 : Angle de contact en fonction du temps d'irradiation

Une fois les surfaces activées, un protocole de greffage permettant d'obtenir des modifications chimiques de surface reproductibles a été mis au point. Des mesures d'angle de contact ainsi que des analyses de topographie de surface par AFM ont permis de valider le protocole.

Dans une étude réalisée avec des molécules ayant un groupement biphosphonate et similaires aux molécules BpOH et BpF [22], le greffage d'une monocouche moléculaire avait été réalisée en immergeant une surface d'oxyde de titane dans une solution 10^{-3} mol/L de cette molécule dans de l'éthanol pur. La surface avait ensuite été rincée avec de l'éthanol, pour éliminer d'éventuelles molécules adsorbées, puis séchée à l'air comprimé.

Pour optimiser les conditions de greffage, différents temps d'immersion ont été testés : quelques secondes (instantané), 5 min, 10 min, 15 min, 20 min et 24 h. Les valeurs des angles de contact sont reportées sur la Figure 35. Pour chacune des molécules, à partir d'un temps d'immersion de quelques secondes pour les molécules hydrophiles et dix minutes pour les molécules hydrophobes, la valeur de l'angle de contact atteint un plateau. Ceci peut s'expliquer par la forte réactivité des surfaces activées par UV-ozone. Pour une durée de 24 h, l'angle de contact est identique à celui obtenu pour des temps d'immersion plus courts.

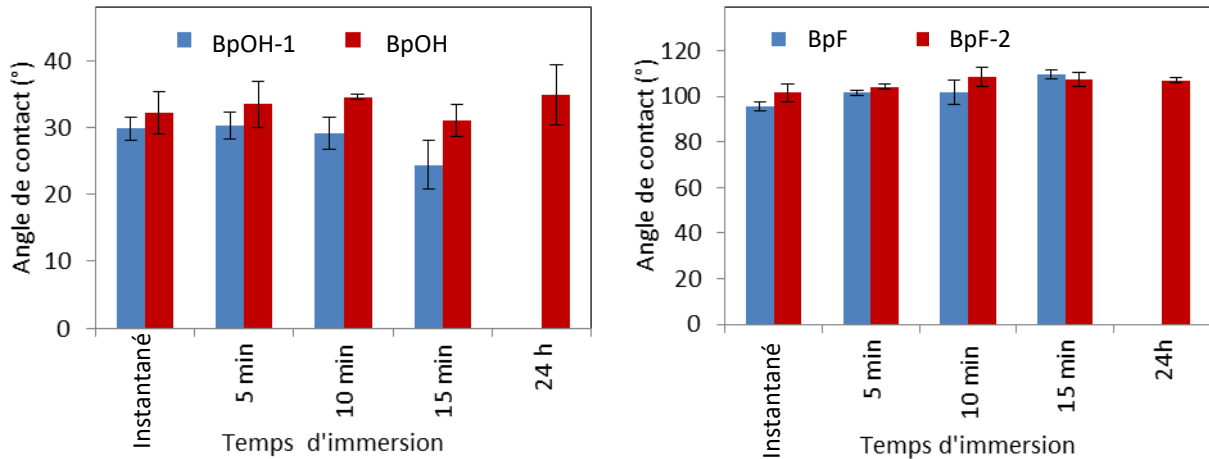


Figure 35 : Evolution de l'angle de contact des surfaces de TiO₂ fonctionnalisées en fonction du temps d'immersion pour les quatre molécules

L'hydrophobie des surfaces est la même quelle que soit la longueur de la molécule fluorée. En revanche, le caractère hydrophile des autres molécules est un peu plus marqué pour les molécules ayant une longueur de chaîne plus courte. Le greffage des deux molécules fluorées a bien donné une surface hydrophobe avec un angle de contact légèrement supérieur à 100°. Le greffage des deux autres molécules a permis de rendre la surface hydrophile avec un angle de contact inférieur à 35°.

Compte tenu des résultats, un temps d'immersion de 15 min, dans une solution à 2×10^{-3} mol/L pour les molécules BpOH-1 et BpOH et 10^{-3} mol/L pour les molécules BpF et BpF-2 dans de l'éthanol pur a donc été choisi. Après greffage, la surface a été systématiquement rincée avec de l'éthanol pour éliminer d'éventuelles molécules non greffées.

3. Analyse topographique et chimique des surfaces

Une fois les surfaces d'oxyde de titane fonctionnalisées, des analyses ont été effectuées par AFM afin de déterminer l'état de surface et par XPS pour vérifier la composition chimique de surface.

Analyse topographique

L'analyse topographique des surfaces a été effectuée par microscopie AFM. Plusieurs images ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de la surface ont été enregistrées à différents endroits de l'échantillon pour vérifier que la surface ne comportait pas de multicouches moléculaires (Figure 36). Nos analyses ont permis de

conclure à la formation d'une monocouche moléculaire sur l'ensemble de la surface des échantillons. La rugosité moyenne des surfaces fonctionnalisées (hydrophile et hydrophobe) était similaire à celle des surfaces de TiO₂ non fonctionnalisées. Par ailleurs, une mesure de réflectivité des rayons X a été réalisée sur les types de deux surfaces hydrophobes. Des franges de Kiessig ont été obtenues, témoignant la présence d'une couche lisse et homogène. La double oscillation créée par les molécules greffées était très large du fait de la faible épaisseur de la couche (2 à 3 nm).

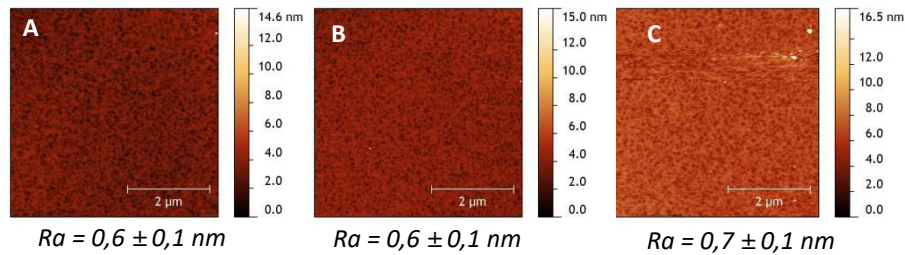


Figure 36 : Images AFM de la surface de TiO₂ A : avant fonctionnalisation et après fonctionnalisation par B : la molécule BpF et C : la molécule BpOH pour un temps de 15 min

Dans la suite de notre étude, comme les propriétés de surface pour chaque type de molécules étaient similaires, seules les molécules BpF et BpOH ont été utilisées.

Analyse chimique

L'analyse chimique des échantillons a été réalisée en utilisant la spectroscopie XPS. Cette technique permet de vérifier la présence des éléments chimiques attendus en surface des matériaux fonctionnalisés.

- Etude de la molécule fluorée BpF

L'analyse du spectre général (Survey) permet de vérifier la présence des éléments chimiques constituant la molécule (Figure 37) : carbone, azote, oxygène, fluor et phosphore. La présence de titane provient de la couche d'oxyde de titane.

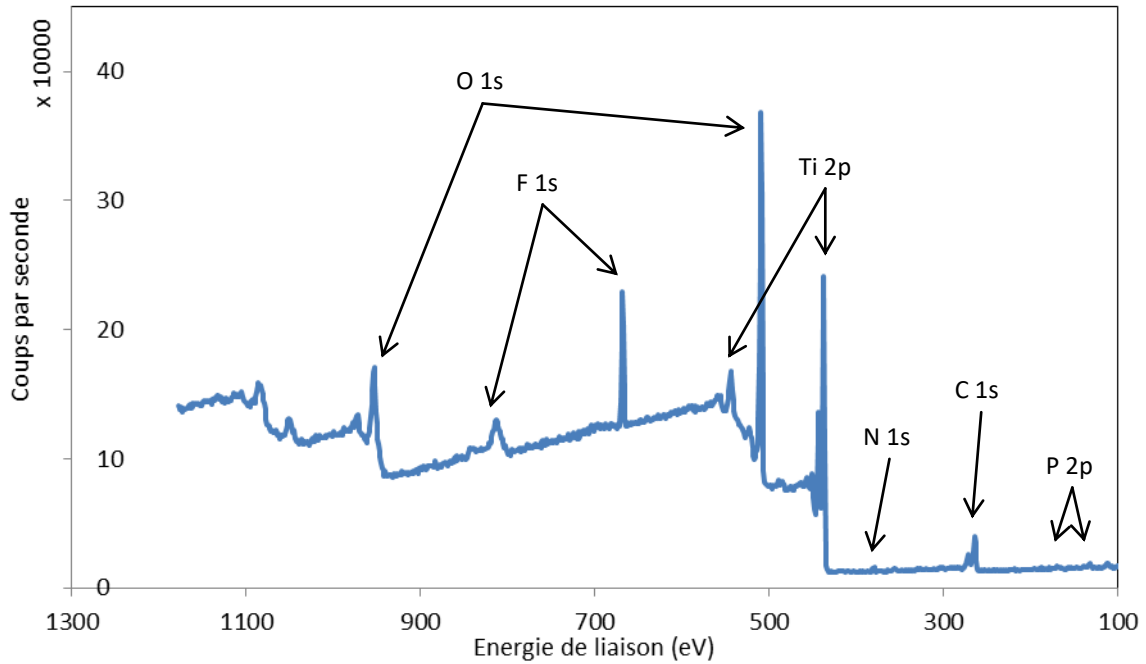


Figure 37 : Spectre général (Survey) pour la molécule BpF greffée sur du TiO₂

L'analyse fine des spectres centrés sur les éléments C 1s, N 1s, O 1s, F 1s, P 2p et Ti 2p a permis de vérifier le pourcentage atomique des différents éléments présents sur la surface et de comparer les fractions atomiques à celles attendues pour la molécule greffée (Tableau 6). Les valeurs déterminées expérimentalement correspondent bien à celles attendues théoriquement avec un faible pourcentage d'erreur. Les deux pics correspondants au phosphore sont très petits sur le spectre Survey car la molécule n'en contient que deux (Figure 37).

Tableau 6 : Comparaison des fractions atomiques obtenues par XPS et théoriquement pour la molécule BpF

Eléments	% atomique	Composition en surface (XPS)	Composition théorique
O	15,8	10,2	12
C	31,2	20,3	21
P	3,0	2	2
N	2,0	1,3	1
F	48,0	31,2	29

L'oxygène présent sur le spectre O 1s provient de la molécule mais aussi du TiO₂; l'analyse fine du spectre centré sur O 1s ne permet pas de définir clairement les groupements chimiques incluant cet élément. Cependant, l'analyse du spectre centré sur les énergies de liaison liées au C 1s (Figure 38), permet de vérifier la présence des différents groupements incluant le carbone et de calculer les proportions relatives pour les différents types de carbone.

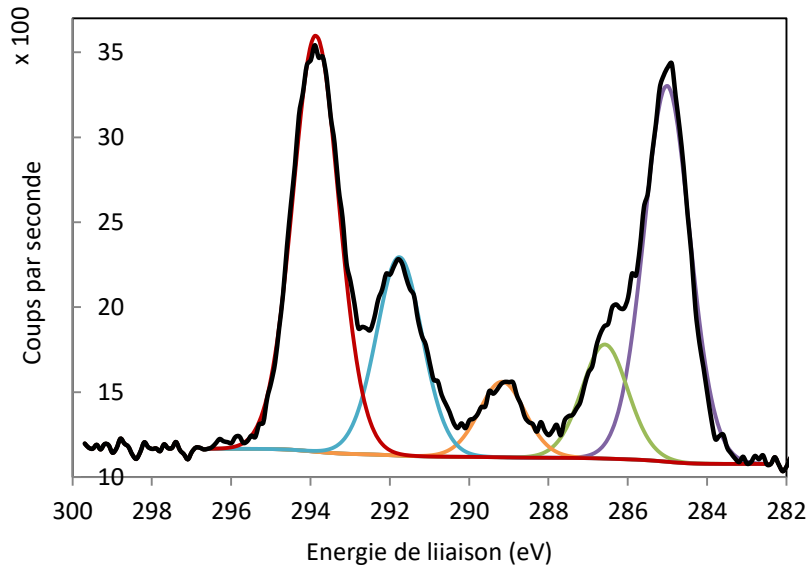


Figure 38 : Spectre XPS centré sur C 1s pour la molécule BpF greffée sur du TiO₂

Le spectre centré sur C 1s est composé de cinq contributions (Tableau 7). Les fractions atomiques expérimentales correspondent aux valeurs attendues pour la molécule. La différence observée entre les compositions théorique et expérimentale peut être expliquée par une légère contamination organique (plus grande quantité expérimentale de C1 et C2) et la dégradation de la molécule sous rayonnement X (diminution expérimentale de C4). Cette dégradation sous rayonnement X est encore plus visible après 3 h d'irradiation, la contribution des carbones C4 et C5 diminuant de manière très importante alors que la quantité des autres types de carbone reste similaire.

Tableau 7 : Attribution des pics du C 1s et comparaison entre la composition théorique et expérimentale

Type de carbone	Energie de liaison (eV)	% atomique	Composition théorique	Composition de surface
C1 (C-C)	285,0	28,4	4,0	4,8
C2 (C-P, C-O) [25-27]	286,6	12,8	2,0	2,2
C3 (amide) [25, 28]	289,1	5,4	1,0	0,9
C4 (CF) [29]	291,7	17,8	4,0	3,0
C5 (OCF ₂ , CF ₃) [30]	293,8	35,6	6,0	6,0

- Etude de la molécule BpOH

Une surface fonctionnalisée par la molécule BpOH (Figure 39) a aussi été analysée par XPS afin de vérifier la composition de surface. Le spectre général (Survey) a montré la présence de carbone, d'oxygène, de phosphore ainsi que le titane provenant de la couche mince.

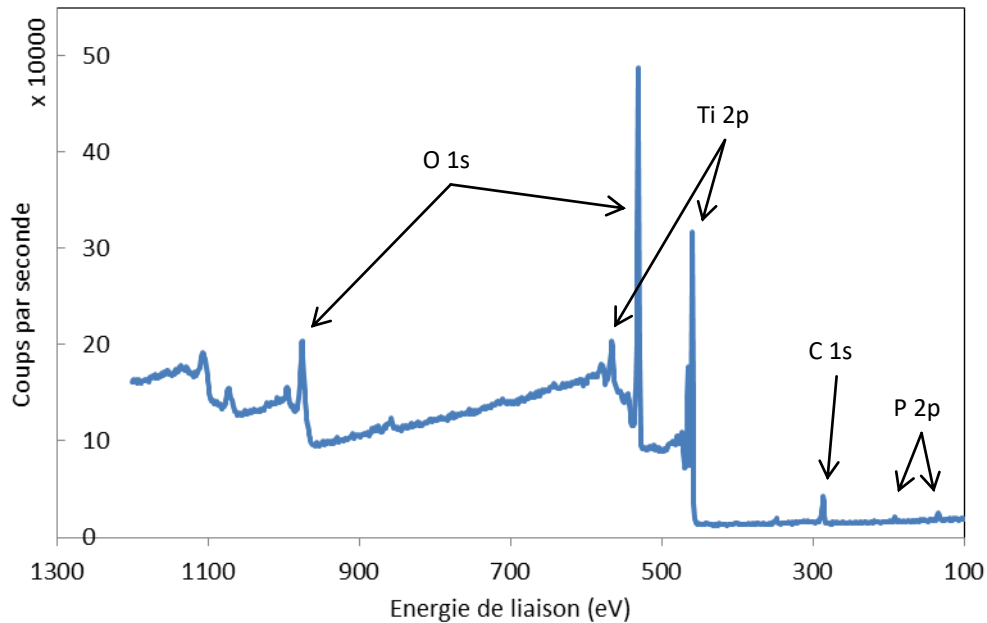


Figure 39 : Spectre général (Survey) de la molécule BpOH greffée sur du TiO₂

La molécule BpOH contient deux atomes de phosphore et douze atomes de carbone. Le ratio théorique P/C est donc de 0,166. Expérimentalement, en utilisant les spectres centrés sur les énergies de liaisons P 2p et C 1s, le ratio P/C obtenu est de 0,103. Ce résultat indique un nombre de carbone supérieur à celui attendu dans le ratio théorique P/C indiquant la présence de contamination carbonée en surface.

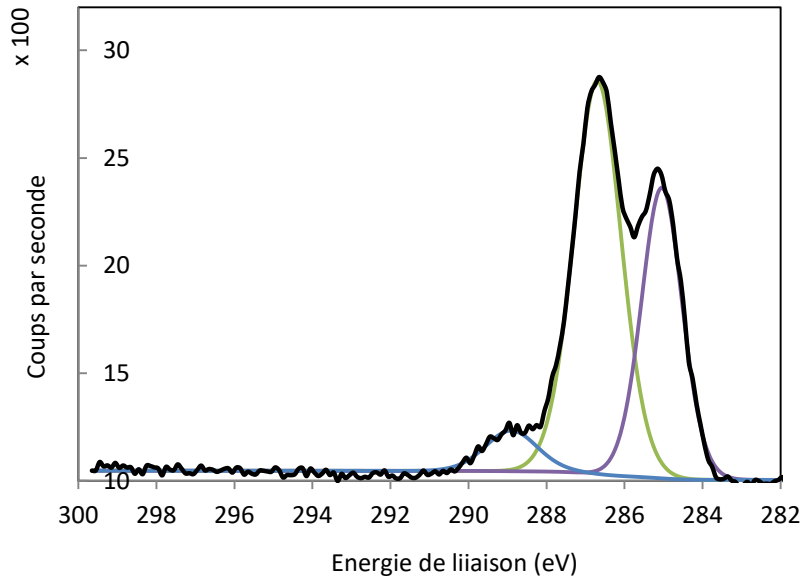


Figure 40 : Spectre XPS centré sur C 1s pour la molécule BpOH greffée sur du TiO₂

L'analyse fine du spectre centré sur les énergies de liaison C 1s permet de vérifier la présence des groupements présents dans la molécule (Figure 40) ainsi que la présence de contamination. Le Tableau 8 présente les attributions des trois contributions du C 1s. Dans la molécule, il existe les groupements O-C-C-O et C-P regroupé dans la contribution C2 [31]. Les contributions C1 et C3 permettent d'affirmer la présence de contamination carbonée, celle-ci se retrouve aussi en moindre quantité dans la contribution C2 [3, 31].

Tableau 8 : Attribution des pics du C 1s

Type de carbone	Energie de liaison (eV)	% atomique
C1 (C-C)	285	36,8
C2 (C-P, O-C-C-O, C-O)	286,7	56,6
C3 (O-C=O)	288,9	6,6

Conclusion

Des surfaces de matériaux à base de titane présentant des rugosités allant du nanomètre au micromètre ont été élaborées par plusieurs méthodes. Les surfaces structurées avec des pyramides présentent différentes tailles dont les plus petites ont une taille proche de celle des microorganismes, de quelques micromètres. Cette morphologie de surface permet l'étude avec des éléments en surface relativement ouvert. La structuration des alliages de titane grade 2 et grade 5 par sablage et par EDM a permis d'obtenir d'autres morphologies de surface avec par exemple des rayures pour les surfaces polies ou des trous avec les surfaces électro-érodées. Les surfaces élaborées avaient des rugosités comprises entre 1 nm pour les surfaces modèles lisses de TiO₂ à 5 µm pour les surfaces les plus rugueuses. Les tailles caractéristiques des motifs de surface sont comprises entre quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres pour les surfaces structurées. L'adhérence de bactéries et de levures sur ces différentes structurations de surface a été étudiée et sera détaillée dans le chapitre suivant.

Le greffage moléculaire sur les surfaces lisses de dioxyde de titane a permis de modifier le caractère hydrophile/hydrophobe de surface de façon à obtenir une surface hydrophobe ou hydrophile. La contribution de ce facteur sur l'adhérence de microorganismes mais aussi sur l'adsorption de protéines a été étudiée.

Le chapitre suivant présente l'ensemble des analyses microbiologiques réalisées sur ces surfaces pour étudier les contributions de la modification de ces paramètres physico-chimiques sur l'adhérence de bactéries et de levures.

Références

- [1] W. Zhou, X. Zhong, The effect of surface roughness and wettability of nanostructured TiO₂ film on TCA-8113 epithelial-like cells (vol 200, pg 6155, 2006), *Surf Coat Tech*, 201 (2006) 505-505.
- [2] A. Gibaud, M. Chebil, T. Beuvier, X-Ray reflectivity, in: G. Bracco, B. Holst (Eds.) *Surface Science Techniques*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, 191-216.
- [3] E. McCafferty, J. Wightman, An X-ray photoelectron spectroscopy sputter profile study of the native air-formed oxide film on titanium, *Appl Surf Sci*, 143 (1999) 92-100.
- [4] F. Tian, Y.P. Zhang, J. Zhang, C.X. Pan, Raman spectroscopy: a new approach to measure the percentage of anatase TiO₂ exposed (001) facets, *Journal of Physical Chemistry C*, 116 (2012) 7515-7519.
- [5] M.J. Henderson, A. Gibaud, J.F. Bardeau, J.W. White, An X-ray reflectivity study of evaporation-induced self-assembled titania-based films, *J Mater Chem*, 16 (2006) 2478-2484.
- [6] U. Balachandran, N.G. Eror, Raman spectra of titanium dioxide, *Journal of Solid State Chemistry*, 42 (1982) 276-282.
- [7] E. Palik, H. Gray, P. Klein, A raman study of etching silicon in aqueous KOH *J. Electrochem. Soc.*, 130 (1983) 956-959.
- [8] H. Seidel, L. Csepregi, A. Heuberger, H. Baumgärtel, Anisotropic etching of crystalline silicon in alkaline solutions I. Orientation dependence and behavior of passivation layers, *J. Electrochem. Soc.*, 137 (1990) 3612-3626.
- [9] S.A. Campbell, K. Cooper, L. Dixon, R. Earwaker, S.N. Port, D.J. Schiffrin, Inhibition of Pyramid Formation in the Etching of Si p[100] in Aqueous Potassium Hydroxide-Isopropanol, *J Micromech Microeng*, 5 (1995) 209-218.
- [10] O.A. Tabata, R; Funabashi,H; Shimaoka, K; Sugryama, S, Anisotropic etching of silicon in TMAH solutions, *Sensors and Actuators A*, 34 (1992) 51-57.
- [11] M.A. Gosalvez, R.M. Nieminen, Surface morphology during anisotropic wet chemical etching of crystalline silicon, *New J Phys*, 5 (2003).
- [12] I. Zubel, K. Rola, M. Kramkowska, The effect of isopropyl alcohol concentration on the etching process of Si-substrates in KOH solutions, *Sensor Actuat a-Phys*, 171 (2011) 436-445.
- [13] J. Chen, L.T. Liu, Z.J. Li, Z.M. Tan, Q.S. Jiang, H.J. Fang, Y. Xu, Y.X. Liu, Study of anisotropic etching of (100) Si with ultrasonic agitation, *Sensor Actuat a-Phys*, 96 (2002) 152-156.
- [14] T. Baum, J. Satherley, D.J. Schiffrin, Contact angle, gas bubble detachment, and surface roughness in the anisotropic dissolution of Si(100) in aqueous KOH, *Langmuir*, 14 (1998) 2925-2928.
- [15] M. Elwenspoek, On the mecanism of anisotropic etching of silicon, *Journal of electrochemistry society*, 140 (1993) 2075-2080.
- [16] G. Kuchler, R. Brendel, Reconstruction of the surface topography of randomly textured silicon, *Prog Photovoltaics*, 11 (2003) 89-95.
- [17] H. Park, E. Bae, J.J. Lee, J. Park, W. Choi, Effect of the anchoring group in Ru-bipyridyl sensitizers on the photoelectrochemical behavior of dye-sensitized TiO₂ electrodes: Carboxylate versus phosphonate linkages, *J Phys Chem B*, 110 (2006) 8740-8749.
- [18] R. Luschtinetz, A.F. Oliveira, J. Frenzel, J.O. Joswig, G. Seifert, H.A. Duarte, Adsorption of phosphonic and ethylphosphonic acid on aluminum oxide surfaces, *Surf Sci*, 602 (2008) 1347-1359.
- [19] R. Boissezon, J. Muller, V. Beaugeard, S. Monge, J.J. Robin, Organophosphonates as anchoring agents onto metal oxide-based materials: synthesis and applications, *Rsc Adv*, 4 (2014) 35690-35707.
- [20] G. Zorn, I. Gotman, E.Y. Gutmanas, R. Adadi, G. Salitra, C.N. Sukenik, Surface modification of Ti45Nb alloy with an alkylphosphonic acid self-assembled monolayer, *Chem Mater*, 17 (2005) 4218-4226.
- [21] J. Amalric, P.H. Mutin, G. Guerrero, A. Ponche, A. Sotto, J.P. Lavigne, Phosphonate monolayers functionalized by silver thiolate species as antibacterial nanocoatings on titanium and stainless steel, *J Mater Chem*, 19 (2009) 141-149.

- [22] G. Lecollinet, N. Delorme, M. Edely, A. Gibaud, J.F. Bardeau, F. Hindré, F. Boury, D. Portet, Self-assembled monolayers of bisphosphonates: influence of side chain steric hindrance, *Langmuir*, 25 (2009) 7828-7835.
- [23] G. Busch, E. Jaehne, X.D. Cai, S. Oberoi, H.J.P. Adler, Ultrathin layers for adhesion promotion, *Synthetic Met*, 137 (2003) 871-872.
- [24] E.L. Hanson, J. Schwartz, B. Nickel, N. Koch, M.F. Danisman, Bonding self-assembled, compact organophosphonate monolayers to the native oxide surface of silicon, *J Am Chem Soc*, 125 (2003) 16074-16080.
- [25] A. Vitale, A. Pollicino, E. Bernardi, R. Bongiovanni, Ultrathin perfluoropolyether coatings for silicon wafers: a XPS study, *Prog Org Coat*, 78 (2015) 480-487.
- [26] A. Szwejca, M. Krzywiecki, H. Koroniak, Self-assembled monolayers of partially fluorinated alcohols on Si(001): XPS and UV-photoemission study, *Journal of fluorine chemistry*, 180 (2015) 248-256.
- [27] S.P. Pujari, E. Spruijt, M.A.C. Stuart, C.J.M. van Rijn, J.M.J. Paulusse, H. Zuilhof, Ultralow adhesion and friction of fluoro-hydro alkyne-derived self-assembled monolayers on H-terminated Si(111), *Langmuir*, 28 (2012) 17690-17700.
- [28] S. Ray, A. Shard, Quantitative analysis of adsorbed proteins by X-ray photoelectron spectroscopy, *Anal Chem*, 83 (2011) 8659-8666.
- [29] M.E. Napier, P.C. Stair, Decomposition of fluorinated diethers on the clean iron surface, *Surf Sci*, 298 (1993) 201-214.
- [30] S. Mori, W. Mordes, Degradation and crosslinking of perfluoroalkyl polyethers under X-ray irradiation in ultrahigh vacuum, NASA technical paper 2910, Lewis Research Center Cleveland, Ohio, (1989).
- [31] S. Sharma, R.W. Johnson, T.A. Desai, XPS and AFM analysis of antifouling PEG interfaces for microfabricated silicon biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2004) 227-239.

Chapitre 3

Etude de la réponse biologique des échantillons

La bactérie *Staphylococcus aureus* et la levure *Candida albicans* sont deux microorganismes responsables de près de 20% des infections nosocomiales [1]. Les établissements de santé développent des procédures afin de limiter le risque de contamination, cependant ces infections persistent en milieu hospitalier en raison de la difficulté à stériliser toutes les surfaces ou par l'apparition de souches résistantes. Les laboratoires de recherche essaient quant à eux de mettre au point de nouveaux matériaux sur lesquels le développement de microorganismes serait limité ou impossible. Dans ce cadre, nous avons cherché à modifier les propriétés physiques et chimiques de surface de matériaux à base de titane dans le but d'étudier leurs influences de ces facteurs sur l'adhérence des microorganismes. Des études *in vitro* en conditions statiques ont été réalisées avec *S. aureus* (ATCC 6538 P) et *C. albicans* (ATCC MYA2876).

L'adhérence de ces microorganismes a été testée sur l'intérieur de chambres implantables de trois marques commerciales : BBraun, Perouse et Bard. Des études similaires ont été réalisées sur des surfaces préparées au laboratoire : surfaces présentant des pyramides en surface, surfaces d'alliage de titane grade 2 et grade 5 polies et sablées et surfaces d'alliage de titane grade 5 électro-érodées.

L'adhérence de bactéries et levures a ensuite été testée sur les surfaces fonctionnalisées par greffage moléculaire rendant la surface hydrophile ou hydrophobe. L'adsorption de protéines plasmatiques sur les implants médicaux peut avoir un impact sur l'adhérence de microorganismes. Pour vérifier cela, nous avons étudié l'adsorption de trois protéines largement présentes dans le plasma sanguin sur les surfaces fonctionnalisées. L'adhérence de bactéries et levures a ensuite été évaluée *in vitro* en présence d'un film de conditionnement composé de protéines recouvrant les surfaces fonctionnalisées.

I. Protocole pour l'analyse de l'adhérence de bactéries et de levures

Les tests *in vitro* ont été réalisés en conditions statiques et la méthode de dénombrement par unités formant colonies (UFC) a été utilisée, pour sa facilité de mise en œuvre. Les analyses microbiologiques avec les bactéries ont été réalisées au Centre de Transfert de Technologie du Mans (CTTM) et celles avec les levures au sein du Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP) à Angers. Un protocole équivalent a été établi pour les analyses microbiologiques avec les bactéries et les levures, afin de s'affranchir d'éventuels facteurs expérimentaux liés aux laboratoires effectuant les analyses. Il ne semble pas exister de norme pour l'évaluation de l'adhérence des microorganismes

sur une surface. Les protocoles expérimentaux diffèrent pour les études microbiologiques, ce qui peut expliquer les différences obtenues. Cependant, plusieurs étapes sont à respecter afin de d'obtenir des résultats reproductibles [2].

Le protocole utilisé est décrit ci-dessous et schématisé en Figure 1.

Préparation des suspensions de microorganismes

1. La culture du microorganisme est initiée à partir d'un cryotube sur un milieu de culture gélosé approprié et est incubée pendant 24 h à 37°C (= suspension R1).
2. A partir de cette culture de 24 h (suspension R1), une colonie est transférée dans 10 ml de milieu nutritif¹ et la suspension est incubée pendant 6 à 8 h à 37°C pour les bactéries ou pendant 24 h à 37°C pour les levures (= suspension R2).
3. 1 ml de la suspension R2 est ajouté à 50 ml de milieu de culture et la suspension est incubée pendant une nuit à 37°C (= suspension R3). Les bactéries sont alors en début de phase stationnaire de croissance et les levures sont alors en phase exponentielle de croissance.
4. La suspension R3 est centrifugée pendant 10 min, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 25 ml de PBS (tampon phosphate salin 0,15 M, pH 7,2) stérile. Cette étape est répétée deux fois.
5. La concentration cellulaire est évaluée pour les bactéries par mesure de l'absorbance à 600 nm par spectrophotométrie et pour les levures en utilisant une cellule de Malassez. Une suspension à 10⁶ cellules/ml est préparée.

Protocole d'adhésion

Les différentes surfaces sont utilisées sans étape de désinfection préalable.

1. Les échantillons sont disposés dans les puits d'une microplaque 12 puits.
2. Les échantillons sont immergés dans 1 ml ou 2 ml de suspension de bactéries ou de levures à 10⁶ éléments/ml.
3. Les échantillons sont incubés pendant 30 min à 37°C sans agitation.
4. A l'issue de la période d'incubation, les échantillons sont prélevés à l'aide d'une pince stérile, rincés trois fois par immersion dans trois puits différents contenant du PBS stérile.

¹ **Milieu nutritif** : bouillon trypticase soja (Hydrolysate tryptique de caséine 17,0 g/L, Peptone de soja 3,0 g/L, Chlorure de sodium 5,0 g/L, Phosphate dipotassique 2,5 g/L, Glucose 2,5 g/L à pH 7,4 ± 0,2

Protocole de décrochage et de dénombrement

1. A la fin de l'étape de rinçage, chaque échantillon est transféré dans un tube conique à centrifuger de 50 ml contenant 10 ml de milieu SCDLP² stérile.
2. Le tube est immergé pendant 5 min dans un bain d'ultrasons et est centrifugé au vortex pendant 30 s à vitesse maximale.
3. Des dilutions sériees de raison 10 sont réalisées et les suspensions obtenues sont étalées sur milieu gélosé PCA³ en boîtes de Pétri pour les bactéries ou PDYA-Cmp⁴ pour les levures (ensemencement en spirale ou méthode manuelle).
4. Les géloses sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 h, et le nombre d'unités formant colonies (UFC) est déterminé. Les résultats sont exprimés en UFC/cm².

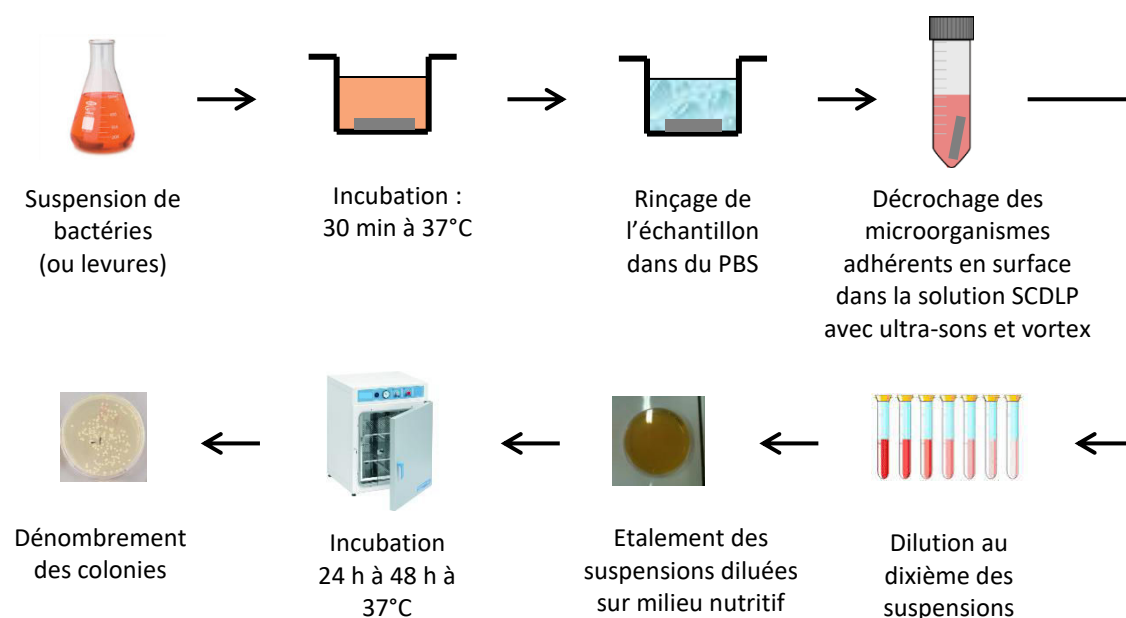


Figure 1 : Schéma du protocole d'adhésion, de décrochage et de dénombrement des éléments adhérents pour les bactéries et les levures

Ce protocole a été établi de manière à étudier l'adhésion primaire des microorganismes sur les surfaces. Le temps de 30 min a été choisi afin de laisser le temps aux bactéries et aux levures d'adhérer sur la surface sans que le biofilm n'ait le temps de se former et de recouvrir la surface. Le choix de travailler en PBS a permis de ne pas offrir aux microorganismes un milieu nutritif lors de

² SCDLP : Soybean Casein Digest broth with Lecithin and Polyoxyethylene sorbitan monooleate : Peptone de caséine 17 g/L, Peptone de soja 3 g/L, NaCl 5 g/L, Glucose 2,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,5 g/L, Tween 80 7 g/L.

³ Milieu gélosé PCA : tryptone 5 g/L, extrait de levures 2,5 g/L, glucose 1 g/L, agar 15 g/L.

⁴ Milieu gélose PDYA-Cmp : peptone 10 g/L, glucose 20 g/L, extrait de levures 5 g/L, chloramphénicol 0,5 g/L, agar 20 g/L.

l'incubation des échantillons et de se placer à pH constant pour ne pas modifier les propriétés physico-chimiques de surface des bactéries ou des levures.

Pour chaque campagne microbiologique, un même échantillon témoin a été introduit ; nous avons choisi une surface lisse de TiO₂ (rugosité Ra inférieure à 1 nm). Il a ainsi pu être vérifié la répétabilité des mesures puisque la variation de l'adhérence des microorganismes sur cette surface évoluait dans une fourchette maximale de 0,2 log. Les analyses ont été réalisées au minimum en triplicata (parfois avec quatre échantillons) afin de pouvoir réaliser des tests statistiques.

Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour les analyses statistiques. Le choix d'un test non paramétrique a été préféré du fait du faible nombre de résultats par type d'échantillon (3 ou 4). Cela évite par ailleurs de faire l'hypothèse sur la distribution des valeurs (par exemple une distribution normale des valeurs est nécessaire pour le test de Student ou la méthode ANOVA). Ce test, à comparaisons multiples, donne une probabilité (limite souvent placée à 0,05), permettant de rejeter ou non l'hypothèse H₀ selon laquelle « tous les échantillons proviennent d'une population, de même moyenne » est vraie. Dans le cas où la valeur obtenue p (valeur seuil) par ce test est inférieure à 0,05, il y a plus de 95% de chance de considérer que certains échantillons appartiennent à une population différente. Dans ce cas, chaque type d'échantillon peut être comparé deux à deux afin de déterminer quelles paires font partie d'une population différente. Pour cela, il est possible d'utiliser le test de Mann and Whitney ou la méthode de Conover-Iman. Pour ce dernier test, la correction de Bonferroni peut être appliquée, ce qui permet de réajuster le niveau de significativité dans le cadre de comparaisons multiples.

Sur les prochains graphiques, les barres d'erreur correspondent à l'écart type des valeurs.

II. Etude de l'adhérence de bactéries et de levures sur des surfaces structurées

L'adhérence de bactéries *Staphylococcus aureus* et de levures *Candida albicans* a été testée sur les différentes surfaces structurées dont l'élaboration a été décrite dans le Chapitre 2 ainsi que sur l'intérieur du boîtier des chambres implantables.

1. Chambres implantables

L'analyse de l'adhérence de bactéries et de levures à l'intérieur des chambres implantables a nécessité l'adaptation du protocole des analyses microbiologiques pour tenir compte de la géométrie particulière des boîtiers. Des chambres implantables de grande taille de marque BBraun (modèle Celsite ST201G), Perouse (modèle Polysite 4019) ou Bard (modèle PowerPort 8708000) ont été achetées, puis découpées de manière à ne garder que le boîtier interne de la chambre (Figure 2).



Figure 2 : Photo des chambres implantables des trois marques avant et après découpe

Avant l'analyse, les chambres ont été stérilisées par autoclave de manière à éliminer d'éventuels microorganismes accrochés à l'extérieur. La suspension de microorganismes a été introduite à l'intérieur du boîtier de la chambre jusqu'au rebord marquant la séparation avec le septum (la sortie pour le cathéter a été bouchée par soudage). La suite du protocole est similaire à celui utilisé pour les autres échantillons, excepté l'adaptation des volumes de liquide. La superficie interne de chaque chambre implantable a été mesurée de manière à pouvoir comparer l'adhérence de microorganismes dans les trois cas.

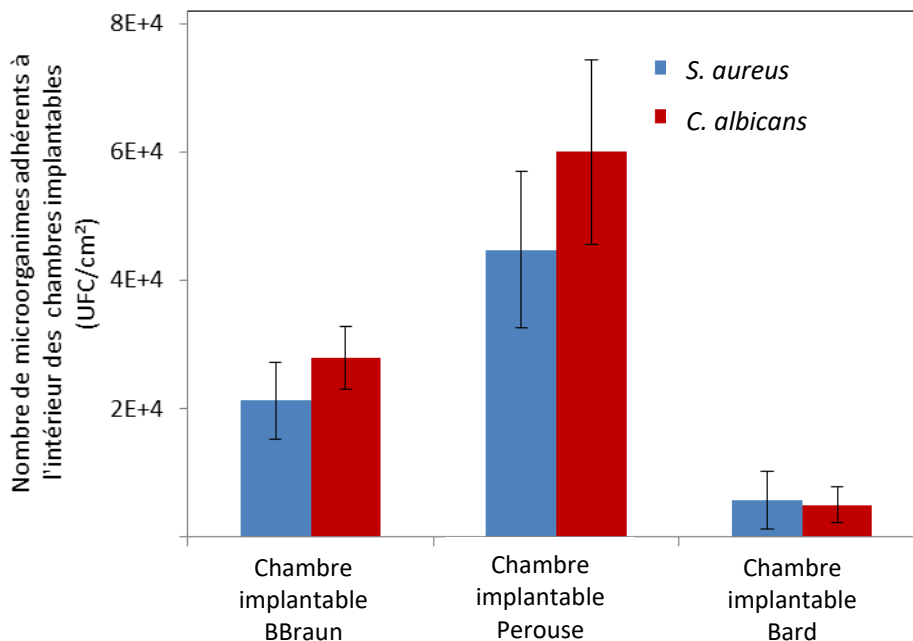


Figure 3 : Adhérence de *S. aureus* (en bleu) et *C. albicans* (en rouge) à l'intérieur des chambres implantables

Comme cela a été montré dans le Chapitre 1, la topographie intérieure des chambres implantables est différente selon les marques et parfois selon les modèles. La Figure 4 montre les caractéristiques de surface des chambres implantables étudiées.

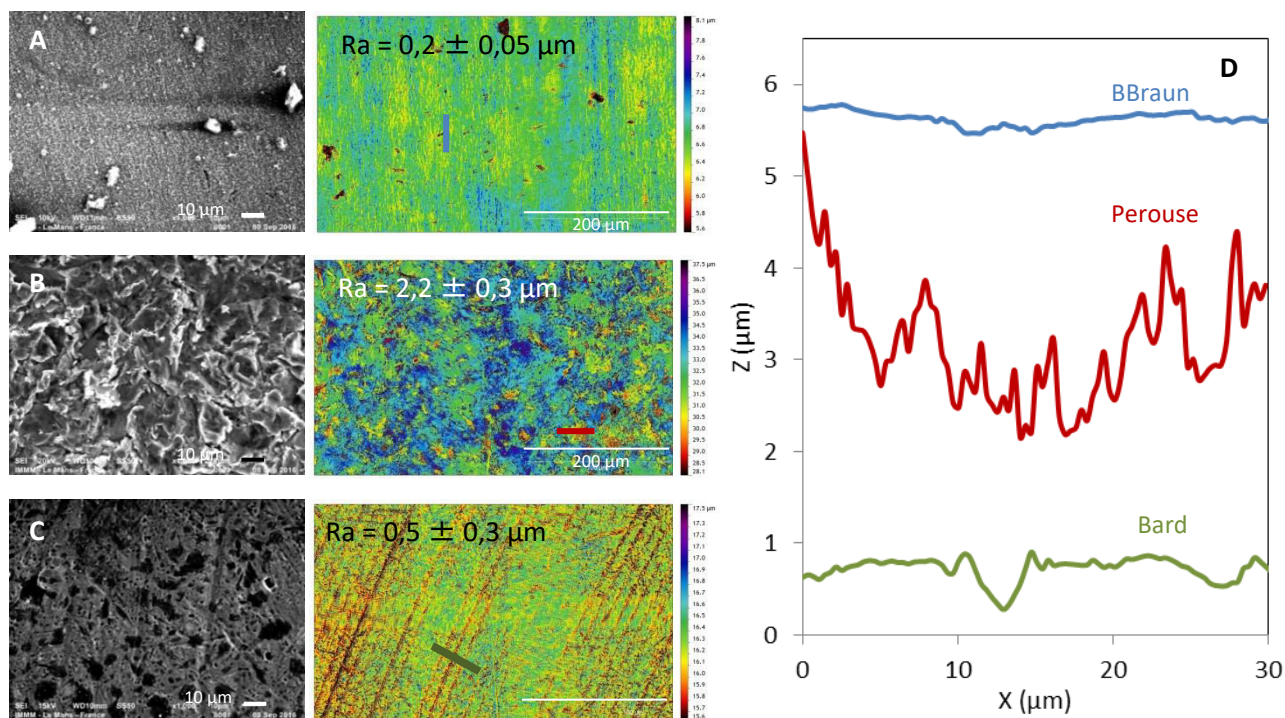


Figure 4 : Images obtenues par MEB (X 1000) (1^{ère} colonne) et par profilométrie optique (2^{ème} colonne) de l'intérieur des chambres implantables des marques : A : BBraun, B : Perouse et C : Bard.
D : Profils des hauteurs des segments représentés sur les images de profilométrie optique.

D'après les tests de Kruskal-Wallis et de Conover-Iman, les résultats obtenus pour chacune des chambres implantables avec les bactéries comme avec les levures montrent des différences significatives (Figure 3). Le nombre de microorganismes adhérents est plus important pour la chambre implantable de marque Perouse. Il s'agit de la chambre implantable présentant la rugosité de surface la plus grande et des motifs de surface de l'ordre de quelques micromètres de largeur et de hauteur. Ces motifs peuvent permettre aux microorganismes de multiplier leurs points de contact avec la surface. Les chambres implantables BBraun et Bard présentent des rugosités de surface plus faibles que les chambres de la marque Perouse (les valeurs de rugosité Ra sont respectivement 0,2, 0,5 et 2,2 μm , mesurées par profilométrie optique sur une surface de 0,5 x 0,3 mm^2). La valeur des angles de contact à l'intérieur des chambres implantables a été mesurée, ces valeurs obtenues sont respectivement $51 \pm 2^\circ$, $49 \pm 2^\circ$ et $68 \pm 2^\circ$ pour les chambres BBraun, Perouse et Bard. Ces valeurs sont proches et ne permettent pas d'expliquer les variations observées du nombre de microorganismes adhérents. La chambre implantable BBraun est composée de titane alors que la chambre implantable Bard est composée de l'alliage de titane grade 5. Cette différence de composition peut peut-être expliquer la différence d'adhérence des microorganismes entre ces deux chambres. De plus, la chambre implantable Bard a une coloration violette, indiquant un traitement de surface (à base de cuivre d'après des premières analyses EDX) pouvant aussi être à l'origine de la d'un comportement antibactérien.

2. Surfaces structurées avec des pyramides

L'adhérence de bactéries et de levures augmente quand la taille des pyramides augmente (Figure 5), mais la rugosité à partir de laquelle se fait l'augmentation dépend de la taille du microorganisme étudié. Les caractéristiques topographiques des pyramides sont rappelées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques topographiques des pyramides

Pyramide	Hauteur moyenne (μm)	Rugosité Ra (μm)	Aire moyenne d'une face (μm^2)
Taille 1	$3,6 \pm 1,2$	0,6	7,3
Taille 2	$6,8 \pm 1,7$	1,1	25,9
Taille 3	$12,4 \pm 3,4$	1,8	86,1
Taille 4	$20,8 \pm 6,7$	4,3	242,2

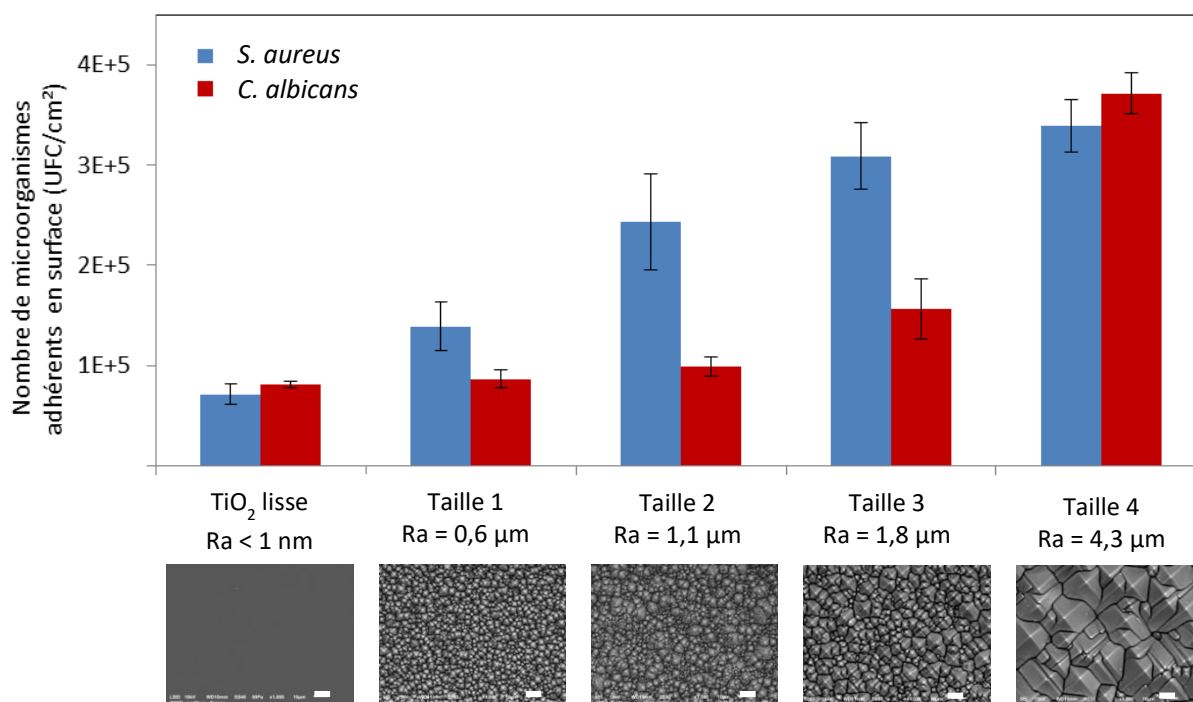


Figure 5 : Evolution de l'adhérence de *S. aureus* (en bleu) et de *C. albicans* (en rouge) en fonction de la taille des pyramides et images MEB des surfaces correspondantes (X 1000). Les barres d'échelle correspondent à 10 μm.

Pour *S. aureus*, d'après les tests statistiques, seule les nombres de bactéries adhérentes entre la surface lisse et la surface la plus rugueuse (Ra = 4,3 μm) sont statistiquement différents. Cependant, le faible écart type pour les autres surfaces rugueuses montre tout de même une tendance à l'augmentation du nombre de bactéries adhérentes avec l'augmentation de la rugosité.

Les bactéries *S. aureus* ont une taille d'environ 1 μm de diamètre. Les bactéries peuvent facilement adhérer sur les faces des pyramides, même de petite taille. Ceci a été observé par MEB (Figure 6). Les conditions de préparation des surfaces sont décrites en Annexe 3. Les bactéries adhèrent sur les faces, et pas nécessairement dans les creux où les points d'attache avec la surface seraient plus importants. La hauteur des pyramides, de 6,8 μm à 20,8 μm, est très supérieure à la taille des bactéries. Celles-ci ne sont donc probablement pas influencées par la rugosité de surface durant la phase d'adhérence primaire mais une augmentation de la superficie de surfaces lisses (sur les faces), d'où une augmentation du nombre de bactéries adhérentes quand la taille des pyramides augmente. Pour les plus petites pyramides (Taille 1), les bactéries ont tendance à se placer dans les creux afin d'augmenter les points de contact avec la surface.

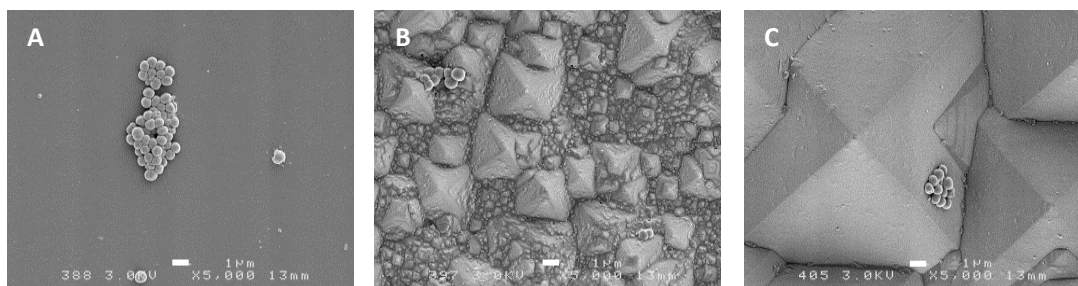


Figure 6 : Images MEB (X 5000) de *S. aureus* sur A : une surface lisse de TiO₂, B : une surface de TiO₂ avec des petites pyramides et C : une surface de TiO₂ avec de grandes pyramides. Les barres d'échelle correspondent à 1 µm.

Avec *C. albicans*, le nombre de levures présentes ne varie pas sur les surfaces ayant les plus petites pyramides (Taille 1 à taille 3). L'adhérence de levures n'augmente que pour les surfaces présentant les plus grandes pyramides (Taille 4). Le test de Kruskal-Wallis donne significative la différence entre la surface lisse et celle avec les pyramides les plus grandes (Taille 4).

La levure *C. albicans* présente une taille supérieure à celle des bactéries comme *S. aureus*; elle mesure environ 4 µm de long. Sur les plus petites pyramides, les levures ne peuvent pas s'intercaler entre les pyramides pour adhérer entre celles-ci et restent sur les sommets comme cela a été observé par MEB (Figure 7). Ceci explique donc que le nombre de levures adhérentes reste similaire au nombre observé sur une surface lisse, puisque la superficie de la surface sur laquelle elles peuvent reposer reste identique. Le nombre de pyramides sur lesquelles les levures peuvent reposer ne semble donc pas influencer leur nombre sur la surface comme cela avait pu être montré avec des bactéries sur des surfaces présentant des pics plus petits, de taille nanométrique [3, 4]. En revanche, sur les surfaces avec de grandes pyramides, les levures ont tendance à se placer au pied des pyramides ou dans des zones où elles peuvent avoir un nombre de points de contact plus important.

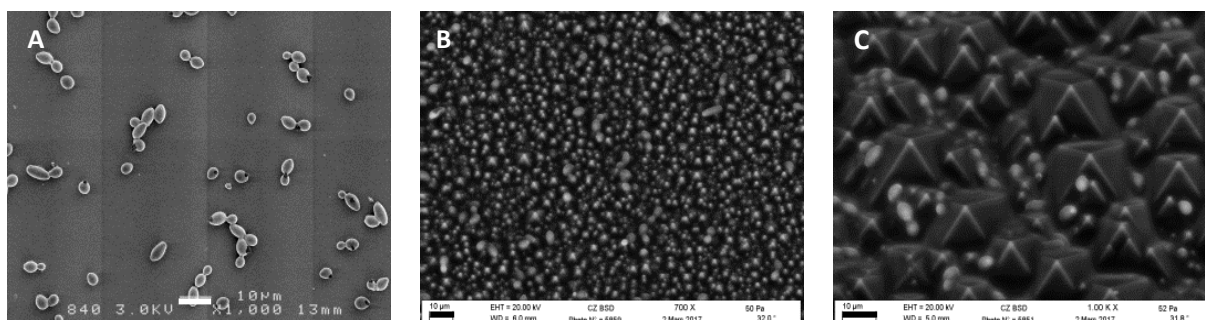


Figure 7 : Images MEB (X 700 ou X 1000) de *Candida albicans* sur A : une surface lisse de TiO₂, B : une surface de TiO₂ avec des petites pyramides et C : une surface de TiO₂ avec de grandes pyramides. B : et C : images tiltées avec un angle de 30°. Chaque barre d'échelle correspond à 10 µm.

D'après ces analyses *in vitro* et les observations MEB, l'adhérence de chaque microorganisme commence à augmenter de manière plus importante lorsque la rugosité moyenne de surface se

rapproche de la taille du microorganisme (environ 1 μm pour *S. aureus* et 4 μm pour *C. albicans*) ou que l'espace entre les pyramides est de taille similaire à celle du microorganisme.

3. Surfaces d'alliage de titane structurées par sablage

Le nombre de microorganismes adhérents sur des surfaces sablées, de rugosités comparables aux surfaces précédemment étudiées, est relativement similaire que ce soit pour les bactéries ou les levures (Figure 8). Aucune différence significative de l'adhérence de chaque microorganisme, d'après le test de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$), n'est observée en fonction de l'intensité du sablage que ce soit avec les alliages de titane grade 2 ou grade 5.

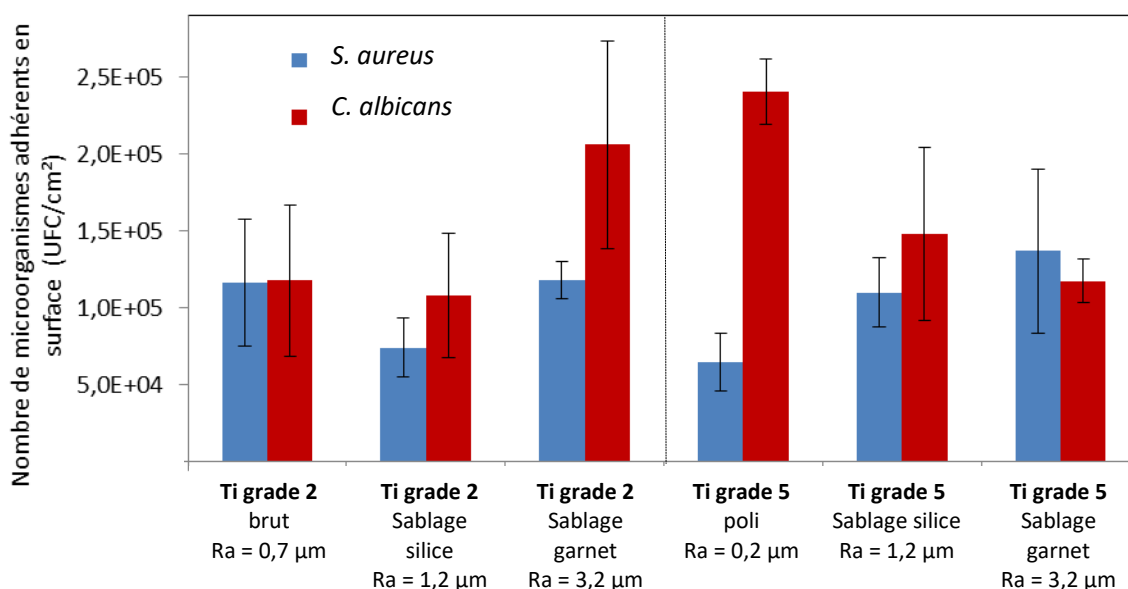


Figure 8 : Adhérence de *S. aureus* (en bleu) et *C. albicans* (en rouge) sur les surfaces structurées par sablage (silice ou garnet) d'alliage de titane grade 2 ou de titane grade 5.

Sur les surfaces d'alliage de titane grade 2, les bactéries *S. aureus* adhèrent globalement de la même façon sur les trois types de surfaces. Le nombre de *S. aureus* adhérentes sur les surfaces de titane grade 5 est légèrement plus faible sur la surface polie mais est similaire sur les deux surfaces sablées, malgré l'augmentation de la rugosité.

Des images des surfaces d'alliage de titane ayant été en contact avec les bactéries ont été obtenues par microscopie électronique à balayage. Les images ont confirmé les analyses *in vitro* puisque peu de différences ont été observées dans le nombre de bactéries visibles en surface, entre les surfaces d'alliage de titane grade 2 ou les surfaces de titane grade 5. De plus, sur les surfaces structurées, les bactéries ont tendance à être aussi bien dans les creux que sur des zones plus lisses (Figure 9).

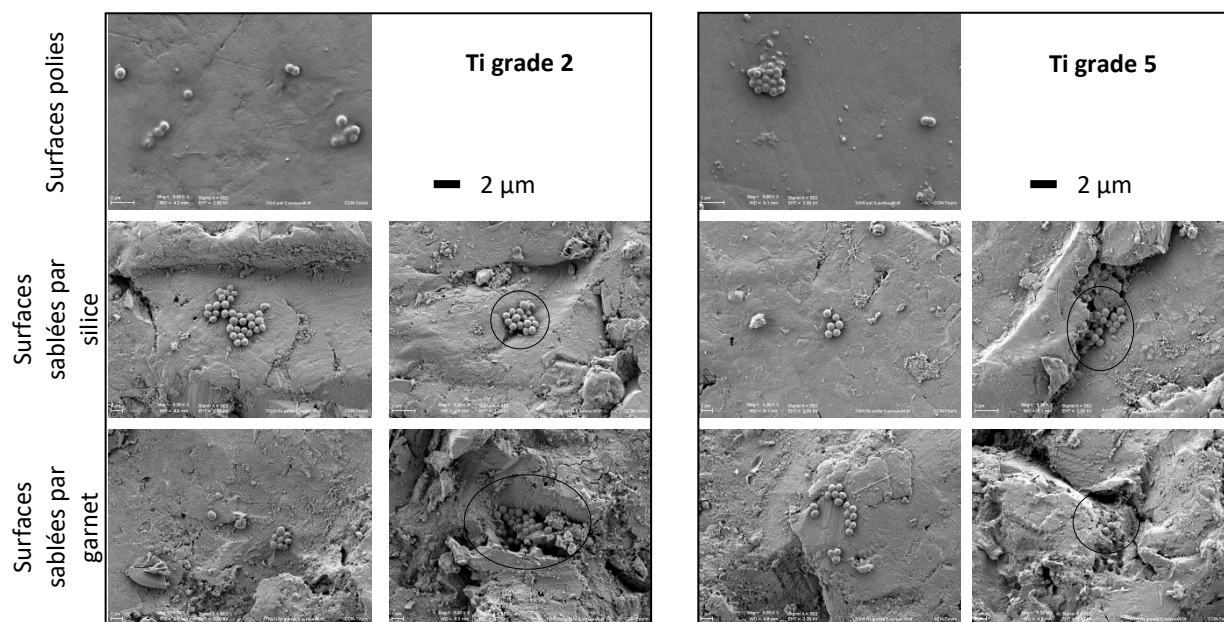


Figure 9 : Images MEB (X 5000) de *S. aureus* sur les surfaces polies ou sablées d'alliage de titane grade 2 ou grade 5. Les cercles aident à repérer la position des bactéries.

Sur la surface polie de titane grade 5, l'adhérence de *C. albicans* est anormalement élevée. En effet, sur les surfaces avec les pyramides, il avait été trouvé que l'adhérence de levures était minimale sur la surface lisse. Sur les deux surfaces sablées de titane grade 5, l'importance des écarts type ne permet pas de classer les deux surfaces en fonction du nombre de levures adhérentes. Sur les surfaces de titane grade 2, l'adhérence de levures n'évolue pas de manière significative entre les trois surfaces.

Des images MEB des surfaces d'alliage avec *C. albicans* ont aussi été réalisées (Figure 10). De la même façon que pour les bactéries, peu de différences ont pu être observées entre les alliages de titane grade 2 et grade 5. Cependant, sur les surfaces structurées, si certaines levures restent sur les zones les plus lisses, la majorité d'entre elles semble se placer préférentiellement dans les creux.

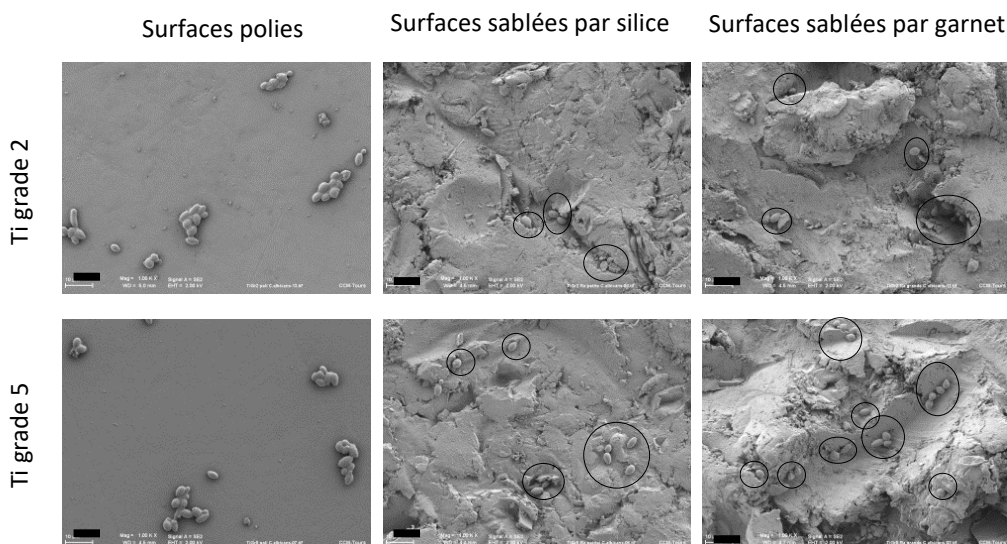


Figure 10 : Images MEB (X 1000) de *C. albicans* sur les surfaces polies ou sablées d'alliage de titane grade 2 ou de titane grade 5. Les barres d'échelle représentent 10 μ m. Les cercles aident à repérer la position des levures sur la surface.

La topographie des surfaces d'alliage de titane grade 2 ou grade 5 sablées par la silice ou le garnet est similaire. Les surfaces présentent des zones lisses (à l'échelle des microorganismes) et des creux de quelques micromètres ou plus grands. Les bactéries semblent adhérer sur la surface aussi bien dans les creux que sur les zones lisses alors que les levures sont observées préférentiellement dans les parties creuses.

Le changement de rugosité n'entraîne donc pas de différence significative dans le nombre de microorganismes adhérents en surface. Ceci montre l'importance de considérer la topographie de surface et non seulement la rugosité lors de l'analyse de l'adhérence de microorganismes sur une surface.

4. Surfaces d'alliage de titane structurées par électroérosion (EDM)

Des surfaces d'alliage de titane grade 5 ont été structurées par électroérosion, créant des trous de taille croissante sur la surface des échantillons. L'adhérence de bactéries et de levures a été testée sur ces surfaces. Les résultats sont présentés sur la Figure 11.

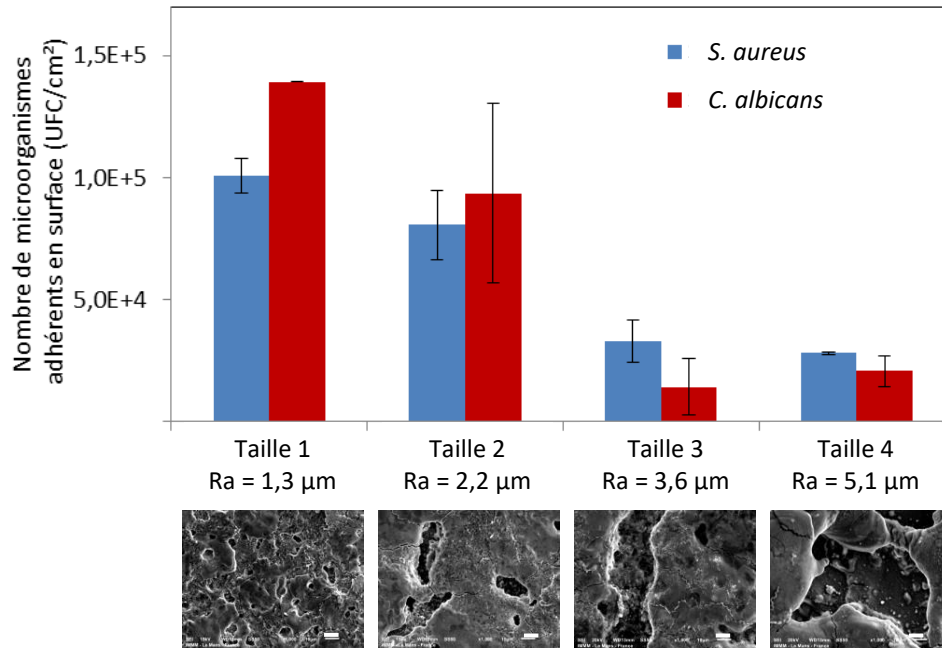


Figure 11 : Adhérence de *S. aureus* (en bleu) et *C. albicans* (en rouge) sur les surfaces électro-érodées en fonction de la rugosité et images MEB des surfaces correspondantes (X 1000). Les barres d'échelle correspondent à 10 µm.

Les valeurs caractéristiques de ces surfaces structurées sont rappelées dans le Tableau 2. Le pourcentage de recouvrement des trous a été calculé à partir des images MEB pour un grossissement de X 500.

Tableau 2 : Valeurs caractéristiques des surfaces électro-érodées

Surface	Rugosité (µm)	Profondeur moyenne des trous (µm)	Largeur maximale moyenne des trous (µm)	% de recouvrement des trous sur la surface
Taille 1	1,3 ± 0,1	4,2 ± 1,2	30,9 ± 12,1	6,8%
Taille 2	2,2 ± 0,2	10,7 ± 2,1	96 ± 12	9,7%
Taille 3	3,6 ± 0,3	18,9 ± 2,7	96,7 ± 22	16,6%
Taille 4	5,1 ± 0,4	25,7 ± 1,7	79 ± 6,5	22,6%

L'adhérence de bactéries est relativement stable pour les échantillons ayant des trous de taille 1 et 2 (Ra = 1,3 µm et 2,2 µm). Pour les surfaces ayant des trous beaucoup plus profonds (trous de taille 3 et 4), l'adhérence bactérienne tend à diminuer, bien que la surface spécifique augmente du fait de la présence de trous de plus en plus profonds, atteignant 20 µm (Figure 11) et recouvrant une plus grande partie de la surface (Tableau 2). Cette diminution peut être due au fait que toutes les bactéries adhérentes dans les trous les plus profonds ne sont pas décrochées de la surface par la

solution de décrochage. Elles resteraient coincées au fond des trous et ne seraient donc pas prises en compte par la méthode de dénombrement par UFC entraînant une diminution apparente du nombre de bactéries adhérentes. Dans cette hypothèse, seules les bactéries se situant sur les zones lisses et sur les parois des trous le plus grands seraient décrochées.

Par observation MEB, les bactéries ne semblent pas choisir préférentiellement de s'accrocher sur les parties lisses ou au fond des trous, elles sont visibles sur toute la surface (Figure 12).

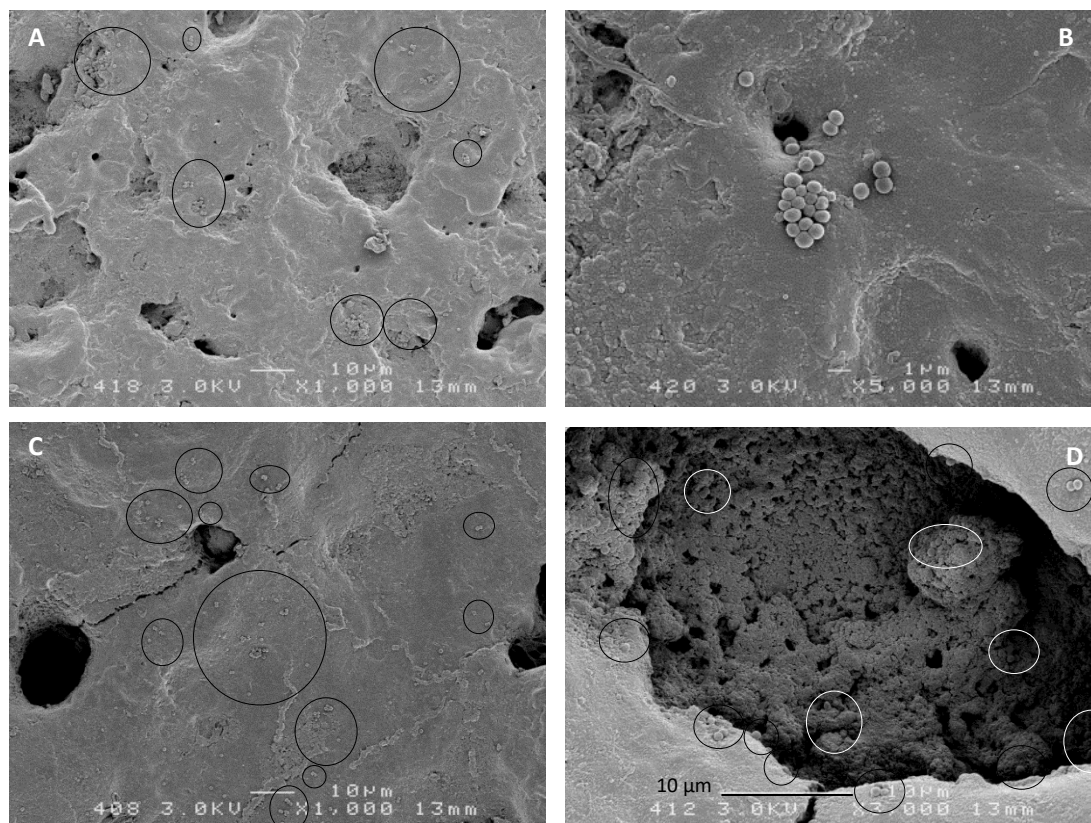


Figure 12 : Images MEB des surfaces d'alliage électro-érodées de titane grade 5 permettant de visualiser la position des bactéries *S. aureus* sur les surfaces : A et B : taille 1 ; et C et D : taille 3. Les cercles aident à repérer la position de certains amas de bactéries.

Sur les surfaces structurées par EDM, l'adhérence de levures diminue quand la taille et la profondeur des trous augmentent (Figure 11). Comme pour les bactéries, ceci peut être dû au fait que les levures se retrouvent piégées au fond des trous et ne sont pas éluées lors de la phase de décrochage.

D'après les images MEB des surfaces structurées, les levures se placent préférentiellement dans les trous, même si quelques levures isolées restent sur les zones plus lisses (Figure 13). La surface avec les trous de taille 1 présente de nombreux motifs de surface qui permettent aux levures de se placer

dans les creux car ils ont une taille comparable. De plus la faible profondeur des trous (environ 4 μm) permet de les décrocher plus facilement et de les dénombrer.

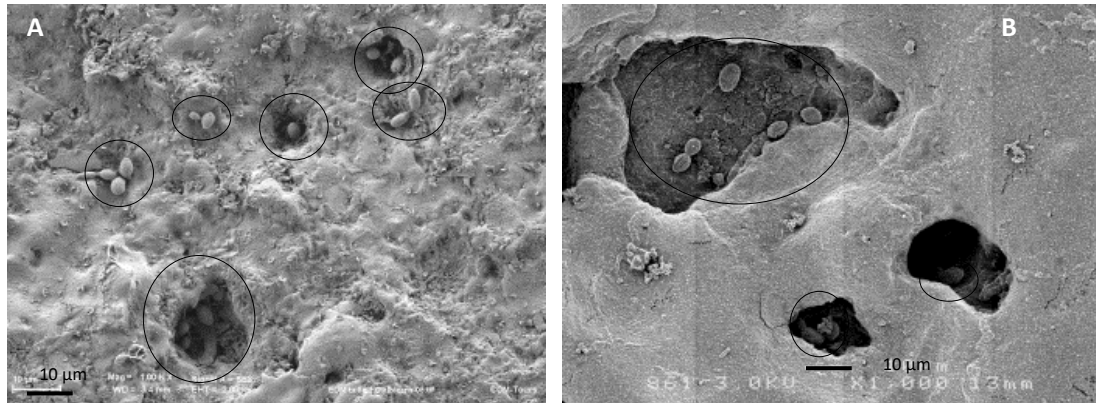


Figure 13 : Images MEB de surfaces électro-érodées de titane grade 5 permettant de visualiser la position des levures *C. albicans* sur les surfaces. A : Taille 1 ; et B : Taille 4. Les cercles aident à repérer la position des levures.

5. Comparaison des résultats entre les différentes surfaces et les chambres implantables

L'adhérence de *S. aureus* et *C. albicans* a montré des comportements différents en fonction de la topographie des surfaces structurées. Le paramètre de rugosité ne suffit pas à lui seul pour décrire la facilité ou non des microorganismes à adhérer sur une surface. En effet, sur les surfaces structurées avec des pyramides, l'augmentation de la rugosité a induit une augmentation de l'adhérence de microorganismes alors que sur les surfaces d'alliage de titane structurées par sablage, l'adhérence de microorganismes restait similaire pour les différentes rugosités.

Verran *et al.* [5] ont montré que sur des surfaces polymériques de poly (méthyl méthacrylate) (PMMA) plus ou moins rugueuses (rugosités de 7,3 ou 12,8 μm), la rétention de *C. albicans* augmentait fortement lorsque la rugosité augmentait, puisque les levures se retrouvaient coincées dans les motifs de surface. Pour les surfaces électro-érodées, notre hypothèse est la même que celle de Verran à savoir que plus la taille des trous augmente, plus les microorganismes pourront pénétrer dans les trous et y rester piégés, notamment dans les trous les plus grands et les plus profonds.

Dans le cas des surfaces structurées avec des pyramides, les bactéries et les levures ne semblaient pas avoir été piégées dans les recoins entre deux pyramides puisque le nombre de microorganismes adhérents augmentait avec l'augmentation de la taille des pyramides, ou du moins elles pouvaient en être éluées lors de la phase de décrochage. La forme des pyramides, relativement ouverte au

sommet, permet très probablement d'éluer plus facilement les microorganismes adhérents en surface durant la phase de décrochage.

Un échantillon ayant servi pour l'analyse microbiologique avec les bactéries, puis désinfecté, a été réutilisé pour l'observation MEB avec des levures. Quelques images ont montré la présence de bactéries dans certains trous, en plus des levures ayant été ajoutées. Cette image (Figure 14) permet donc de montrer que toutes les bactéries n'ont pas été décrochées des trous les plus grands et n'ont donc pas été comptées par la méthode de dénombrement par UFC. Il est ainsi possible d'interpréter la diminution apparente de l'adhérence de microorganismes comme un problème d'éluion et non une diminution du nombre de microorganismes adhérents.

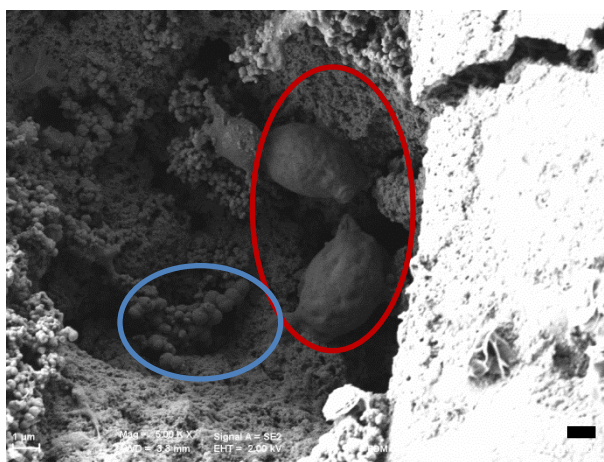


Figure 14 : Image MEB (X 5000) d'une surface de titane grade 5 électro-érodées 'taille 4' sur laquelle des levures (cercle rouge) et des bactéries (cercle bleu) sont visibles. La barre d'échelle correspond à 1 µm.

D'après les résultats obtenus, la rugosité de surface n'était pas à l'origine de toutes les différences observées de l'adhérence de microorganismes. Whitehead [6] et Lüdecke [7] ont montré que l'adhérence de microorganismes augmente quand la taille des motifs de surface est similaire à celle des bactéries ou levures, ou si la surface présente de multiples points d'accrochage à l'échelle du nanomètre. Dans nos études, la taille caractéristique des motifs de surface est généralement plus grande que celle des microorganismes étudiés. Un effet est cependant visible sur les surfaces avec les pyramides, l'adhérence des bactéries augmentait avec l'augmentation de la taille des pyramides et de la surface spécifique. Avec les levures, l'augmentation de l'adhérence était visible seulement quand l'espacement entre les pyramides était assez grand pour leur permettre de s'intercaler et d'augmenter leur contact avec la surface. Sur les surfaces électro-érodées, lorsque la taille des trous devient de l'ordre de 20 µm, la méthode de dénombrement par UFC montre ses limites quant à l'estimation du nombre de microorganismes réellement présents sur la surface.

Lors des traitements de surface par sablage ou électroérosion, la composition de surface du matériau peut changer. En utilisant l'analyse EDX, nous avons montré la formation d'un oxyde en surface des échantillons structurés par ces deux méthodes. Néanmoins, ce changement de composition chimique ne semble pas influencer le nombre de microorganismes adhérents sur les surfaces structurées.

La vérification du dénombrement grâce à la microscopie MEB n'est pas possible. En effet, les surfaces recouvertes de microorganismes ont besoin d'être préparées pour améliorer la qualité des images. Cette préparation nécessite de nombreux bains, susceptibles de déplacer ou de décrocher certains microorganismes (Annexe 3). Les images MEB permettent néanmoins de voir la répartition des microorganismes restés sur la surface après les rinçages et ainsi aident à mieux comprendre les résultats obtenus par la méthode de dénombrement par UFC.

III. Etude de l'adhérence de microorganismes et de l'adsorption de protéines sur les surfaces lisses fonctionnalisées

1. Adhérence de microorganismes sur les surfaces de TiO₂ lisses et fonctionnalisées

Des surfaces lisses de TiO₂ ont été fonctionnalisées par greffage moléculaire à l'aide de deux molécules munies d'un groupement biphosphonate, rendant la surface hydrophile grâce à un groupement poly(éthylène glycol) (molécule BpOH) ou hydrophobe grâce à un groupement perfluorate (molécule BpF).

L'adhérence de *S. aureus* et *C. albicans* a été testée sur ces surfaces lisses et fonctionnalisées. Les résultats sont présentés en Figure 15.

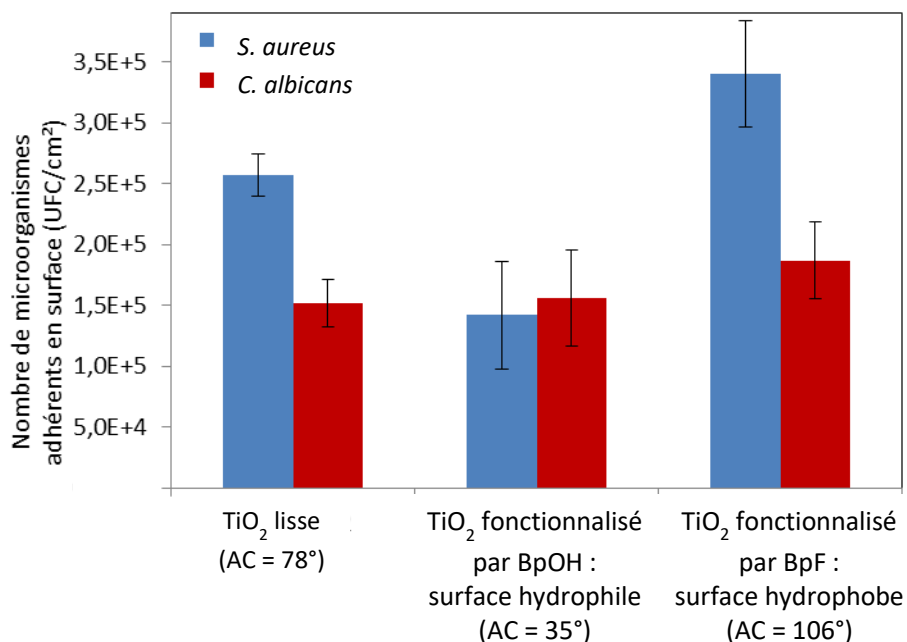


Figure 15 : Adhérence de *S. aureus* (en bleu) et *C. albicans* (en rouge) sur les surfaces de TiO₂ fonctionnalisées par les molécules BpOH (surface hydrophile) et BpF (surface hydrophobe). AC : angle de contact.

Contrairement à d'autres études pour lesquelles l'adhérence sous flux de bactéries dépendait de l'hydrophobie de surface [8, 9], l'adhérence des bactéries et des levures dans nos expériences ne semble pas être impactée significativement par le changement d'hydrophobicité de surface (Figure 15). Ici, la faible différence obtenue concernant l'adhérence des microorganismes n'est pas statistiquement significative ($p > 0,05$ d'après le test de Kruskal-Wallis). Cependant, sur deux surfaces, l'une se terminant par le groupement CH₃ et l'autre par le groupement CF₃ (toutes deux hydrophobes), Cunliffe [10] n'avait pas trouvé de modification significative du nombre de *S. aureus* adhérentes après 24 h de mise en culture .

Pour vérifier l'influence de la durée d'incubation et s'assurer de la pertinence des faibles écarts observés sur l'adhérence des microorganismes, des temps d'incubation plus long de 1 h, 4 h et 24 h ont été testés avec *S. aureus* (Figure 16).

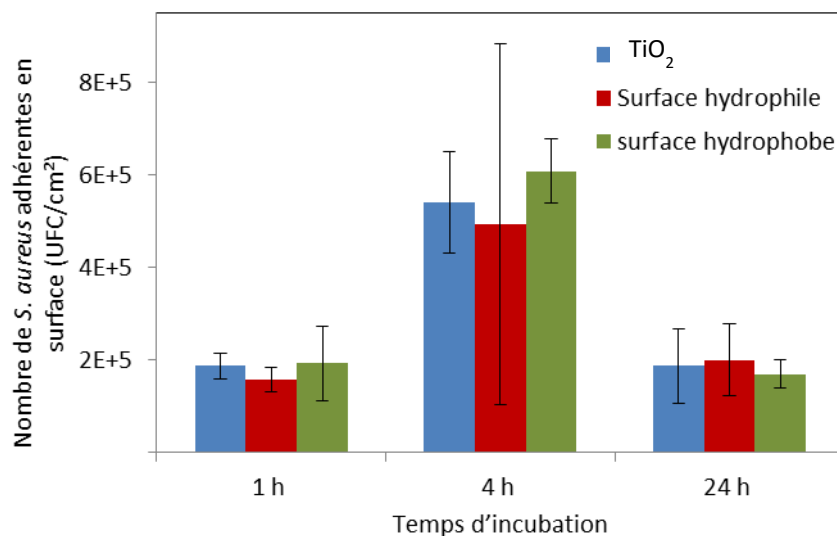


Figure 16 : Evolution de l'adhérence de *S. aureus* en fonction du temps d'incubation des échantillons

Sur les trois types de surface, l'adhérence de bactéries après 1 h d'incubation est relativement similaire à celle observée pour 30 min, proche de $2,5 \times 10^5$ UFC/cm² (Figure 15). Après 4 h d'incubation, l'adhérence augmente, probablement du fait de la possibilité des microorganismes de se multiplier sur la surface. Après 24 h de mise en culture, l'adhérence diminue et revient au même niveau qu'après 1 h d'incubation. Cette diminution est très probablement due à l'élimination de plaques de bactéries (qui ont commencé à former un biofilm) lors de la phase de rinçage. De plus, pour les différents temps d'incubation aucune différence significative n'est apparue entre les trois types de surface. Ainsi, d'après ces analyses, comme aucune différence n'est apparue entre la surface de TiO₂ et les surfaces fonctionnalisées, une durée d'incubation de 30 min a été choisie pour étudier la phase d'adhérence primaire des bactéries.

La présence de protéines adsorbées sur les surfaces est un facteur important conditionnant l'adhérence de microorganismes. En effet, ces molécules, beaucoup plus petites que les bactéries et les levures, peuvent s'adsorber rapidement sur une surface, créant un film sur la surface [10]. Les propriétés initiales de la surface peuvent ainsi être masquées, expliquant que les microorganismes adhèrent de façon similaire sur les trois types de surface. Dans le corps humain, dès lors qu'un implant est en contact avec des fluides biologiques, il se recouvre d'un film de conditionnement composé de protéines et autres petites molécules [11]. En fonction de la composition du film de conditionnement, l'adhérence de microorganismes peut être modifiée [12]. L'adsorption de plusieurs protéines plasmatiques a donc été étudiée de manière à déterminer la quantité de protéines adsorbées sur chacune de ces surfaces lisses et fonctionnalisées et l'impact de l'adsorption sur

l'adhérence des microorganismes. Les principales protéines étudiées dans la littérature sont l'albumine, la fibronectine, le fibrinogène et la laminine, du fait de leur grande concentration dans le plasma humain ou de leurs propriétés adhésives.

2. Analyse de l'adsorption sur l'adhérence de protéines

a. Rôle des protéines plasmatiques dans l'adhérence des microorganismes

Comme les protéines jouent un rôle majeur sur l'adhérence de microorganismes, l'adsorption de l'albumine, de la fibronectine et du fibrinogène a été étudiée sur les surfaces lisses de TiO₂ fonctionnalisées ou non.

L'albumine est une petite protéine de 66 kDa très abondante dans le plasma avec une concentration d'environ 35 à 50 g/L. Le fibrinogène est une protéine plus grande, de masse molaire 340 kDa, présente dans le plasma humain avec une concentration d'environ 4 g/L. Elle permet la coagulation plasmatique [13]. La fibronectine est une protéine d'environ 450 kDa présente dans le plasma humain avec une concentration de 300 à 500 mg/L [14].

La composition chimique de surface influence le processus d'adhésion des protéines sur la surface. Ainsi en modifiant les propriétés de surface, il est possible de modifier l'adhérence bactérienne et fongique. En effet, certaines bactéries ou levures ont des récepteurs spécifiques pour certaines protéines [15]. Ainsi, il a été montré que la présence d'albumine sur différents types de surface limitait l'adhérence de *S. aureus* [13, 16, 17]. Cette diminution peut s'expliquer par la conformation particulière que peut prendre l'albumine sur la surface qui n'interagit pas avec la bactérie. Au contraire, la présence de fibrinogène, de fibronectine ou de laminine semble augmenter l'adhérence de bactéries pathogènes comme *S. aureus* [9, 11, 18].

De nombreuses publications présentent les résultats d'étude de l'adsorption de protéines sur une surface fonctionnalisée ou métallique, mais les résultats ne montrent pas une tendance claire en fonction notamment de l'hydrophobicité de surface [19-22].

b. Mesure de la quantité de protéines adsorbées par QCM

L'étude de l'adsorption des protéines sur les surfaces lisses fonctionnalisées, dont l'élaboration est décrite dans le chapitre 2, a été réalisée par microbalance à quartz (QCM-D). Cet appareil permet de déterminer la quantité de protéines déposées ou adsorbées en surface d'un quartz avec une grande précision (au ng/cm^2) [23]. L'appareil permet aussi de déterminer la cinétique d'adsorption puisque la mesure se fait *in situ*.

La microbalance est composée d'un disque en quartz sur lequel deux électrodes sont placées. Un courant est appliqué entre ces deux électrodes entraînant l'oscillation du quartz à sa fréquence de résonance. Le courant est ensuite éteint, l'oscillation diminue exponentiellement. La fréquence d'oscillation du disque et la dissipation du signal sont mesurées. Les harmoniques impaires de la fréquence et de la dissipation sont collectées durant la mesure. La 5^{ème} harmonique est généralement choisie lors de l'analyse des résultats. Lorsqu'un liquide est introduit, si une masse se dépose ou au contraire est enlevée de la surface la fréquence d'oscillation du disque est modifiée (Figure 17-B). En fonction de la rigidité de la couche déposée, la dissipation du signal est plus ou moins importante (Figure 17-C). Ces deux informations (fréquence et dissipation) permettent de retrouver certaines caractéristiques de la couche déposée. Le fluide contenant la solution de protéines est entraîné par une pompe et la cellule contenant le quartz est à température fixe (37°C).

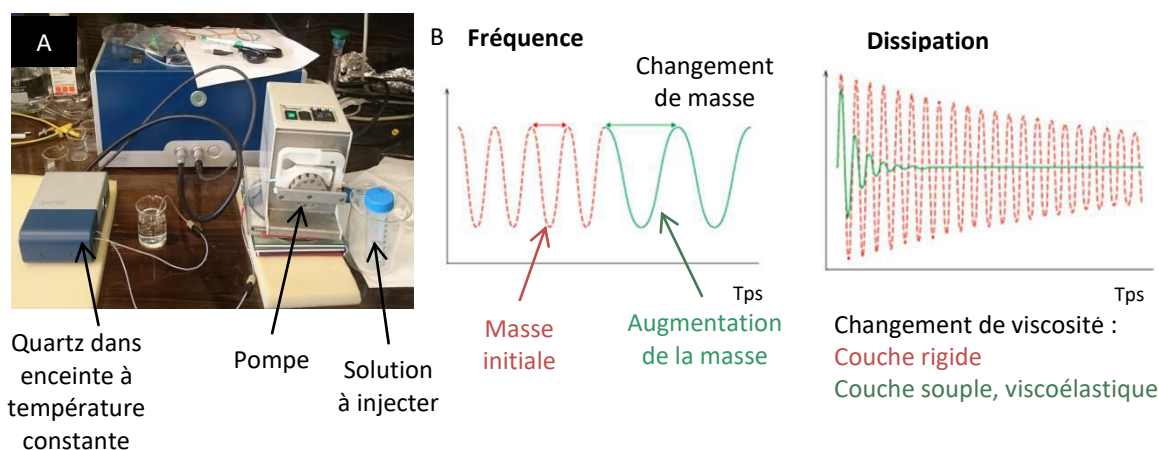


Figure 17 : A : Photo du dispositif de la microbalance à quartz. B : Impact d'un changement de masse sur la fréquence (QSense) C : Impact d'un changement de rigidité sur la dissipation (QSense).

L'adsorption de l'albumine (BSA : Bovine serum albumin, albumine d'origine bovine), le fibrinogène (Fg, origine humaine) et la fibronectine (Fn, origine humaine) a été étudiée par QCM-D sur les surfaces lisses de TiO_2 et de TiO_2 fonctionnalisées. Ces protéines sont souvent étudiées du fait de leur forte concentration dans le plasma ou de leur rôle dans l'adhérence cellulaire. Les solutions

protéiques ont été préparées dans du PBS. La concentration en albumine a été fixée à 1 g/L, et celle du fibrinogène et de la fibronectine à 250 mg/L. Les solutions de protéines ont été utilisées dans les 48 h après leur préparation. Pour chaque mesure, la fréquence du quartz est d'abord stabilisée dans de l'eau ultra-pure, puis dans du PBS avant l'introduction des protéines. Chaque solution protéique a été introduite pendant 10 min après que la stabilisation soit réalisée, puis une solution de PBS a été injectée pendant 10 min pour rincer le quartz et étudier une éventuelle désorption.

Les dépôts de TiO_2 et les fonctionnalisations ont été réalisés sur des quartz, ces supports sont nécessaires pour l'étude avec la microbalance, en suivant le même protocole que sur les wafers de silicium, dont le protocole est décrit dans le Chapitre 2. Après chaque utilisation, les quartz ont été lavés dans une solution d'Hellmanex 2% pendant 30 min, puis mis dans un bain d'éthanol aux ultrasons pendant 10 min et enfin irradiés 10 min sous UV- O_3 avant rinçage avec de l'eau ultra-pure. Les quartz ont pu être réutilisés, cependant, avant chaque réutilisation, un film mince de TiO_2 a été déposé sur chaque quartz pour avoir de nouveau une surface propre et homogène, sur laquelle l'adsorption des protéines a pu être étudiée.

c. Résultats obtenus

Quand la solution de protéines est injectée dans la cellule, la fréquence diminue quel que soit la nature de la protéine, témoignant de l'adsorption de protéines en surface. Durant le rinçage en PBS, la faible augmentation de la fréquence est due à la désorption partielle de protéines. La pente initiale lors de l'introduction de la solution de protéines permet de déterminer la vitesse d'adsorption initiale des protéines sur une surface nue, sans protéines. Les résultats des mesures d'adsorption de l'albumine, du fibrinogène et de la fibronectine sur le TiO_2 et les surfaces de TiO_2 fonctionnalisées sont donnés en Figure 18.

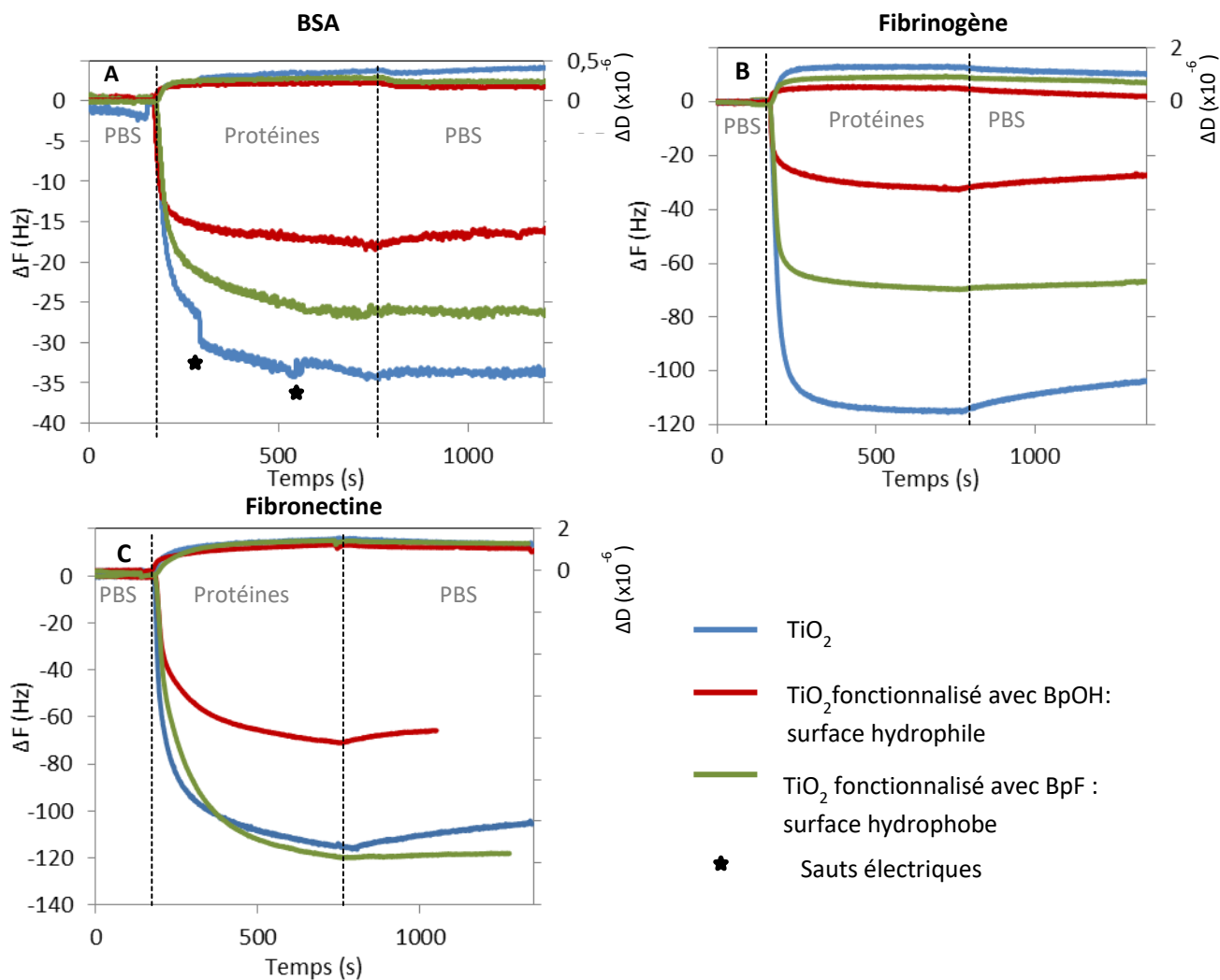


Figure 18 : Evolution de la variation de fréquence et de la variation de la dissipation en fonction du temps (5^{ème} harmonique) sur le TiO₂ (en bleu), le TiO₂ fonctionnalisé par BpOH (surface hydrophile, en rouge) et le TiO₂ fonctionnalisé par BpF (surface hydrophobe, en vert) avec A : BSA, B : Fibrinogène et C : Fibronectine.

Pour la BSA et le fibrinogène, l'adsorption est minimale sur la surface hydrophile et maximale sur le TiO₂. Inversement, l'adsorption de fibronectine est minimale sur la surface hydrophile, et similaire sur le TiO₂ et la surface hydrophobe.

Le modèle de Sauerbrey permet de déterminer la masse de protéines adsorbée en surface à partir de la variation de la fréquence. Ce calcul utilise comme hypothèse que le film déposé est homogène et rigide. Dans ce cas, il est admis que la variation de dissipation (ΔD) doit rester inférieure à 1×10^{-6} (pour un quartz 5 MHz) [23].

Avec les trois protéines, ce critère sur la variation de la dissipation a été vérifié, il a donc été possible de calculer la masse de protéines adsorbée sur chaque surface (Tableau 3). La formule reliant la fréquence à la masse est donnée par : $\Delta m = -C \frac{\Delta F_n}{n}$ où Δm est la variation de masse, ΔF_n la variation

de fréquence pour la $n^{\text{ième}}$ harmonique et $C = 17,7 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{Hz}^{-1}$ [24]. La masse obtenue tient aussi compte de la masse du solvant.

Tableau 3 : Valeurs caractéristiques de l'adsorption de l'albumine, du fibrinogène et de la fibronectine sur les trois types de surfaces lisses et fonctionnalisées

Protéine	ΔF (Hz) Adsorption	Masse surfacique (ng.cm^{-2}) Modèle de Sauerbrey	ΔF (Hz) Désorption	Taux adsorption initial ($\text{ng.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
Bovine serum albumin (BSA)				
Surface hydrophile	-16 ± 3	280 ± 50	2 ± 1	14,1
Surface hydrophobe	-26 ± 2	460 ± 40	$0,3 \pm 1$	10,6
TiO ₂	-34 ± 2	600 ± 40	$0,5 \pm 1$	14,1
Fibrinogène (Fg)				
Surface hydrophile	-28 ± 2	500 ± 40	4 ± 1	49,6
Surface hydrophobe	-68 ± 2	1200 ± 40	1 ± 1	42,5
TiO ₂	-105 ± 3	1860 ± 50	10 ± 2	56,7
Fibronectine (Fn)				
Surface hydrophile	-71 ± 2	1260 ± 40	7 ± 2	20,2
Surface hydrophobe	-119 ± 2	2100 ± 40	1 ± 1	22,1
TiO ₂	-115 ± 2	2040 ± 40	10 ± 2	37,1

Pendant le rinçage en PBS, la BSA ne se désorbe pas de manière significative ou avec une cinétique très lente, non visible en 10 min. Ainsi, avec les conditions utilisées, la BSA s'adsorbe de manière irréversible sur chacune des trois surfaces. Le fibrinogène se désorbe très légèrement sur les deux surfaces fonctionnalisées (moins de 4 Hz), mais cette désorption est plus visible sur le TiO₂ (9 Hz), ceci peut s'expliquer par la formation de bicouches lors de la phase d'adsorption qui se décrocheraient plus facilement lors du rinçage avec le PBS. Sur la surface hydrophile et sur le TiO₂, la fibronectine semble pouvoir se désorber plus facilement (ΔF désorption > 7Hz) que sur la surface hydrophobe où la désorption est quasiment nulle. La désorption de cette protéine est relativement faible du fait de sa taille, en effet, elle a de nombreux points d'accroche ce qui rend plus difficile la désorption [25].

Le taux d'adsorption initial semble ne pas dépendre du type de surface et de son hydrophobicité mais uniquement de la nature de la protéine. Il est plus important avec le fibrinogène et la fibronectine qu'avec la BSA en masse surfacique (Tableau 3).

La valeur du gradient $\Delta D/\Delta F$ caractérise la viscoélasticité de la couche de protéines déposée. Plus cette valeur sera faible et plus la couche sera rigide [20, 26]. La rigidité de la couche et leur nombre sur la surface impacte la conformation, la densité et l'orientation des protéines [26].

Pour la BSA, la valeur de $\Delta D/\Delta F$ est similaire pour les trois types de surface (Figure 19-A). Ainsi, même si plus de protéines sont présentes en surface, la compacité de la couche reste similaire.

Pour le fibrinogène, de très faibles variations de la valeur initiale de $\Delta D/\Delta F$ sont observées indiquant un même comportement initial lorsque le fibrinogène arrive sur une surface nue (Figure 19-B). Cependant, la courbe ΔD en fonction de ΔF de l'adsorption du fibrinogène sur le TiO_2 montre trois pentes. La conformation des protéines sur la surface de TiO_2 dépend aussi du nombre de protéines présentes sur la surface, une nouvelle organisation des protéines est probablement à l'origine de ces changements de pente. Cependant, la stabilité du fibrinogène n'est probablement pas impactée par cette nouvelle organisation puisque la désorption lors du rinçage en PBS est très faible.

L'adsorption de la fibronectine sur les trois types de surface se fait très probablement en deux étapes, comme chaque tracé de ΔD en fonction de ΔF présente deux pentes (Figure 19-C). La première pente correspond aux valeurs de fréquences les plus faibles (avec moins de protéines en surface) alors que la seconde pente correspond aux fréquences plus grandes (avec plus de protéines en surface). Les valeurs montrent que l'adsorption se fait de manière plus rigide dans un premier temps, la valeur $\Delta D/\Delta F$ étant plus faible dans les trois cas. Une réorientation apparaît donc, conduisant à une couche moins rigide où les protéines ont plusieurs degrés de dépliement [27].

Les valeurs de $\Delta D/\Delta F$ restent néanmoins relativement faibles avec chaque protéine et sur chaque surface, ce qui confirme la possibilité d'utiliser la relation de Sauerbrey pour le calcul des masses de couches rigides déposées [23].

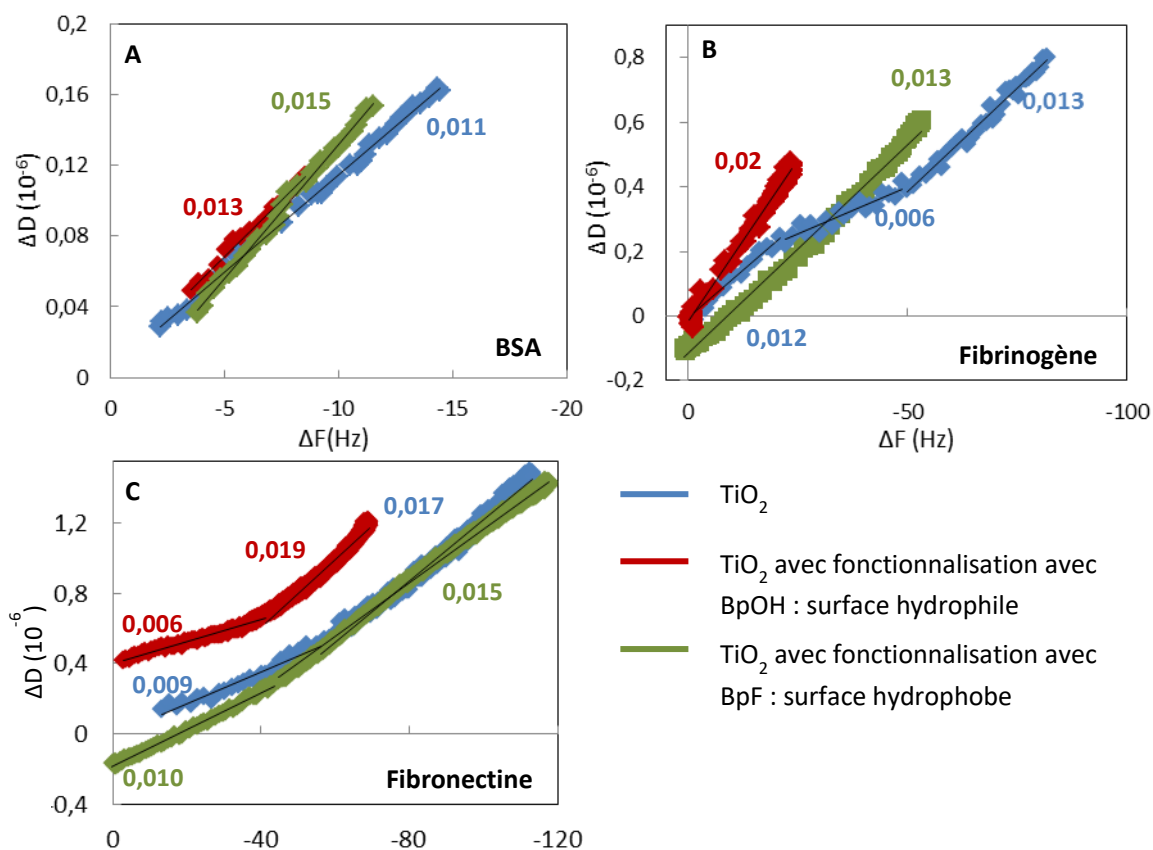


Figure 19 : La variation de la dissipation (ΔD) en fonction de la variation de la fréquence (ΔF) pour les adsorptions de A : BSA, B : Fibrinogène et C : Fibronectine, sur le TiO₂ (en bleu), le TiO₂ fonctionnalisé par BpOH (surface hydrophile, en rouge) et le TiO₂ fonctionnalisé par BpF (surface hydrophobe, en vert)

d. Comparaison des capacités d'adsorption des différentes protéines

D'après les résultats, l'adsorption de fibrinogène est environ deux fois plus importante, en masse surfacique, que celle de la BSA sur la surface hydrophobe et le TiO₂ et l'écart est plus faible sur la surface hydrophile. La masse surfacique de protéine adsorbée sur les surfaces fonctionnalisées est plus importante pour la fibronectine que pour les deux autres protéines. Cependant, l'adsorption sur la surface de TiO₂ est similaire entre le fibrinogène et la fibronectine. Cette tendance a déjà été observée sur des surfaces fonctionnalisées se terminant par CH₃, OH et CF₃ [24, 28].

Pour les trois protéines, l'adsorption est moins importante sur la surface hydrophile. La BSA et le fibrinogène s'adsorbent mieux sur la surface hydrophobe et en plus grande quantité sur la surface de TiO₂ non fonctionnalisée. L'adsorption de la fibronectine sur la surface hydrophobe et sur le TiO₂ est similaire. La plus faible adsorption de protéines sur les surfaces hydrophiles, se terminant par OH, en comparaison aux surfaces hydrophobes se terminant par CH₃ a déjà été rapportée dans la littérature [20, 25, 28, 29]. En effet, les surfaces se terminant par du poly(éthylène glycol) sont particulièrement

connues pour limiter l'adsorption de protéines, ce qui est conforme aux résultats obtenus [21, 30, 31]. Vogler [32] a expliqué cette faible adsorption sur les surfaces hydrophiles par le fait qu'elles se recouvrent d'un film de molécules d'eau qui défavorise l'adsorption des protéines.

A partir de la masse de protéine adsorbée, il est possible de déterminer la densité surfacique de protéines déposées (Tableau 4).

Tableau 4 : Densités surfaciques de la BSA, du fibrinogène et de la fibronectine sur les trois surfaces lisses.

Protéines/cm ²	BSA	Fibrinogène	Fibronectine
TiO ₂ -BpOH	2,6 x 10 ¹²	8,8 x 10 ¹¹	1,7 x 10 ¹²
TiO ₂ -BpF	4,2 x 10 ¹²	2,1 x 10 ¹²	2,8 x 10 ¹²
TiO ₂	5,5 x 10 ¹²	3,3 x 10 ¹²	2,7 x 10 ¹²

En fonction du pH et du milieu, la BSA ne se présente pas avec la même conformation et l'adsorption peut être modifiée [33]. A pH 7,4, dans du PBS, la BSA existe repliée avec une forme de cœur, appelée forme N. L'albumine a un rayon hydrodynamique de 2,6 nm, valeur mesurée par Cannistraro [34]. A partir de cette valeur, l'aire projetée d'une molécule de BSA est estimée à 21,2 nm², donnant ainsi une densité de surface de 4,7 x 10¹² BSA/cm² pour obtenir une monocouche, où les protéines seraient en contact les unes des autres, en gardant la même forme qu'en solution.

La forme en cœur de la BSA présente trois domaines différents, chargés positivement et négativement, qui peuvent modifier l'orientation avec laquelle la protéine arrive sur une surface (en fonction de la charge de surface) [33]. Dans la littérature, l'adsorption de la BSA sur des surfaces hydrophile ou hydrophobe a été observée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) dans le but d'étudier la conformation de la protéine. La bande amine I a été utilisée pour étudier la structure secondaire de la protéine. Les auteurs ont observé une diminution de la bande correspondant à la structure hélice α liée et une augmentation de la bande correspondant à la structure hélice α libre [35]. Cette conformation a été observée avec la BSA de manière légèrement plus importante sur des surfaces hydrophobes indiquant un degré de dénaturation de la protéine plus important dans la direction longitudinale [28]. Les ions phosphate présents dans la solution de PBS peuvent aussi stabiliser les protéines par la formation de complexes [35]. Ainsi, la déformation de la BSA dans une direction longitudinale permet de maximiser à la fois les interactions avec le solvant et avec la surface, permettant d'obtenir une couche plus stable et plus rigide [33]. La déformation de la BSA peut en partie expliquer la plus faible densité surfacique que celle calculée ci-dessus.

D'après les résultats QCM donnés dans le Tableau 4, la densité surfacique de la BSA sur la surface hydrophobe était très proche de la valeur théorique, indiquant la formation d'une monocouche après une légère déformation de la protéine comme cela a pu être montré par Roach [28]. Sur la surface de TiO₂, la densité surfacique calculée est un peu plus importante que la valeur théorique, les protéines forment probablement des multicouches par endroit sur la surface. Enfin, les protéines sur la surface hydrophile ne semblent pas former une monocouche. Pour cela, deux hypothèses ont été formulées pour expliquer la forte rigidité de la couche :

- La déformation de la BSA peut permettre de former une monocouche, en fonction du degré de dénaturation [28, 35] ;
- La formation d'îlots de protéines compacts lors de l'adsorption des protéines en surface peut permettre d'obtenir une couche partielle rigide, comme cela a déjà pu être observé [36-38].

La molécule de fibrinogène se présente la forme d'une ellipsoïde. Elle peut arriver sur la surface sous deux formes : une orientation parallèle à la surface pour laquelle la densité surfacique a été estimée à $3,0 \times 10^{11}$ Fg/cm² et une orientation perpendiculaire à la surface avec une densité surfacique de $2,0 \times 10^{12}$ Fg/cm² [39]. Le nombre de molécules de fibrinogène adsorbé sur la surface hydrophobe est très proche de la valeur donnée dans la littérature, indiquant la formation d'une monocouche de protéines dans la direction perpendiculaire à la surface. Sur le TiO₂, la valeur calculée à partir de la variation de fréquence est plus importante, suggérant la formation de multicouches. La formation de multicouches peut expliquer la désorption plus importante du fibrinogène, faiblement lié, observée sur le TiO₂ (Tableau 3). Sur la surface hydrophile, la densité surfacique obtenue est comprise entre les deux valeurs données dans la littérature, compatible avec la formation d'une monocouche compacte formée avec un certain angle par rapport à la surface, ou d'une couche hydratée [39].

La molécule de fibronectine prend différentes formes en fonction du pH et de la force ionique de la solution. Aux conditions physiologiques (37°C et pH 7,4), la fibronectine se présente sous forme compacte alors que lorsque la température et la force ionique augmentent, elle se trouve dans une forme dépliée du fait de sa flexibilité, sans qu'il y ait dénaturation [40, 41]. Sur une surface, la protéine peut aussi changer de conformation en fonction des propriétés de la surface [42]. Sur une surface de TiO₂ la taille de la molécule de fibronectine a été évaluée par AFM à $16,5 \pm 1$ nm de longueur, $9,6 \pm 1,2$ nm de largeur et $2,5 \pm 0,5$ nm de hauteur [40]. Il a été montré que sur une surface de mica, hydrophile, la fibronectine seule ou agrégée s'adsorbait sur la surface. Au contraire, sur une surface polymérique hydrophobe de PMMA, la fibronectine formait un réseau où les protéines se liaient les unes aux autres en limitant les interactions avec la surface. L'épaisseur de ce réseau était estimée entre 2 et 5 nm, montrant que les protéines formaient par endroit des multicouches [42].

En utilisant les dimensions données pour la fibronectine pour en déduire l'aire projetée d'une molécule de fibronectine, on obtient une densité surfacique de $6,3 \times 10^{11}$ Fn/cm². Sur la surface de TiO₂ et la surface hydrophobe, la densité de protéines en surface (Tableau 4) est supérieure à celle attendue si les molécules de fibronectine sont dans la même conformation que sur le TiO₂ étudié [42]. Cela peut s'expliquer par la formation d'un réseau de molécules de fibronectine liées entre elles et pouvant former des monocouches, comme cela a pu être observé sur la surface hydrophobe de PMMA [42]. Sur la surface hydrophile, la valeur de la densité de surface de fibronectine calculée est supérieure à la valeur théorique, mais reste néanmoins plus faible que sur les deux autres surfaces (Tableau 4). Il est probable que la fibronectine s'adsorbe directement sur la surface en formant dans un premier temps une monocouche, puis des multicouches par endroits. Cette hypothèse est en accord avec le changement de valeur de $\Delta D/\Delta F$ (Figure 19). En effet, le changement de pente apparaît pour une fréquence d'environ 40 Hz, soit une densité surfacique légèrement supérieure à celle correspondant à une monocouche. La diminution de la rigidité apparaît donc probablement lors de la formation des monocouches en surface.

L'adsorption de protéines sur une surface dépend de paramètres tels que l'hydrophobicité de surface ou encore du potentiel zéta. La surface de TiO₂ et les deux surfaces fonctionnalisées ont un potentiel zéta négatif à pH = 7,4. Les points isoélectriques sont respectivement 4,3, 4,17 et 3,85 pour la surface de TiO₂, la surface hydrophile fonctionnalisée par BpOH et la surface hydrophobe fonctionnalisée par BpF. Le point isoélectrique est de 4,9 pour l'albumine, et de 5,5 pour le fibrinogène et la fibronectine. Les trois protéines sont donc chargées négativement à pH 7,4. Ainsi, l'adsorption des protéines sur ces surfaces ne devrait pas être favorisée, cependant les structures des protéines présentent différents domaines positifs et négatifs permettant de favoriser une adsorption sur certaines surfaces [33, 42].

Pour rappel, les angles de contact des trois surfaces sont respectivement de $78 \pm 2^\circ$, $106 \pm 3^\circ$ et $35 \pm 2^\circ$ pour le TiO₂, la surface hydrophobe et la surface hydrophile. Une étude réalisée par Tamada [43] montre que l'adsorption de la fibronectine et de l'albumine est maximale pour une surface polymérique ayant un angle de contact compris entre 70 et 80° et diminue pour les surfaces plus hydrophiles et plus hydrophobes (Figure 20). Cette tendance a été retrouvée avec l'albumine et la fibronectine, mais aussi avec le fibrinogène, d'après les résultats QCM. Les valeurs obtenues par QCM sont du même ordre de grandeur voire un peu plus faibles avec la fibronectine que les valeurs présentées par Tamada.

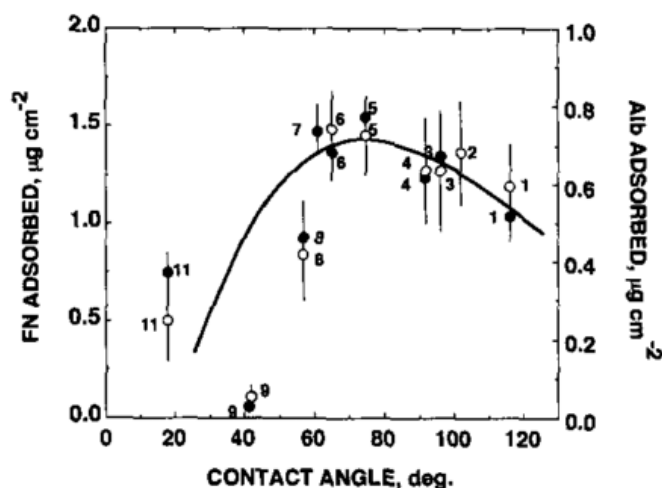


Figure 20 : Dépendance de l'adsorption de l'albumine (Alb - ○) et la fibronectine (FN- ●) en fonction de l'angle de contact de la surface [43]

Ce résultat indique qu'il existe un angle de contact pour lequel l'adsorption de protéines est maximale et répond aux résultats obtenus montrant une diminution de l'absorption de protéines sur une surface hydrophile [21, 25, 31] ou hydrophobe [22, 44].

3. Adhérence des microorganismes en présence de protéines sur les surfaces lisses

L'adhérence des microorganismes a ensuite été testée sur les trois types de surfaces lisses : les deux surfaces fonctionnalisées et la surface de TiO₂, pré-recouvertes de BSA ou de fibrinogène.

Protocole de recouvrement des surfaces par les protéines

La solution de BSA a été préparée comme précédemment indiqué pour les analyses de l'adsorption des protéines avec la QCM. La concentration en BSA a été choisie à 1 g/L (solution en PBS). La concentration en fibrinogène a été fixée à 200 mg/L, dans une solution de citrate de sodium 0,15 mol/L en PBS. La présence de citrate dans la solution permet d'empêcher le fibrinogène de coaguler.

Chaque échantillon de TiO₂ ou de TiO₂ fonctionnalisé a ensuite été immergé dans 1,5 ml de la solution protéique pendant 1 h à 37°C. Des échantillons témoins, n'ayant pas été recouverts de protéines, ont été immergés pendant 1 h à 37°C dans du PBS, afin de reproduire des conditions

expérimentales similaires. Les échantillons ont ensuite été mis en contact avec la suspension de microorganismes pendant 30 min en suivant le protocole décrit précédemment.

Etude de l'adhérence de bactéries

L'adhérence de *S. aureus* a été testée sur les surfaces lisses de TiO₂ et de TiO₂ fonctionnalisées par les molécules BpOH et BpF et pré-recouvertes ou non de BSA ou de fibrinogène. Les résultats sont présentés sur la Figure 21.

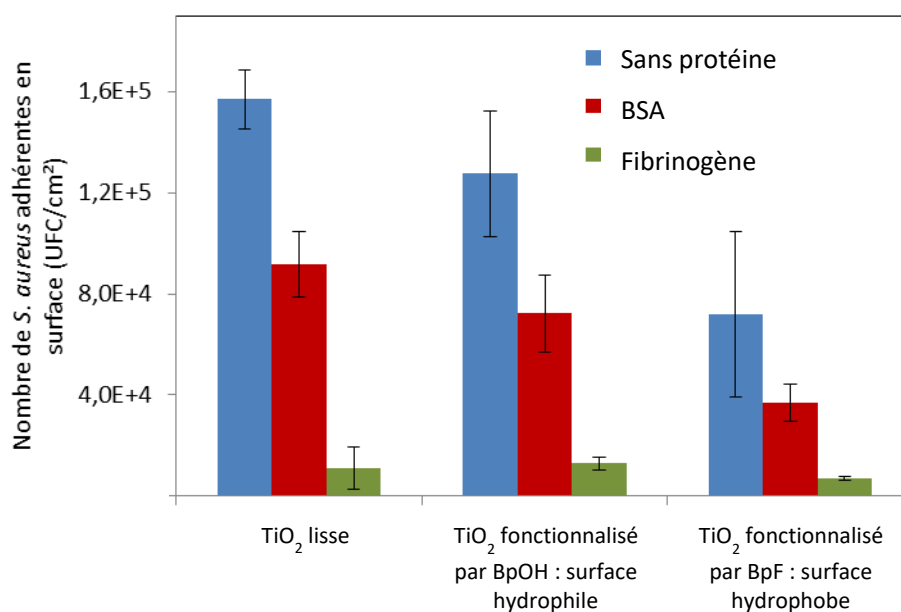


Figure 21 : Nombre de bactéries adhérentes sur les surfaces lisses et fonctionnalisées pré-recouvertes de BSA (en rouge) ou de fibrinogène (en vert)

L'adhérence de *S. aureus* sur les surfaces non recouvertes de protéines est similaire à celle déjà observée, aucune différence significative n'est observée. La présence de BSA sur les surfaces engendre une faible diminution du nombre de bactéries adhérentes. Cette diminution est non significative, mais la tendance est observée sur les trois types de surface. Cette tendance à la diminution a déjà été observée dans la littérature [13, 16]. D'après les résultats obtenus par QCM, la BSA s'adsorbe davantage sur la surface de TiO₂ par comparaison avec la surface hydrophile. Cependant, ici la différence d'adhérence entre les surfaces sans protéine et les surfaces pré-recouvertes de BSA est similaire qu'elles soient hydrophile ou hydrophobe, indiquant que même une monocouche incomplète peut suffire à limiter l'adhérence. La présence de BSA sur les surfaces incubées pendant 30 min avec *S. aureus* permet une diminution d'environ 30% de l'adhérence bactérienne.

En présence de fibrinogène sur les surfaces, l'adhérence de *S. aureus* diminue fortement, et de manière significative. Ce résultat va à l'encontre de nombreuses études qui ont montré que la présence de fibrinogène en surface augmentait l'adhérence de *S. aureus* car cette bactérie présente des récepteurs pour le fibrinogène sur sa membrane [9, 11, 45, 46]. Certaines analyses microbiologiques [9] ont été réalisées sous flux, et peuvent, par un protocole d'étude différent, expliquer cette différence. Les études de Flemming [45] et de McDevitt [46] présentaient cependant des conditions expérimentales similaires aux nôtres en termes de temps d'incubation. Cette forte diminution de l'adhérence de *S. aureus* peut donc s'expliquer par la présence de citrate trisodique dans la solution dans laquelle est dissout le fibrinogène ou bien par le décrochage partiel de la couche de fibrinogène de la surface entraînant le décrochage des bactéries adhérentes lors des phases de rinçage.

L'adhérence de *S. aureus* a été testée sur des surfaces de TiO_2 pré-recouvertes de fibrinogène ayant été préparées dans une solution contenant ou non du citrate afin de vérifier la première hypothèse. Les résultats de l'analyse de l'adhérence de *S. aureus* sur les surfaces de TiO_2 sont donnés sur la Figure 22.

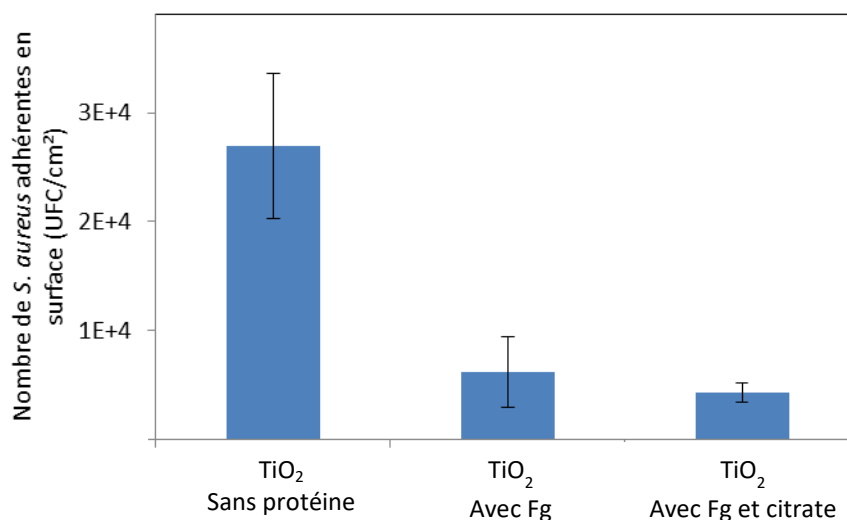


Figure 22 : Adhérence de *S. aureus* sur des surfaces lisses de TiO_2 pré-recouvertes ou non de Fg

Le test de Kruskal-Wallis complété par le test de Conover-Iman indique que la diminution de l'adhérence entre les surfaces de TiO_2 sans protéine et celles recouvertes de fibrinogène est significativement différente. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les surfaces ayant été recouvertes de fibrinogène en solution en PBS ou en PBS-citrate. La présence de citrate n'est donc pas à l'origine de la forte diminution de l'adhérence de *S. aureus* sur les surfaces recouvertes de fibrinogène. La deuxième hypothèse expliquant la diminution de l'adhérence

bactérienne par le décrochage partiel de plaques de fibrinogène durant la phase de rinçage est donc privilégiée.

Etude de l'adhérence de levures

Comme cela a été expliqué dans le Chapitre 1, la levure *Candida albicans* peut se présenter sous deux formes : la forme blastospore et la forme filamenteuse (hyphes issus des tubes germinatifs). L'adhérence de la levure sur les surfaces lisses fonctionnalisées pré-recouvertes de protéines (BSA ou fibrinogène) a été testée avec les deux formes. En effet, les tubes germinatifs présentent des récepteurs pour le fibrinogène, la laminine et la fibronectine qui sont absents en surface des blastospores [47].

La forme hyphe est obtenue à partir des levures sous forme blastospore par culture en milieu 199 (milieu de culture riche en sels et en protéines) pendant 1 h à 37°C. Dans un premier temps, la Figure 23 représente l'influence du stade morphologique (blastospores versus tubes germinatifs) sur l'adhérence de la levure sur les surfaces lisses de TiO₂ et fonctionnalisées.

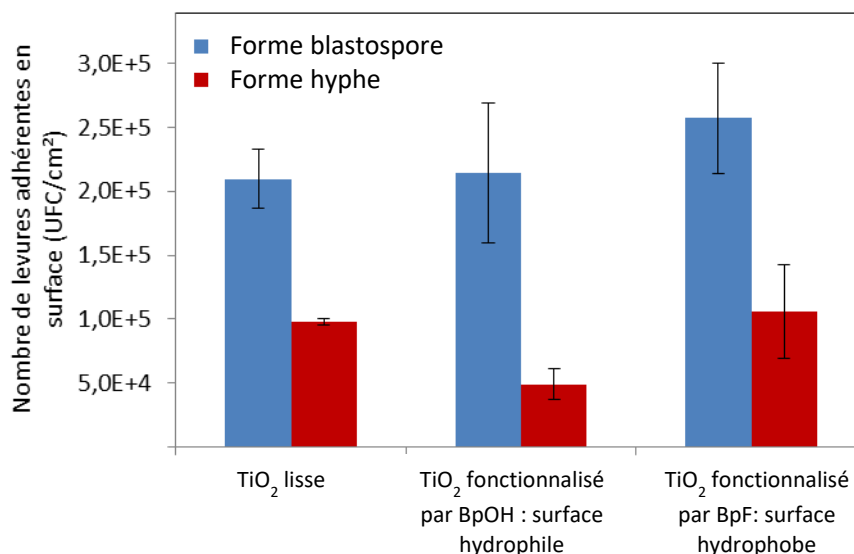


Figure 23 : Nombre de levures adhérentes sous forme blastospore (en bleu) ou sous forme d'hyphes (en rouge) sur les surfaces lisses et fonctionnalisées

Sur la surface de TiO₂ et les surfaces fonctionnalisées, hydrophile ou hydrophobe, les levures adhèrent davantage (différence significative d'après le test de Kruskal-Wallis) lorsqu'elles sont sous forme blastospore (Figure 23). L'adhérence des levures ayant des tubes germinatifs est similaire sur les trois types de surface.

L'adhérence de levures sous forme blastospore ou hyphale a ensuite été étudiée sur les surfaces pré-recouvertes de protéines : BSA ou fibrinogène. Les résultats sont regroupés sur la Figure 24.

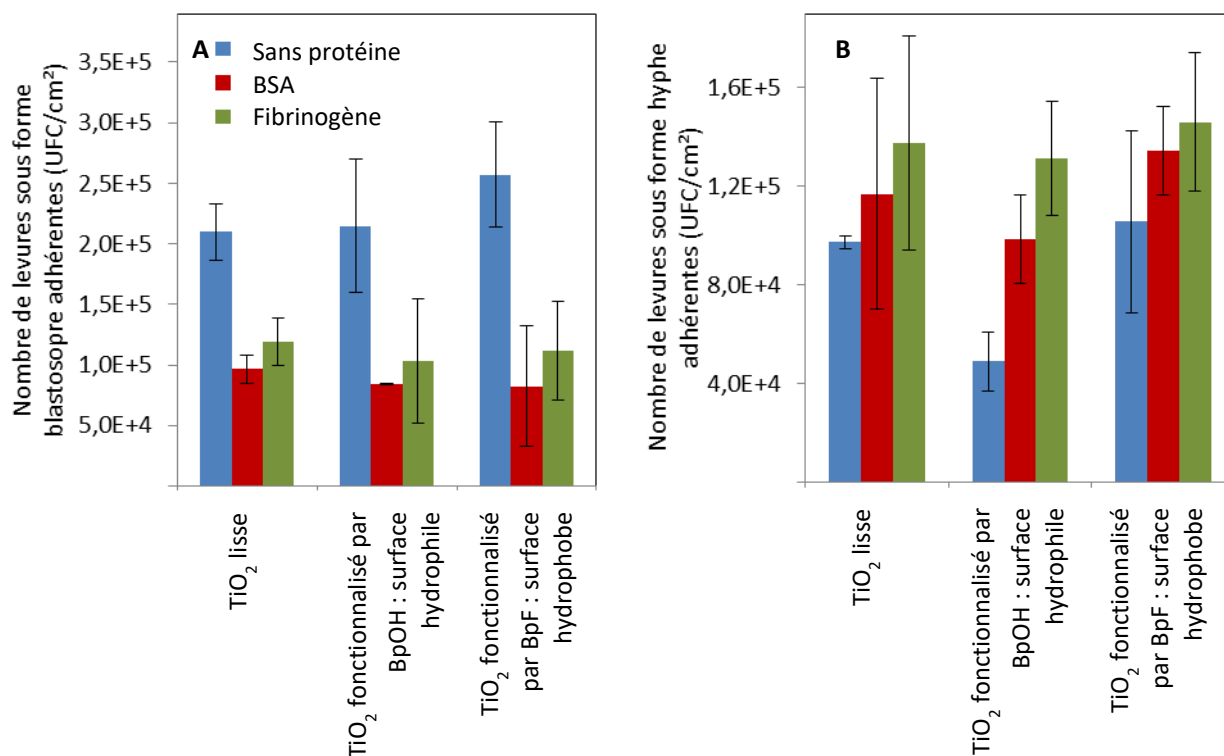


Figure 24 : Nombre de levures adhérentes (A : forme blastospore et B : forme hyphale) sur les surfaces lisses fonctionnalisées pré-recouvertes ou non (en bleu) de BSA (en rouge) ou de fibrinogène (en vert)

Pour les levures sous forme blastospore, la Figure 24-A montre que le nombre de levures sur les surfaces de TiO₂ ou fonctionnalisées (hydrophile ou hydrophobe) diminuent lorsque celles-ci sont recouvertes de BSA ou de fibrinogène. Le nombre de levures adhérentes sur les surfaces pré-recouvertes de l'une ou l'autre des protéines est similaire (diminution d'environ 50%), la différence n'est pas significative.

Avec les levures sous forme de tubes germinatifs, le nombre de levures adhérentes est plus élevé sur les surfaces fonctionnalisées pré-recouvertes de BSA, mais surtout de fibrinogène (Figure 24-B). Cette différence est significative d'après le test de Kruskal-Wallis sur la surface hydrophile. Sur la surface de TiO₂ et sur la surface hydrophobe, une tendance est observée, bien que les écarts types soient relativement importants. Il a été montré que les tubes germinatifs de *Candida albicans* comportaient des récepteurs pour le fibrinogène contrairement aux levures sous forme blastospore [47]. Grâce à ces récepteurs, la présence de fibrinogène sur la surface favorise l'adhérence primaire des levures, et ce quel que soit la nature de la surface de TiO₂. Les résultats obtenus par QCM ont

montré que les protéines BSA et fibrinogène s'adsorbaient au moins en monocouche sur la surface de TiO₂ et les surfaces fonctionnalisées ; l'adhérence des levures, qui est similaire sur les trois types de surface montre que les levures s'adsorbent de la même façon qu'il s'agisse d'une monocouche ou de multicouches partielles de protéines.

Les levures ayant des tubes germinatifs sont donc plus sensibles à la présence de protéines sur les surfaces. En effet, sans protéine, l'adhérence de *C. albicans* sous sa forme hyphale est moins importante que pour les blastospores, mais en présence d'un film de conditionnement à base de fibrinogène notamment, le nombre de levures adhérentes augmente.

Conclusion

L'étude de l'adhérence de microorganismes sur les surfaces modèles structurées présentant des pyramides en surface a montré une augmentation du nombre de microorganismes adhérents avec la rugosité. Sur les surfaces structurées par sablage, la rugosité, semblable aux surfaces précédentes, ne semblait pas influencer le nombre de microorganismes adhérents. Ceci montre que la topographie de surface constitue un facteur important à contrôler pour limiter l'adhérence des microorganismes. La méthode de dénombrement par UFC n'est pas apparue optimale lors de l'étude avec les surfaces électro-érodées puisque les microorganismes mis en contact avec les surfaces présentant les trous les plus profonds en surface n'étaient pas tous élués. Nos travaux montrent donc que les surfaces lisses de TiO₂ semblent néanmoins limiter le nombre de microorganismes adhérents en comparaison aux surfaces structurées.

La modification de la chimie de surface par greffage moléculaire n'a pas entraîné de modifications notables de l'adhérence de *S. aureus* et *C. albicans*. L'analyse de l'adsorption de protéines plasmatiques (albumine, fibrinogène et fibronectine) a en revanche montré que les surfaces hydrophiles retenaient moins de protéines que les surfaces hydrophobes et que les surfaces de TiO₂. L'adhérence de *S. aureus* sur ces surfaces pré-recouvertes de protéines était significativement plus faible sur les surfaces recouvertes de fibrinogène et était légèrement diminuée sur les surfaces recouvertes de BSA, *C. albicans* adhérait en plus grand nombre sur les surfaces sans protéine lorsque la levure était sous sa forme blastospore, et sur les surfaces recouvertes de fibrinogène lorsqu'elle était sous forme d'hyphes.

Après un temps d'incubation de 30 min, certaines différences ne sont pas significatives d'après les analyses statistiques effectuées. Cependant une incubation prolongée en permettrait la

multiplication des microorganismes ayant adhéré en surface permettrait peut-être d'amplifier les différences observées.

L'ensemble des résultats montrent donc l'importance de considérer à la fois la rugosité et la topographie de surface lors de l'étude de l'adhérence de microorganismes sur des surfaces structurées. L'adhérence de microorganismes est minimale sur les surfaces ultra-lisses. Enfin, dans le cadre de notre étude, sans utiliser de revêtement bactéricide, le changement de la composition chimique de surface n'a pas modifié l'adhérence de *S. aureus* et *C. albicans*.

La présence d'un film de conditionnement composé de protéines et autres molécules (présentes dans le milieu de culture) a montré son importance lors de l'étude de l'adhérence de bactéries ou de levures. Pour une utilisation de ces surfaces dans le contexte des traitements de chimiothérapie, nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de la présence de produits de chimiothérapie et de nutrition parentérale sur les surfaces lisses et fonctionnalisées.

Références

- [1] E. Bouza, R. San Juan, P. Munoz, J. Pascau, A. Voss, M. Desco, A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility *Clinical microbiology and infection*, 10 (2004) 838-842.
- [2] Y.H. An, R.J. Friedman, Laboratory methods for studies of bacterial adhesion, *J. Microbiol. Methods*, 30 (1997) 141-152.
- [3] L. Jin, W. Guo, P.H. Xue, H.N. Gao, M. Zhao, C. Zheng, Y.L. Zhang, D. Han, Quantitative assay for the colonization ability of heterogeneous bacteria on controlled nanopillar structures, *Nanotechnology*, 26 (2015).
- [4] M. Lorenzetti, I. Dogsa, T. Stosicki, D. Stopar, M. Kalin, S. Kobe, S. Novak, The influence of surface modification on bacterial adhesion to titanium-based substrates, *Acs Appl Mater Inter*, 7 (2015) 1644-1651.
- [5] J. Verran, C.J. Maryan, Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography, *J. Prosthet. Dent.*, 77 (1997) 535-539.
- [6] K.A. Whitehead, J. Colligon, J. Verran, Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 41 (2005) 129-138.
- [7] C. Ludecke, M. Roth, W. Yu, U. Horn, J. Bossert, K.D. Jandt, Nanorough titanium surfaces reduce adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* via nano adhesion points, *Colloid Surface B*, 145 (2016) 617-625.
- [8] M.G. Katsikogianni, Y.F. Missirlis, Interactions of bacteria with specific biomaterial surface chemistries under flow conditions, *Acta Biomater*, 6 (2010) 1107-1118.
- [9] V.A. Tegoulia, S.L. Cooper, *Staphylococcus aureus* adhesion to self-assembled monolayers effect of surface chemistry and fibrinogen presence, *Colloids and Surfaces B - Biointerfaces* 24 (2002) 217-228.
- [10] D. Cunliffe, C. Smart, C. Alexander, E.N. Vulfson, Bacterial adhesion at synthetic surfaces, *Applied and environmental microbiology*, 65 (1999) 4995-5002.
- [11] M. Herrmann, P.E. Vaudaux, D. Pittet, R. Auckenthaler, P.D. Lew, F. Schumacher-Perdreau, G. Peters, W. F.A, Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material, *Journal of Infectious Diseases*, 158 (1988) 693-701.
- [12] J. Strauss, Y. Liu, T. Camesano, Bacterial adhesion to protein coated surfaces: an AFM and QCM-D study, *JOM*, 61 (2009) 71-74.
- [13] S. Schuster, W. Yu, M. Nega, Y.-Y. Chu, S. Zorn, F. Zhang, F. Götz, F. Schreiber, The role of serum proteins in *Staphylococcus aureus* adhesion to ethylene glycol coated surfaces, *International Journal of Medical Microbiology*, 304 (2014) 949-957.
- [14] L. Poulouin, O. Gallet, J.-M. Imhoff, La fibronectine : propriétés et fonctions de la molécule native et de ses fragments, *médecine/sciences*, 13 (1997) 657-661.
- [15] C. Scotchford, C. Gilmore, E. Cooper, G. Leggett, S. Downes, Protein adsorption and human osteoblast-like cell attachment and growth on alkylthiol on gold self-assembled monolayers, *J Biomed Mater Res A*, 59 (2002) 84-99.
- [16] C. Nune, W. Xu, R.D. Misra, The impact of grafted modification of silicone surfaces with quantum-sized materials on protein adsorption and bacterial adhesion, *J Biomed Mater Res A*, 100 (2012) 3197-3204.
- [17] A. Alcheikh, G. Pavon-Djavid, G. Helary, H. Petite, V. Migonney, F. Anagnostou, PolyNaSS grafting on titanium surfaces enhances osteoblast differentiation and inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion, *J Mater Sci-Mater M*, 24 (2013) 1745-1754.
- [18] A. Fleer, C. Timmerman, J. Besnier, A. Pascual, J. Verhoef, Surface proteins of coagulase-negative *staphylococci*: their role in adherence to biomaterials and in opsonization, *Journal of biomaterials applications*, 5 (1990) 154-165.

- [19] V. Silin, H. Weetall, D. Vanderah, SPR studies of the nonspecific adsorption kinetics of human IgG and BSA on gold surfaces modified by self-assembled monolayers (SAMs), *J Colloid Interf Sci*, 185 (1997) 94-103.
- [20] L. Pandey, S. Pattanayek, D. Delabouglise, Properties of adsorbed bovine serum albumin and fibrinogen on self-assembled monolayers, *Journal of physical chemistry C*, 117 (2013) 6151-6160.
- [21] N. Faucheux, R. Schweiss, K. Lutzow, C. Werner, T. Groth, Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies, *Biomaterials*, 25 (2004) 2721-2730.
- [22] K. Anselme, L. Ploux, A. Ponche, Cell/Material interfaces: influence of surface chemistry and surface topography on cell adhesion, *J. Adhes. Sci. Technol.*, 24 (2010) 831-852.
- [23] I. Reviakine, D. Johannsmann, R.P. Richter, Hearing what you cannot see and visualizing what you hear: interpreting quartz crystal microbalance data from solvated interfaces, *Anal Chem*, 83 (2011) 8838-8848.
- [24] S. Ray, A. Shard, Quantitative analysis of adsorbed proteins by X-ray photoelectron spectroscopy, *Anal Chem*, 83 (2011) 8659-8666.
- [25] D. MacDonald, B. Markovic, A. Boskey, P. Somasundaran, Physico-chemical properties of human plasma fibronectin binding to well characterized titanium dioxide, *Colloid Surface B*, 11 (1998) 131-139.
- [26] A.G. Hemmersam, K. Rechendorff, M. Foss, D.S. Sutherland, F. Besenbacher, Fibronectin adsorption on gold, Ti-, and Ta-oxide investigated by QCM-D and RSA modelling, *J Colloid Interf Sci*, 320 (2008) 110-116.
- [27] M. Pegueroles, C. Tonda-Turo, J. Planell, F. Gil, C. Aparicio, Adsorption of fibronectin, fibrinogen, and albumin on TiO₂ time-resolved kinetics, structural changes, and competition study, *Biointerphases*, 7 (2012).
- [28] P. Roach, D. Farrar, C. Perry, Interpretation of protein adsorption: Surface-induced conformational changes, *J Am Chem Soc*, 127 (2005) 8168-8173.
- [29] M.A. Daeschel, J. McGuire, Interrelationships between protein surface adsorption and bacteria adhesion, in: T. Francis (Ed.) *Biotechnology and Genetic engineering review*, 1998, pp. 413-438.
- [30] F. Kirschhofer, A. Rieder, C. Prechtel, B. Kuhl, K. Sabljo, C. Woll, U. Obst, G. Brenner-Weiss, Quartz crystal microbalance with dissipation coupled to on-chip MALDI-ToF mass spectrometry as a tool for characterising proteinaceous conditioning films on functionalised surfaces, *Anal. Chim. Acta*, 802 (2013) 95-102.
- [31] K.G. Neoh, E.T. Kang, Combating bacterial colonization on metals via polymer coatings: relevance to marine and medical applications, *Acs Appl Mater Inter*, 3 (2011) 2808-2819.
- [32] E.A. Vogler, Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces, *Adv Colloid Interfac*, 74 (1998) 69-117.
- [33] H. Larsericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, Structure, stability, and orientation of BSA adsorbed to silica, *J Colloid Interf Sci*, 289 (2005) 26-35.
- [34] S. Cannistraro, F. Sacchetti, Rotational and translational dynamics of human-albumin, *Phys. Rev. A*, 33 (1986) 745-746.
- [35] Y.L. Jeyachandran, E. Mielezarski, B. Rai, J.A. Mielczarski, Quantitative and qualitative evaluation of adsorption/desorption of bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Langmuir*, 25 (2009) 11614-11620.
- [36] H. Lefaix, A. Galtayries, F. Prima, P. Marcus, Nano-size protein at the surface of a Ti-Zr-Ni quasi-crystalline alloy: Fibronectin adsorption on metallic nano-composites, *Colloid Surface A*, 439 (2013) 207-214.
- [37] A. Ithurbide, I. Frateur, A. Galtayries, P. Marcus, XPS and flow-cell EQCM study of albumin adsorption on passivated chromium surfaces: Influence of potential and pH, *Electrochim Acta*, 53 (2007) 1336-1345.
- [38] V. Payet, T. Dini, S. Brunner, A. Galtayries, I. Frateur, P. Marcus, Pre-treatment of titanium surfaces by fibronectin: in situ adsorption and effect of concentration, *Surface and interface analysis*, 42 (2010) 457-481.

- [39] J. Rodriguez-Sanchez, A.M. Gallardo-Moreno, J.M. Bruque, M.L. Gonzalez-Martin, Adsorption of human fibrinogen and albumin onto hydrophobic and hydrophilic Ti6Al4V powder, *Appl Surf Sci*, 376 (2016) 269-275.
- [40] D.E. MacDonald, B. Markovic, M. Allen, P. Somasundaran, A.L. Boskey, Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials, *J Biomed Mater Res*, 41 (1998) 120-130.
- [41] K.J. Johnson, H. Sage, G. Briscoe, H.P. Erickson, The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 15473-15479.
- [42] R. Emch, F. Zenhausern, M. Jobin, M. Tadorelli, P. Descouts, Morphological difference between fibronectin spayed on mica and PMMA, *Ultramicroscopy*, 42 (1992) 1155-1160.
- [43] Y. Tamada, Y. Ikada, Effect of preadsorbed proteins on cell-adhesion to polymer surfaces, *J Colloid Interf Sci*, 155 (1993) 334-339.
- [44] P. Roach, N.J. Shirtcliffe, D. Farrar, C.C. Perry, Quantification of surface-bound proteins by fluorometric assay: Comparison with quartz crystal microbalance and amido black assay, *J Phys Chem B*, 110 (2006) 20572-20579.
- [45] R.G. Flemming, R.A. Proctor, S.L. Cooper, Bacterial adhesion to functionalized polyurethanes, *J Biomat Sci-Polym E*, 10 (1999) 679-697.
- [46] D. McDevitt, T. Nanavaty, K. HousePompeo, E. Bell, N. Turner, L. McIntire, T. Foster, M. Hook, Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen, *Eur. J. Biochem.*, 247 (1997) 416-424.
- [47] G. Tronchin, R. Robert, A. Bouali, J.M. Senet, Immunocytochemical localization of *in vitro* binding of human-fibrinogen to *Candida albicans* germ tube and mycelium *Annales De L Institut Pasteur-Microbiologie*, 138 (1987) 177-187.

Chapitre 4

Applications aux chambres implantables

Nous avons présenté dans le chapitre 3 la contribution des propriétés physico-chimiques de surface sur l'adhérence de microorganismes sur des surfaces structurées ou lisses et fonctionnalisées. Ces analyses *in vitro* ont été réalisées dans des conditions dites "classiques", en présence ou non de protéines plasmatiques. Dans la pratique hospitalière, les surfaces internes des boîtiers des chambres implantables sont en contact avec des produits de chimiothérapie et/ou de nutrition parentérale. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux effets que pourraient avoir ces produits sur les surfaces modèles de TiO₂ et TiO₂ fonctionnalisées.

Quatre produits couramment préconisés pour le traitement des cancers du sein, de l'estomac ou du pancréas ont été choisis pour l'étude: la farmorubicine, l'endoxan, l'éloxatine et le taxol. L'influence de la nutrition parentérale sur des surfaces lisses et structurées a aussi été testée.

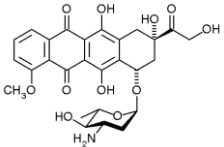
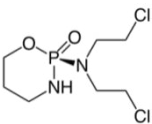
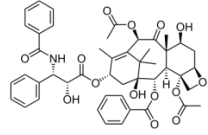
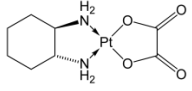
I. Mise en contact de produits de chimiothérapie sur les surfaces lisses fonctionnalisées

1. Description du protocole

Quatre produits ont été étudiés : la farmorubicine, l'endoxan, l'éloxatine et le taxol. La durée d'injection des produits de chimiothérapie dépend du volume à injecter et du débit. Après chaque administration, la chambre est "nettoyée" par une injection à fort débit de sérum physiologique.

Un protocole d'étude a été mis au point avec le personnel soignant de la clinique Victor Hugo, afin de se rapprocher au mieux du protocole utilisé avec les chambres implantables, même si la géométrie des échantillons est différente. Ainsi des temps de mise en contact entre les échantillons et chacune des solutions ont été définis pour correspondre à des temps équivalents à l'administration d'une dose unique ou à six mois de cure (Tableau 1).

Tableau 1 : Temps de contact équivalents à ceux habituellement utilisés pour quatre produits de chimiothérapie, leur formule et leur concentration d'utilisation

	Farmorubicine (épirubicine)	Endoxan (cyclophosphamide)	Taxol (paclitaxel)	Eloxatine (oxaliplatine)
Formule chimique				
Concentration utilisée	Pur	4 g/L dans du sérum glucosé 5%	600 mg/L dans du sérum glucosé 5%	600 mg/L dans du sérum glucosé 5%
Temps de mise en contact équivalent à l'administration d'une dose unique	10 min	30 min	1 h	2 h
Temps de mise en contact équivalent à 6 mois de cure	6 x 10 min	6 x 30 min	12 x 1 h	6 x 2 h

Les échantillons lisses et carrés, de 1 cm², ont été immergés pendant la durée indiquée dans des puits d'une plaque 12 puits, puis rincés abondamment par 30 ml de sérum physiologique à l'aide d'une seringue. Entre deux "doses", ils ont été stockés dans du sérum physiologique.

Bien que les échantillons ne présentent pas la même forme et surtout pas le même environnement confiné que les surfaces dans les chambres implantables, le protocole a eu pour but de se rapprocher des conditions utilisées par les infirmières lors des injections. Les manipulations des produits de chimiothérapie ont été réalisées dans la pièce de préparation à la clinique Victor Hugo sous une hotte à flux laminaire.

2. Analyse des surfaces

Avant chaque analyse, les surfaces ont été rincées dans de l'eau pure par simple trempage, pour éliminer une partie des sels contenus dans le sérum physiologique, et séchées à l'air comprimé. Optiquement, les surfaces paraissaient propres, sans traces visibles à l'œil nu. Pour le vérifier, les surfaces ont ensuite été analysées par AFM pour déterminer la topographie de surface à l'échelle du nanomètre.

L'étude a dans un premier temps été réalisée avec les quatre produits de chimiothérapie sur une surface lisse de TiO₂ et une surface de TiO₂ greffée par BpF (surface hydrophobe), pour des temps en immersion équivalents à l'administration d'une dose unique ou à six mois de traitement. Cette étude

a ensuite été réalisée sur une surface de TiO₂ greffée par BpOH avec les deux produits laissant le plus de traces.

La microscopie AFM permet d'obtenir une image de la surface à l'échelle du nanomètre. Trois images AFM (5 x 5 μm²) ont été réalisées sur chaque échantillon, permettant de déterminer la rugosité moyenne Ra. Afin de comparer les échantillons, les images AFM des surfaces lisses et fonctionnalisées sont présentées en Figure 1.

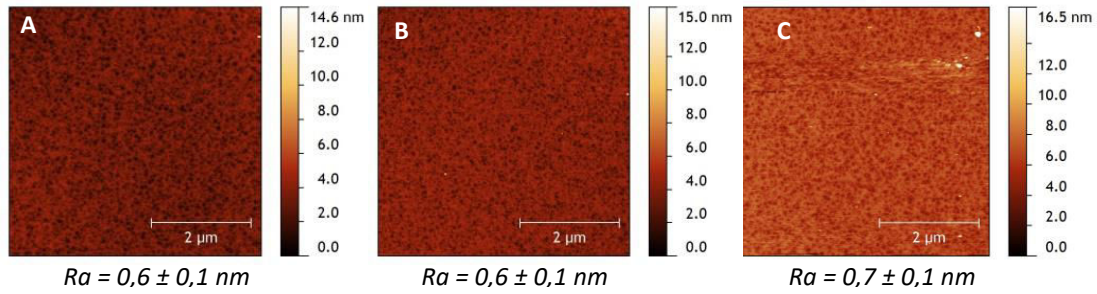


Figure 1 : Images AFM (5 x 5 μm²) de surfaces de A : TiO₂, B : TiO₂ greffées par BpF et C : TiO₂ greffées par BpOH

Les images AFM des surfaces ayant été en contact avec les produits de chimiothérapie sont présentées sur la Figure 2 pour les surfaces de TiO₂ et sur la Figure 3 pour les surfaces hydrophobes.

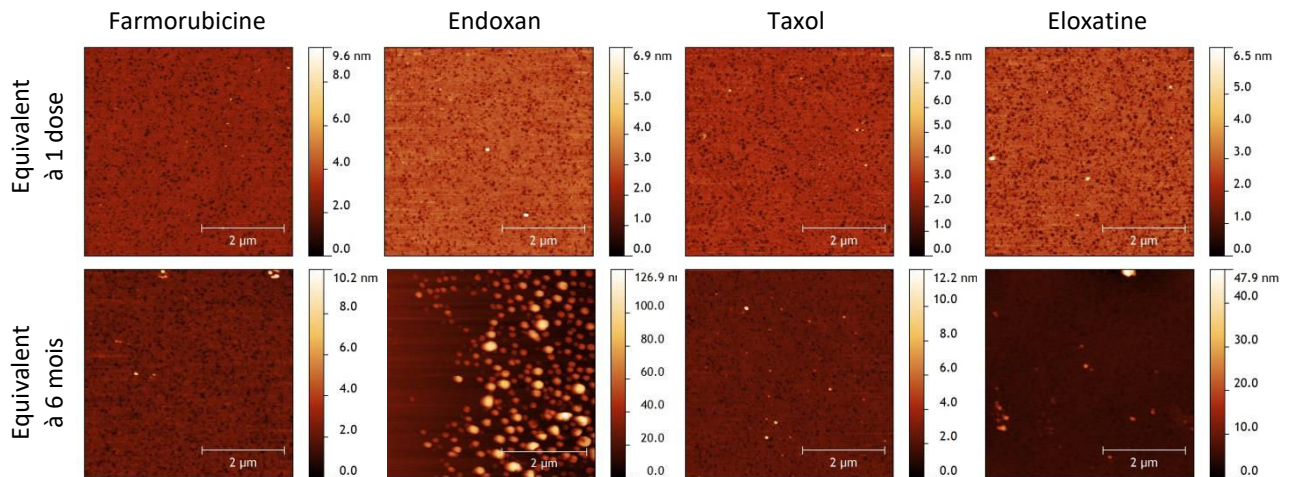


Figure 2 : Images AFM (5 x 5 μm²) de surfaces de TiO₂ après avoir été mises en contact avec les quatre produits de chimiothérapie pendant un temps équivalent à l'administration d'une dose unique ou à six mois de traitement.

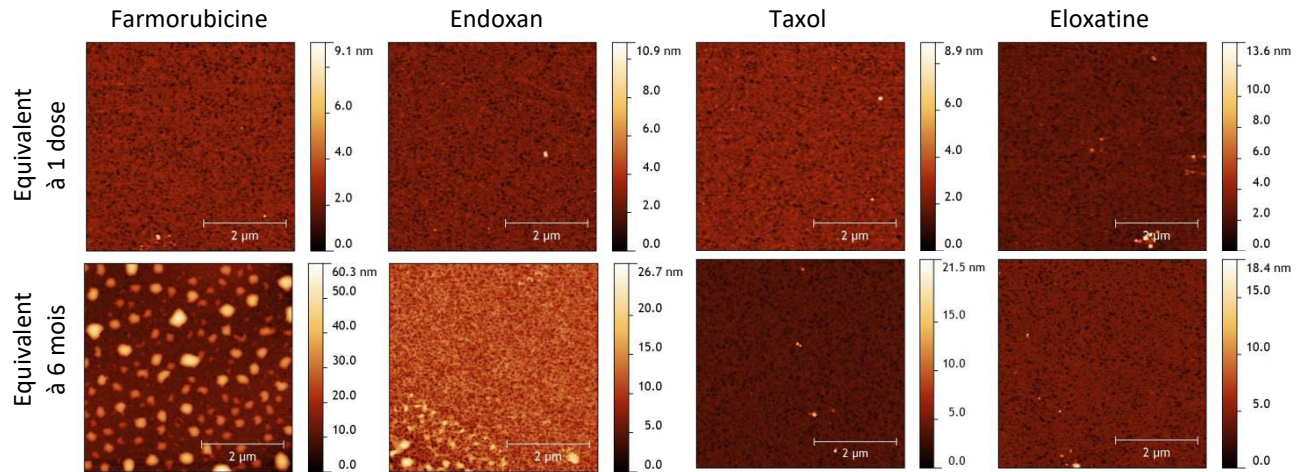


Figure 3 : Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de surfaces de TiO_2 greffées par BpF (surfaces hydrophobes) après avoir été mises en contact avec les quatre produits de chimiothérapie pendant un temps équivalent à l'administration d'une dose unique ou à six mois de traitement.

Après avoir été mises en contact pendant un temps équivalent à l'administration d'une dose unique, les images AFM ne montrent pas de traces de produit sur les surfaces qui sont aussi lisses (rugosité R_a inférieure au nm) qu'une surface de TiO_2 fonctionnalisée ou non (Figure 1). Cependant pour des temps de mise en contact équivalent à six mois de traitement, certaines traces apparaissent sur les surfaces ayant été en contact avec la farmorubicine sur la surface hydrophobe (Figure 3) et avec l'endoxan sur les surface de TiO_2 et hydrophobe (Figure 2 et Figure 3), et ce malgré le rinçage abondant effectué après chaque mise en contact.

Comme la farmorubicine et l'endoxan sont les produits qui semblent laisser le plus de traces sur la surface de TiO_2 et la surface hydrophobe, une étude similaire a été réalisée avec la surface de TiO_2 greffée par BpOH (surface hydrophile) avec ces produits. La Figure 4 présente les images AFM des surfaces lisses hydrophiles après avoir été mises en contact avec les deux produits et rincées avec 30 ml de sérum physiologique après chaque temps de mise en contact équivalent à l'administration d'une dose unique. Il semble que peu de produit soit présent sur les surfaces à l'échelle du nanomètre. Pour des temps équivalents à six mois de traitement, les images AFM ne montraient pas de traces.

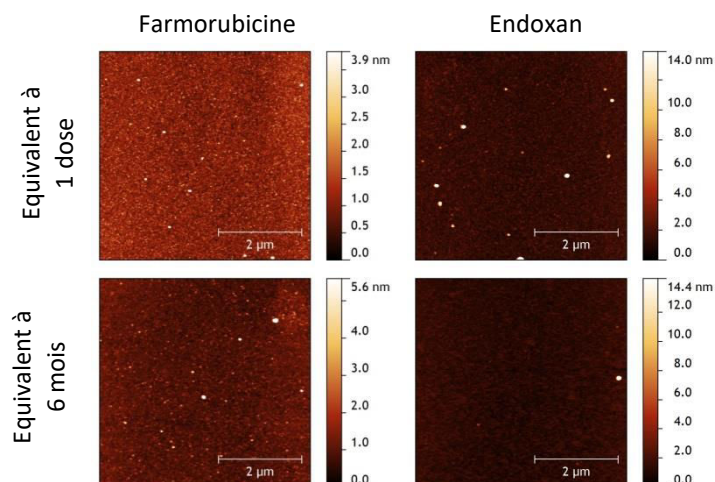


Figure 4 : Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) des surfaces de TiO_2 greffées par BpOH (surfaces hydrophiles) ayant été mises en contact avec la farmorubicine et l'endoxan pendant des temps équivalents à l'administration d'une dose unique ou à six mois de traitement.

Le rinçage effectué, bien que similaire à celui utilisé par les infirmières avec les chambres implantables en termes de volume, est très probablement plus efficace sur nos échantillons. En effet, la forme de la chambre implantable et le faible diamètre de la sortie vers le tube cathéter ne permettent certainement pas un rinçage optimum contrairement à celui réalisé sur les échantillons, qui sont des surfaces lisses de forme carrée. Un rinçage plus léger (simple trempage dans du sérum physiologique) sera donc privilégié lors de l'étude de l'influence de traces de produits de chimiothérapie sur l'adhérence de bactéries pour s'assurer de la présence de traces sur les échantillons.

La surface de TiO_2 et les surfaces fonctionnalisées (hydrophile et hydrophobe) ont été laissées en contact pendant 24 h avec une solution de farmorubicine et d'endoxan, puis rincées par simple trempage dans du sérum physiologique (un rapide rinçage dans de l'eau pure a été effectuée avant analyse). Les images AFM de la surface sont présentées en Figure 5. Des petites traces de largeur micrométriques et d'épaisseur nanométriques sont observées, montrant la présence des produits en faible quantité sur les surfaces. Il est à noter que peu de traces sont visibles optiquement.

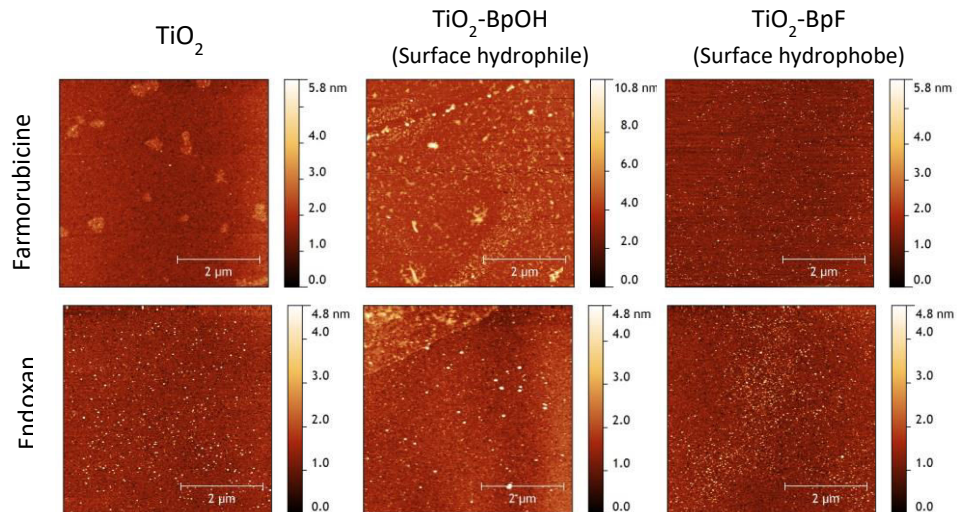


Figure 5 : Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) des surfaces lisses et fonctionnalisées après avoir été mises en contact pendant 24 h et rincées par simple trempage dans du sérum physiologique.

Nous avons ensuite voulu vérifier si certains des produits de chimiothérapie avait une luminescence intrinsèque (sans marquage) ce qui pourrait permettre de développer des méthodes d'analyse rapide par spectroscopie de fluorescence. Pour cela, l'absorbance des quatre produits de chimiothérapie, dilués dans du sérum glucosé à 5%, a été mesurée entre 200 et 600 nm (après avoir réalisé le blanc dans ce solvant). Les résultats sont présentés sur la Figure 6.

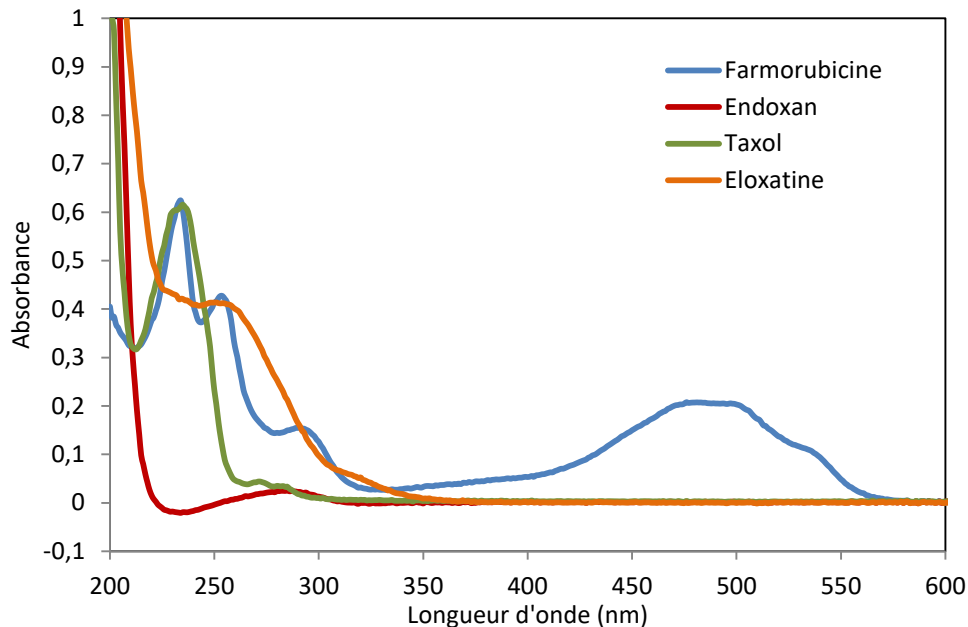
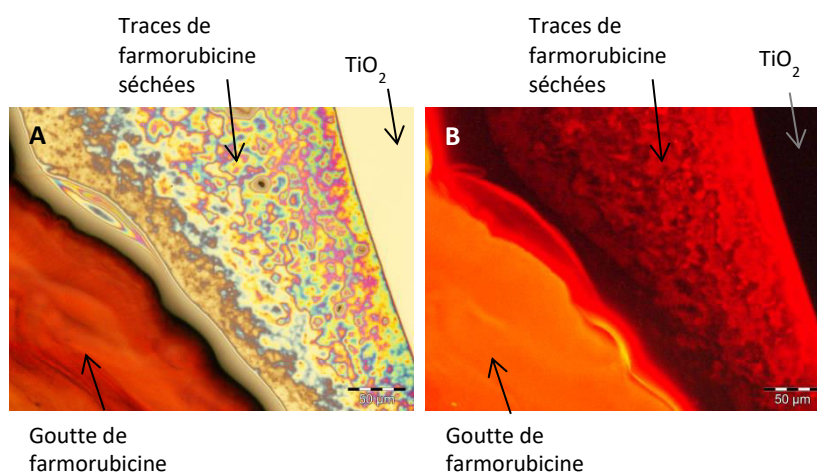


Figure 6 : Absorbance des quatre produits de chimiothérapie entre 200 et 600 nm

La farmorubicine et le taxol absorbe tous deux dans l'UV à 237 nm, l'éloxatine présente aussi un pic d'absorbance autour de 260 nm et l'endoxan autour de 290 nm. Parmi les quatre produits testés, seule la farmorubicine, de couleur rouge, absorbe entre 470 et 510 nm.

L'excitation de la farmorubicine dans cette gamme de longueurs d'onde permet donc d'envisager des imageries par fluorescence. Pour cela, un cube de fluorescence constitué d'un filtre d'excitation laissant passer les longueurs d'onde de 525 à 550 nm et d'un filtre d'émission laissant passer les longueurs d'onde supérieures à 570 nm a été ajouté à un microscope optique. Ce montage a permis d'obtenir des images de fluorescence de la surface après dépôt de farmorubicine.

Tout d'abord, une goutte de farmorubicine a été déposée sur une surface de TiO_2 et a été laissée quelques heures pour qu'elle sèche partiellement. La Figure 7-A montre une image de la surface obtenue par microscopie optique. Il est possible d'y observer la goutte de farmorubicine en rouge, les traces laissées par le produit en séchant et la surface de dioxyde de titane. La Figure 7-B présente la même zone, obtenue en fluorescence. La goutte fluoresce fortement, les traces laissées par le produit en séchant sont aussi visibles en rouge, témoignant de la présence du produit sur la surface, et le TiO_2 est en noir.



**Figure 7 : Images X 20 obtenues A : en microscopie optique et B : en fluorescence (5 s d'intégration).
Les barres d'échelle représentent 50 µm.**

L'imagerie de fluorescence a donc permis de visualiser les traces de farmorubicine laissées lors du séchage d'une goutte. Suite à ce résultat, une surface de TiO_2 a été laissée dans une solution de farmorubicine pendant 10 min et rincée très légèrement (quelques ml au lieu des 30 ml, en rinçage pulsé) afin d'observer d'éventuelles traces (Figure 8).

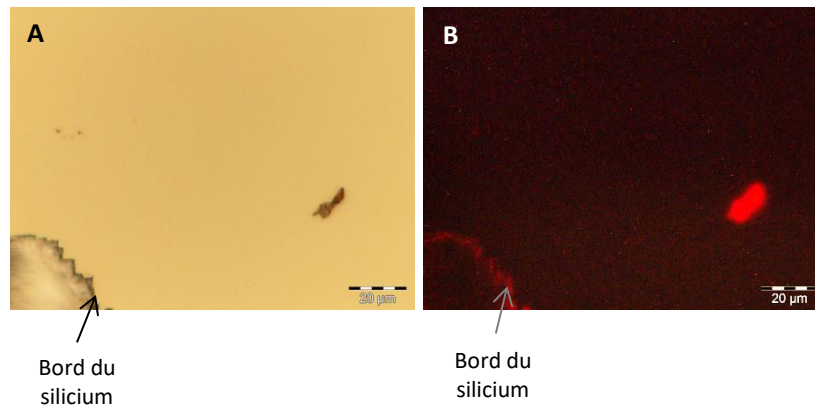


Figure 8 : Images X 50 obtenues en A : microscopie optique et B : à l'aide du cube de fluorescence (8 s d'intégration). Les barres d'échelle représentent 20 µm.

Sur l'image de microscopie optique, la surface semble relativement propre avec la présence d'une goutte ou d'un petit cristal (Figure 8-A). Sur l'image de fluorescence, la petite tâche apparaît rouge vif, pouvant signifier la présence de farmorubicine (Figure 8-B) mais comme le bord du silicium apparaît aussi légèrement rouge, ceci peut aussi signifier qu'une poussière de silicium provenant du bord de l'échantillon peut aussi être à l'origine de l'apparition de la couleur rouge sur l'image. Ainsi, il semble difficile de détecter optiquement la différence entre la présence de farmorubicine et une poussière de silicium.

Par microscopie AFM, il a été possible de voir des tâches de petites tailles (inférieure à 1 µm) sur les surfaces ayant été en contact avec la farmorubicine ou l'endoxan. Avec le microscope optique couplé à la fluorescence, des tâches présentes sur la surface obtiennent la même coloration que la farmorubicine. Cependant, d'autres poussières semblent aussi prendre cette coloration.

Afin de vérifier la présence de traces de farmorubicine sur les surfaces, un micro-spectromètre Raman T64000 (Horiba, Jobin-Yvon) a été utilisé. La longueur d'onde d'excitation du laser Argon-Krypton (Coherent) a été choisie à 476 nm pour être dans la zone d'absorption maximale du produit. Les spectres ont été enregistrés entre 200 et 8000 cm^{-1} , ce qui correspond à des longueurs d'onde diffusées entre 479 nm et 770 nm. Le spectre de l'échantillon Si/TiO₂ (Figure 9) présente un pic intense à 520 cm^{-1} caractéristique du substrat de silicium (la couche nanométrique de TiO₂ amorphe ne présente pas de bande vibrationnelle caractéristique). Le spectre d'une goutte séchée de farmorubicine sur la surface de l'échantillon montre la présence de petits pics entre 1200 et 1600 cm^{-1} , caractéristiques de la farmorubicine [1] et une large bande de luminescence ayant un maximum vers 5300 cm^{-1} (660 nm) (Figure 9). L'intensité de cette bande est très importante en raison de la forte concentration de farmorubicine. Le spectre enregistré sur l'une des tâches retrouvée sur la surface rincée ne montre pas la signature vibrationnelle autour de 1200 cm^{-1} ; cela

peut être dû à la trop faible dose de farmorubicine présente sur la surface. Une bande de luminescence est néanmoins observée à partir de 2500 cm^{-1} témoignant de la présence d'un produit luminescent (cette bande n'est pas présente sur le spectre de l'échantillon Si/TiO₂). Sa forme est cependant différente de celle obtenue pour la farmorubicine. Ceci peut être dû à une modification chimique de la farmorubicine lors du séchage ou sous irradiation laser lors de l'analyse.

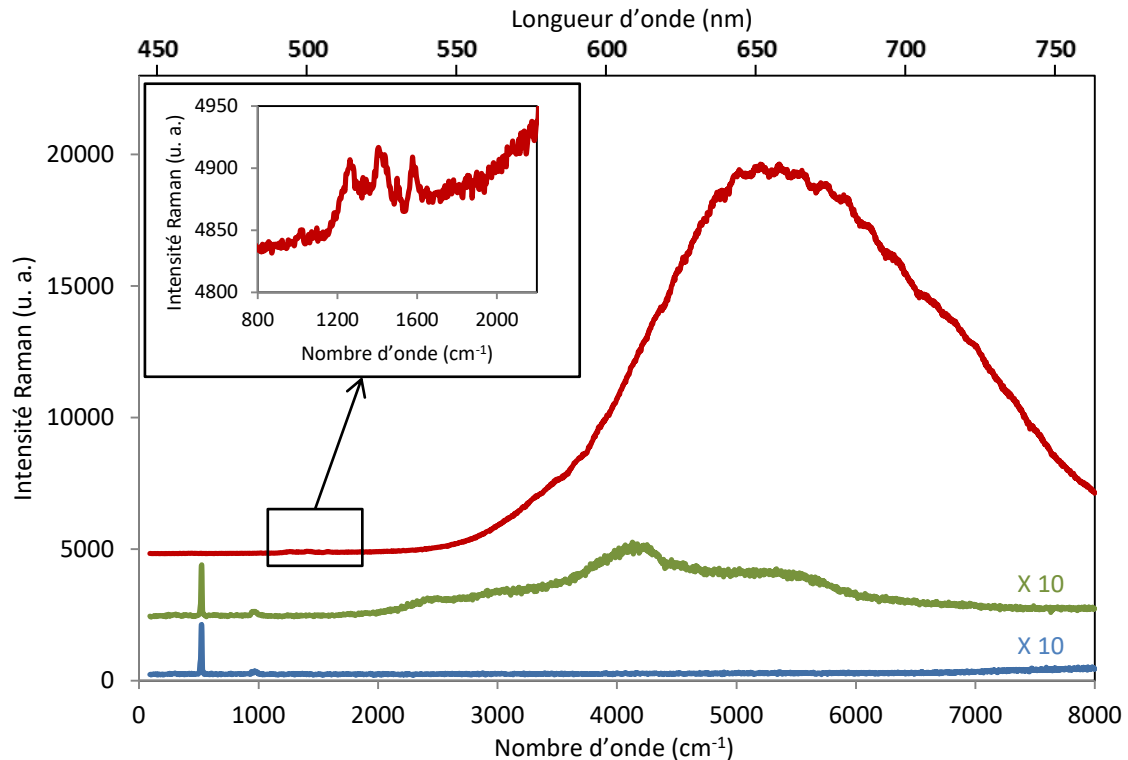


Figure 9 : Spectres Raman de la surface de TiO₂ (Si/TiO₂, en bleu), de la farmorubicine (goutte séchée) (en rouge) et d'une tâche sur la surface rincée (en vert) à 476 nm (Puissance du laser = 0,5 mW, temps d'intégration = 5 s)

Ces résultats préliminaires sont encourageants car ils permettent d'envisager dans le futur l'analyse des surfaces par imagerie Raman pour détecter la présence de farmorubicine. Les cartographies Raman obtenue permettront ainsi de la répartition de la farmorubicine en se plaçant à une longueur d'onde correspondant au maximum d'intensité de luminescence de ces bandes.

II. Mise en contact avec la nutrition parentérale

La nutrition parentérale est un mélange nutritif injecté par voie intraveineuse permettant de remplacer une alimentation par voie orale ou entérale. Une poche de solution (2053 ml) de la marque Kabiven (utilisée à la clinique Victor Hugo) correspond à 1900 kcal et contient du glucose

(220 g), des acides aminés (68 g), des minéraux (sodium, potassium, magnésium, calcium, phosphates, chlorures et acétates) et des lipides (80 g).

1. Mise en place du protocole

L'administration de la totalité de la poche de nutrition parentérale nécessite une perfusion lente. Pour les patients porteurs d'une chambre implantable, cette solution est directement injectée dans le boîtier. L'écoulement doit être lent et peut durer environ 12 h. Un rinçage pulsé à l'aide d'une seringue, est ensuite effectué avec environ 90 ml de sérum physiologique pour éliminer le maximum de traces du produit à l'intérieur de la chambre.

Sur nos échantillons, un temps de mise en contact de 15 h avec la solution de nutrition parentérale a été choisi, suivi d'un rinçage pulsé avec 90 ml de sérum physiologique.

2. Analyse des surfaces

Sur la surface de TiO₂ incubée avec la solution de nutrition parentérale selon le protocole décrit précédemment, aucune trace n'était visible sur la surface d'après les images AFM (Figure 10). La rugosité moyenne de surface, déterminée par AFM, de la surface de TiO₂ ayant été mise en contact avec la solution de nutrition parentérale, est restée inférieure au nanomètre. Trois images de chaque surface ont été réalisées sur différentes zones.

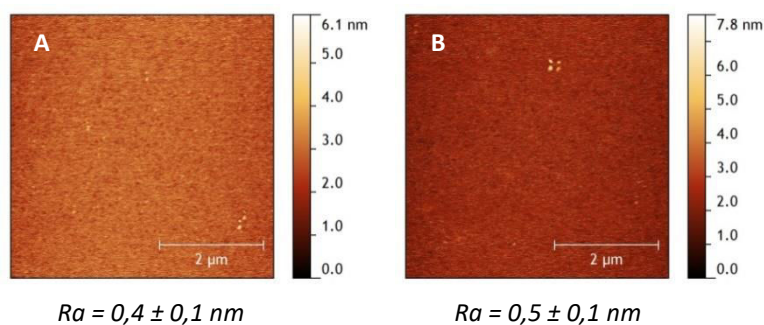


Figure 10 : Images AFM (5 x 5 µm²) de surfaces de TiO₂ A : avant et B : après contact avec la solution de nutrition parentérale et rinçage.

Afin d'induire de traces de nutrition parentérale à la surface des échantillons lisses de TiO₂ et de TiO₂ fonctionnalisés (surfaces hydrophile et hydrophobe) des rinçages moins efficaces ont été réalisés. Pour cela, les surfaces ont été mises en contact avec la solution de nutrition parentérale pendant

5 jours et rincées légèrement par trois trempages successifs dans du sérum physiologique puis un trempage dans de l'eau pure avant d'être séchées avec de l'air comprimé.

Les surfaces ont ensuite été analysées par AFM (Figure 11). Des gouttes de taille micrométrique et nanométrique sont observées cette fois-ci sur toutes les surfaces. D'après ces analyses, il n'a pas été possible de déterminer si l'une des surfaces retient plus de solution de nutrition parentérale que les autres. Ces résultats montrent clairement l'importance du protocole de rinçage sur le maintien de la qualité des surfaces après l'administration d'une solution de nutrition parentérale.

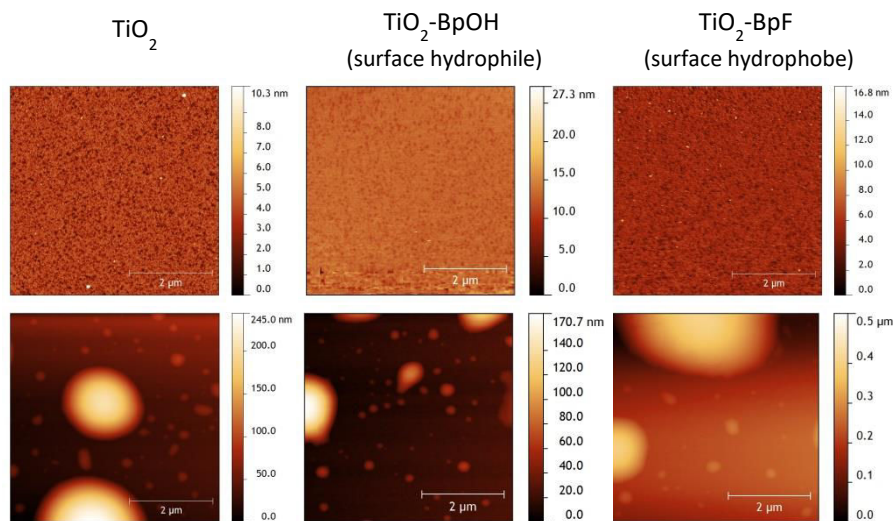


Figure 11 : Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) des surfaces de TiO_2 et TiO_2 fonctionnalisées avant (ligne supérieure) et après (ligne inférieure) contact avec une solution de nutrition parentérale.

Une étude similaire a été réalisée avec des surfaces présentant des pyramides. Ces surfaces ont été mises en contact pendant 15 h avec une solution de nutrition parentérale et rincées par simple trempage dans du sérum physiologique. Les surfaces ont ensuite été observées en microscopie optique. Les images sont présentées sur la Figure 12.

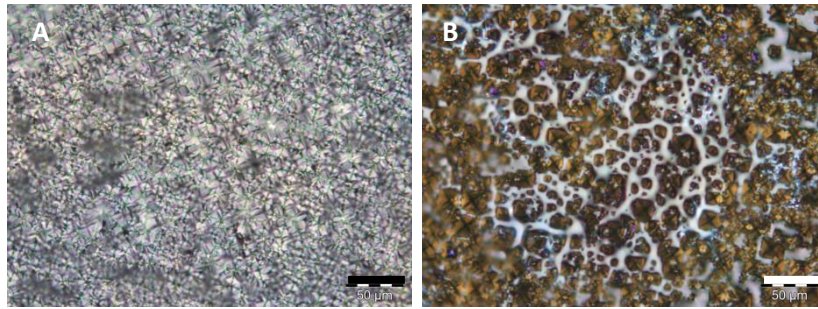


Figure 12 : Images optiques (objectif X 20) de surfaces de TiO₂ avec pyramides A : avant et B : après contact avec la solution de nutrition parentérale. Les barres d'échelle correspondent à 50 µm.

Sur chacune des images, il est possible de voir les arrêtes des pyramides vues de haut. Avec un faible nettoyage, il reste de la solution de nutrition parentérale dans les creux entre les pyramides comme le montre la Figure 12-B. Ainsi, avec ce type de topographie, un rinçage léger ne suffit pas à éliminer les traces de solution. Ce résultat montre l'importance du rinçage après l'administration de nutrition parentérale et la difficulté observée d'éliminer cette solution sur des surfaces structurées. En effet, lors de l'utilisation d'une chambre implantable pour l'administration de nutrition parentérale, il a été observé un plus fort taux d'infections.

Pour étudier l'influence de la nutrition parentérale sur l'adhérence de bactéries, les surfaces lisses et structurées avec des pyramides ont donc été faiblement rincées afin que des traces de nutrition parentérale soient présentes sur la surface.

III. Influence de traces de produits de chimiothérapie ou de nutrition parentérale sur l'adhérence de bactéries

1. Influence de la présence de produits de chimiothérapie

La présence de traces de produits de chimiothérapie sur les surfaces sur l'adhérence de *S. aureus* a été testée sur les surfaces lisses de TiO₂ et de TiO₂ fonctionnalisées (surfaces hydrophile et hydrophobe). En effet, l'introduction répétée de ces produits dans la chambre implantable peut laisser des traces à l'intérieur de la chambre et modifier la topographie de surface et/ou la chimie de surface. D'après les analyses effectuées sur les surfaces lisses, la farmorubicine et l'endoxan sont les deux produits, parmi les quatre testés, qui ont laissé des traces, même après un rinçage pulsé comparable à celui utilisé avec les patients porteurs de chambre implantable.

Afin de s'assurer de la présence de traces importantes sur les surfaces et étudier leur éventuel effet sur l'adhérence de bactéries, les échantillons de silicium recouverts d'une couche mince de TiO_2 et fonctionnalisés ont été mis en contact pendant 24 h avec les produits de chimiothérapie et rincés légèrement par trempage dans du sérum physiologique. Les résultats de l'adhérence bactérienne sur ces surfaces sont présentés sur la Figure 13. L'analyse microbiologique a été réalisée en triplicata, les barres d'erreur sur le graphique correspondent à l'écart type des valeurs.

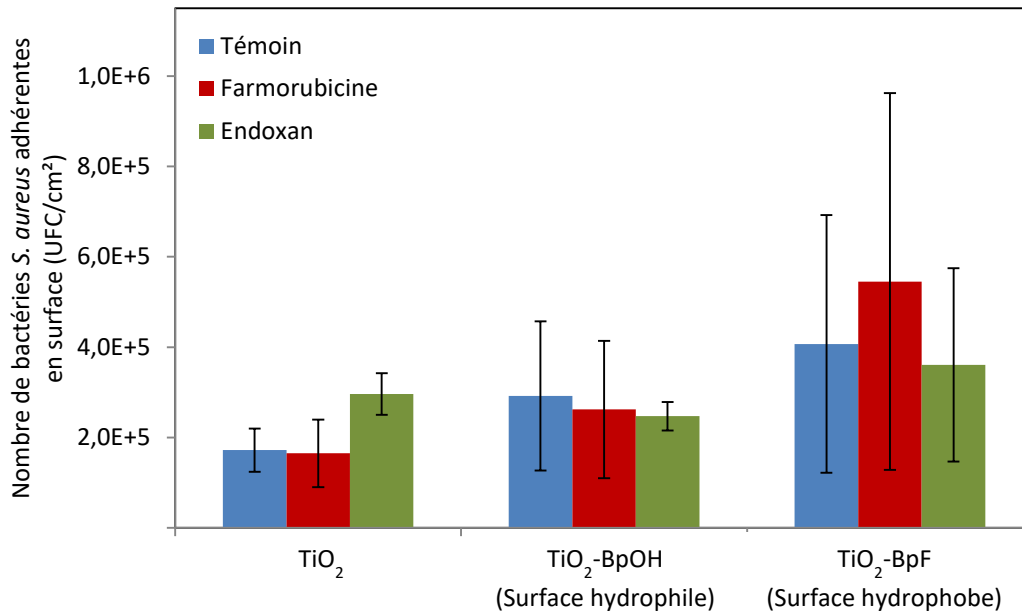


Figure 13 : Nombre de bactéries adhérentes (*S. aureus*) sur des surfaces lisses ayant été mises en contact avec des produits de chimiothérapie (farmorubicine et endoxan).

D'après le test de Kruskal-Wallis, l'adhérence de bactéries dans ces conditions (30 min d'incubation à 37°C, puis dénombrement par la méthode des UFC) n'est pas statistiquement différente sur les trois surfaces étudiées (Figure 13). La présence des produits de chimiothérapie sous forme de traces submicrométriques sur les surfaces n'engendre pas de modifications notables sur l'adhérence de *S. aureus* puisqu'aucune diminution significative du nombre de bactéries n'est observée. La farmorubicine et l'endoxan ne semblent pas non plus favoriser l'adhérence bactérienne pour un temps d'incubation de 30 min. La large distribution des valeurs ne permet pas de dégager de tendances concernant une augmentation ou une diminution de l'adhérence bactérienne, même non significative, entre les différentes surfaces. Des études sur des temps plus longs pourraient être envisagées pour dégager une tendance.

2. Influence de la présence de nutrition parentérale

Pour vérifier si la présence de traces de nutrition parentérale peut influencer l'adhérence primaire de bactéries, des surfaces de TiO_2 et TiO_2 fonctionnalisées ainsi qu'une surface structurée avec des pyramides ont été utilisées pour les analyses microbiologiques. De la même façon, les échantillons ont été analysés en triplicata.

Afin de s'assurer de la présence de traces sur chacune des surfaces, celles-ci ont été laissées en contact avec la solution de nutrition parentérale pendant 5 jours, puis rincées simplement par trois trempages dans du sérum physiologique. Avant l'analyse (quelques heures), les échantillons ont été conservés dans du sérum physiologique. La Figure 14 compare les résultats de l'adhérence bactérienne sur les échantillons ayant été mis en contact ou non avec la solution de nutrition parentérale.

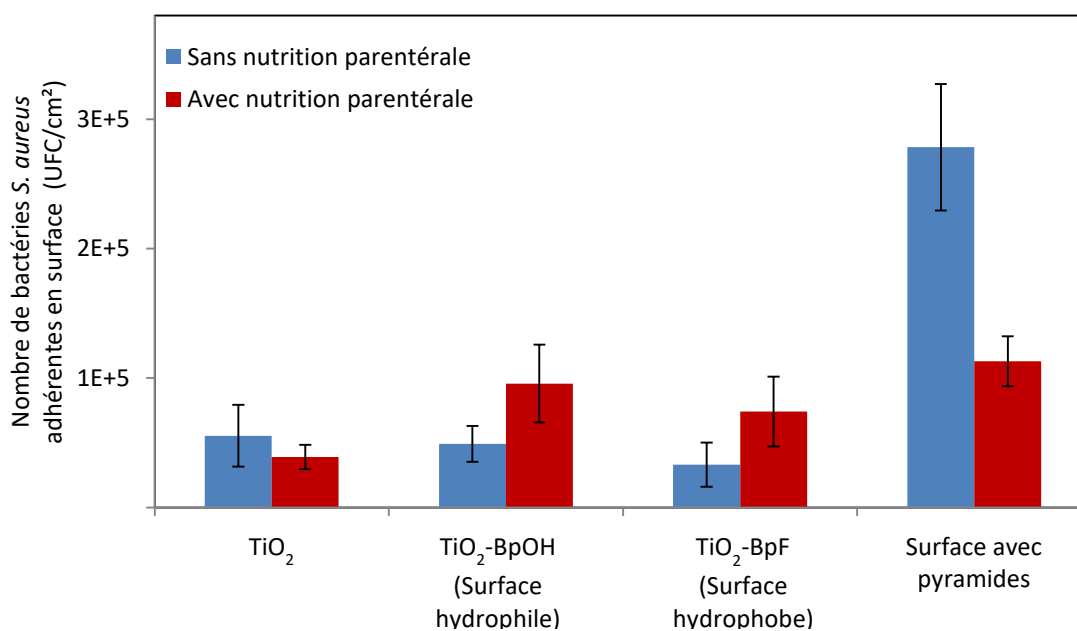


Figure 14 : Concentration de bactéries adhérentes (*S. aureus*) sur des surfaces lisses et structurées avec des pyramides avec (en rouge) ou sans (en bleu) avoir été mis en contact avec la solution de nutrition parentérale

L'adhérence de bactéries sur les surfaces lisses ayant été en contact avec la nutrition parentérale ou non ne montre pas de différences significatives d'après les tests statistiques. Une faible augmentation de la rugosité de surface est observée sur les trois types de surfaces lisses lorsqu'elles ont été en contact avec la solution de nutrition parentérale (R_a passant de 0,6 nm à environ 50 nm). Cependant, cette faible augmentation de la rugosité de semble pas impacter l'adhérence bactérienne.

Sur la surface avec des pyramides, les analyses ont montré la présence de nutrition parentérale dans les creux entre les pyramides, réduisant ainsi les différences de hauteurs. La diminution de l'adhérence sur la surface avec les pyramides ayant été en contact avec la solution de nutrition parentérale, n'est pas considérée comme significative avec le test de Kruskal-Wallis. Cependant la diminution du nombre de bactéries d'environ 50% pourrait être liée directement à une diminution de la rugosité.

La présence, sur la surface, de traces de glucides, nutriment pour les bactéries, ne semble donc pas impacter l'adhérence primaire des bactéries puisque celle-ci reste similaire à celle observée sur les surfaces lisses. Un temps d'incubation plus long ou une étude de la formation et du développement du biofilm permettraient peut-être de mettre en évidence des différences entre ces surfaces.

Conclusion

En utilisant des échantillons lisses et des conditions comparables à celles utilisées avec les chambres implantables, il est difficile d'observer optiquement des traces des produits de chimiothérapie ou de nutrition parentérale en surface. La différence de géométrie avec les chambres implantables permet un rinçage beaucoup plus efficace avec les échantillons lisses. Cependant, des traces submicrométriques ont été observées par AFM sur les surfaces lisses. De plus, les études n'ont sûrement pas été réalisées avec un nombre suffisant de répétitions qui permettraient de se rapprocher des conditions réelles d'utilisation.

Après un temps d'incubation de 30 min avec une suspension de *S. aureus*, il semble que la présence de farmorubicine, d'endoxan ou de nutrition parentérale n'a pas d'effet significatif sur l'adhérence primaire de *S. aureus* quel que soient les propriétés chimiques de surfaces lorsque la rugosité est de l'ordre du nanomètre. Ces trois produits n'engendrent pas d'augmentation du nombre de bactéries adhérentes et n'ont pas non plus d'effet inhibiteur sur l'adhérence lorsqu'ils sont présents sous forme de traces sur la surface. Les caractéristiques différentes des surfaces de TiO₂ ou de TiO₂ fonctionnalisées n'entraînent pas de différence significative sur l'adhérence bactérienne en présence de ces produits. Sur la surface structurée avec des pyramides, la diminution du nombre de bactéries adhérentes semble provenir d'une diminution de la rugosité et de la réduction de la surface spécifique.

Pour vérifier le caractère non inhibiteur et non promoteur du développement de *S. aureus*, il serait intéressant de déposer une goutte, et la laisser sécher, de chacun de ces produits sur les surfaces

lisses étudiées pour vérifier que la réponse bactérienne est similaire à celle observée sur les surfaces ne présentant que quelques traces en surface.

De plus, il serait intéressant d'étudier le développement de microorganismes en présence de ces produits avec des temps d'incubation plus long (au moins 12 heures) afin de vérifier si l'effet observé pour des temps d'incubation de 30 min, correspondant à l'étude de l'adhérence primaire, sont amplifiés. En effet, d'après les observations reportées par les centres de santé, la présence de nutrition parentérale favorise l'augmentation du nombre d'infections nosocomiales [2]. De plus, avec sa géométrie particulière, les chambres implantables sont plus enclines à retenir ces produits, réaliser les analyses avec des temps plus longs permettrait donc de se rapprocher des conditions réelles d'utilisation et d'observer une éventuelle augmentation du nombre de microorganismes présents en surface.

De plus, l'étude combinée de la présence de ces produits avec celle de protéines pourrait apporter des différences, et dans certains cas favoriser l'adhérence bactérienne. De telles études multifactorielles permettraient de se rapprocher des conditions réelles d'utilisation des chambres implantables et de survenue d'infections sur dispositifs implantables, mais l'analyse des résultats de ces études serait très complexe et il serait très difficile de comprendre la contribution de chaque paramètre.

Références

- [1] G. Smulevich, A.R. Mantini, M.P. Marzocchi, Surface-enhance Raman-scattering excitation profiles of anthracyclines adsorbed onto silver particles, *J. Phys. Chem.*, 94 (1990) 2540-2545.
- [2] D. Lebeaux, N. Fernandez-Hidalgo, A. Chauhan, S. Lee, J.M. Ghigo, B. Almirante, C. Beloin, Management of infections related to totally implantable venous-access ports: challenges and perspectives, *Lancet Infect Dis*, 14 (2014) 146-159.

Conclusion générale

Conclusion

L'objectif de cette étude a été d'étudier l'influence des propriétés physico-chimiques de surface sur l'adhérence de deux microorganismes souvent retrouvés lors d'infections nosocomiales : *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet MATINNO, financé par la région Pays de la Loire, qui visait à étudier l'influence des propriétés de surface de matériaux utilisés dans les chambres implantables sur l'adhérence des microorganismes et le risque de survenue d'une infection nosocomiale. Dans ce contexte, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'adhérence primaire de microorganismes sur des matériaux à base de titane, biocompatibles, et souvent utilisés à l'intérieur des boîtiers des chambres implantables.

L'analyse des propriétés physico-chimiques de surface de chambres implantables commerciales a d'abord été effectuée afin de fixer le cadre de notre étude en termes à la fois de rugosité et de chimie de surface.

Des méthodes d'élaboration ont alors été mises au point permettant de contrôler les propriétés topographiques de surface. Des échantillons modèles, ultra-lisses, avec une rugosité inférieure au nanomètre, ont été élaborés, de manière répétable, par dépôt d'un film mince d'oxyde de titane sur des wafers de silicium. Ces surfaces modèles ont ensuite été fonctionnalisées par greffage moléculaire à l'aide de fonctions biphosphonate de manière à obtenir des monocouches et à maîtriser le caractère hydrophile / hydrophobe de la surface en fonction de la molécule greffée tout en conservant une rugosité inférieure au nanomètre. Ensuite, différentes stratégies ont été envisagées afin de modifier de façon homogène la topographie de surfaces à base de titane en contrôlant la rugosité. Tout d'abord, des attaques basiques sur du silicium orienté ont été réalisées et, en contrôlant les conditions expérimentales, des surfaces présentant des pyramides, avec une taille moyenne contrôlée, ont été obtenues. D'autres topographies de surface ont été élaborées par modification des surfaces d'alliage de titane grade 2 et grade 5 : des surfaces structurées par sablage, avec des rugosités comprises entre 1 à 3 μm , ou par électroérosion, présentant des surfaces avec des trous et des rugosités de 1 à 5 μm . Les valeurs de rugosité ont été choisies de manière à rester proche de celles mesurées dans les chambres implantables commerciales.

Des analyses microbiologiques ont ensuite été réalisées sur les supports préparés pour étudier l'adhérence primaire des bactéries et des levures. Un protocole similaire comprenant plusieurs étapes a été mis au point pour l'étude de *S. aureus* et *C. albicans*. Les résultats ont permis de

montrer que l'adhérence des microorganismes n'était pas systématiquement et simplement reliée à la rugosité. En effet, alors que sur les surfaces présentant des pyramides, l'adhérence de microorganismes a augmenté à partir d'une rugosité proche de la taille du microorganisme considéré, les tendances observées sur les autres surfaces rugueuses (sablage et électroérosion) ont été différentes. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'importance du paramètre 'topographie de surface' pour l'élaboration de surfaces anti-adhésives ainsi que certaines caractéristiques dimensionnelles. En effet, la présence de creux ou de motifs de taille comparable à celle des microorganismes favorise leur adhérence sur les surfaces. Il a donc été montré que l'adhérence de *S. aureus* et *C. albicans* était minimale sur les surfaces lisses de TiO₂ dont la rugosité était inférieure au nanomètre.

La modification de l'hydrophobicité de surface par greffage moléculaire n'a pas entraîné de modification significative de l'adhérence de *S. aureus* ou de *C. albicans*. En revanche, l'adsorption de protéines plasmatiques (albumine, fibrinogène et fibronectine) était différente sur les trois surfaces : surfaces de TiO₂ et surfaces fonctionnalisées (hydrophile et hydrophobe). Quelle que soit la protéine, l'adsorption était minimale sur la surface hydrophile et maximale sur la surface de TiO₂. Les protéines formaient une couche compacte sur chacune des surfaces lisses. L'adsorption de l'albumine sur la surface hydrophile ne formait pas une monocouche complète. Au contraire, l'adsorption de l'albumine sur la surface de TiO₂ et sur la surface hydrophobe ainsi que l'adsorption du fibrinogène et de la fibronectine sur les trois types de surface se faisait au moins sous forme de monocouche, avec parfois la présence de multicouches.

Lorsque les surfaces fonctionnalisées étaient pré-recouvertes d'albumine ou de fibrinogène, les bactéries et les levures ont présenté un comportement différent en termes de capacité d'adhérence au substrat. L'adhérence de *S. aureus* sur ces surfaces lisses a diminué de manière significative en présence de fibrinogène et plus faiblement en présence d'albumine. Sur ces surfaces, l'adhérence de *C. albicans* sous forme blastospore a diminué en présence de ces deux protéines alors que sous sa forme hyphale, la levure a adhéré fortement aux surfaces recouvertes de fibrinogène, grâce à la présence de récepteurs pariétaux spécifiques de cette protéine.

L'importance du nettoyage a pu être mise en évidence lors de la mise en contact des produits de chimiothérapie ou de nutrition parentérale avec les échantillons. En effet, pour des nettoyages rapides, des traces submicrométriques étaient observées sur les surfaces. La présence de produits de chimiothérapie (farmorubicine et endoxan) à faible dose sur les surfaces (sous forme de traces) n'a pas engendré d'évolution de l'adhérence primaire des bactéries. Des répétitions supplémentaires ou des temps d'immersion plus longs dans ces solutions de produits de chimiothérapie pourraient peut-

être permettre de montrer des effets inhibiteurs ou promoteurs de la colonisation des surfaces et du développement microbien.

Pour conclure, cette étude a permis de montrer l'importance de la morphologie de surface lors de l'élaboration de surfaces anti-adhérentes pour les microorganismes ainsi que l'influence d'un film de conditionnement composé de protéines plasmatiques sur l'adhérence de bactéries et de levures.

Limites et perspectives

La méthode d'analyse de l'adhérence des microorganismes (méthode par dénombrement des UFC après élution des microorganismes adhérents à la surface) a montré quelques limites. En effet, lorsque les surfaces présentent une topographie avec des trous, la totalité des microorganismes adhérents n'a pu être élue. De plus, la microscopie électronique à balayage n'a pas permis le dénombrement exact des microorganismes. En effet, la préparation des surfaces peut décrocher certaines bactéries et levures. Une méthode de dénombrement *in situ* par microscopie à fluorescence pourrait permettre de compter plus efficacement les microorganismes présents sur les surfaces, en utilisant des microorganismes bioluminescents ou un marquage préalable.

De plus, dans le protocole utilisé pour l'analyse microbiologique *in vitro*, la phase de rinçage est nécessaire pour éliminer les microorganismes non adhérents en surface et ainsi ne compter que ceux qui ont réellement adhérents. Cependant, l'efficacité de cette phase dépend fortement de l'expérimentateur, puisqu'en fonction de la manière de laver l'échantillon en PBS, un nombre différent de microorganismes peut être éliminé. Pour limiter ce facteur humain, des expériences préliminaires ont été réalisées avec un banc d'essai d'adhésion bactérienne en conditions dynamiques, suivi d'une méthode de dénombrement par UFC. Les analyses ont montré une forte réduction de l'écart type, lors des répétitions, lorsque le rinçage a été réalisé *in situ*. Cependant, le nombre de microorganismes adhérents était similaire aux tests en conditions statiques réalisés en parallèle, sur les surfaces lisses de TiO₂ et fonctionnalisées. D'autres paramètres comme l'augmentation du flux de la suspension de microorganismes dans la chambre de flux du banc d'essai pourraient éventuellement permettre de faire apparaître certaines différences notamment pour des échantillons rugueux. De plus, en adaptant le dispositif, l'étude en conditions dynamiques pourrait être couplée à la détection par microscopie à fluorescence.

Dans le cadre du projet régional, les travaux se sont centrés sur des surfaces à base de titane dont les rugosités étaient similaires à celles mesurées dans des chambres implantables commerciales. Pour

cela, différents protocoles de modification de l'état de surface ont été mis au point. Cependant, la topographie de certaines surfaces d'alliage de titane est très hétérogène : certaines surfaces ne présentaient pas des motifs de taille régulière à l'échelle du micromètre. Ainsi, de nouvelles surfaces modèles à base de titane présentant des motifs réguliers, en termes de largeur ou de profondeur, de taille micrométrique (comparable aux microorganismes) pourraient être imaginées afin d'étudier l'influence de la taille et de la répartition des motifs de surface sur l'adhérence primaire de bactéries et de levures.

Les analyses microbiologiques ont été réalisées avec *S. aureus* et *C. albicans* qui représentent environ 20% des microorganismes responsables des infections nosocomiales. Des études microbiologiques *in vitro* pourraient être complétées avec d'autres espèces de bactéries aussi présentes lors d'infections nosocomiales (qui peuvent réagir différemment sur ces surfaces). De plus, des analyses *in vivo* pourraient être réalisées afin de vérifier la biocompatibilité des échantillons réalisés ainsi que la tolérance des animaux vis-à-vis des traitements de surface, avec ou sans présence de bactéries et de levures.

Enfin, dans le cadre de ce projet, les études se sont focalisées sur l'intérieur des boîtiers en titane des chambres implantables. Cependant, l'apparition d'infections nosocomiales peut se faire à différents endroits du dispositif, comme par exemple sur l'extérieur du boîtier ou au niveau du cathéter.

Annexe 1 : Méthode MATS pour évaluer le caractère acide/base de Lewis et l'hydrophobicité de surface des microorganismes

La méthode MATS (Microbial adhesion to solvents) permet d'étudier les propriétés de la membrane de microorganismes. Elle renseigne sur le caractère acide (accepteur d'électrons) ou basique (donneurs d'électrons) au sens de Lewis ainsi que l'hydrophobicité. Les microorganismes sont mis en suspension dans du PBS puis un solvant est ajouté. En fonction de la répartition des microorganismes entre la phase aqueuse (PBS) et la phase organique (solvant ajouté) alors il est possible de déterminer l'affinité des microorganismes pour chaque solvant et avoir des informations sur ses propriétés de surface. Les solvants (souvent le chloroforme, l'héxadécane, l'acétate d'éthyle et le décane) sont choisis de manière à définir les propriétés de la membrane des microorganismes.

Le protocole décrit dans la littérature [1] est le suivant :

1. Les microorganismes sont d'abord préparés dans 1,2 ml d'une solution de PBS stérile. La densité optique est mesurée à 400 nm (A_0).
2. 0,2 ml de solvant est ajouté à la suspension préparée et le tout est vortexé pendant 90 s.
3. Le mélange est ensuite laissé 15 min au repos, pour permettre aux phases de se séparer.
4. 1 ml de phase aqueuse est prélevé et la densité optique est mesurée à 400 nm (A).
5. Le pourcentage d'affinité est ensuite déterminé d'après la formule : $\% \text{ affinité} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100$

Les résultats obtenus pour *S. aureus* sont donnés en Figure 1.

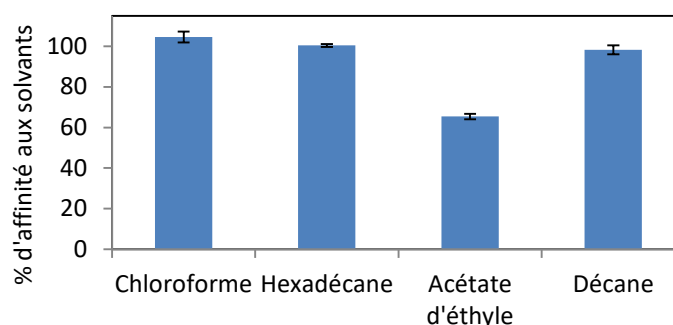


Figure 1 : Pourcentages d'affinité aux solvants

Ainsi, la bactérie *S. aureus* présente une surface hydrophobe avec un caractère basique.

[1] M.N. BellonFontaine, J. Rault, C.J. vanOss, Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells, Colloid Surface B, 7 (1996) 47-53.

Annexe 2 : Essais de cytotoxicité *in vitro* des molécules BpOH et BpF selon la norme ISO 10993-5 (2010)

Les essais de cytotoxicité ont été réalisés pour les molécules fluorées (BpF) et celle ayant le groupement éthylène glycol (BpOH). La molécule BpF a d'abord été solubilisée dans 1 ml d'éthanol. Chacune des molécules a ensuite été solubilisée dans le milieu de culture complet : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% de sérum de veau fœtal et 1% de Pénicilline/Streptomycine pour atteindre une concentration de 10 mM pour BpF et 100 mM pour BpOH. Des dilutions ont été réalisées pour tester différentes concentrations : de 0,0001 mM à 10 mM pour BpF et de 0,001 mM à 100 mM pour BpOH.

Les essais ont été réalisés avec des cellules L929 de souris (C3H/an) selon les indications de la norme.

Les essais de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés en plaque 96 puits. Chaque puit a étéensemencé avec les cellules avec une concentration d'environ $1,5 \times 10^4$ cellules/puits. Les plaques ont ensuite été incubées 24 h à 37°C sous 5% de CO₂ avant de débiter les essais de cytotoxicité. Le milieu avec les cellules est ensuite enlevé des puits et est remplacé dans chacun des puits par 100 µl de solution aux différentes concentrations testées. Le tout est incubé pendant 24 h à 37°C sous 5% de CO₂. Des témoins négatif et positif sont ajoutés pour comparer les résultats obtenus par les trois méthodes d'évaluation préconisées dans la norme.

1. Une observation par microscopie optique inversée avec un grossissement X 100 afin de comparer le nombre et la forme des cellules par rapport aux témoins.
2. Un essai de cytotoxicité au rouge neutre. Ce test repose sur la capacité des cellules à absorber le colorant. Après rinçage, le colorant est extrait à l'aide d'une solution acidifiée d'éthanol. L'absorbance de cette solution est ensuite mesurée à 540 nm et est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.
3. Un essai de cytotoxicité au MTS¹. Pour cela, du MTS est introduit dans les puits. Si les cellules sont vivantes alors elles réduisent le MTS en formazan. La mesure de l'absorbance, du formazan, à 490 nm est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

¹ MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, innersalt

Pour ces deux derniers tests, le résultat est exprimé en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport aux témoins négatifs (cellules cultivées en l'absence des molécules).

Les résultats obtenus par ces différentes approches concordent et montrent que, dans les conditions de cette étude et selon les critères de la norme, aucun effet cytotoxique potentiel n'a été observé pour BpF et BpOH pour une concentration inférieure ou égale à 1 mM.

Annexe 3 : Préparation des échantillons avec les bactéries et les levures pour l'observation MEB

L'utilisation de la microscopie électronique à balayage a permis de visualiser la topographie des surfaces ainsi que la répartition des microorganismes sur ces surfaces. Les microorganismes sont des composés fragiles, sensibles à la température et à la pression et non conducteurs. Pour permettre une observation optimale des bactéries et des levures sur les surfaces, il est donc nécessaire de préparer chimiquement les échantillons avant observation. Une fixation des protéines de surfaces et une déshydratation des microorganismes est nécessaire afin qu'ils conservent leur structure lors de l'observation MEB, dans l'enceinte sous vide [1]. Enfin, une métallisation de la surface à l'aide d'une couche nanométrique de platine permet de rendre conducteur les échantillons.

Le protocole de préparation des échantillons est le suivant :

1. Les protéines des membranes des bactéries et des levures sont d'abord fixées par une solution de paraformaldéhyde 2,5% et de glutaraldéhyde 2,5% dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 à température ambiante pendant une nuit.
2. Les échantillons sont ensuite rincés dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 (éventuellement sur plusieurs jours à 4°C).
3. Un deuxième rinçage est ensuite réalisé dans de l'eau pure.
4. Les microorganismes sont déshydratés successivement dans trois bains d'éthanol à 100°, et l'éthanol du 3^{ème} bain s'évapore à l'air.
5. Les échantillons sont ensuite fixés sur des plots, de taille adaptée, pour l'observation au MEB.
6. La surface des échantillons est ensuite métallisée par le dépôt d'une couche de 5 à 10 nm de platine.

Les images ont été réalisées avec un MEB à effet de champ, en électrons secondaires. La tension d'accélération a été fixée à 2 ou 3 keV. La pression de l'enceinte était comprise entre 5×10^{-6} mbar et 9×10^{-7} mbar. Les observations ont été réalisées sur l'un de ces deux MEB à effet de champ : un modèle JEOL JSM-6301F à Angers ou un modèle Zeiss Ultra Plus (Tours).

[1] E.R. Fischer, B.T. Hansen, V. Nair, F.H. Hoyt, D.W. Dorward, Scanning Electron Microscopy, Current Protocols in Microbiology, CHAPTER (2012) Unit2B.2.

Thèse de Doctorat

Héloïse FABRE

Contributions des propriétés physico-chimiques de surfaces de titane sur l'adhérence de microorganismes : Application aux chambres

Contributions of physico-chemical properties of titanium based surfaces on the adherence of microorganisms: Application to totally implantable venous-access ports

Résumé

Les chambres implantables sont des dispositifs médicaux utilisés pour l'administration de produits de chimiothérapie et/ou de nutrition parentérale. Comme la plupart des implants médicaux, ces dispositifs peuvent être à l'origine d'infections nosocomiales. L'objectif de la thèse a été d'étudier la contribution des modifications physico-chimiques de surface de matériaux à base de titane sur l'adhérence de microorganismes. Des surfaces présentant différentes caractéristiques ont été élaborées et l'adhérence de la bactérie *Staphylococcus aureus* et de la levure *Candida albicans* a été testée *in vitro* en conditions statiques. Des surfaces modèles de TiO₂ présentant des rugosités à l'échelle du nanomètre et du micromètre ont été élaborées avec des wafers de silicium revêtues d'un film mince d'oxyde de titane déposé par pulvérisation cathodique. Des surfaces d'alliages de titane grade 2 et grade 5 ont été modifiées par polissage, sablage ou électroérosion, créant différentes morphologies. Il est apparu que le nombre de microorganismes adhérents changeait certes avec la rugosité, mais était fonction de la morphologie de surface des matériaux et de la taille du microorganisme. Des surfaces lisses de TiO₂ ont ensuite été fonctionnalisées par greffage moléculaire pour modifier le caractère hydrophile/hydrophobe de surface. L'étude de l'adsorption de protéines du plasma sanguin, par QCM, a permis de mieux expliquer l'adhérence de bactéries et de levures sur ces surfaces. L'influence de la nutrition parentérale et des produits de chimiothérapie sur les surfaces a aussi été étudiée afin de se rapprocher des conditions d'utilisation des chambres implantables.

Mots clés

Dispositifs implantables, Infections nosocomiales, Microorganismes, Titane, Structuration de surface, Fonctionnalisation de surface

Abstract

Totally implantable venous-access ports are medical devices used for the administration of chemotherapy drugs and/or parenteral nutrition. Infections can occur and it is indispensable in modern-day medical practice to prevent and reduce the rare infectious complications. In this context, the goal of this work was to study the contribution of the modification of physico-chemical properties of titanium based surfaces on the adherence of microorganisms. Surfaces with different characteristics were produced and the adherence of the bacterium *Staphylococcus aureus* and the yeast *Candida albicans* was studied *in vitro* in static conditions. Model surfaces made of titanium dioxide with roughness from nanometer to micrometer were elaborated using silicon wafers recovered with a thin film of titanium dioxide deposited by plasma vapor deposition. Titanium alloy surfaces (Ti grade 2 and Ti grade 5) were modified by polishing, grit-blasting or wire erosion, to create different surface morphologies. *In vitro* studies were performed and it was found that the number of adhering microorganisms changed with roughness, but more importantly with the surface morphology of the biomaterials and microorganism's size. Flat titanium dioxide thin films were then functionalized by molecular grafting to modify the hydrophobicity of the surface. Study of plasma protein adsorption, by QCM, allowed to better explain the adherence of bacteria and yeast onto these surfaces. The influence of parenteral nutrition and chemotherapy drugs was also studied in order to better approach the real conditions of totally implantable venous-access ports.

Key Words

Implantable devices, Nosocomial infections, Microorganisms, Titanium, Surface modification, Surface functionalization