# Préparation et caractérisations physicochimiques et biologiques de surfaces modifiées par du chitosane

Mamoudou Diallo

▶ **To cite this version:**

Mamoudou Diallo. Préparation et caractérisations physicochimiques et biologiques de surfaces modifiées par du chitosane. Polymères. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1083 . tel-01871984

**HAL Id: tel-01871984**
**https://theses.hal.science/tel-01871984**

Submitted on 11 Sep 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.

N°d'ordre NNT : 2018LYSE1083

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**
opérée au sein de
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**ED34 : Ecole Doctorale Matériaux de Lyon**

**Spécialité de doctorat** :
**Discipline** : Matériaux Polymères et Composites

Soutenue publiquement le 30/05/2018, par :
**Mamoudou DIALLO**

---

# Préparation et caractérisations physicochimiques et biologiques de surfaces modifiées par du chitosane

---

Devant le jury composé de :

| | | | |
|---|---|---|---|
| M. LEONARD, Didier | PU | Université Claude Bernard Lyon 1 | Président de jury |
| M$^{me}$ TRAN, Yvette | MC | ESPCI Paris Tech | Rapporteuse |
| M$^{me}$ LE VISAGE, Catherine | DR | Université de Nantes | Rapporteuse |
| M$^{me}$ KARAKASYAN-DIA, Carole | MC | Université de Rouen | Examinatrice |
| M. THEODOLY, Olivier | DR | Unité INSERM U1067 | Examinateur |
| M. DELAIR, Thierry | PU | Université Claude Bernard Lyon 1 | Directeur de thèse |
| M. SUDRE, Guillaume | MC | Université Claude Bernard Lyon 1 | Co-encadrant de thèse |
| M. TROMBOTTO, Stéphane | MC | Université Claude Bernard Lyon 1 | Co-encadrant de thèse |
| M$^{me}$ MONTEMBAULT, Alexandra | MC | Université Claude Bernard Lyon 1 | Invitée |
| M. RAHBE, Yvan | DR | INRA INSA Lyon | Invité |

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

| | |
|---|---|
| **Président de l'Université** | **M. le Professeur Frédéric FLEURY** |
| Président du Conseil Académique | M. le Professeur Hamda BEN HADID |
| Vice-président du Conseil d'Administration | M. le Professeur Didier REVEL |
| Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire | M. le Professeur Philippe CHEVALIER |
| Vice-président de la Commission Recherche | M. Fabrice VALLÉE |
| Directrice Générale des Services | Mme Dominique MARCHAND |

## *COMPOSANTES SANTE*

| | |
|---|---|
| Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard | Directeur : M. le Professeur G.RODE |
| Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux | Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON |
| Faculté d'Odontologie | Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS |
| Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA |
| Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation | Directeur : M. X. PERROT |
| Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine | Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT |

## *COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE*

| | |
|---|---|
| Faculté des Sciences et Technologies | Directeur : M. F. DE MARCHI |
| Département Biologie | Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD |
| Département Chimie Biochimie | Directeur : Mme C. FELIX |
| Département GEP | Directeur : M. Hassan HAMMOURI |
| Département Informatique | Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE |
| Département Mathématiques | Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV |
| Département Mécanique | Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID |
| Département Physique | Directeur : M. le Professeur J-C PLENET |
| UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives | Directeur : M. Y.VANPOULLE |
| Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon | Directeur : M. B. GUIDERDONI |
| Polytech Lyon | Directeur : M. le Professeur E.PERRIN |
| Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique | Directeur : M. G. PIGNAULT |
| Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1 | Directeur : M. le Professeur C. VITON |
| Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education | Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE |
| Institut de Science Financière et d'Assurances | Directeur : M. N. LEBOISNE |

# REMERCIEMENTS

Ce travail s'est déroulé au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP@Lyon1, UMR 5223) dirigé par Philippe CASSAGNAU. Cette thèse a été financée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Tout d'abord, je tiens à remercier très sincèrement toutes les personnes qui ont encadré cette thèse : Thierry DELAIR, Guillaume SUDRE, Alexandra MONTEMBAULT et Stéphane TROMBOTTO. Je ne vous remercierai jamais assez pour le temps et le soutien que vous avez consacré à ma thèse mais aussi et surtout pour vos différentes qualités scientifiques qui m'ont beaucoup apportées. Cela a été un très grand plaisir pour moi d'avoir travaillé avec vous.

Je remercie Mme Catherine LE VISAGE, directrice de recherche au Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD/INSERM UMR_S 791) de l'Université de Nantes et Mme Yvette TRAN, maître de conférences au Laboratoire Sciences et Ingénierie de la Matière Molle (SIMM, UMR 7615) de l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI) de Paris pour avoir accepté d'être les rapporteuses de cette thèse. Je remercie également tous les autres membres du jury : Mme Carole KARAKASYAN-DIA, maître de conférences au Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces (UMR, 6270) de l'Université de Rouen, M. Didier LEONARD, professeur à l'Institut des Sciences Analytiques (ISA, UMR 5280) de l'Université Claude Bernard de Lyon et M. Olivier THEODOLY, directeur de recherche au Laboratoire Adhésion et Inflammation (LAI/INSERM U1067 CNRS UMR 7333) de l'Université de Marseille pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail. Je remercie aussi M. Yvan RAHBE, directeur de recherche au Laboratoire Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions (BF2I, UMR 0203) de Lyon d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie Tâm Mignot, Julier TREGUIER du Laboratoire de Chimie Bactérienne (LCB, UMR 7283) et Olivier THEODOLY du Laboratoire Adhésion et Inflammation (LAI/INSERM U1067) de Marseille pour leur collaboration sur la caractérisation biologique des films de chitosane. Mes remerciements vont également à l'endroit de Didier LEONARD et Corinne GABLIN de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA, UMR 5280) de Lyon pour les expériences de spectrométrie de masse TOF-SIMS ainsi que pour leur aide à l'interprétation des résultats. J'adresse également mes remerciements à Didier LAIREZ, Fabrice COUSIN et Alexis CHENNEVIERE du Laboratoire Léon Brillouin (UMR 12) pour leur accueil, leur aide dans la réalisation des expériences de réflectivité des neutrons et pour

le traitement des données. Je remercie également Fernand CHASSAGNEUX pour la formation, l'accès à l'ellipsomètre et sa disponibilité. Merci également à Yvette TRAN pour le prêt du matériel infrarouge et des cristaux de silicium qui m'ont été d'une grande utilité au cours de cette thèse. Je remercie Loïc BUGNICOURT pour son aide et sa contribution à ce travail.

Je tiens également à remercier tout le personnel du laboratoire notamment Olivier GAIN, Florian DOUCET, Thierry TAMET, Ali HADDANE, Flavien MELIS, Adrien TAULEIGNE, Laurent CAVETIER et Sabine SAINTE-MARIE pour leur implication au quotidien pour le bon fonctionnement du laboratoire. Je remercie également Agnès CREPET pour les expériences de chromatographie. Mes remerciements vont également à l'endroit de Catherine LADAVIERE pour son aide précieuse sur les expériences en spectrométrie de masse MALDI-TOF et l'interprétation des résultats. Je tiens à remercier aussi Pierre ALCOUFFE pour sa disponibilité et son aide pour les expériences AFM. Je remercie Sylvie NOVAT et Nadia BEN YACOUB pour les aides sur les démarches administratives.

J'aimerais également remercier tous les doctorants que j'ai eu à rencontrer au laboratoire. Permettez-moi d'abord de commencer par les anciens du l'équipe biomatériaux, je veux dire Kévin BLANCHARD, Alice GALAIS, Gautier LALEVEE, Nicolas SERENI, Mélanie DUMONT, Danjun WU et Célia HALIMI qui m'ont bien accueilli et à coté de qui j'ai beaucoup appris. Je n'oublierai jamais vos aides durant mon séjour au laboratoire et surtout pendant ma période de stage de Master. A coté de ces anciens, je remercie « les nouveaux » : Anaïs ALTOUNIAN, Amani MOUSSA, Renaud PASSIEUX, Paula OLIVEIRA, Soline PEERS, Maxime MOCK-JOUBERT, Jimmy FAIVRE, Orianne DOMENGE, Florian VANNESTE et Imane KOUADRI. Je remercie également tous les anciens et nouveaux doctorants des autres pôles du laboratoire : Antoine LUCAS, Fabien TOQUET, Jihane SAHYOUN, Margarita RUEDA, Imed Eddine BEN ALI, Guillaume COLLIAT, Alice PAZAT, Edwin COURTIAL, Afef HOUACHTA, Marwa KCHAOU, Clément PERRINET, Antoine JOURDAIN, Hend JAOUA, Marie-Camille AUSCHER, Iurii ANTONIUK, Marjorie MARCOURT, Baptiste PAGET, Christophe MOUGEL, Thibaut METIVIER, Yann GABET, Mickael ROBERT, Bryan GUICHARD, Anthony BLANCHARD, Pierre PILUSO, Bastien TURLIER, Laurent VERNY, Clémence RETAILLEAU, Mathilde AUCLERC, Manon BESANCON, Benjamin MULOT, Walid ACHOUR, Dimitri FLACHARD, Sarra ZID, QuanYi YIN, Amira KALLEL, Abdel Wahab DAHRI, Mohammad ABOU TAHA. Je

remercie également les collègues du bureau 428 : Asma KEDIM la chef du bureau, Renaud PASSIEUX l'adjoint chef du bureau, Thomas QUERETTE, Thibaut PREFOL.

Je ne saurais terminer sans adresser mes remerciements à mes parents et proches. Je ne citerai pas de noms car vous avez été nombreux à me soutenir et à m'encourager durant ces trois années de thèse. En plus des remerciements pour vos bonnes actions et votre bonne foi, je vous dédie ce travail.

Anda a anda

Sa andi a anda a anadat

Sa anada a anda a andata

« Savoir que l'on ne sait pas »

« Si tu sais que tu ne sais pas, tu sauras »

« Si tu ne sais pas que tu ne sais pas, tu ne sauras pas »

Amadou Hampathé Ba

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE ..... 1

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ..... 5
I. Comprendre l'adhésion des bactéries sur une surface ..... 8
I.1. Structure et anatomie des bactéries ..... 9
I.1.1. La capsule ..... 9
I.1.2. La paroi cellulaire ..... 9
I.1.3. La membrane cytoplasmique ..... 11
I.1.4. Les flagelles ..... 12
I.2. Interactions des bactéries avec une surface ..... 13
I.2.1. Les interactions non spécifiques ..... 13
I.2.2. Interactions spécifiques ..... 16
I.3. Approche d'adhésion des bactéries sur une surface ..... 19
I.3.1. Approche classique DLVO de l'adhésion des bactéries sur une surface ..... 19
I.3.2. Approche thermodynamique de l'adhésion des cellules sur une surface ..... 21
I.3.3. Mécanisme d'adhésion et de prolifération des bactéries sur une surface ..... 22
I.4. Facteurs influençant l'adhésion de bactéries sur une surface ..... 24
I.4.1. Facteurs liés aux propriétés de la surface ..... 25
I.4.2. Facteurs liés aux conditions environnementales ..... 26
I.4.3. Facteurs liés aux propriétés des bactéries ..... 26
I.4.4. Le « surface sensing » ou la détection de la surface ..... 27
II. Modification de surfaces et intérêts biologiques ..... 28
II.1. Méthodes et approches de modification de surfaces ..... 29
II.2. Applications des films minces dans le domaine biomédical ..... 30
III. Le Chitosane : de la biomasse à l'utilisation biomédicale ..... 32
III.1. Origine et structure du chitosane ..... 32
III.2. Paramètres moléculaires du chitosane ..... 33
III.2.1. Le degré d'acétylation ..... 33
III.2.2. La masse molaire ..... 33
III.3. Propriétés du chitosane en solution ..... 34
III.3.1. Solubilité du chitosane ..... 34
III.3.2. Conformation du chitosane en solution ..... 35

III.4. Caractérisation des paramètres moléculaires du chitosane ..... 36
III.4.1. Le degré d'acétylation ..... 36
III.4.2. La masse molaire ..... 37
III.5. Propriétés biologiques du chitosane ..... 38
III.5.1. Propriétés bactériostatiques ..... 38
III.5.2. Propriétés anti-tumorales ..... 38
III.5.3. Propriétés de biocompatibilité ..... 39
III.6. Propriétés physicochimiques des films de chitosane ..... 39
III.6.1. Mouillabilité des films de chitosane ..... 39
III.6.2. Gonflement des films de chitosane ..... 40
III.6.3. Propriétés de cristallinité des films de chitosane ..... 41
III.7. Applications biomédicales de films minces de chitosane ..... 41
Conclusion ..... 43
Références bibliographiques: ..... 44

CHAPITRE II : ETUDE DES PROPRIETES DES FILMS DE CHITOSANE ELABORES PAR SPIN-COATING ..... 59
Introduction ..... 62
I. Préparation des films de chitosane ..... 63
I.1. Purification et réacétylation du chitosane ..... 63
I.1.1. Purification ..... 63
I.1.2. Réacétylation ..... 63
I.2. Préparation des solutions de chitosane ..... 64
I.3. Détermination de la viscosité des solutions de chitosane ..... 65
I.4. Adsorption d'une chaîne de polyélectrolytes sur une surface ..... 66
I.5. Préparation des substrats ..... 68
I.6. Elaboration des films de chitosane par spin-coating ..... 68
II. Détermination des épaisseurs des films de chitosane par ellipsométrie ..... 69
II.1. Effet de la concentration et de la viscosité des solutions sur les épaisseurs ..... 69
II.2. Effet du recuit des films sur les épaisseurs ..... 71
II.3. Effet du lavage des films de chitosane à l'eau acide pH 4 ..... 73
III. Etude de la mouillabilité des films de chitosane ..... 74
III.1. Technique de détermination des propriétés de mouillabilité ..... 74
III.2. Notions de « pinning » et de « tache de café » ..... 76

III.3. « Tache de café » et stabilité de la goutte sonde sur les films de chitosane ..... 78
III.4. Détermination des angles de contact en fonction du vieillissement des films ..... 80
III.4.1. Films non rincés ..... 80
III.4.2. Films recuits et neutralisés ..... 82
III.4.3. Films lavés avec une solution aqueuse d'acide acétique pH 4 ..... 83
III.5. Détermination des angles de contact statiques ..... 85
III.5.1. Effet du degré d'acétylation ..... 85
III.5.2. Effet de la masse molaire du chitosane ..... 86
III.5.3. Effet des épaisseurs des films de chitosane ..... 88
IV. Etude de l'hystérèse de contact des films de chitosane ..... 89
V. Etude de la tension et de la polarité de surface des films de chitosane ..... 91
V.1. Effet du degré d'acétylation ..... 91
V.2. Effet de la masse molaire ..... 94
V.3. Effet des épaisseurs des films de chitosane ..... 95
Conclusion ..... 98
Références: ..... 99

CHAPITRE III : ETUDE DE LA STRUCTURE ET DE LA MORPHOLOGIE DES FILMS DE CHITOSANE ..... 103
Introduction ..... 106
I. Etude de la morphologie des films de chitosane par AFM ..... 107
I.1. Principe de la technique AFM ..... 107
I.2. Effet des différents acides et du degré d'acétylation ..... 107
I.3. Effet de l'épaisseur des films de chitosane ..... 108
I.4. Effet du recuit des films de chitosane ..... 109
II. Caractérisation par spectroscopie infrarouge des films de chitosane ..... 110
II.1. Effet des acides acétique et chlorhydrique sur la structure chimique des films de chitosane ..... 110
II.2. Effet de la température et de la neutralisation sur la structure des films de chitosane 113
III. Etude de la structure des films par réflectivité de neutrons ..... 115
III.1. Introduction à la conformation des polyélectrolytes faibles ..... 115
III.1.1. Effet du pH sur l'ionisation et la conformation des polyélectrolytes faibles ..... 115

III.1.2. Conformation des chaînes de polyélectrolytes faibles en interaction avec une surface ..... 116
III.1.3. Comportement en solution des chaînes de polyélectrolytes faibles ..... 119
III.2. Détermination de la structure des films ..... 120
III.2.1. Interaction neutron matière ..... 120
III.2.2. Méthode de variation de contraste ..... 121
III.2.3. Détermination de la réflectivité ..... 121
III.2.4. Principe de la réflectivité des neutrons ..... 123
III.3. Partie expérimentale ..... 124
III.3.1. Préparation des échantillons ..... 124
III.3.2. Méthode de traitement des données de réflectivité ..... 125
III.4. Résultats expérimentaux ..... 126
III.4.1. Effet du degré d'acétylation ..... 126
III.4.2. Effet des épaisseurs des films de chitosane ..... 128
III.4.3. Effet du pH ..... 131
III.4.4. Effet de la longueur des chaînes de chitosane ..... 134
Conclusion ..... 137
Références ..... 138

CHAPITRE IV : CARACTERISATION BIOLOGIQUE DES FILMS DE CHITOSANE .. 141
Introduction et contexte de l'étude ..... 143
I. Partie expérimentale ..... 145
I.1. Préparation des films de chitosane ..... 145
I.2. Préparation du milieu de culture des bactéries ..... 145
I.3. Méthode de culture des bactéries sur les films de chitosane ..... 146
I.4. Tests de sensibilité des bactéries aux antibiotiques ..... 147
I.5. Techniques d'observation de l'adhésion des bactéries ..... 147
II. Résultats expérimentaux ..... 148
II.1. Adhésion et prolifération des bactéries *E. coli* ..... 148
II.2. Adhésion et prolifération des bactéries *Klebsiella pneumoniae* ..... 150
II.3. Adhésion et prolifération des bactéries *Staphylococcus aureus* ..... 152
II.4. Effet non toxique des films de chitosane sur les bactéries *E. coli* ..... 153

II.5. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques ..... 154
III. Discussion des résultats expérimentaux ..... 155
III.1. Effet des paramètres moléculaires ..... 155
III.2. Effet des paramètres physicochimiques ..... 157
Conclusion ..... 160
Références ..... 161

CHAPITRE V : GREFFAGE CHIMIQUE COVALENT DE CHITOOLIGOSACCHARIDES SUR DES SURFACES DE SILICIUM ..... 165
Introduction ..... 167
I. Généralités sur la chimie click ..... 168
II. Etude du greffage en solution de quelques substrats modèles ..... 169
II.1. Méthodes expérimentales ..... 170
II.1.1. Protocole expérimental du greffage en solution ..... 170
II.1.2. Techniques de caractérisation ..... 171
II.2. Résultats et discussion ..... 172
III. Greffages chimiques des chitooligosaccharides sur des surfaces de silicium ..... 181
III.1. Généralités sur la fonctionnalisation des surfaces ..... 181
III.1.1. Nettoyage des surfaces de silicium ..... 182
III.1.2. Silanisation ..... 182
III.1.3. Azidation ..... 184
III.1.4. Réaction « Click » azoture/alcyne sur des surfaces planes ..... 184
III.2. Méthodes expérimentales ..... 185
III.2.1. Nettoyage des substrats de silicium ..... 185
III.2.2. Silanisation des substrats ..... 186
III.2.3. Azidation des substrats ..... 186
III.2.4. Greffage des chitooligosaccharides sur les substrats ..... 186
III.3. Méthodes de caractérisation ..... 187
III.3.1. Analyse des surfaces par spectroscopie IR ..... 187
III.3.2. Analyse des surfaces par spectroscopie de masse TOF-SIMS ..... 187
III.4. Résultats et discussion ..... 188
III.4.1. Silanisation des surfaces de silicium ..... 189
III.4.2. Azidation du silane ..... 193

III.4.3. Greffage des chitooligosaccharides ..... 194
Conclusion ..... 199
Références ..... 200

CONCLUSION GENERALE ..... 205

LEXIQUE DE QUELQUES TERMES BIOLOGIQUES ..... 211

ANNEXES ..... 215
ANNEXE A : MORPHOLOGIE DES FILMS DE CHITOSANE PAR AFM ..... 216
1. Films élaborés avec la solution aqueuse d'acide chlorhydrique ..... 217
❖ Chitosane 600, concentration 0.5 % (m/m) ..... 217
❖ Chitosane 600, concentration 1% (m/m) ..... 217
❖ Chitosane 180, concentration 2 % (m/m) ..... 218
❖ Chitosane 180, concentration 1.42 % (m/m) ..... 218
❖ Chitosane 180, concentration 1 % (m/m) ..... 219
2. Films élaborés avec la solution aqueuse d'acide acétique ..... 219
❖ Chitosane 600, concentration 0.67 % (m/m) ..... 219
❖ Chitosane 600, concentration 1 % (m/m) ..... 220
❖ Chitosane 180, concentration 2 % (m/m) ..... 220
❖ Chitosane 180, concentration 1.42 % (m/m) ..... 221
❖ Chitosane 180 DA 55 % AcOH (NR) ..... 221
❖ Chitosane 180 DA 55 % AcOH (RA) ..... 222
❖ Chitosane 600 DA 55 %: effet recuit et neutralisation ..... 222
ANNEXE B : SYNTHESE DES CHITOOLIGOSACCHARIDES DERIVES PROPARGYL 223
1. Synthèse des COSamf X~16 et 27 ..... 224
2. Synthèse du 4-propargyloxyaniline-g-COSamf X ~ 16 et 27 ..... 225

# LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| AcOH | Acide acétique |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AFM | « Atomic Force Microscopy » |
| amf | 2,5-anhydro-D-mannofuranose |
| AMP | Ampicilline |
| Ar | Groupe aromatique |
| ARNm | Acide ribonucléique messager |
| ATG | Analyse thermogravimétrique |
| CES | Chromatographie d'exclusion stérique |
| CMI | Concentration minimale inhibitrice |
| COS | Chitooligosaccharide |
| DA | Degré d'acétylation |

| | |
|---|---|
| DMAc | Diméthylacétamide |
| DMF | Diméthylformamide |
| DVLO | Derjaguin Landau Verwey Overbeek |
| E. *coli* | Escherichia coli |
| EPS | Exopolysaccharide |
| ETP | Ertapenam |
| GlcN | D-Glucosamine |
| GlcNAc | N-acétyl-D-glucosamine |
| HCl | Acide chlorhydrique |
| IR | Spectroscopie infrarouge |
| K. *pneumoniae* | Klebsiella pneumoniae |
| LB | Lysozyme Broth |
| LiCl | Chlorure de lithium |
| MALDI-TOF | « Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight » |
| MCIR | Microscopie à contraste interférentiel par réflexion |
| MCT | Mercure-cadmium-tellurure |
| MEC | Mecillinam |
| PEG-$N_3$ | Polyéthylène glycol – Azoture |
| RMN $^1$H | Résonance magnétique nucléaire du proton |
| RMS | « Root mean square », rugosité moyenne quadratique |
| S. *aureus* | Staphylococcus aureus |
| TOF-SIMS | « Time of flight secondary ion mass spectrometry » |
| TSP-d4 | Acide triméthylsilylpropanoïque deutéré |

# INTRODUCTION GENERALE

La détermination des antibiotiques par les laboratoires médicaux n'a pas toujours été évidente et peut parfois s'ériger en facteur bloquant pour le traitement des patients. En effet, dans certains cas, cette détermination peut s'étendre sur plusieurs heures voire plusieurs jours. Cette lenteur dans la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques peut entraîner une hospitalisation prolongée du patient, rendre son traitement plus complexe et même entraîner sa mort. A ce problème lié à la durée de détermination des antibiotiques, s'ajoute celui de l'antibiorésistance. En effet, l'inefficacité des antibiotiques dans le traitement de certaines infections figure aujourd'hui parmi les plus grands défis de santé publique sur le plan mondial. L'inefficacité croissante des antibiotiques classiques est attribuée à leur sur-consommation en santé humaine et leur utilisation abusive dans l'élevage intensif. Aux Etats-Unis par exemple, une utilisation inutile d'antibiotiques à hauteur de 20 à 50 % est constatée chez l'homme et une utilisation discutable de 40 à 80 % dans l'agriculture, et ce malgré les politiques mises en place et les sensibilisations menées par les organisations de santé.[a] Il résulte d'études prévisionnelles que le rythme actuel d'évolution de l'antibiorésistance pourrait entraîner jusqu'à 10 millions de morts par année soit un mort toutes les 3 secondes en 2050 dans le monde et sans nul doute à un retour vers les dégâts des infections courantes de la période « pré antibiotique ».[b] A l'état actuel de l'avancée de l'antibiorésistance, les espoirs pour résoudre ce problème sont portés sur la recherche scientifique. Cependant, les principales difficultés rencontrées dans cette recherche sont liées soit à l'adhésion et à la prolifération des bactéries antibiorésistantes soit à la reproductibilité des systèmes sur lesquels les bactéries adhèrent.

Le fil conducteur de cette thèse est de développer des surfaces de chitosane de propriétés biologiques et physicochimiques bien contrôlées qui pourront servir dans la lutte contre l'antibiorésistance. En effet, cette étude vise à simplifier l'observation de l'effet des antibiotiques sur les bactéries à travers des surfaces bioactives mais aussi à permettre une observation plus rapide de cet effet. Ainsi, l'objectif principal de cette thèse est d'élaborer à partir d'un polymère naturel de paramètres moléculaires bien contrôlés, des surfaces bioactives de propriétés physicochimiques bien caractérisées afin d'établir les relations entre

---

[a] : Wise, R.; Hart, T.; Cars, O.; Streulens, M.; Helmuth, R.; Huovinen, P.; Sprenger, M., Antimicrobial resistance. *In British Medical Journal Publishing Group*: 1998.

[b] : O'neill, J., Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. *Review on Antimicrobial Resistance*: 2015.

les caractéristiques moléculaires du polymère, les propriétés physicochimiques des surfaces et les réponses biologiques. Afin d'effectuer les évaluations biologiques des surfaces, une collaboration a été initiée au cours de cette thèse avec une équipe du Laboratoire de Chimie Bactérienne (LCB, UMR 7283) et le Laboratoire Adhésion et Inflammation (LAI, Inserm, U1067) de Marseille pour les caractérisations biologiques des surfaces modifiées par le chitosane.

Le choix du polymère pour réaliser cette étude est porté sur le chitosane. Le chitosane est un bio-polymère linéaire de nature hydrophile appartenant à la classe des polysaccharides. Il est obtenu par N-désacétylation partielle de la chitine, elle-même généralement extraite des exosquelettes de crustacés (crevette) ou des endosquelettes de céphalopodes (calamar). Le chitosane est composé d'unités D-glucosamine (GlcN) et N-acétyl-D-glucosamine reliées par des liaisons glycosidiques de type β-(1,4). Le choix du chitosane est justifié d'une part par ses propriétés de biocompatibilité, de biodégradabilité, de non toxicité, bactériostatiques, antifongiques,… du chitosane mais aussi par certaines de ses propriétés liées à son caractère hémocompatible telles que la bonne interaction avec les protéines et les cellules biologiques, la facilité à être colonisé par les cellules biologiques qui permettent d'envisager son utilisation sur des surfaces. En plus de ces propriétés, sa structure est très proche de celles des glucosaminoglycanes sécrétés par certaines bactéries étudiées au cours de ce travail. D'autre part, ce choix est motivé par les travaux réalisés au Laboratoire IMP Lyon 1 (UMR 5223). Le savoir-faire et l'expertise du laboratoire IMP notamment le pôle « matériaux polymères à l'interface avec les sciences de la vie » sur la préparation de chitosanes de paramètres moléculaires bien contrôlés sont d'un atout majeur pour la réalisation de cette étude. En effet, de récents travaux menés au laboratoire ont mis en évidence les potentielles utilisations du chitosane pour la régénération des cellules germinales, la régénération tissulaire de la peau et du cartilage, la fabrication d'implants vasculaire,….

Ce manuscrit sera structuré en trois parties ; une première partie bibliographique ou nous discuterons de façon générale des interactions (notamment l'adhésion et la prolifération) entre les bactéries et une surface. Cette partie inclura l'adhésion et la prolifération des bactéries sur une surface, les propriétés des bactéries, des surfaces et les facteurs environnementaux impliqués dans ces processus d'adhésion et de prolifération. Cette étude bibliographique sera ensuite focalisée sur le rôle des propriétés moléculaires et physicochimiques du chitosane dans ces interactions.

La deuxième partie, composée de trois chapitres, est consacrée à la caractérisation physicochimique et biologique des surfaces de chitosane élaborées par spin-coating. Dans les deux premiers chapitres de cette partie, nous cherchons à montrer comment les propriétés physicochimiques des films sont influencées par les paramètres moléculaires du chitosane (masse, DA) et de certaines méthodes de traitement (neutralisation, recuit, rinçage des films,…).En effet, dans ces chapitres, nous avons étudié d'une part l'effet des paramètres moléculaires sur les propriétés de mouillabilité (Angles de contact, tensions de surface, polarités de surface,…), les propriétés structurales (structure chimique, densité volumique, gonflement,…) et morphologiques (rugosité) des films. D'autre part, l'effet de l'acide (AcOH ou HCl), du vieillissement des films sur ces propriétés ainsi que la neutralisation des films en rapport avec la nature de l'acide ont été abordés. Ces chapitres ont permis d'élucider le comportement des propriétés physicochimiques des films vis-à-vis des paramètres moléculaires du chitosane et des conditions expérimentales étudiées. Dans le dernier chapitre de cette partie, les réponses biologiques des films de chitosane préparés dans les deux premiers chapitres sont présentées. Cette étude, réalisée par le LCB, illustre les propriétés biologique d'adhésion et de prolifération de différentes souches de bactéries sur des films de chitosane de paramètres moléculaires et physicochimiques différents afin de comprendre le lien entre ces paramètres et les propriétés biologiques. Finalement, ce chapitre démontre l'utilité des surfaces de chitosane, notamment pour caractériser l'effet des antibiotiques sur les souches de bactéries utilisées.

La troisième partie de ce manuscrit est consacrée au greffage par « grafting to » de chaînes de chitooligosaccharides à structure macromoléculaire bien contrôlée sur des surfaces de silicium. Dans cette partie, nous cherchons à mettre en évidence par différentes méthodes de caractérisation le greffage sur les surfaces et à développer des surfaces fonctionnalisées chimiquement par des chitooligosaccharides qui pourraient comme dans le cas des films de chitosane adsorbés, être caractérisées biologiquement. Enfin, cette dernière partie sera suivie de la conclusion générale de cette thèse.

# CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ..... 5
I. Comprendre l'adhésion des bactéries sur une surface ..... 8
I.1. Structure et anatomie des bactéries ..... 9
I.1.1. La capsule ..... 9
I.1.2. La paroi cellulaire ..... 9
I.1.3. La membrane cytoplasmique ..... 11
I.1.4. Les flagelles ..... 12
I.2. Interactions des bactéries avec une surface ..... 13
I.2.1. Les interactions non spécifiques ..... 13
I.2.2. Interactions spécifiques ..... 16
I.3. Approche d'adhésion des bactéries sur une surface ..... 19
I.3.1. Approche classique DLVO de l'adhésion des bactéries sur une surface ..... 19
I.3.2. Approche thermodynamique de l'adhésion des cellules sur une surface ..... 21
I.3.3. Mécanisme d'adhésion et de prolifération des bactéries sur une surface ..... 22
I.4. Facteurs influençant l'adhésion de bactéries sur une surface ..... 24
I.4.1. Facteurs liés aux propriétés de la surface ..... 25
I.4.2. Facteurs liés aux conditions environnementales ..... 26
I.4.3. Facteurs liés aux propriétés des bactéries ..... 26
I.4.4. Le « surface sensing » ou la détection de la surface ..... 27
II. Modification de surfaces et intérêts biologiques ..... 28
II.1. Méthodes et approches de modification de surfaces ..... 29
II.2. Applications des films minces dans le domaine biomédical ..... 30
III. Le Chitosane : de la biomasse à l'utilisation biomédicale ..... 32
III.1. Origine et structure du chitosane ..... 32
III.2. Paramètres moléculaires du chitosane ..... 33
III.2.1. Le degré d'acétylation ..... 33
III.2.2. La masse molaire ..... 33
III.3. Propriétés du chitosane en solution ..... 34
III.3.1. Solubilité du chitosane ..... 34
III.3.2. Conformation du chitosane en solution ..... 35
III.4. Caractérisation des paramètres moléculaires du chitosane ..... 36
III.4.1. Le degré d'acétylation ..... 36
III.4.2. La masse molaire ..... 37

III.5. Propriétés biologiques du chitosane ..... 38
III.5.1. Propriétés bactériostatiques ..... 38
III.5.2. Propriétés anti-tumorales ..... 38
III.5.3. Propriétés de biocompatibilité ..... 39
III.6. Propriétés physicochimiques des films de chitosane ..... 39
III.6.1. Mouillabilité des films de chitosane ..... 39
III.6.2. Gonflement des films de chitosane ..... 40
III.6.3. Propriétés de cristallinité des films de chitosane ..... 41
III.7. Applications biomédicales de films minces de chitosane ..... 41
Conclusion ..... 43
Références bibliographiques: ..... 44

# I. Comprendre l'adhésion des bactéries sur une surface

L'adhésion des bactéries sur les surfaces est un phénomène naturel très complexe qui est étudié aujourd'hui dans plusieurs domaines pour des applications spécifiques notamment dans le biomédical (modification d'implant, ingénierie tissulaire, ophtalmologie,…).[1-5] Les conditions favorisant l'adhésion n'étant pas toujours bien maîtrisées, cette reprise du phénomène d'adhésion pour des applications biomédicales est souvent confrontée à des difficultés liées à l'adsorption des protéines sur la surface des biomatériaux et à des réponses inflammatoires.[6] Pour palier cela, des études sur la compréhension de ce phénomène d'adhésion des bactéries sur les surfaces ont longtemps été explorées aussi bien sur le plan théorique[7-10] que sur le plan expérimental.[11-13] Cependant, jusqu'à nos jours, ce sujet reste peu maîtrisé. Différents modèles basés sur des approches différentes ont vu le jour pour expliquer l'adhésion des bactéries sur une surface mais l'absence de structures possédant des propriétés similaires à celles des bactéries rendent souvent les modèles moins efficaces pour expliquer cette adhésion qui, outre les interactions (de Van der Waals, électrostatiques, acide-bases,…) et les forces browniennes[14-17], est favorisée par une sécrétion d'exopolysaccharides par les bactéries.[18-20] En effet, il est connu que l'adhésion des bactéries sur les surfaces fait intervenir différents types d'interactions. Parmi celles-ci, les interactions hydrophiles et hydrophobes sont les plus déterminantes dans le processus d'adhésion et restent mal comprises d'un point de vue théorique.[10, 21-25] A ces limites, on peut rajouter les difficultés liées à la prise en compte simultanée des multiples paramètres liés aux facteurs environnementaux, aux propriétés de surfaces et à celles des bactéries.

Dans ce premier chapitre bibliographique, nous rappelons d'abord, de manière succincte les composantes des bactéries susceptibles d'intervenir dans le processus d'adhésion. Les modèles de référence utilisés pour décrire les phénomènes d'adhésion des bactéries ainsi que les interactions sur lesquelles reposent ces modèles sont ensuite décrits. Il s'ensuit une description du mécanisme d'adhésion des bactéries et des paramètres liés à la surface, aux bactéries et au milieu environnant pouvant influencer l'adhésion. Enfin, pour terminer ce chapitre, quelques méthodes de modification de surface ainsi que leurs intérêts biomédicaux sont détaillés.

## I.1. Structure et anatomie des bactéries

L'adhésion des bactéries sur les surfaces vient généralement de la combinaison des contributions des différentes propriétés physicochimiques des différentes parties de celles-ci. En effet, de l'attraction à l'attachement des bactéries sur la surface, des propriétés spécifiques de certaines de leurs parties ou constituants sont sollicitées. Parmi ces constituants (**Figure 1**), on peut citer la capsule, la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique et les flagelles dont les structures sont décrites de manière succincte dans ce qui suit.

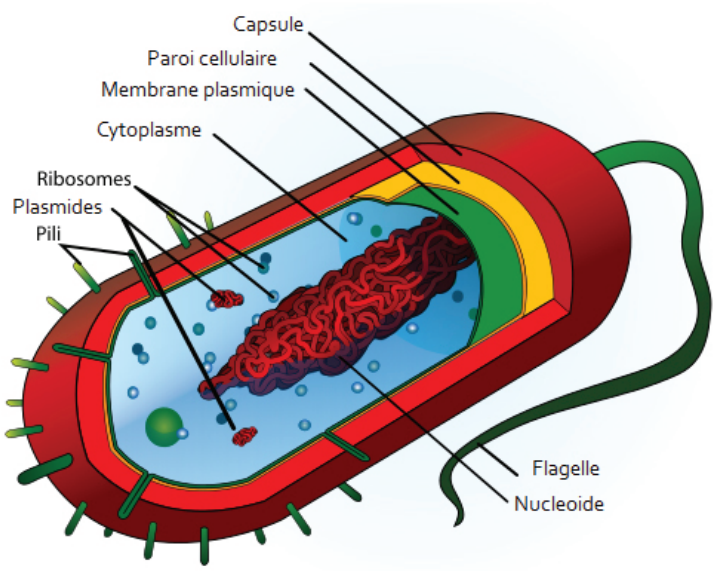



**Figure 1 : Représentation schématique des différentes composantes d'une bactérie.**

### I.1.1. La capsule

De nature gluante, la capsule constitue la couche externe des bactéries. Elle peut être de nature polysaccharidique comme chez la plupart des bactéries et quelques fois polypeptidique comme chez les *Bacillus anthracis*.[26] Dans le cas de certaines souches de bactéries *E. coli*, ce polysaccharide est l'acide colanique.[27] La capsule permet aux bactéries de se lier entre elles pour former les biofilms et d'adhérer aux surfaces. Cependant, au-delà de 30 °C, ce polysaccharide est faiblement synthétisé chez les bactéries *E. coli*. Cette capsule permet également de protéger les bactéries de l'assèchement et des agressions externes.[28]

### I.1.2. La paroi cellulaire

La paroi cellulaire est une paroi rigide située sous la capsule de la bactérie. Elle entoure la membrane cytoplasmique. La particularité de cette paroi est qu'elle est composée d'acides

aminés non protéiques qui diffèrent selon les espèces de bactéries. Elle est responsable de la forme de la bactérie et l'empêche de se déformer ou d'éclater en cas d'absorption d'eau. En effet, en absorbant de l'eau, la membrane plasmique est pressée contre la paroi cellulaire qui permet de limiter la quantité d'eau absorbée. La paroi cellulaire constitue également une barrière de perméabilité sélective qui bloque le passage d'éléments nuisibles (y compris les antibiotiques) à la survie des bactéries. La structure et la composition de la paroi cellulaire diffèrent fortement entre les bactéries à Gram négatif et celles à Gram positif (**Figure 2**).[26] Quelques exemples de bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont mentionnés dans le **Tableau 1.**

| Bactéries à Gram négatif | Bactéries à Gram positif |
|---|---|
| *Escherichia coli* | *Staphylococcus aureus* |
| *Klebsiella pneumoniae* | *Streptococcus pneumoniae* |
| *Pseudomonas aeruginosa* | *Listeria* |
| *Salmonella* | *Lactobacillus* |
| *Helicobacter pylori* | *Clostridium* |

**Tableau 1 : Quelques exemples de bactéries à Gram négatif et à Gram positif.**

#### I.1.2.1. Les Grams positifs

La paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est essentiellement recouverte de peptidoglycanes (40 à 80 % de la surface de la paroi). L'épaisseur de la paroi peut atteindre jusqu'à 300 nm.[26] Les peptidoglycanes sont constitués de chaînes linéaires hétéropolysaccharidiques pontées par des chaînes de peptides, formant une structure tridimensionnelle sur la surface de la paroi cellulaire (**Figure 2**).[26] La composition de la paroi cellulaire peut varier avec les conditions de croissance des bactéries et son renouvellement s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur. En effet, le peptidoglycane se forme d'abord sur la surface interne de la paroi puis migre vers l'extérieur pour remplacer l'ancienne couche.[26] Les parois de certaines bactéries contiennent également des lipides.[26]

#### I.1.2.2. Les Grams négatifs

La paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif peut être jusqu'à plus de 10 fois plus fine que celle des bactéries à Gram positif. Contrairement à la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif, la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est constituée de couches distinctes. Une membrane externe à la membrane cytoplasmique, et qui est formée de plusieurs couches

de peptidoglycanes (le gel périplasmique). Cependant, une étude suggère l'existence d'une seule couche de peptidoglycanes chez les bactéries *E. coli*.[29] Une deuxième couche externe à la paroi cellulaire qui est formée d'une bicouche lipidique constituée de phospholipides (couche lipidique interne) et de lipopolysaccharides (couche lipidique externe) (**Figure 2**). D'autres bactéries, telles que les cyanobactéries, sont considérées à Gram négatif, mais présentent également des caractéristiques de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif.[30]

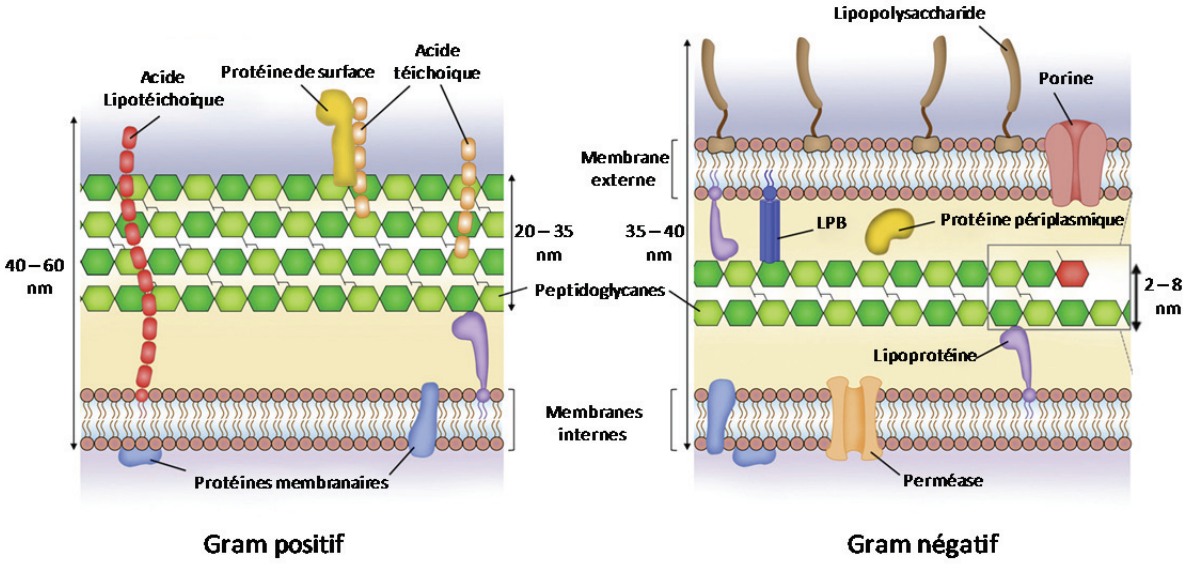



**Figure 2 : Différence entre les parois cellulaires des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.** [31]

### I.1.3. La membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique des bactéries est une membrane située à l'intérieur de la paroi cellulaire et qui entoure le cytoplasme. Elle est essentiellement constituée de phospholipides. Les types de phospholipides dans la membrane cytoplasmique dépendent de la nature des bactéries (Gram positif ou négatif). La membrane cytoplasmique des bactéries à Gram négatif est principalement constituée de phosphatidyléthanolamine. Alors que la plupart des membranes cytoplasmiques des bactéries à Gram positif contiennent un phospholipide (la phosphatidylcholine) qui est absent dans celles des bactéries à Gram négatif. L'organisation de la membrane cytoplasmique repose sur le caractère amphiphile des phospholipides qui la composent. Ces derniers sont constitués d'une tête hydrophile composée de glycérol et de phosphate et de deux queues hydrophobes constituées d'acides gras. Une des propriétés particulières de cette bicouche est son imperméabilité aux molécules chargées. Dans le cas des bactéries *E. coli*, cette membrane contient en proportion autant de phospholipides que de protéines, avec plus de 200 types protéiques différents. La charge globale négative de la plupart des bactéries provient de l'organisation de cette bicouche lipidique.

### I.1.4. Les flagelles

Les flagelles sont formés de filaments essentiellement protéiques constitués d'une seule sous unité de protéine appelée la flagelline. Ils possèdent un diamètre d'environ 20 nm.[32, 33] Les bactéries sont classées suivant le nombre et la position de leurs flagelles : monotriche (un seul flagelle polaire), lophotriche (une touffe de flagelles polaires) et péritriche (flagelles disposés partout sur la bactérie). Les bactéries dotées de flagelles se déplacent par le mouvement d'ondulations de leurs flagelles. Cependant, le sens du déplacement est directement lié au nombre et au sens de rotation des flagelles (**Figure 3**).[34] La direction de rotation des flagelles est contrôlée par des stimuli environnementaux (pH, température, certains sucres et acides aminés).[35, 36] Les flagelles jouent un rôle prépondérant dans le processus de chimio taxie. En effet, ce dernier doit être accompagné par une modulation de la direction ou de la vitesse de rotation des flagelles par le milieu environnant. La vitesse de rotation des flagelles peut atteindre jusqu'à 100.000 révolutions par minute dans un milieu, générant ainsi une vitesse de déplacement des bactéries d'environ 60 µm/s.[34] L'énergie à l'origine de la rotation des flagelles provient de la force protomotrice transmembranaire.

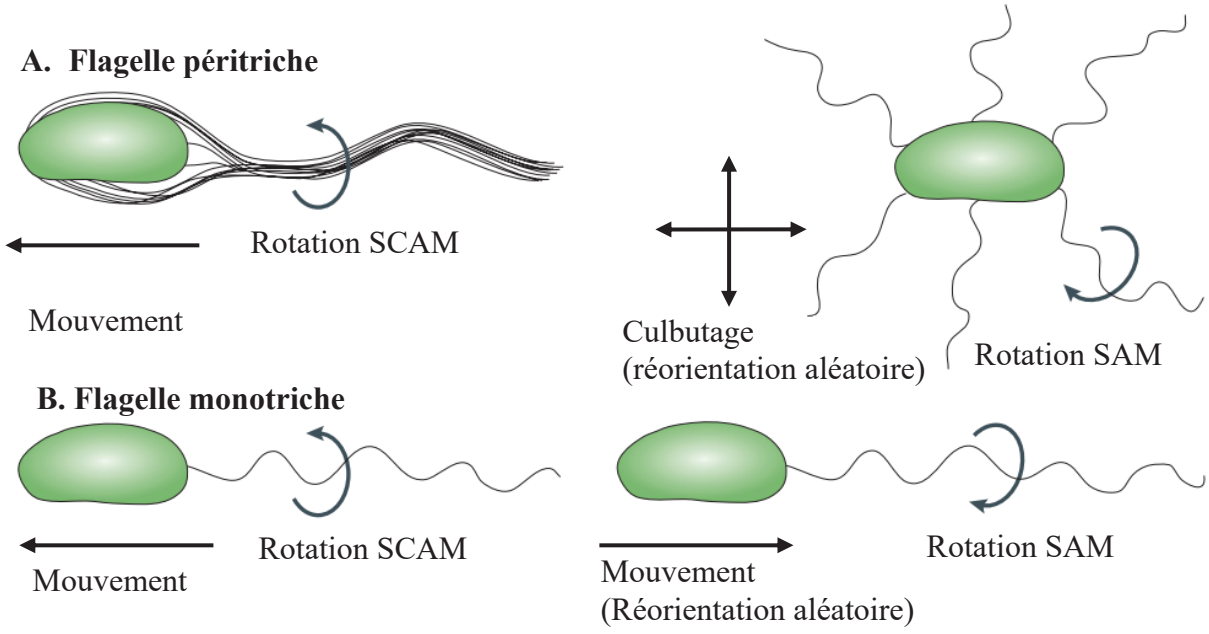



**Figure 3 : Influence des flagelles au mode de déplacement des bactéries dotées de flagelles. Le mode de déplacement des bactéries dépend du nombre de flagelles et leur sens de rotation. A : Dans le cas des bactéries péritriches comme les bactéries E. coli, la rotation des flagelles dans le sens contraire des aiguilles d'une montre (SCAM) résulte à une formation d'un faisceau de flagelle dont la rotation propulse les bactéries vers l'avant et dans une direction unique. Au contraire, la rotation des flagelles dans le sens des aiguilles d'une montre (SAM) entraîne une dispersion des flagelles dans tous les sens, permettant aux bactéries de se déplacer par culbutage et dans des directions aléatoires. B : Dans le cas des bactéries monotriche, la rotation du flagelle suivant le SCAM propulse la bactérie vers l'avant comme dans le cas des bactéries péritriches. Cependant, dans le cas de la rotation SAM du flagelle, la bactérie est propulsée vers l'arrière en se déplaçant en même temps de façon aléatoire. Schéma extrait de.[34]**

### I.1.5. Les pili

Les pili sont des appendices protéiques allongés ou capilliformes généralement présents à la surface des bactéries à Gram négatif. Ils sont plus fins et plus courts que les flagelles et se distinguent par leur taille et leur forme. Les pili sont généralement constitués d'une chaîne formée de piline complexée à l'adhésine. Les pili jouent un rôle important dans le processus de conjugaison chez les bactéries à Gram négatif. En effet, l'adhésine présente dans la structure des pili permet leurs interactions avec les récepteurs hydrocarbonés (glycolipides ou glycoprotéines) présents à la surface d'une autre cellule et facilite par conséquent l'attachement entre les bactéries au cours de la conjugaison. La conjugaison peut avoir lieu dans des conditions physiques différentes sous l'intervention de différents types de pili.[26]

## I.2. Interactions des bactéries avec une surface

L'adhésion des bactéries sur une surface nécessite diverses étapes qui font intervenir différents types d'interactions dont la nature est directement liée à la distance séparant la surface des bactéries. Ces interactions peuvent être classées en deux catégories : les interactions non spécifiques qui regroupent les interactions Van der Waals et électrostatiques (**Tableau 2**) et les interactions spécifiques qui regroupent les interactions hydrogènes, polaires, acide-base….[21]

### I.2.1. Les interactions non spécifiques

Les interactions non spécifiques sont généralement considérées à l'échelle macroscopique. Dans ces types d'interaction, les caractères chimiques des molécules sont négligés et celles-ci sont considérées comme des particules chargées qui agissent entre elles par des forces physiques (**Figure 4**). Ces interactions jouent un rôle important dans le processus d'adhésion des bactéries sur une surface. En effet, ce sont ces interactions, sous l'effet des forces browniennes, électrostatiques et de Van der Waals qui sont responsables du déplacement des bactéries vers la surface ou de leur rapprochement.

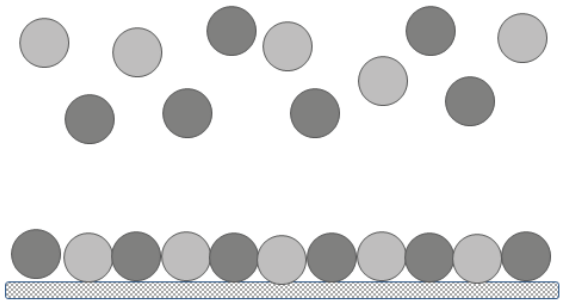


**Figure 4 : Schéma explicatif des interactions non spécifiques entre les particules chargées dans un milieu en interaction avec une surface chargée (boules gris sombre : chargées négativement, boules gris clair : chargées positivement).**

#### I.2.1.1. Les interactions de Van der Waals

Les interactions de Van der Waals sont générées par les forces de polarisation qui proviennent des interactions entre les dipôles des atomes et des molécules induites par les charges voisines et les dipôles permanents. Elles sont de courte portée et d'origine électrostatique. Les interactions de Van der Waals réunissent trois types d'interactions connues sous les noms d'interactions de Keesom, Debye et London.

##### ❖ Interactions de Keesom

Les interactions dites de Keesom proviennent des forces électrostatiques qui se développent entre deux dipôles permanents. En effet, le rapprochement des deux dipôles conduit à un changement d'orientation de ceux-ci sous l'effet des attractions entres les charges de signes opposés et les répulsions entre celles de même signe. La configuration résultant de ces changements d'orientation permet au système d'acquérir une énergie minimale.[37] Cette énergie minimale correspondant à un état liant est appelée interaction de Keesom (voir **Tableau 2**). Ces interactions de Keesom sont de courte portée et ne peuvent aboutir à une formation de liaison que si les molécules peuvent se rapprocher.[37]

##### ❖ Interactions de Debye

Les interactions de Debye sont issues de la mise en commun d'un dipôle permanent et d'une molécule non polaire. Dans cette situation, les charges du dipôle permanent induisent dans la molécule non polaire un moment dipolaire susceptible d'interagir de manière attractive avec le dipôle permanent pour créer une cohésion.[37] L'énergie permettant de garder la cohésion et la stabilité du système dipôle permanent-molécule est appelée énergie de Debye.[37, 38] Cette énergie est contrairement à l'énergie de Keesom indépendante de la température.

### ❖ Interactions de London

Les interactions dispersives de London viennent des interactions entre dipôles instantanés. L'existence de ces interactions passe par trois étapes : la création d'un dipôle instantané dans la molécule non polaire par une fluctuation très rapide de la densité électronique autour du noyau, la création par le dipôle instantané initial de dipôles induits instantanés dans les molécules voisines, l'interaction entre ces dipôles induits instantanés et le dipôle instantané d'origine. Cette dernière étape contribue à assurer la cohésion entre les molécules.[37, 38] Dans le cas des petites molécules, ces trois étapes ont lieu simultanément.[38]

Une manière générale de décrire complètement les interactions attractives et répulsives mises en jeu lors de processus d'adhésion des bactéries sur une surface est de considérer le potentiel de Lennard Jones – Van der Waals. Cette approche revient à représenter la somme des énergies répulsives et attractives en fonction de la distance de séparation *r* entre les particules (bactéries) et la surface. La sommation de ces énergies conduit à un potentiel de la forme : $V(r) = -\frac{C}{r^6} + \frac{B}{r^{12}}$ avec C et B des constantes des interactions attractives de Van der Waals et répulsives de Bohr respectivement. Ce potentiel met bien en évidence les interactions de répulsion en $1/r^{12}$ (courte distance) et d'attraction en $1/r^6$ (longue distance) (**Figure 5**).

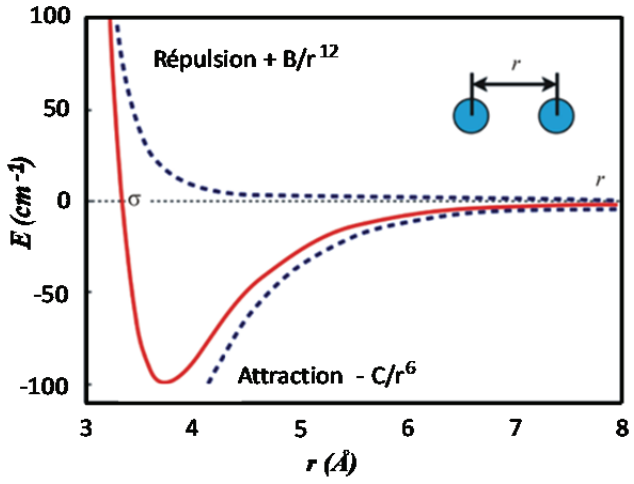



**Figure 5 : Courbe schématique du potentiel de Lennard-Jones permettant de décrire la contribution des interactions répulsives et de Van der Waals au potentiel total d'interaction. Image extraite de.[39]**

#### I.2.1.2. Interactions électrostatiques

Le changement chimique de la surface de la bactérie sous l'effet de conditions environnementales occasionne l'intervention de divers types d'interactions électrostatiques au cours du processus d'adhésion des bactéries. Ces interactions ont lieu entre des particules

chargées ou des particules possédant des moments dipolaires permanents ou induits constituant le milieu. Le processus menant à ces interactions se fait par action et réaction des particules concernées. En effet, sous l'influence d'une particule chargée, la distribution de charges des particules voisines subit une perturbation entraînant une polarisation de celles-ci. Cette perturbation des charges est accompagnée de la création d'un champ en réponse à la modification de leur distribution. Le champ ainsi créé s'exerce en retour sur la particule à l'origine de la perturbation.[38] L'intensité et l'énergie des interactions ainsi créées dépendent directement de la nature des particules mises en jeu : ions, dipôles permanents, dipôles induits,….[38]

### I.2.2. Interactions spécifiques

L'adhésion finale ou irréversible des bactéries sur une surface nécessite l'intervention d'interactions fortement localisées. Ces interactions désignées sous le nom « d'interactions spécifiques » prennent en compte des aspects purement chimiques des interactions (ioniques, polaires, acide-base,…).[21] Ces interactions parfois appelées interactions ligand-récepteur en biologie se font par affinité moléculaire (**Figure 6**).[40, 41] Les interactions spécifiques sont indispensables pour le bon fonctionnement des systèmes biologiques. En effet, la structure des cellules, leur organisation, leurs interactions, leurs réponses à un stimulus reposent sur celles-ci.[42-44]

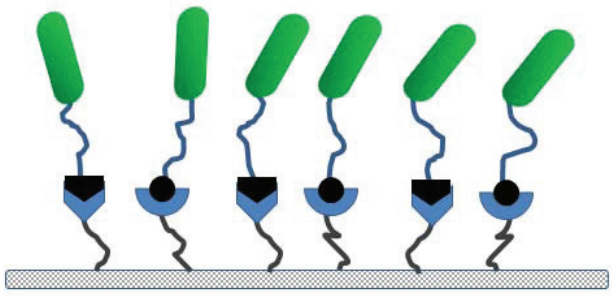


**Figure 6 : Schéma explicatif des interactions spécifiques (ou ligand-récepteur) entre les bactéries et une surface.**

#### I.2.2.1. Interactions hydrophobes et hydrophiles

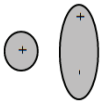
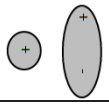
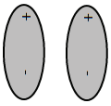
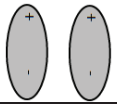
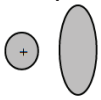
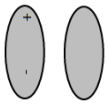
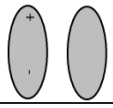
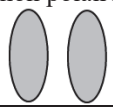
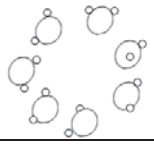
Le terme « interaction hydrophobe » fait référence aux interactions entre deux ou plusieurs molécules apolaires ou des fragments de molécules dans l'eau. Ces interactions sont considérées comme responsables en grande partie de la nature et de la fonction de plusieurs

protéines. Les interactions hydrophobes sont très complexes et leur compréhension nécessite la prise en compte de plusieurs interactions élémentaires : polaires, électrostatiques, dispersives, répulsives,… A ces interactions s'ajoutent les effets d'hydratation hydrophobe. Ce phénomène d'hydratation est lié à l'organisation des molécules d'eau sous forme d'enveloppe autour de composés hydrophobes dans le but de maximiser le nombre de leurs liaisons hydrogène. Après la formation des enveloppes autour des composés hydrophobes, de fortes interactions interviennent dans la micro-organisation dans l'eau menant à la coalescence des enveloppes et par conséquent à une agrégation des composés hydrophobes sous diverses formes : les interactions hydrophobes. Ces interactions dépendent de l'orientation des molécules d'eau dans la couche d'hydratation.[38]

Les interactions hydrophiles encore appelées forces d'hydratation sont des interactions de nature répulsive qui s'exercent entre des groupes hydrophiles de natures diverses : ions, surfaces ou molécules totalement soit partiellement hydrophiles (molécules amphiphiles). La non-dépendance des forces répulsives à la quantité d'électrolytes en solution prouve que ces interactions proviennent directement d'interactions provoquées par la structure du solvant autour de surface hydratée et non d'interactions électrostatiques.[38]

#### I.2.2.2. Liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène sont issues d'interactions faisant intervenir dans la plupart des cas les interactions de transfert de charges, de polarisation et de dispersion et répulsives. Ces liaisons impliquent systématiquement un ou plusieurs atomes d'hydrogène le plus souvent liés à des atomes très électronégatifs, le fluor, l'oxygène ou l'azote. En effet, ces atomes attirent l'électron de l'hydrogène faisant ainsi de celui-ci un atome chargé positivement et capable d'attirer les paires d'électrons non liants des atomes des molécules voisines. Les liaisons hydrogène peuvent se former soit à l'intérieur d'une molécule (liaisons hydrogène intramoléculaires) soit entre deux molécules (liaisons hydrogène intermoléculaires). Ces liaisons sont responsables en grande partie de la cohésion dans les polymères naturels et sont d'une grande importance dans tous les systèmes biologiques.[38]

| Origine | Intensité | Portée | Expression |
|---|---|---|---|
| *Répulsive* | Très intense | $\frac{1}{r^9}$ à $\frac{1}{r^{16}}$ (très courte) | $A\frac{e^{-r}}{\lambda}$ |
| *Coulombienne*<br>• Ion-ion | ~ 300 kT (Très intense) | $\frac{1}{r}$ (très longue) | $\frac{z_1 z_2 e^2}{4\pi\varepsilon_0 r}$ |
| • Ion-dipôle fixe  | ~ 100 kT (Intense) | $\frac{1}{r^2}$ (longue) | $\frac{ze\mu cos\theta}{4\pi\varepsilon_0 r^2}$ |
| • Ion-dipôle mobile  | ~ kT (Moyenne) | $\frac{1}{r^4}$ (moyenne) | $\frac{(ze)^2\mu^2}{6(4\pi\varepsilon_0)^2 kTr^4}$ |
| *Dipolaire*<br>• 2 dipôles fixes  | ~ kT (Moyenne) | $\frac{1}{r^3}$ (longue) | $\frac{\mu_1\mu_2}{4\pi\varepsilon_0 r^3}[2cos\theta_1 cos\theta_2 - sin\theta_1 sin\theta_2 cos\varphi]$ |
| • 2 dipôles mobiles  | < kT (Faible) | $\frac{1}{r^6}$ (courte) | *Keesom* $\frac{\mu_1^2\mu_2^2}{3(4\pi\varepsilon_0)^2 kTr^6}$ |
| *Polarisation*<br>• Ion-molécule non polaire  | ~ kT (Moyenne) | $\frac{1}{r^4}$ (moyenne) | $\frac{(ze)^2\alpha}{2(4\pi\varepsilon_0)^2 r^4}$ |
| • Dipôle fixe-molécule non polaire  | < kT (Faible) | $\frac{1}{r^6}$ (courte) | $\frac{\mu^2\alpha(1+3cos^2\theta)}{2(4\pi\varepsilon_0)^2 r^4}$ |
| • Dipôle mobile -molécule non polaire  | < kT (Faible) | $\frac{1}{r^6}$ (courte) | *Debye* $\frac{\mu^2\alpha}{(4\pi\varepsilon_0)^2 r^6}$ |
| *Dispersion*<br>• 2 molécules non polaires  | ~ kT (Moyenne) | $\frac{1}{r^6}$ (courte) | *London* $-\frac{3}{4}\frac{h\nu\alpha^2}{(4\pi\varepsilon_0)^2 r^6}$ |
| *Hydrophobe*  | Intense | $\frac{e^r}{\lambda}$ (longue) | Très complexe |

**<u>Tableau 2</u> : Tableau récapitulatif de la nature, de la portée, de l'intensité et des expressions des différentes interactions susceptibles d'intervenir lors du processus d'adhésion des bactéries sur les surfaces. Les expressions sont calculées en considérant le vide (ε=1).[38, 45]**

## I.3. Approche d'adhésion des bactéries sur une surface

L'adhésion des bactéries sur une surface est liée aux propriétés physicochimiques des bactéries et celles de la surface. Cependant, cette adhésion est expliquée par des approches différentes dont les plus connues sont celle dite DLVO (d'après Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) et thermodynamique. La première approche dite de DVLO basée sur la considération des propriétés des interactions électrostatiques entre les bactéries et la surface et la deuxième approche suggérée par Absolom est basée sur des considérations des propriétés thermodynamiques des cellules et de la surface.[7] Ces deux approches ne tenant pas compte des interactions apportées par les protéines entre elles dans le cas *in vivo*, ne sont valables que dans le cas *in vitro*.[46]

### I.3.1. Approche classique DLVO de l'adhésion des bactéries sur une surface

Cette approche classique décrit l'adhésion des cellules sur une surface par les interactions électrostatiques. En effet, les auteurs considèrent deux niveaux d'interaction entre les cellules et la surface.[21, 47, 48] Un premier niveau d'interaction qui fait intervenir les forces d'interaction de Van der Waals. Ces interactions ont lieu à des distances entre les cellules et la surface supérieures à 50 nm. En-deçà de cette valeur et tout près de la surface, de nouvelles forces d'interaction entrent en jeu. Ces interactions proviennent de la formation d'une double couche de charges entre les bactéries et la surface permettant de neutraliser les charges des cellules. Le rôle de cette double couche est de procurer aux cellules des charges de même nature que celles de la surface et générer ainsi des répulsions électrostatiques. La force générée par cette double couche dépend de la force ionique du milieu et des charges de la surface. L'apparition de cette force est liée à l'épaisseur de la double couche. Cependant, cette approche présente des limites car elle ne prend pas en compte les interactions à courte portée qui peuvent mettre en jeu des interactions spécifiques (ioniques, hydrogène, chimiques…) et certains paramètres tels que la constante de Hamaker qui permet l'évaluation des interactions de Van der Waals. Ainsi, cette approche est complétée par Busscher *et al.*[21] qui proposent dans leur étude une troisième zone d'interactions entre les bactéries et la surface (**Figure 7**). Selon les auteurs, cette zone se limite à une distance entre les bactéries et la surface inférieure à 1,5 nm et est le siège d'interactions spécifiques pouvant permettre l'adhésion.

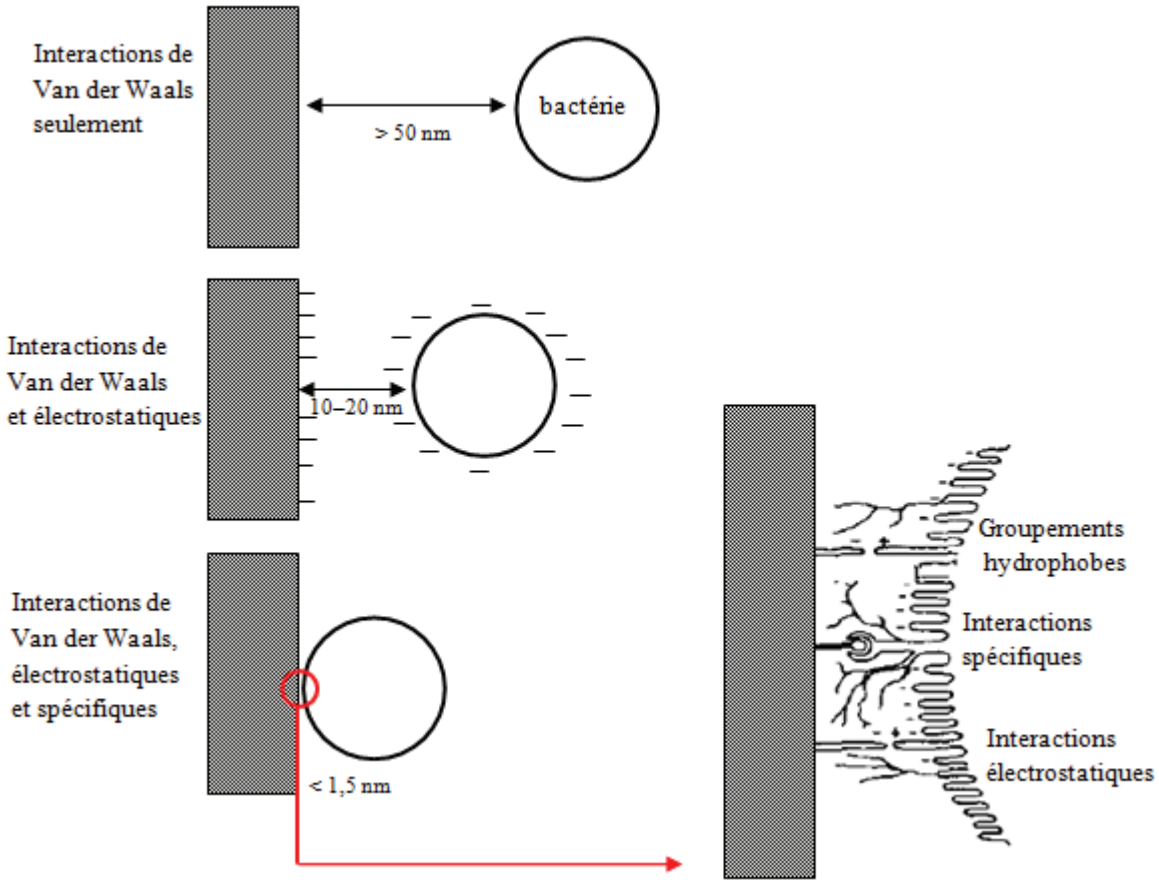



**Figure 7 : Schéma représentatif des trois zones d'interaction entre les bactéries et la surface durant le processus d'adhésion. Schéma extrait de.[21]**

- **Zone 1 : distance de séparation > 50 nm, dans cette zone, les interactions entre les bactéries et la surfaces sont de types Van der Waals et les propriétés des bactéries sollicitées sont celles non spécifiques et macroscopiques.**
- **Zone 2 : distance comprise entre 10 et 20 nm, dans cette intervalle, en plus les interactions Van der Waals, interviennent les interactions électrostatiques répulsives qui sont responsables de l'adhésion réversible des bactéries.**
- **Zone 3 : distance < 1 nm, dans cette zone interviennent les interactions spécifiques à courte distance qui mènent à l'adhésion irréversible des bactéries.**

Le contact des bactéries avec les surfaces requiert le franchissement de barrières énergétiques induites par les interactions bactéries-surfaces mises en jeu lors du processus d'adhésion. A l'approche des bactéries de la surface, ces barrières énergétiques deviennent plus importantes (**Figure 8**). En effet, à des distances mettant en jeu les interactions à longue portée (~ 10 nm), les bactéries se trouvent dans une position de minimum secondaire. A ce stade du processus d'adhésion, une faible énergie peut causer un détachement des bactéries de la surface. A des distances de séparation plus petites (< 2 nm), les interactions à courte portée interviennent dans le processus d'adhésion. A ce niveau, un franchissement d'une barrière énergétique par les bactéries est requis pour atteindre le minimum primaire et établir des interactions acide-

base ou hydrogène avec la surface. Le franchissement de la barrière énergétique nécessite une dépense élevée d'énergie presque impossible à atteindre à cause des répulsions électrostatiques. Ainsi pour surmonter cet obstacle, des réorganisations de la surface des bactéries (avec l'apparition de protubérances) sont nécessaires pour permettre des contacts directs avec la surface et faciliter le franchissement de la barrière énergétique.[21] Le niveau de la barrière énergétique dépend de l'énergie de surface du substrat : il est élevé pour les substrats de faible énergie de surface et très petit voire absent pour les substrats de haute énergie de surface.[49]

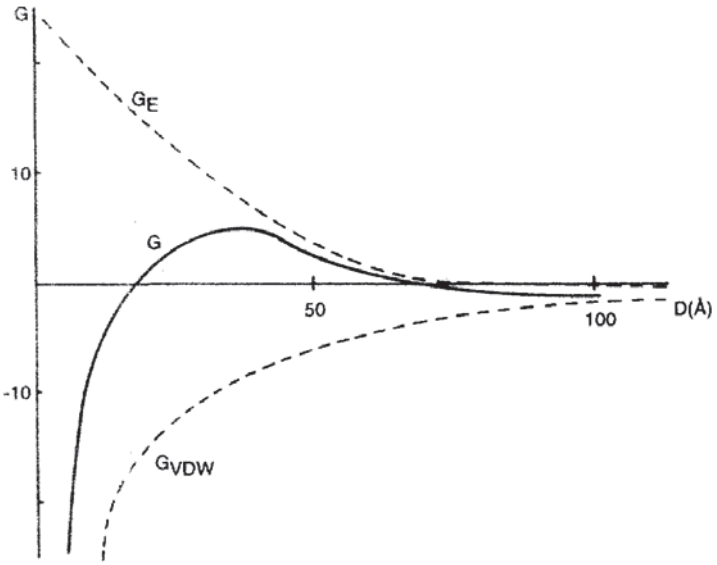



**Figure 8 : Energie d'interaction entre une bactérie et une surface en fonction de la distance d'approche. En pointillé, l'énergie attractive de Van der Waals (en bas) et l'énergie de répulsion des interactions électrostatiques (en haut). En ligne continue, l'énergie totale d'interaction.**

### I.3.2. Approche thermodynamique de l'adhésion des cellules sur une surface

L'adhésion thermodynamique des bactéries en suspension dans un liquide sur une surface peut-être décrite par la relation thermodynamique de Young-Dupré (**Équation I**). Dans ces conditions, l'adhésion des bactéries est gouvernée par le changement de l'énergie libre de Gibbs qui dépend des tensions de surface entre les bactéries, la surface et le milieu de culture. En effet, l'adhésion est énergétiquement favorisée si l'énergie libre de Gibbs est négative (**Figure 9**).

$$\Delta F_{adh} = \gamma_{sb} - \gamma_{lb} - \gamma_{sl} \qquad \textbf{Équation I}$$

Avec $\gamma_{sb}$, $\gamma_{lb}$ et $\gamma_{sl}$ les tensions de surface surface-bactérie, liquide-bactérie et surface-liquide.

De cette approche, il ressort que les bactéries adhèrent préférentiellement sur des surfaces hydrophiles (énergies de surface élevées) si leur énergie de surface est supérieure à celle du milieu de culture et sur des surfaces hydrophobes (basses énergies de surface) si l'énergie de surface des bactéries est inférieure à celle du milieu de culture. L'utilisation de l'équation de Young-Dupré pour décrire l'adhésion des bactéries est basée sur une adhésion réversible ce qui n'est pas toujours le cas.[50] Dans le cas de l'adhésion des bactéries sans la formation d'une interface franche bactérie-surface, cette approche devient inefficace pour décrire l'adhésion.[10] En plus de ces deux désavantages, ce modèle considère l'adhésion à un état d'équilibre donné, ce qui ne permet pas de rendre compte de la cinétique d'adhésion des bactéries.[50] L'utilisation de cette approche menant parfois à des interprétations contradictoires des résultats d'adhésion des bactéries de souches différentes sur les surfaces, Pratt-Terpstra *et al.*[51] suggèrent l'introduction de paramètres empiriques liées aux propriétés de surfaces des souches de bactéries pour corriger et universaliser cette approche d'adhésion.

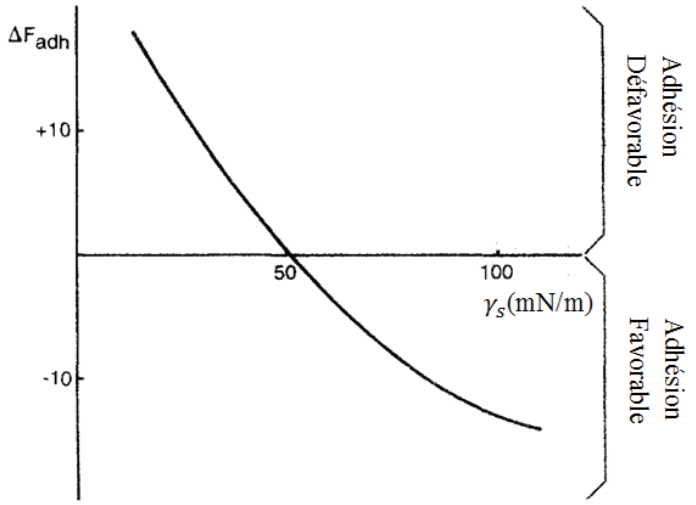
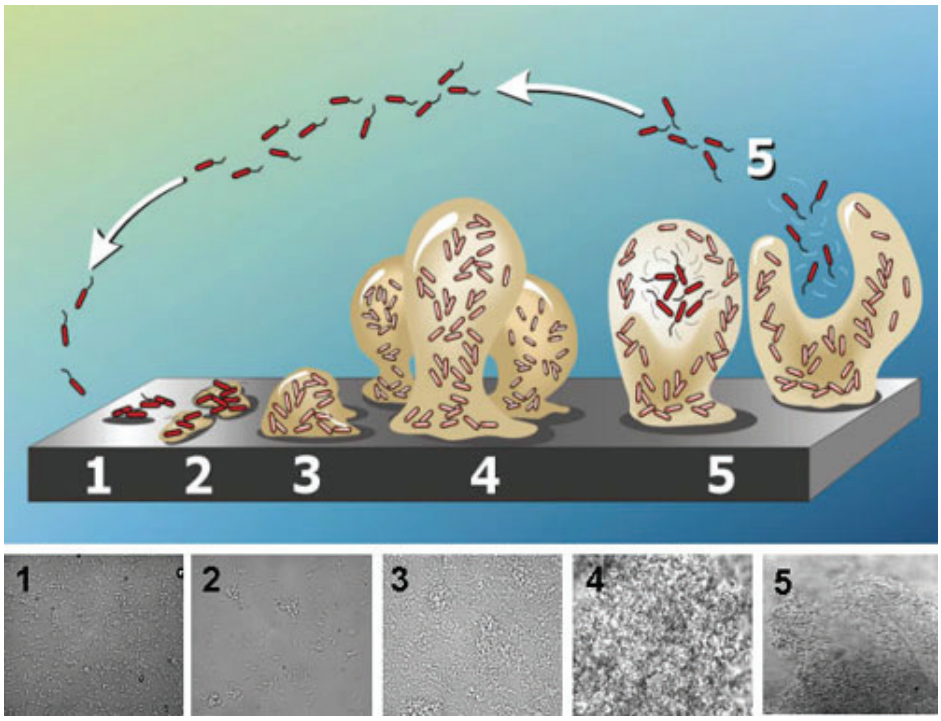



**Figure 9 : Energie interfaciale d'adhésion en fonction de la tension de surface du substrat. A faible tension de surface, une énergie est nécessaire pour l'adhésion des bactéries tandis qu'à tension de surface élevée, cette énergie est déjà disponible pour l'adhésion.**

### I.3.3. Mécanisme d'adhésion et de prolifération des bactéries sur une surface

L'adhésion des bactéries sur une surface est le plus souvent suivie d'une division continue des bactéries et d'une sécrétion de matrice extracellulaire par celles-ci. Cette matrice extracellulaire assure le lien entre les bactéries et garantit leur assemblage. Cet assemblage des bactéries liées à une surface par la matrice extracellulaire est appelé biofilm.

La formation de biofilm sur une surface passe par plusieurs étapes (**Figure 10**). Dans la première étape, les bactéries s'attachent de manière individuelle à la surface. Cet attachement est gouverné par divers processus. D'abord, un film conditionnant constitué d'ions et de protéines présents dans le milieu se forme à la surface du substrat.[52, 53] Les bactéries sous l'effet de forces physiques (interactions électrostatiques, de Van der Waals, gravitationnelles,…)[54-56] ou chimiques (chimiotaxie ou haptotaxie)[57] sont attirées par le film conditionnant. Les effets chimiques sont souvent attribués aux aminoacides, aux glucides et aux oligopeptides. En contact avec la surface, les bactéries s'adsorbent d'abord de manière réversible sur le film conditionnant. L'adsorption des bactéries sur le film conditionnant intervient très rapidement (dans l'ordre d'une minute) et est fortement influencée par les interactions hydrodynamiques et électrostatiques.[58, 59] Cette adsorption est suivie d'une adhésion irréversible occasionnée par la sécrétion de substances exo-polymériques sur leur surface. Ces substances, souvent considérées comme des adhésines sécrétées soit par les fimbriae soit par la surface des bactéries, sont responsables de l'adhésion des bactéries sur les surfaces biotiques et abiotiques.[60-63] Contrairement à l'adhésion initiale, l'adhésion irréversible des bactéries sur une surface est un processus lent qui peut se dérouler sur plusieurs heures.[64] Suite à leur attachement, elles commencent à subir une transformation de leur phénotype. Cette transformation est accompagnée de la sécrétion d'une matrice extracellulaire (étape 2). La nature de cette matrice (neutre, polyanionique ou polycationique) dépend fortement de la nature des bactéries (Gram positif ou négatif).[18, 65] La quantité sécrétée et la composition de la matrice varient également avec la souche, l'âge des bactéries et les conditions environnementales dans lesquelles se forme le biofilm.[66] La matrice extracellulaire peut constituer jusqu'à 90 % de la matière organique contenue dans le biofilm.[18, 67] Elle a pour rôle de créer un lien entre les bactéries à travers les intégrines, de les alerter des dangers provenant de l'extérieur et de leur apporter les éléments nutritifs nécessaires à leur croissance (étape 3). En plus de la matrice extracellulaire, le lien entre les bactéries est favorisé par les interactions entre les pili. Les micro-colonies formées par les bactéries continuent à croître et fusionnent entre elles après leurs contacts pour donner un biofilm mature à la surface (étape 4). Pour un confort dans leur processus de métabolisme, d'autres bactéries peuvent se détacher de la macro-colonie pour coloniser d'autres parties de la surface (étape 5). Les composantes de la surface des bactéries *E. coli* impliquées à chaque étape de la prolifération des bactéries sont résumées dans le **Tableau 3**.[68]




1. Attachement des bactéries à la surface
2. Attachement irréversible des bactéries
3. Première phase de maturation – formation des micro-colonies
4. Deuxième phase de maturation – fusion des micro-colonies entre elles
5. Dispersion des bactéries planctoniques.

**Figure 10 : Mécanisme de prolifération des bactéries attachées à une surface.**

| | |
|---|---|
| 1. Attachement des bactéries | Flagelle et motilité |
| 2. Attachement irréversible | Fimbrae type 1, curli, β-1,6-N-acetyl-D-glucosamine |
| 3. Formation des micro-colonies | Motilité, curli, antigène 43, acide colanique, β-1,6-N-acetyl-D-glucosamine (EPS) |
| 4. Fusion des micro-colonies | Acide colanique (EPS), curli, pili conjugués |
| 5. Dispersion | Flagelle et motilité |

**Tableau 3 : Déterminants de la surface impliqués dans la prolifération des bactéries *E. coli***

## I.4. Facteurs influençant l'adhésion de bactéries sur une surface

La compréhension du phénomène d'adhésion des bactéries sur une surface nécessite la prise en compte des propriétés physicochimiques de la surface, des bactéries et du milieu de culture. En effet, les propriétés physicochimiques de ces trois entités étant diverses et variées, l'adhésion des bactéries doit résulter d'une très forte affinité entre ces trois entités. Ainsi les

paramètres physicochimiques de chaque entité susceptibles d'agir sur l'adhésion des bactéries sont présentés sur la **Figure 11**.

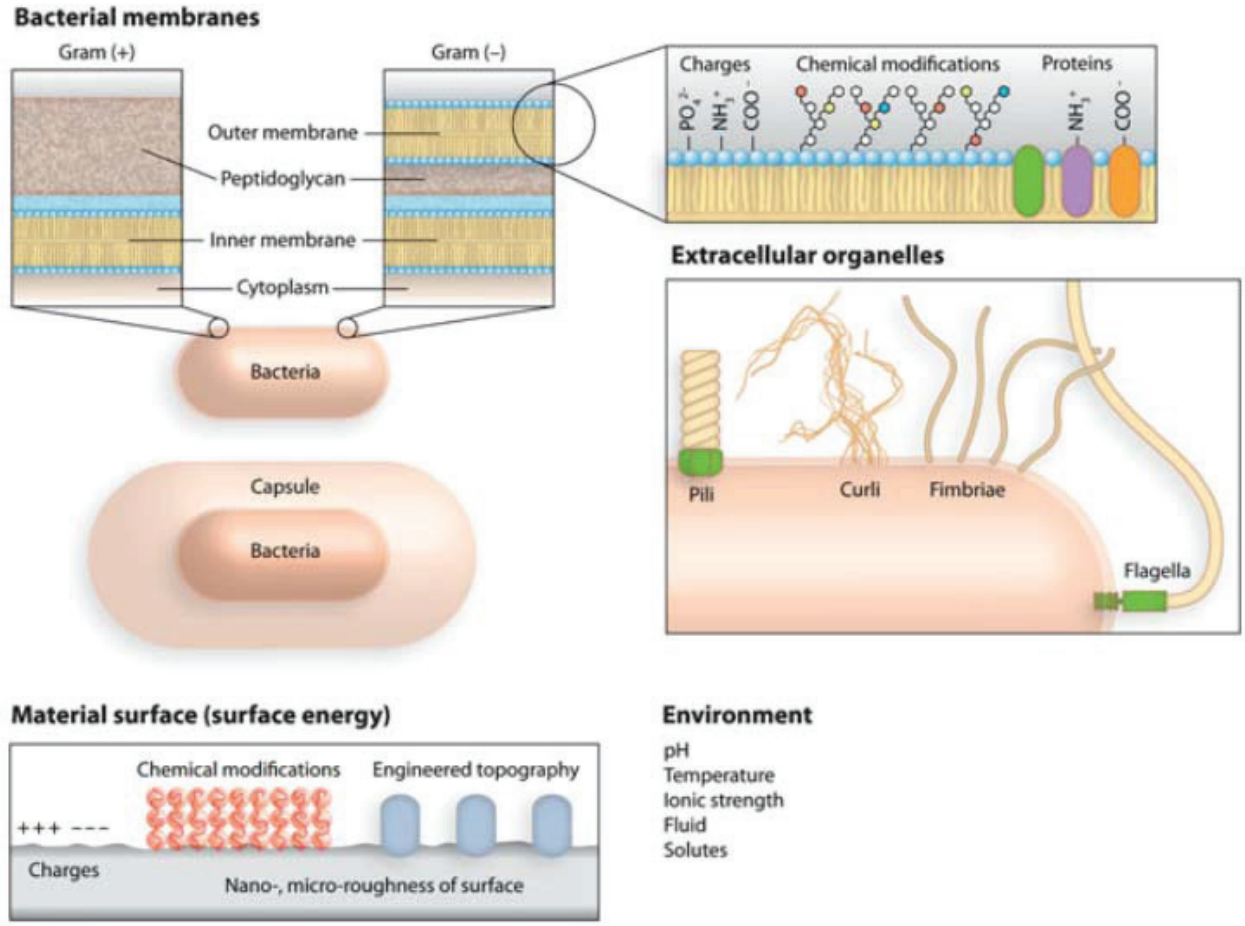



**Figure 11 : Paramètres physicochimiques des bactéries, de la surface et du milieu de culture susceptibles d'agir sur l'adhésion des bactéries sur une surface. Schéma extrait de.[69]**

### I.4.1. Facteurs liés aux propriétés de la surface

L'adhésion des bactéries sur une surface est fortement influencée par les propriétés de la surface. En effet, des études ont montré qu'en raison de la différence des propriétés chimiques et de mouillabilité de la surface, une bactérie peut ou non y adhérer. La rugosité de la surface joue un rôle primordial dans le processus d'adhésion des bactéries. La présence de rugosité à la surface favorise l'adhésion des bactéries. En effet, les aspérités constituent des sites d'accrochage pour les bactéries et les protègent des écoulements hydrodynamiques du milieu de culture et d'autres facteurs exogènes qui pourraient les empêcher de s'accrocher à la surface.[70] Le caractère électrostatique de la surface apporte une contribution non négligeable dans le processus d'adhésion. Les bactéries étant pour la plupart chargées, une corrélation entre leurs charges et celles de la surface favoriserait fortement l'adhésion. Sur une étude de

l'adhésion des bactéries sur des surfaces chargées de même caractère hydrophile/hydrophobe, Gottenbos *et al.*[71] ont montré que l'adhésion était plutôt favorable si les surfaces sont chargées positivement. L'énergie de surface, liée indirectement aux propriétés chimiques et de rugosité de la surface influence fortement l'adhésion des bactéries. Généralement, les surfaces hydrophiles sont moins favorables à l'adhésion des bactéries.[72-74] Des études suggèrent des propriétés de mouillabilité intermédiaires pour avoir une bonne adhésion des bactéries.[75-77]

### I.4.2. Facteurs liés aux conditions environnementales

La croissance et le métabolisme des bactéries sont fortement liés aux conditions environnementales (pH, température, la force ionique du milieu, …).[78] Ainsi toute variation de ces conditions modifiera l'adhésion des bactéries sur la surface. Certaines bactéries voient leur taux d'adhésion varier sous l'effet de la température. Cela est en lien avec l'existence pour chaque souche de bactéries d'une température optimale associée à la production de nutriments, d'enzymes,… et à la présence de certains appendices à leur surface.[79-81] Le changement du pH du milieu qui peut affecter l'état de charge de la surface et des bactéries constitue un facteur clé pour l'adhésion des bactéries. Dans le cas spécifique des surfaces métalliques ou d'oxydes métalliques, ce changement peut affecter fortement l'état d'oxydation. Une étude menée par Fletcher *et al.*[82] sur l'effet du pH sur l'adhésion de *pseudomonas fluorescens* sur des substrats de verre a montré une augmentation de leur adhésion avec la diminution du pH. La force ionique du milieu influence les interactions entre la surface et les bactéries. Cette influence conditionne l'adhésion des bactéries sur la surface. Ainsi, selon la nature des sels, cette force ionique peut impacter positivement ou négativement l'adhésion des bactéries.[83-85] Selon les régimes d'écoulement hydrodynamique du milieu, l'adhésion des bactéries peut s'avérer difficile. En effet, en régime laminaire, l'adhésion des bactéries va dépendre de leur faculté à traverser la couche limite qui se forme à l'interface solide/liquide tandis qu'en régime turbulent, l'adhésion des bactéries repose sur le temps d'interaction entre les bactéries et la surface qui est très court à cause des tourbillonnements. D'autres études ont montré que la sécrétion des macromolécules pouvant faciliter l'adhésion des bactéries dépend aussi des conditions hydrodynamiques du milieu.[86, 87]

### I.4.3. Facteurs liés aux propriétés des bactéries

Les propriétés physicochimiques des bactéries sont directement liées à l'espèce, la souche et l'âge de la bactérie.[88] En effet, leurs propriétés physicochimiques relèvent des propriétés chimiques des macromolécules constituant leurs membranes externes. L'adhésion des

bactéries est fortement dépendante des propriétés physicochimiques de surface de la bactérie. Pour une bactérie donnée, les paramètres physicochimiques susceptibles d'influencer son adhésion sont ses propriétés de mouillabilité, d'interactions électrostatiques et spécifiques, sa forme, sa capacité à s'étaler… Les caractères hydrophiles et hydrophobes des bactéries impactent fortement leur adhésion sur une surface. En effet, des études[72, 74, 89] ont montré que les bactéries hydrophobes ont une tendance préférentielle à adhérer sur des surfaces hydrophobes et les bactéries hydrophiles sur des surfaces hydrophiles. Des études[72, 74, 90] ont prouvé que la diminution de l'hydrophobicité des bactéries entraînerait une diminution de l'adhésion des bactéries. Katsikogianni *et al.* ont étudié la prépondérance des propriétés hydrophobes de la surface et des bactéries sur leur adhésion. Ces derniers concluent dans leur étude que l'hydrophobicité de la surface jouerait le rôle le plus important dans le processus d'adhésion.[91] La charge de surface des bactéries contribue également à l'adhésion bactérienne sur une surface. Cette charge provient de l'état d'ionisation des macromolécules constituant la surface des bactéries et dépend des propriétés du milieu de culture : pH, force ionique,….[92-94] Les bactéries présentent souvent une charge surfacique négative;[71, 91, 92] plus celle-ci est élevée, plus les bactéries sont hydrophiles.[95] Ainsi, toute augmentation de cette charge entraîne une diminution de l'adhésion. Les macromolécules constituant la surface des bactéries peuvent faciliter leur adhésion sur les surfaces. Cependant, leur synthèse peut dépendre de l'état physiologique des bactéries et des conditions du milieu. La forme et la présence ou non de flagelles à la surface des bactéries apportent une contribution importante dans leur processus d'adhésion sur les surfaces.[96-98] En effet, sous l'effet du pH du milieu et de certains de ses constituants, les bactéries peuvent acquérir un caractère de chimio-taxie positif ou négatif leur permettant de se déplacer dans une direction privilégiée augmentant ainsi leur probabilité de trouver la surface.

### I.4.4. Le « surface sensing » ou la détection de la surface

Certaines bactéries possèdent la faculté en se déplaçant dans le milieu de culture de détecter la surface et de diriger leur mouvement vers celle-ci : la chimiotaxie. Cette détection de la surface est guidée par la variation de concentration du milieu de culture près de la surface due aux ions ou petites molécules que la surface libère dans le milieu. Ces ions ayant servi de guide pour les bactéries, ils sont piégés entre elles et la surface (**Figure 12**). Ce piégeage d'ions induit, dans le cas de l'adhésion des bactéries *E. coli,* une diminution du pH et de l'osmolarité du milieu de culture près de la surface.[99] La diminution de ces deux paramètres affecte directement les propriétés bioénergétiques et de transcription des bactéries et peut

permettre une corrélation liée au pH à l'adhésion bactérienne.[100] En plus de ces phénomènes, le contact des bactéries avec la surface induit des contraintes physiques qui peuvent entrainer une inhibition de la rotation de leurs flagelles.[101-103] En bref, la détection de la surface par les bactéries entraîne une série de changements, le plus souvent morphologiques, qui facilitent leur adhésion.

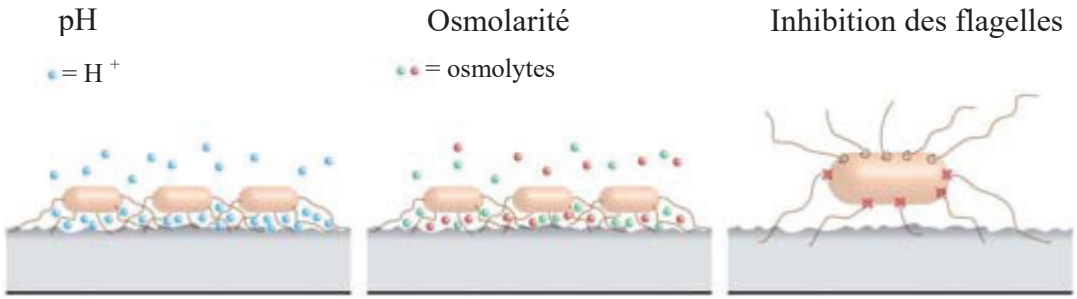



**Figure 12 : Effet du rapprochement de la bactérie avec la surface sur le pH, l'osmolarité du milieu et sur la rotation des flagelles. Schéma extrait de.[69]**

## II. Modification de surfaces et intérêts biologiques

Les matériaux bruts ne possédant pas nécessairement toutes les propriétés requises pour certaines applications de surface, la modification de l'extrême surface permet de combiner en un seul matériau toutes les propriétés nécessaires à une application. L'utilisation de cette technique dans divers secteurs pour adapter les matériaux à leurs utilisations croît de manière continue. Dans le secteur biomédical qui requiert des matériaux dont les propriétés de masse et de surface sont censées répondre aux normes conventionnelles, la modification de surface sert d'outil pour rendre les surfaces des biomatériaux biocompatibles et leur apporter une activité physiologique. Etant donné que les surfaces des biomatériaux constituent les premières zones de contact entre ceux-ci et le vivant, la maîtrise de ces propriétés de surface permet d'éviter les interactions non spécifiques entre les cellules et les biomatériaux et par conséquent assurer leur intégration.[104-107] Cette technique permet, par la modification des paramètres physicochimiques des surfaces (mouillabilité, charges de surface, rugosités, structures,…), d'accéder à des matériaux qui peuvent présenter des caractéristiques telles que : la résistance à l'usure et à la corrosion, la résistance mécanique, la biocompatibilité, la conductivité électrique… Plusieurs méthodes de modification de surface sont disponibles pour modifier les propriétés d'une surface (plasma,[108] traitement laser,[109] revêtement,[110] greffage de polymères ou de nanoparticules,[111]…). Cependant, celles-ci présentent des

avantages différents vis-à-vis de certains domaines biomédicaux (ingénierie tissulaire, libération de médicaments, orthopédie,…).

## II.1. Méthodes et approches de modification de surfaces

La modification de surface doit nécessairement se faire par des revêtements de couches ultra-minces qui ne vont concerner que les propriétés de surface des matériaux. Contrairement aux revêtements épais, les films ultra-minces présentent souvent une bonne adhésion et n'affectent pas les propriétés de masse des matériaux. Les différentes approches permettant d'améliorer les fonctionnalités des surfaces des matériaux peuvent être réparties en deux catégories : une première catégorie qui permet la modification chimique ou physique de la surface par altération des atomes ou molécules de la surface du matériau initial et une deuxième catégorie qui nécessite un nouveau revêtement élaboré par voie physique ou chimique pour apporter une nouvelle composition chimique à la surface. Le choix de la méthode de modification de la surface des biomatériaux peut s'avérer très important pour leur durabilité et leur efficacité. Par exemple, dans la conception de cathéters, l'utilisation de revêtements d'hydrogels physiques est privilégiée du fait de leur caractère glissant tandis que pour des applications dans des zones du corps de forte humidité, la modification par greffage chimique de la surface des biomatériaux est préférée car elle permet d'éviter la délamination des revêtements.

### II.1.1. Modification des aspects topologiques de la surface

Cette approche de modification de la surface des biomatériaux est largement utilisée dans le domaine biomédical. Elle permet d'apporter des modifications topologiques de la surface des biomatériaux sans altérer leurs propriétés chimiques.[112] La modification de la topologie des surfaces peut se faire de manière régulière ou irrégulière. Cette approche peut être utilisée seule ou combinée à d'autres approches pour améliorer les propriétés de surfaces. L'introduction de rugosités à la surface des biomatériaux augmente l'aire de contact entre ceux-ci et le vivant et permet de favoriser leurs interactions.[113-116] Des études ont montré que l'introduction de rugosités à la surface modifie fortement les propriétés hydrophiles de la surface des biomatériaux et par conséquent améliore l'attachement des bactéries sur ceux-ci.[117, 118] La création d'une structure régulière à la surface des biomatériaux peut diminuer les interactions non spécifiques entre les biomatériaux et les protéines qui sont souvent responsables du mauvais fonctionnement des biomatériaux.[119] Ces nano structurations de la surface des biomatériaux sont utilisées, par exemple, pour améliorer l'attachement des cellules endothéliales qui interviennent dans la régénération des parois des vaisseaux sanguins

et aident à limiter les risques de thrombose.[120, 121] La création de nano-piliers dans les biomatériaux poreux permet une prolifération des bactéries et sert dans la libération de médicaments.[122]

### II.1.2. Modification des aspects chimiques de la surface

La modification chimique permet de modifier chimiquement les propriétés des surfaces des biomatériaux sans affecter significativement les propriétés de masse. Cette approche réunit les techniques telles que le dépôt chimique par voie vapeur, le dépôt physique par voie vapeur, les techniques de greffage chimique, les revêtements par des films minces,….[120, 123] Le niveau de modification de la surface des biomatériaux peut être différent dans cette approche. En effet, certaines techniques nécessitent la formation de liaisons chimiques et d'autres un dépôt par voie physique. Le traitement des surfaces par plasma offre diverses possibilités pour façonner la surface des biomatériaux. Il a été montré que la modification de surface par dopage par plasma pulsé (PIII) induit une augmentation du caractère hydrophile de la surface des biomatériaux, améliore l'adhésion des protéines et réduit les risques de formation de thrombus et d'agrégation des thrombocytes.[124] Le traitement des biomatériaux par plasma ammoniacal promeut l'adhésion de cellules endothéliales.[116, 125] Dans leur étude, Lee *et al.*[126, 127] ont démontré que le traitement des surfaces par plasma de vapeur d'eau entraîne une génération de groupes hydroxyle à la surface des biomatériaux et par conséquent une amélioration de l'attachement des bactéries. La modification des surfaces par des monocouches auto-assemblées (notées SAM pour self-assembled monolayers), présente l'avantage d'avoir des couches ordonnées et une orientation contrôlée des chaînes constituant les couches. Ces particularités des SAM offrent le choix d'exposer des groupes ou fonctions requises permettant de répondre à des besoins spécifiques.[128]

## II.2. Applications des films minces dans le domaine biomédical

Les propriétés biologiques (biocompatibilité, biodégradabilité), physicochimiques (mouillabilité, énergie de surface, rugosité, porosité) et mécaniques (élasticité, résistance à la corrosion, résistance à l'usure) des films minces leur permettent d'occuper une place importante dans la conception et les applications des biomatériaux. En effet, les problèmes les plus délicats couramment rencontrés dans le domaine biomédical proviennent des failles des propriétés de surface des biomatériaux (fibrose, coagulation sanguine, réponses inflammatoires,…).[129, 130] Pour contourner ces problèmes, il apparaît nécessaire de recourir au traitement de surface afin de bien contrôler les propriétés de surface des biomatériaux pour

des besoins spécifiques. Ainsi, le traitement de surface est largement utilisé dans différents domaines biomédicaux. Dans l'orthopédie, le traitement de surface permet d'éviter les infections bactériennes et d'assurer l'ostéo-intégration. Dans la fabrication d'implants (cardiaques, neuronaux, cochléaires,…), l'utilisation de revêtements biodégradables et biocompatibles est indispensable pour leur bonne intégration. Les films ultra minces peuvent servir de moyen pour éviter les risques d'infections post-implantation, améliorer la biodisponibilité des médicaments, réduire la dose thérapeutique, ou faciliter la vectorisation des médicaments.[131, 132] Le traitement de la surface des micro-aiguilles s'avère être très efficace pour une libération effective et moins invasive des médicaments.[133] Dans l'ingénierie tissulaire, la modification de surface peut permettre une meilleure différentiation des ostéoblastes, une meilleure minéralisation et une bonne ostéoconductivité. En effet, Mathews *et al.*[134] ont montré dans leur étude que le revêtement des surfaces des implants par un tri polymère (Chitosane-Collagène1-Acide hyaluronique), permettra d'avoir de bonnes propriétés d'ostéoconductivité et d'ostéointégration. L'importance accordée aux biocapteurs dans l'industrie biomédicale revient aujourd'hui aux techniques de traitement de surface. En effet, l'utilisation de cette technique dans la fabrication des biocapteurs a permis une grande avancée dans plusieurs études : le traitement local d'inflammation,[135] la détermination d'antibiotiques,[136] le diagnostic et la thérapie des maladies liées aux os,[137] la détection de certaines maladies virales aiguës,[138] ….

Les réponses biologiques (adhésion, interaction et croissance) des bactéries sur une surface relèvent fortement d'une synergie entre les propriétés chimiques et physicochimiques de celles des bactéries et de la surface, et peuvent changer d'un polymère à un autre. Ainsi, dans cette étude de caractérisations physicochimiques et biologiques des films minces supportés, nous avons choisi d'utiliser un polysaccharide issu de la biomasse : le chitosane. Le chitosane a l'avantage de posséder une structure chimique modulable et proche de celles de certains exopolysaccharides sécrétés par certaines bactéries lors de leur processus d'adhésion sur une surface. Pour mieux pouvoir comprendre les réponses biologiques des films de chitosane, il est nécessaire de prendre connaissance de ses propriétés moléculaires et physicochimiques ainsi que du lien qui existe entre elles. Dans ce but, nous allons présenter les propriétés moléculaires, physicochimiques, biologiques des films à base de chitosane ainsi que leurs applications dans le domaine biomédical.

# III. Le Chitosane : de la biomasse à l'utilisation biomédicale

## III.1. Origine et structure du chitosane

La chitine a été découverte pour la première fois en 1811 sous le nom de « fungina » chez des champignons par le chimiste français Henri Braconnot.[139] En 1823, sur des études de cuticules de coléoptères, Auguste Odier découvre un polymère de même nature qu'il nomma chitine qui est l'appellation utilisée aujourd'hui. Cependant, la découverte du chitosane en tant que tel est datée de 1859 avec les travaux de Charles Rouget. Cette découverte est survenue par observation d'un produit soluble lors du traitement de la chitine par de la potasse à température élevée. Il faudra attendre les travaux de l'allemand Felix Hoppe-Seyler en 1894 pour que le chitosane reçoive le nom qu'il porte aujourd'hui.[140]

Le chitosane est un copolymère naturel appartenant à la famille des polysaccharides. Ce copolymère de nature linéaire est composé d'unités D-glucosamine (GlcN) et de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées par des liaisons glycosidiques de type β-(1→4) (**Figure 13**). Le chitosane est généralement obtenu par N-désacétylation partielle ou totale de la chitine, l'un des biopolymères naturels les plus abondants dans la biomasse. La chitine est extraite par traitement acide ou enzymatique des exosquelettes des crustacés, des cuticules des insectes, de l'endosquelette des céphalopodes et de la paroi cellulaire de certains champignons.[141]

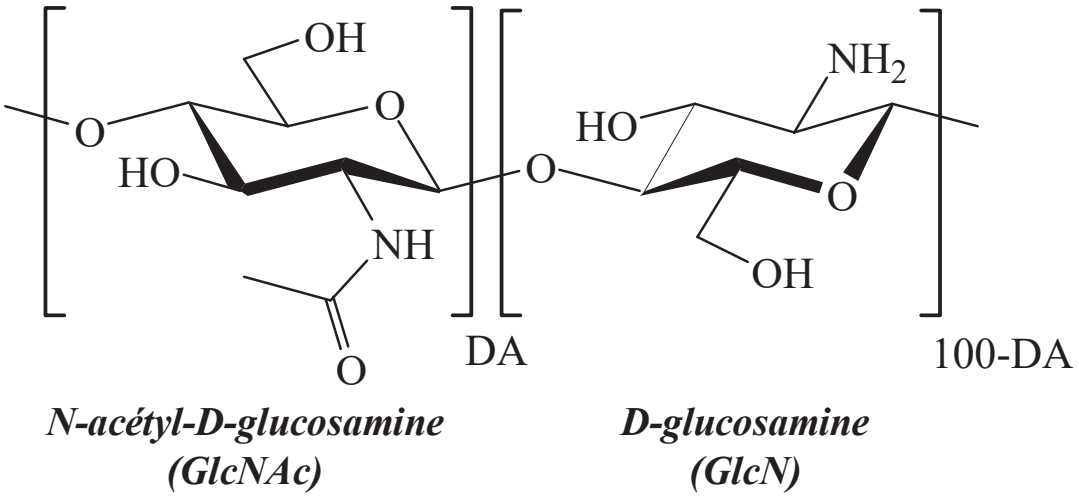



**Figure 13 : Structure chimique de la chitine et du chitosane (DA représente le pourcentage molaire d'unités N-acétyl-D-glucosamine contenues dans les chaînes de polymères).**

La chitine et le chitosane possèdent des structures chimiques très proches et il n'existe pas de nomenclature officielle permettant les différencier. Ainsi pour différencier ces deux biopolymères, leurs propriétés intrinsèques sont utilisées. La différence entre ces deux

biopolymères est souvent basée sur une délimitation d'intervalle de degré d'acétylation. Ce degré d'acétylation correspond au pourcentage molaire d'unités N-acétyl-D-glucosamine contenues dans les chaînes de polymères. Cependant, cette délimitation du DA pouvant varier avec certaines propriétés ou avec les sources des deux biopolymères, la solubilité est considérée comme le moyen le plus efficace pour différencier la chitine du chitosane. Le chitosane est soluble dans les solutions aqueuses d'acides diluées tandis que la chitine ne l'est pas. La chitine est soluble que dans le N,N-diméthylacétamide (DMAc) en présence du chlorure de lithium (LiCl).

## III.2. Paramètres moléculaires du chitosane

Les diverses propriétés attribuées à la chitine et au chitosane sont fortement liées à leurs paramètres moléculaires. Ce lien oblige à connaître de manière précise ces paramètres pour bien comprendre les propriétés physicochimiques et biologiques du chitosane, et en particulier son degré d'acétylation et sa masse molaire.

### III.2.1. Le degré d'acétylation

Les propriétés électrostatiques, mécaniques, biologiques, physicochimiques,… du chitosane dépendent fortement du degré d'acétylation. En effet, en fonction de ce paramètre, Schatz et *al.* sont parvenus à définir des intervalles de prédominance de la nature des interactions que possède le chitosane.[142] Ces intervalles sont délimités comme suit :

- Intervalle 1 : DA < 20 %. Dans cet intervalle de DA, les chaînes de chitosane ont un caractère polycationique. Les interactions prédominantes sont essentiellement électrostatiques et les chaînes de chitosane sont étirées ;
- Intervalle 2 : 20 % < DA < 50 %. Dans cet intervalle intermédiaire, les interactions hydrophiles/hydrophobes se contrebalancent et leurs impacts sur les propriétés sont équilibrés ;
- Intervalle 3 : DA > 50 %. Dans ce dernier intervalle de DA, les interactions hydrophobes sont fortement prédominantes.

### III.2.2. La masse molaire

La masse molaire du chitosane est le plus souvent liée à la source de chitosane. Cependant, cette masse molaire peut être ajustée par des méthodes chimiques de traitement telles que la dépolymérisation par exemple. Plusieurs propriétés du chitosane sont connues pour être

influencées par la masse molaire : propriétés rhéologiques, hygroscopiques, mécaniques… Des études menées par Kofuji *et al.*[143] ont montré que la viscosité d'une solution de chitosane dépend fortement de sa masse molaire et de sa dispersité. Les propriétés mécaniques telles que l'élongation à la rupture, la résistance à la traction de matériaux à base de chitosane sont fortement améliorées avec l'augmentation de la masse molaire.[144, 145] Il a été prouvé aussi que le caractère hygroscopique du chitosane est lié à sa masse molaire. En effet, ce caractère, plus précisément le gonflement, augmente avec la masse molaire.[146] Les réponses biologiques du chitosane dépendent également de la masse molaire du chitosane. En effet, celle-ci peut influencer l'adhésion, le métabolisme et la prolifération des bactéries. Cependant, cette influence de la masse molaire reste contradictoire dans la littérature.[147-150]

## III.3. Propriétés du chitosane en solution

### III.3.1. Solubilité du chitosane

En dehors de ces groupes amine et acétamide, le chitosane possède des fonctions hydroxyle et éther sur sa chaîne principale. La présence de ces fonctions et groupes dans la structure du chitosane influence fortement sa solubilité. En milieu aqueux pur, ces groupes interagissent entre eux par des liaisons hydrogène pour empêcher la dissociation des chaînes de chitosane et par conséquent la solubilité du polymère. Cependant, en milieu aqueux d'acide dilué, cette solubilité est liée à la protonation des fonctions amine de sa chaîne principale qui induit une énergie de répulsion électrostatique très supérieure à l'énergie attractive, favorable à la formation de liaisons hydrogène. Outre les caractéristiques du milieu (pH, force ionique,…), la solubilité du chitosane dépend aussi de son DA et de sa masse molaire. Vårum *et al.*[151] ont montré que la solubilité du chitosane augmente avec la diminution de sa masse molaire. Le chitosane devient plus soluble quand son DA diminue.[142] Malgré la diminution de la solubilité avec l'augmentation du DA, le chitosane devient soluble sur un plus large intervalle de pH quand son DA augmente. A des DA proches de 50 %, le chitosane est soluble dans l'eau quel que soit le pH.[151] Les propriétés de solubilité du chitosane en fonction du DA sont expliquées par Sorlier *et al.*[152] En étudiant une série de chitosane de DA compris entre 5 % et 89 %, Sorlier et *al* ont montré que le *pK* intrinsèque du chitosane ($pK_0$) augmente lorsque le DA augmente. Ce résultat traduit le renforcement du caractère cationique du chitosane en solution avec l'augmentation du DA. La nature des acides utilisés peut jouer un rôle important dans la solubilisation du chitosane.[153] En effet, les contre-ions libérés par les acides dans le milieu étant différents, leurs encombrements stériques affecteront de manière différente la rigidité des chaînes et par conséquent la solubilité du polymère.

### III.3.2. Conformation du chitosane en solution

La conformation en solution des chaînes de chitosane est liée à plusieurs paramètres sensibles et parfois difficiles à contrôler. Parmi ces paramètres, on peut citer : le DA, la force ionique du milieu, le degré d'ionisation des chaînes de chitosane, la distribution des résidus N-acétyl-D-glucosamine le long des chaînes….

La conformation des chaînes de chitosane en solution est directement liée à son DA et à sa masse molaire. Plusieurs études liées à la détermination de la conformation des chaînes de chitosane en solution sont reportées dans la littérature. Une étude sur une série de chitosanes réacétylés de manière homogène, a montré une augmentation de la longueur de persistance des chaînes de chitosane avec l'augmentation du DA (11 nm (DA= 2 %) à 15 nm (DA = 60 %)).[154-156] Une évolution similaire de la longueur de persistance des chaînes de chitosane en fonction du DA a été observée par Terbojevich *et al.*[157, 158] Les auteurs expliquent ce phénomène par la stabilisation du chitosane avec l'augmentation du DA due à la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires.
Une étude plus complète de l'effet du DA sur la conformation des chaînes de chitosane en solution en fonction du DA a été effectuée par plusieurs auteurs.[142, 152, 159-161] Ces derniers définissent trois intervalles de DA qui régissent la conformation des chaînes.

- DA < 25 % : domaine polyélectrolyte ; dans cet intervalle, les chaînes de chitosane présentent une densité de charge élevée conduisant à une expansion des chaînes de chitosane qui résultent des interactions répulsives inter et intra chaînes. Le caractère polyélectrolyte des chaînes étant très présent dans cet intervalle, la conformation des chaînes dépend aussi de la concentration en sel dans le milieu.
- 25 % < DA ≤ 50 % : domaine de transition ; dans cet intervalle de DA, un équilibre entre les interactions hydrophiles et hydrophobes commence à s'établir.
- DA > 50 % : domaine hydrophobe ; dans ce domaine, les chaînes deviennent très faiblement chargées du fait de l'augmentation du DA. Cette augmentation favorise les interactions segment/segment au détriment des interactions segment/solvant, ce qui induit une association des chaînes.

## III.4. Caractérisation des paramètres moléculaires du chitosane

### III.4.1. Le degré d'acétylation

La détermination du degré d'acétylation du chitosane peut être effectuée par plusieurs techniques : titration colloïdale, titration potentiométrique, spectrométrie de masse, spectroscopies IR et UV, dichroïsme circulaire, spectroscopie RMN,…. Cependant, de par sa fiabilité, sa facilité d'utilisation, sa rapidité et sa faible consommation de produit, la spectroscopie RMN du proton reste la technique la plus utilisée.

Plusieurs techniques sont proposées pour la détermination du DA à partir du spectre RMN $^{1}$H. Celle de Hiraï *et al.*[162] a été utilisée dans cette étude. Pour déterminer le DA du chitosane, l'intégrale des protons du groupe méthyle ($I_{CH_3}$) des unités N-acétyl-D-glucosamine située vers 2 ppm est comparée avec celle de la somme des intégrales des protons ($H_2$ – $H_{6'}$) ($I_{H_2-H_{6'}}$) des unités N-acétyl-D-glucosamines et D-glucosamines situées entre 3 et 4 ppm (**Figure 14**). Le DA est ainsi donné par la relation :

$$DA\ (\%) = \left[\frac{\frac{1}{3}I_{CH_3}}{\frac{1}{6}I_{H_2-H_{6'}}}\right] * 100 \qquad \textbf{Équation II}$$

Les analyses dans notre étude ont été effectuées à température ambiante. Le solvant utilisé est une solution aqueuse deutérée d'acide chlorhydrique en présence de triméthylsilylpropanoate de sodium deutéré (TSP-d4).

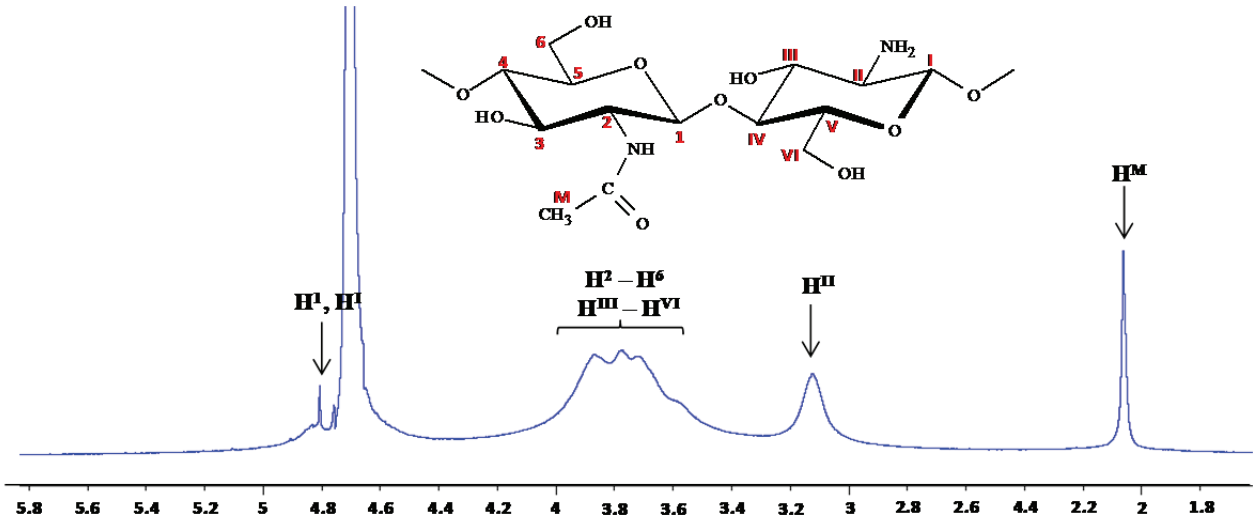



**Figure 14 : Spectre RMN du proton $^{1}$H du chitosane (expérience réalisée dans du $D_2O$ à température ambiante).**

La RMN du proton permet aussi la détermination de la distribution des unités acétylées le long de la chaîne principale. Vårum *et al.*[163] ont montré que le déplacement chimique du proton $H_1$ dépend de la nature de l'unité adjacente (acétylée ou non). Ainsi, cela permet de calculer la fréquence des diades et par conséquent déterminer le type de distribution (statistique ou en bloc) des unités N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine.

### III.4.2. La masse molaire

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour déterminer la masse molaire du chitosane : la viscosimétrie capillaire, la diffusion statique de la lumière, la chromatographie d'exclusion stérique (CES), l'osmométrie,….

Les masses molaires des chitosanes étudiés dans le cadre de ce travail ont été mesurées par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière. L'association de ces deux techniques permet une caractérisation complète de la masse molaire du chitosane. En fait, celle-ci permet d'obtenir les masses molaires moyennes en nombre ($M_n$) et en masse ($M_w$) ainsi que la dispersité (Đ).

L'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse des polyélectrolytes s'avère très délicate du fait des interactions entre l'éluant et la phase stationnaire et celles induites par les polyélectrolytes. Afin de contourner ces phénomènes d'interactions, il est important de bien choisir le pH et la force ionique du solvant. Dans notre étude, nous avons choisi une solution tampon acide acétique 0,2M / acétate d'ammonium 0,15 M de pH=4,5. Les caractéristiques de cette solution permettent de limiter la possibilité de formation de liaisons hydrogène entre le chitosane et la phase stationnaire et de favoriser l'écrantage des charges du chitosane.[164, 165]

La détermination de la masse molaire moyenne en masse n'est possible que grâce à la connaissance des valeurs d'incrément de l'indice de réfraction (dn/dc) dans le solvant. Ce paramètre est fortement dépendant de la nature de l'éluant, des caractéristiques du solvant et du DA.[166] Dans notre cas, la détermination des valeurs d'incrément de l'indice de réfraction et les mesures de la masse ont été effectuées dans le même solvant.

## III.5. Propriétés biologiques du chitosane

### III.5.1. Propriétés bactériostatiques

Les propriétés physicochimiques et moléculaires du chitosane lui confèrent un caractère inhibiteur de plusieurs types de bactéries et de champignons. Deux principaux mécanismes d'inhibition des bactéries par le chitosane sont décrits dans la littérature. D'une part, ce phénomène est expliqué par le caractère polycationique du chitosane qui interfère par des interactions électrostatiques sur le métabolisme des bactéries. D'autre part, ce phénomène est compris comme un blocage de la transcription de l'ADN des bactéries en ARN du fait de l'adsorption du chitosane sur les molécules de l'ADN lorsqu'il s'infiltre dans les bactéries.[167-170] Les interactions du chitosane avec les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif se font de manières différentes. Sur un plan général, plusieurs études dans la littérature ont montré que les interactions sont plus fortes entre le chitosane et les bactéries à Gram négatif et que celles-ci sont plus sensibles aux propriétés antibactériennes du chitosane que celles à Gram positif.[171, 172] Des études portant sur l'effet de l'âge des bactéries ont suggéré une variation des propriétés d'électronégativité de la surface des bactéries qui serait liée à leur croissance.[173, 174] Tsai *et al.* concluent que cette variation influence fortement l'adhésion et la prolifération des bactéries sur le chitosane.[175] Le caractère bactériostatique du chitosane est d'autant plus présent que son DA est faible. L'effet de la masse molaire est souvent contradictoire sur l'ensemble des travaux de la littérature.[172, 176-178]

### III.5.2. Propriétés anti-tumorales

Le chitosane et ses dérivés présentent à la fois des activités antitumorales dans les milieux *in vivo* et *ex vivo*. Ces propriétés du chitosane ont été mises en évidence dans plusieurs études. Tokoro *et al.* ont constaté l'effet antitumoral du chitosane par une sécrétion importante d'interleukines 1 et 2 qui induisent une maturation et une infiltration des lymphocytes T cytolytiques.[179] *In vivo*, Lin *et al.*[180] ont découvert que le chitosane peut permettre une augmentation de la production de lymphokine et par conséquent une prolifération des lymphocytes T cytolytiques. Plusieurs études ont démontré que le chitosane peut agir directement sur les cellules tumorales par apoptose.[181-183] Il peut également avoir des effets pro apoptotiques très forts pour certaines cellules cancéreuses. Le chitosane peut également aider à la suppression de certaines cellules d'hépatome humain.[184] L'effet antitumoral du chitosane est directement lié à ses propriétés moléculaires.[185, 186]

### III.5.3. Propriétés de biocompatibilité

La biocompatibilité est une fonction indispensable des biomatériaux pour leurs applications dans le domaine biomédical. Elle réside dans leur capacité à ne pas produire d'effets toxiques ou nuisibles sur les systèmes biologiques.[187, 188] Cette fonctionnalité peut inclure d'autres aspects des biomatériaux tels que la cytocompatibilité, la non-toxicité,….[187] Plusieurs études ont prouvé que cette fonction de biocompatibilité est présente chez le chitosane.[189-191] En effet, des études menées sous des approches différentes ont confirmé le caractère biocompatible du chitosane pour divers types de cellules.[189, 192-196]

## III.6. Propriétés physicochimiques des films de chitosane

### III.6.1. Mouillabilité des films de chitosane

Les propriétés de mouillabilité des films font généralement référence aux angles de contact à l'eau et à la tension de surface. Ces propriétés participent fortement aux propriétés biomédicales des biomatériaux. En effet, la variation de ces deux propriétés peut permettre l'adhésion et la prolifération de plusieurs types de bactéries. Les propriétés souhaitées pour l'adhésion et la prolifération des bactéries sont l'hydrophobie et de manière générale des tensions de surface élevées. Les propriétés de mouillabilité des films de chitosane sont fortement dépendantes des paramètres moléculaires du polysaccharide. Cependant, les conclusions sur ces propriétés en fonction des paramètres du chitosane sont contradictoires dans la littérature. Foster *et al.,* dans leur étude de la mouillabilité de films de chitosane commercial non supportés (obtenus par évaporation de solvant), d'épaisseur ~ 20 µm et de DA compris en 15 et 28 %, ont observé une diminution des angles de contact avec l'augmentation du DA. En effet, les angles sont compris entre 75 et 65 ° pour les DA supérieurs à 20 %. Ils obtiennent une valeur d'angle fortement élevée de l'ordre de 105 ° pour le DA 15 %.[197] Tomihata et Ikada, sur des films d'épaisseur 150 µm préparés suivant la méthode de Tokura,[198] rapportent une augmentation des angles de contact avec l'augmentation du DA. Les auteurs observent des angles qui varient de 49 ° pour le DA 0 % à 69 ° pour le DA 100 %.[199] Wenling *et al.*, sur des films de DA compris entre 5 et 30 % et d'épaisseur entre 60 – 90 µm, ont obtenu des angles compris entre 74 et 80 °. Cependant, les auteurs n'ont pas observé de tendance en fonction du DA.[200] Ces contradictions peuvent provenir de la source du chitosane ou de la méthode de réacétylation, d'où l'importance dans notre étude de considérer des séries de DA issues de la même source de chitosane et réacétylées dans des conditions de réaction homogène. On retrouve différentes valeurs de

tensions de surface du chitosane dans la littérature ; des valeurs de l'ordre de 70 mN/m pour le chitosane en solution[201, 202] et des valeurs comprises entre 30 et 35 mN/m sur des membranes de chitosane.[203-205] Qun et Ajun ont observé des tensions de surface du chitosane en milieux aqueux de HCl et de AcOH qui restent presque constantes avec la variation du DA.[202]

### III.6.2. Gonflement des films de chitosane

Connu pour ses propriétés hygroscopiques, le chitosane gonfle facilement en contact avec l'eau. Cette caractéristique est souvent traduite par le pourcentage d'eau absorbée à l'équilibre par le polymère. Le gonflement des films de chitosane est d'une grande importance dans le domaine biomédical. En effet, cette propriété des polymères facilite l'inclusion des principes actifs et leur relargage dans les systèmes biologiques. Le gonflement du chitosane résulte des interactions entre les molécules d'eau et les groupes hydrophiles du polymère. La densité des groupes hydrophiles sur la chaîne principale et les forces intermoléculaires constituent les principaux facteurs qui gouvernent le gonflement du chitosane. Cependant, celles-ci dépendent des paramètres moléculaires du chitosane (DA, masse molaire, cristallinité,…), des paramètres du milieu environnant (pH, force ionique, température, humidité,…). Une étude menée sur l'effet du pH sur le gonflement des films de chitosane a prouvé une augmentation du gonflement des films avec la diminution du pH, jusqu'à un pH limite en deçà duquel les films de chitosane deviennent solubles. En effet, les auteurs ont étudié le gonflement des films de chitosane d'épaisseurs comprises entre 70 et 90 µm dans des milieux de pH différents : eau distillée, solution saline normale, tampon phosphate à pH 7,2 et tampon HCl-KCl pH 1,2. En immergeant les films de chitosane dans les solutions tampon HCl-KCl pH 1,2 et saline normale, les auteurs ont observé une dissolution facile et rapide des films de chitosane. Dans l'eau distillée, les films de chitosane de faible masse molaire gonflent très rapidement avant de se dissoudre dans l'immédiat. Un gonflement plus important et une dissolution sous forme de fragments après 2 h d'immersion ont été notés pour les films de masse molaire élevée. Dans la solution tampon à pH 7,2, les auteurs ont constaté un gonflement important des films au cours des 15 premières minutes d'immersion puis une diminution du gonflement au-delà.[206] Ces résultats peuvent provenir de la différence du degré d'ionisation des chaînes de chitosane en fonction du pH. Une étude de gonflement dans l'eau distillée d'une série de chitosane de DA compris entre 9 et 48 % a montré que le gonflement du chitosane augmente avec l'augmentation du degré d'acétylation. Les auteurs ont observé lors de cette étude un gonflement suivi d'une dissolution du film pour le DA 48 %. Ils expliquent ce phénomène par

les propriétés cristallines du chitosane et par une éventuelle existence de groupes hydrophiles résiduels après la formation de liaisons hydrogène aux DA élevés. En effet, pour les DA proches de 50 %, les zones amorphes du chitosane se solubilisent facilement à cause de l'affaiblissement des liaisons intermoléculaires dû à la distribution aléatoire des fonctions acétamide et des fonctions amine. Pour les faibles DA, les auteurs relient le gonflement des films au degré d'association des groupes hydrophiles (fonctions hydroxyle et amine).[207]

### III.6.3. Propriétés de cristallinité des films de chitosane

Les propriétés cristallines des films de chitosane influencent fortement les propriétés physicochimiques et mécaniques des films. Une étude menée par Chen et *al*. a montré que la résistance à la traction des films de chitosane obtenus par évaporation du solvant diminue quand la cristallinité des films diminue.[208] Des différences de cristallinité suivant la méthode de réacétylation (homogène ou hétérogène) ont été également observées par Aiba.[209] Wan *et al.*, en investiguant les propriétés cristallines des films de chitosane neutralisés par de l'hydroxyde de sodium, de masses molaires similaires et de DA compris entre 8 et 30 %, ont trouvé que celles-ci étaient liées au DA. En effet, le taux de cristallinité des films de chitosane augmente avec le DA.[146] Une tendance similaire de l'effet du DA sur la cristallinité est observée par Gámiz-González et *al*.[210] Cependant, Suh *et al.*[211] rapportent que la cristallinité est maximale pour la chitine non désacétylée (DA = 100 %) et le chitosane totalement désacétylé (DA = 0 %) et que la cristallinité minimale est atteinte pour un DA intermédiaire. Le taux de cristallinité des films de chitosane dépend également de la masse molaire et il diminue quand la masse molaire diminue.[144, 212] Huei *et al.* ont étudié la cristallinité d'une série de membranes de chitosane de même DA et de masses molaires différentes et leurs résultats ont montré que la cristallinité diminuait avec la diminution de la masse molaire.[144] Cependant, Wan et *al*. ont quant à eux observé dans leur étude une diminution de la cristallinité quand la masse molaire augmente.[146]

## III.7. Applications biomédicales de films minces de chitosane

Le processus de libération des médicaments est la plupart du temps lié au mécanisme de libération, au pH du milieu, à l'épaisseur du système contenant le médicament (film, matrice, capsules,…), aux propriétés chimiques et physicochimiques du système et à la quantité initiale de médicament introduit dans le système. Des propriétés de biodégradabilité des systèmes de libération des médicaments sont requises pour éviter d'éventuels effets secondaires. Ce critère indispensable et d'autres propriétés du chitosane ont permis son

utilisation pour la libération de médicaments. Rodrigues et *al*, dans leur étude sur la libération de dexaméthasone par des films de chitosane ont montré que les films constitués d'une seule monocouche de chitosane permettent une libération maximale et plus rapide de la dexaméthasone.[213] Des tests de libération de diazépam chez des lapins ont conduit à des résultats similaires entre des films de chitosane et des formulations commerciales.[214] L'effet bactéricide des films de chitosane sur la plupart des microorganismes empêchant la cicatrisation des plaies, sa perméabilité à l'oxygène, son caractère hydro absorbant et sa biocompatibilité justifient son attractivité pour la régénération tissulaire. En effet, la cytocompatibilité des films de chitosane avec les kératinocytes et les fibroblastes favorise leurs adhésions et leurs proliférations sur les films et par conséquent la régénération tissulaire.[189] Des études menées par Allan *et al.*[215] ont confirmé que les propriétés bactéricides, la perméabilité aux gaz et le caractère hydrophile des films de chitosane permettent leur utilisation dans la fabrication des lentilles de contact. Une étude sur la perméabilité des films de chitosane à certains métabolites a permis de mettre en évidence leur utilisation potentielle pour l'hémodialyse.[216]

## Conclusion

Les films de chitosane possèdent des propriétés biologiques très intéressantes (biocompatibilité, biodégradabilité, bioactivité, hémocompatibilité, non toxicité,…) qui motivent aujourd'hui son utilisation pour plusieurs applications biomédicales. Ces propriétés biologiques sont fortement liées aux paramètres moléculaires.

Les propriétés physicochimiques des films de chitosane influencent fortement leurs propriétés d'adhésion bactérienne. Ainsi, la maîtrise des propriétés physicochimiques des films est importante pour comprendre les réponses des bactéries quant à leur adhésion sur les films de chitosane. En effet, le chitosane présente une structure chimique composée de deux types de groupes responsables de son caractère hydrophile et/ou hydrophobe. Donc, toute modification de ces groupes impacte directement les propriétés de mouillabilité (angles de contact, énergie de surface, polarité,…) des films. En plus de cet effet structural, les propriétés de mouillabilité des films de chitosane peuvent être affectées par la rugosité des films liée à la méthode d'élaboration des films.

A l'instar des propriétés moléculaires et physicochimiques des films de chitosane, l'adhésion des bactéries est également très sensible aux propriétés des bactéries (structure, charge de surface, propriétés chimiques de surface,…) et aux conditions environnementales (pH, force ionique, température, écoulement hydrodynamique,…). Ainsi, une corrélation entre les propriétés moléculaires, physicochimiques et biologiques des films de chitosane nécessite la considération des propriétés liées aux bactéries.

Au vu de ce recueil bibliographique qui révèle parfois des résultats contradictoires sur les propriétés physicochimiques et biologiques des films de chitosane en relation avec leurs paramètres moléculaires, nous avons choisi de travailler avec deux séries de chitosanes issues de sources différentes (calamar et crevette) avec des paramètres moléculaires bien contrôlés (DA, masse molaire, dispersité). A partir de ces différentes séries, une étude systématique de caractérisation des films élaborés par spin-coating en vue de parvenir à une maîtrise des propriétés physicochimiques (angles de contact, énergies de surface, polarités,…) et structurales (morphologies, structures chimiques, gonflements,…) des films a été effectuée. Ces caractérisations permettront de comprendre et d'établir un lien entre les propriétés physicochimiques des films et celles moléculaires et biologiques.

## Références bibliographiques:


1. Berlot, S.; Aissaoui, Z.; Pavon-Djavid, G.; Belleney, J.; Jozefowicz, M.; Hélary, G.; Migonney, V., Biomimetic poly (methyl methacrylate)-based terpolymers: modulation of bacterial adhesion effect. *Biomacromolecules* **2002,** 3, (1), 63-68.
2. Kaushik, N. K.; Kaushik, N.; Pardeshi, S.; Sharma, J. G.; Lee, S. H.; Choi, E. H., Biomedical and clinical importance of mussel-inspired polymers and materials. *Marine drugs* **2015,** 13, (11), 6792-6817.
3. Maddikeri, R.; Tosatti, S.; Schuler, M.; Chessari, S.; Textor, M.; Richards, R.; Harris, L., Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008,** 84, (2), 425-435.
4. Shi, Z.; Neoh, K.; Kang, E.; Poh, C.; Wang, W., Bacterial adhesion and osteoblast function on titanium with surface-grafted chitosan and immobilized RGD peptide. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008,** 86, (4), 865-872.
5. Uchida, M.; Oyane, A.; Kim, H. M.; Kokubo, T.; Ito, A., Biomimetic Coating of Laminin–Apatite Composite on Titanium Metal and Its Excellent Cell-Adhesive Properties. *Advanced materials* **2004,** 16, (13), 1071-1074.
6. Tang, L.; Thevenot, P.; Hu, W., Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Current topics in medicinal chemistry* **2008,** 8, (4), 270-280.
7. Absolom, D.; Neumann, A.; Zingg, W.; Van Oss, C., Thermodynamic studies of cellular adhesion. *ASAIO Journal* **1979,** 25, (1), 152-158.
8. Boks, N. P.; Norde, W.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J., Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Microbiology* **2008,** 154, (10), 3122-3133.
9. Dong, H.; Onstott, T. C.; Ko, C.-H.; Hollingsworth, A. D.; Brown, D. G.; Mailloux, B. J., Theoretical prediction of collision efficiency between adhesion-deficient bacteria and sediment grain surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2002,** 24, (3), 229-245.
10. Van Loosdrecht, M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A., The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and environmental microbiology* **1987,** 53, (8), 1893-1897.
11. Neoh, K. G.; Hu, X.; Zheng, D.; Kang, E. T., Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces. *Biomaterials* **2012,** 33, (10), 2813-2822.
12. Ong, Y. L.; Razatos, A.; Georgiou, G.; Sharma, M. M., Adhesion Forces between Escherichia coli bacteria and biomaterial surfaces. *Langmuir* **1999,** 15, (8), 2719-2725.
13. Pratt-Terpstra, I. H.; Weerkamp, A. H.; Busscher, H. J., Adhesion of oral streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumin-coated surfaces. *Microbiology* **1987,** 133, (11), 3199-3206.
14. Cerca, N.; Pier, G. B.; Vilanova, M.; Oliveira, R.; Azeredo, J., Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. *Research in microbiology* **2005,** 156, (4), 506-514.

15. Harris, L.; Tosatti, S.; Wieland, M.; Textor, M.; Richards, R., Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly (L-lysine)-grafted-poly (ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials* **2004,** 25, (18), 4135-4148.
16. Simões, L. C.; Simões, M.; Vieira, M. J., Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2010,** 98, (3), 317-329.
17. Van Oss, C., Hydrophobicity of biosurfaces-origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1995,** 5, (3-4), 91-110.
18. Donlan, R. M., Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* **2002,** 8, (9), 881.
19. Dunne, W. M., Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews* **2002,** 15, (2), 155-166.
20. Padera, R. F., Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovascular Pathology* **2006,** 15, (5), 264-270.
21. Busscher, H. J.; Weerkamp, A. H., Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiology Letters* **1987,** 46, (2), 165-173.
22. Hermansson, M.; Kjelleberg, S.; Korhonen, T. K.; Stenström, T.-A., Hydrophobic and electrostatic characterization of surface structures of bacteria and its relationship to adhesion to an air-water interface. *Archives of Microbiology* **1982,** 131, (4), 308-312.
23. Israelachvili, J.; Wennerström, H., Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. *Nature* **1996,** 379, (6562), 219.
24. McEldowney, S.; Fletcher, M., Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Applied and Environmental Microbiology* **1986,** 52, (3), 460-465.
25. Rosenberg, M.; Kjelleberg, S., Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion. In *Advances in microbial ecology*, Springer: 1986; pp 353-393.
26. Singleton, P., *Bacteria in biology, biotechnology and medicine*. John Wiley & Sons: 2004.
27. Stevenson, G.; Andrianopoulos, K.; Hobbs, M.; Reeves, P. R., Organization of the Escherichia coli K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *Journal of bacteriology* **1996,** 178, (16), 4885-4893.
28. d'Ari, R. S., G. , *Biologie et génétique d'Escherichia coli : les organismes modèles*. Belin ed.; 2008; p 361.
29. Park, J. T., Turnover and recycling of the murein sacculus in oligopeptide permease-negative strains of Escherichia coli: indirect evidence for an alternative permease system and for a monolayered sacculus. *Journal of bacteriology* **1993,** 175, (1), 7-11.
30. Hoiczyk, E.; Hansel, A., Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of bacteriology* **2000,** 182, (5), 1191-1199.
31. Alcorlo, M.; Martínez-Caballero, S.; Molina, R.; Hermoso, J. A., Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases. *Current opinion in structural biology* **2017,** 44, 87-100.
32. Jawetz, E.; Melnick, J. L.; Adelberg, E. A., *Microbiologie médicale*. Presses Université Laval: 1973.

33. Terashima, H.; Kojima, S.; Homma, M., Flagellar motility in bacteria: structure and function of flagellar motor. *International review of cell and molecular biology* **2008,** 270, 39-85.
34. Butler, S. M.; Camilli, A., Going against the grain: chemotaxis and infection in Vibrio cholerae. *Nature reviews Microbiology* **2005,** 3, (8), 611-620.
35. Armitage, J. P., Bacterial tactic responses. *Advances in microbial physiology* **1999,** 41, 229-289.
36. Parkinson, J. S.; Ames, P.; Studdert, C. A., Collaborative signaling by bacterial chemoreceptors. *Current opinion in microbiology* **2005,** 8, (2), 116-121.
37. Granger, P., Panorama des liaisons chimiques. **1997**.
38. Gerschel, A., *Liaisons intermoléculaires-Les forces en jeu dans la matière condensée*. EDP Sciences: 2012.
39. Zhang, J., The Lennard-Jones potential minimization problem for prion AGAAAAGA amyloid fibril molecular modeling. *1106.1584* **2011**.
40. Kuby, J., Immunology, (1994). *WH Freeman and* **1994,** 178, 582-588.
41. Williams, A. F., Cellular interactions out of equilibrium. *Nature* **1991,** 352, (6335), 473.
42. Bongrand, P., Ligand-receptor interactions. *Reports on Progress in Physics* **1999,** 62, (6), 921.
43. Creighton, T. E., *Proteins: structures and molecular properties*. Macmillan: 1993.
44. Pollard, T. D.; Almo, S.; Quirk, S.; Vinson, V.; Lattman, E. E., Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution. *Annual review of cell biology* **1994,** 10, (1), 207-249.
45. Israelachvili, J., Intermolecular and Surface Forces 2nd edn (London: Academic). **1991**.
46. Schumacher-Perdreau, F.; Peters, G., Les facteurs d'adherence bacterienne. *Médecine et Maladies Infectieuses* **1987,** 17, 326-329.
47. Poortinga, A. T.; Bos, R.; Norde, W.; Busscher, H. J., Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface science reports* **2002,** 47, (1), 1-32.
48. van Loosdrecht, M. C.; Lyklema, J.; Norde, W.; Zehnder, A. J., Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microbial Ecology* **1989,** 17, (1), 1-15.
49. Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic press: 2004.
50. Rijnaarts, H. H.; Norde, W.; Bouwer, E. J.; Lyklema, J.; Zehnder, A. J., Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1995,** 4, (1), 5-22.
51. Pratt-Terpstra, I. H.; Weerkamp, A. H.; Busscher, H. J., On a relation between interfacial free energy-dependent and noninterfacial free energy-dependent adherence of oral streptococci to solid substrata. *Current Microbiology* **1988,** 16, (6), 311-313.
52. Gristina, A. G., Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* **1987,** 237, (4822), 1588-1595.
53. Schneider, R. P.; Chadwick, B. R.; Pembrey, R.; Jankowski, J.; Acworth, I., Retention of the Gram-negative bacterium SW8 on surfaces under conditions relevant to the subsurface environment: effects of conditioning films and substratum nature. *FEMS Microbiology Ecology* **1994,** 14, (3), 243-254.

54. Busscher, H.; Doornbusch, G.; Van der Mei, H., Adhesion of mutans streptococci to glass with and without a salivary coating as studied in a parallel-plate flow chamber. *Journal of dental research* **1992,** 71, (3), 491-500.
55. Busscher, H.; Van der Mei, H., Use of flow chamber devices and image analysis methods to study microbial adhesion. *Methods in enzymology* **1995,** 253, 455-477.
56. Gottenbos, B.; Busscher, H.; Van Der Mei, H.; Nieuwenhuis, P., Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2002,** 13, (8), 717-722.
57. Kirov, S. M., Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS microbiology letters* **2003,** 224, (2), 151-159.
58. Boks, N. P.; Busscher, H. J.; van der Mei, H. C.; Norde, W., Bond-strengthening in staphylococcal adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces using atomic force microscopy. *Langmuir* **2008,** 24, (22), 12990-12994.
59. Boks, N. P.; Kaper, H. J.; Norde, W.; Busscher, H. J.; van der Mei, H. C., Residence time dependent desorption of Staphylococcus epidermidis from hydrophobic and hydrophilic substrata. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008,** 67, (2), 276-278.
60. Berne, C.; Ducret, A.; Hardy, G. G.; Brun, Y. V., Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiology spectrum* **2015,** 3, (4).
61. Götz, F., Staphylococcus and biofilms. *Molecular microbiology* **2002,** 43, (6), 1367-1378.
62. Mack, D., Molecular mechanisms of Staphylococcus epidermidis biofilm formation. *Journal of Hospital Infection* **1999,** 43, S113-S125.
63. O'gara, J. P.; Humphreys, H., Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications. *Journal of medical microbiology* **2001,** 50, (7), 582-587.
64. Renner, L. D.; Weibel, D. B., Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS bulletin* **2011,** 36, (5), 347-355.
65. Sutherland, I. W., Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **2001,** 147, (1), 3-9.
66. Mayer, C.; Moritz, R.; Kirschner, C.; Borchard, W.; Maibaum, R.; Wingender, J.; Flemming, H. C., The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International journal of biological macromolecules* **1999,** 26, (1), 3-16.
67. Flemming, H.-C.; Wingender, J., Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water science and technology* **2001,** 43, (6), 1-8.
68. Van Houdt, R.; Michiels, C. W., Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. *Research in microbiology* **2005,** 156, (5-6), 626-633.
69. Tuson, H. H.; Weibel, D. B., Bacteria–surface interactions. *Soft matter* **2013,** 9, (17), 4368-4380.
70. Campanac, C.; Pineau, L.; Payard, A.; Baziard-Mouysset, G.; Roques, C., Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2002,** 46, (5), 1469-1474.

71. Gottenbos, B.; Grijpma, D. W.; van der Mei, H. C.; Feijen, J.; Busscher, H. J., Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **2001,** 48, (1), 7-13.
72. Hogt, A.; Dankert, J.; De Vries, J.; Feijen, J., Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Microbiology* **1983,** 129, (9), 2959-2968.
73. Ludwicka, A.; Jansen, B.; Wadström, T.; Pulverer, G., Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie* **1984,** 256, (4), 479-489.
74. Satou, N.; Satou, J.; Shintani, H.; Okuda, K., Adherence of streptococci to surface-modified glass. *Microbiology* **1988,** 134, (5), 1299-1305.
75. García-Sáenz, M. C.; Arias-Puente, A.; Fresnadillo-Martinez, M. J.; Matilla-Rodriguez, A., In vitro adhesion of Staphylococcus epidermidis to intraocular lenses. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* **2000,** 26, (11), 1673-1679.
76. Magnusson, K. E., Hydrophobic interaction-a mechanism of bacterial binding. *Scand J Infect Dis Suppl* **1982,** 33, 32-36.
77. Pascual, A.; Fleer, A.; Westerdaal, N.; Verhoef, J., Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro. *European journal of clinical microbiology* **1986,** 5, (5), 518-522.
78. Rogers, H., Adhesion of microorganisms to surfaces: some general considerations of the role of the envelope. *Adhesion of microorganisms to surfaces* **1979**, 29-55.
79. Fletcher, M., The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian journal of microbiology* **1977,** 23, (1), 1-6.
80. Herald, P. J.; Zottola, E. A., Attachment of Listeria monocytogenes to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food science* **1988,** 53, (5), 1549-1562.
81. Stepanović, S.; Ćirković, I.; Mijač, V.; Švabić-Vlahović, M., Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by Salmonella spp. *Food Microbiology* **2003,** 20, (3), 339-343.
82. Fletcher, M., Attachment of Pseudomonas fluorescens to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *Journal of Bacteriology* **1988,** 170, (5), 2027-2030.
83. Mceldowney, S.; Fletcher, M., Effect of growth conditions and surface characteristics of aquatic bacteria on their attachment to solid surfaces. *Microbiology* **1986,** 132, (2), 513-523.
84. Piette, J.; Idziak, E. S., A model study of factors involved in adhesion of Pseudomonas fluorescens to meat. *Applied and environmental microbiology* **1992,** 58, (9), 2783-2791.
85. van Loosdrecht, M. C.; Lyklema, J.; Norde, W.; Zehnder, A., Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological reviews* **1990,** 54, (1), 75-87.
86. Liu, Y.; Tay, J.-H., The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water research* **2002,** 36, (7), 1653-1665.
87. Liu, Y.; Tay, J. H., Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *Journal of Applied Microbiology* **2001,** 90, (3), 337-342.

88. Krekeler, C.; Ziehr, H.; Klein, J., Physical methods for characterization of microbial cell surfaces. *Experientia* **1989,** 45, (11-12), 1047-1055.
89. Vacheethasanee, K.; Temenoff, J. S.; Higashi, J. M.; Gary, A.; Anderson, J. M.; Bayston, R.; Marchant, R. E., Bacterial surface properties of clinically isolated Staphylococcus epidermidis strains determine adhesion on polyethylene. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **1998,** 42, (3), 425-432.
90. Westergren, G.; Olsson, J., Hydrophobicity and adherence of oral streptococci after repeated subculture in vitro. *Infection and Immunity* **1983,** 40, (1), 432-435.
91. Katsikogianni, M.; Missirlis, Y., Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater* **2004,** 8, (3).
92. Jucker, B. A.; Harms, H.; Zehnder, A., Adhesion of the positively charged bacterium Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia 70401 to glass and Teflon. *Journal of Bacteriology* **1996,** 178, (18), 5472-5479.
93. Mafu, A. A.; Roy, D.; Goulet, J.; Magny, P., Attachment of Listeria monocytogenes to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection* **1990,** 53, (9), 742-746.
94. Rijnaarts, H. H.; Norde, W.; Lyklema, J.; Zehnder, A. J., The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1995,** 4, (4), 191-197.
95. Hogt, A. H.; Dankert, J.; Feijen, J., Adhesion of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus to a hydrophobic biomaterial. *Microbiology* **1985,** 131, (9), 2485-2491.
96. Bendinger, B.; Rijnaarts, H. H.; Altendorf, K.; Zehnder, A. J., Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and Environmental Microbiology* **1993,** 59, (11), 3973-3977.
97. Ducret, A.; Théodoly, O.; Mignot, T., Single cell microfluidic studies of bacterial motility. In *Bacterial Cell Surfaces*, Springer: 2013; pp 97-107.
98. Pringle, J. H.; Fletcher, M., Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **1983,** 45, (3), 811-817.
99. Ponsonnet, L.; Boureanu, M.; Jaffrezic, N.; Othmane, A.; Dorel, C.; Lejeune, P., Local pH variation as an initial step in bacterial surface-sensing and biofilm formation. *Materials Science and Engineering: C* **2008,** 28, (5), 896-900.
100. Brown, D. G.; Hong, Y., Impact of the charge-regulated nature of the bacterial cell surface on the activity of adhered cells. *Journal of Adhesion Science and Technology* **2011,** 25, (17), 2199-2218.
101. Alberti, L.; Harshey, R. M., Differentiation of Serratia marcescens 274 into swimmer and swarmer cells. *Journal of bacteriology* **1990,** 172, (8), 4322-4328.
102. Belas, R.; Suvanasuthi, R., The ability of Proteus mirabilis to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *Journal of bacteriology* **2005,** 187, (19), 6789-6803.

103. McCarter, L.; Hilmen, M.; Silverman, M., Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of V. parahaemolyticus. *Cell* **1988,** 54, (3), 345-351.
104. Henry, C. H.; Wolford, L. M., Treatment outcomes for temporomandibular joint reconstruction after Proplast-Teflon implant failure. *Journal of oral and maxillofacial surgery* **1993,** 51, (4), 352-358.
105. Nilsson, B.; Ekdahl, K. N.; Mollnes, T. E.; Lambris, J. D., The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Molecular immunology* **2007,** 44, (1), 82-94.
106. Schmidt, D. R.; Kao, W. J., The interrelated role of fibronectin and interleukin-1 in biomaterial-modulated macrophage function. *Biomaterials* **2007,** 28, (3), 371-382.
107. Sutherland, K.; Mahoney 2nd, J.; Coury, A. J.; Eaton, J. W., Degradation of biomaterials by phagocyte-derived oxidants. *Journal of Clinical Investigation* **1993,** 92, (5), 2360.
108. Kylián, O.; Choukourov, A.; Biederman, H., Nanostructured plasma polymers. *Thin Solid Films* **2013,** 548, 1-17.
109. Velardi, L.; Lorusso, A.; Paladini, F.; Siciliano, M.; Di Giulio, M.; Rainò, A.; Nassisi, V., Modification of polymer characteristics by laser and ion beam. *Radiation Effects & Defects in Solids: Incorporating Plasma Science & Plasma Technology* **2010,** 165, (6-10), 637-642.
110. Chikar, J. A.; Hendricks, J. L.; Richardson-Burns, S. M.; Raphael, Y.; Pfingst, B. E.; Martin, D. C., The use of a dual PEDOT and RGD-functionalized alginate hydrogel coating to provide sustained drug delivery and improved cochlear implant function. *Biomaterials* **2012,** 33, (7), 1982-1990.
111. Slepička, P.; Michaljaničová, I.; Kasálková, N. S.; Kolská, Z.; Rimpelová, S.; Ruml, T.; Švorčík, V., Poly-L-lactic acid modified by etching and grafting with gold nanoparticles. *Journal of materials science* **2013,** 48, (17), 5871-5879.
112. Shadpour, H.; Allbritton, N. L., In situ roughening of polymeric microstructures. *ACS applied materials & interfaces* **2010,** 2, (4), 1086-1093.
113. Curtis, A.; Wilkinson, C., Topographical control of cells. *Biomaterials* **1997,** 18, (24), 1573-1583.
114. Lyu, S.-P.; Cernohous, J. J.; Bates, F. S.; Macosko, C. W., Interfacial reaction induced roughening in polymer blends. *Macromolecules* **1999,** 32, (1), 106-110.
115. Meredith, J. C.; Sormana, J. L.; Keselowsky, B. G.; García, A. J.; Tona, A.; Karim, A.; Amis, E. J., Combinatorial characterization of cell interactions with polymer surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003,** 66, (3), 483-490.
116. Pavithra, D.; Doble, M., Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants—issues and prevention. *Biomedical Materials* **2008,** 3, (3), 034003.
117. Avram, M.; Avram, A. M.; Bragaru, A.; Ghiu, A.; Iliescu, C., Plasma surface modification for selective hydrophobic control. *Romanian Journal of Information Science and Technology* **2008,** 11, (4), 409-422.
118. Oehr, C., Plasma surface modification of polymers for biomedical use. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2003,** 208, 40-47.
119. Falconnet, D.; Csucs, G.; Grandin, H. M.; Textor, M., Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials* **2006,** 27, (16), 3044-3063.

120. Martinez, A. W.; Chaikof, E. L., Microfabrication and nanotechnology in stent design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2011,** 3, (3), 256-268.
121. Ranjan, A.; Webster, T. J., Increased endothelial cell adhesion and elongation on micron-patterned nano-rough poly (dimethylsiloxane) films. *Nanotechnology* **2009,** 20, (30), 305102.
122. Craighead, H.; James, C.; Turner, A., Chemical and topographical patterning for directed cell attachment. *Current opinion in solid state and materials science* **2001,** 5, (2), 177-184.
123. Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B., Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *science* **2007,** 318, (5849), 426-430.
124. Bilek, M. M.; Bax, D. V.; Kondyurin, A.; Yin, Y.; Nosworthy, N. J.; Fisher, K.; Waterhouse, A.; Weiss, A. S.; dos Remedios, C. G.; McKenzie, D. R., Free radical functionalization of surfaces to prevent adverse responses to biomedical devices. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011,** 108, (35), 14405-14410.
125. Lu, A.; Sipehia, R., Antithrombotic and fibrinolytic system of human endothelial cells seeded on PTFE: the effects of surface modification of PTFE by ammonia plasma treatment and ECM protein coatings. *Biomaterials* **2001,** 22, (11), 1439-1446.
126. Lee, J. H.; Jung, H. W.; Kang, I.-K.; Lee, H. B., Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups. *Biomaterials* **1994,** 15, (9), 705-711.
127. Lee, J. H.; Park, J. W.; Lee, H. B., Cell adhesion and growth on polymer surfaces with hydroxyl groups prepared by water vapour plasma treatment. *Biomaterials* **1991,** 12, (5), 443-448.
128. Ratner, B. D., Surface modification of polymers: chemical, biological and surface analytical challenges. *Biosensors and bioelectronics* **1995,** 10, (9), 797-804.
129. Anderson, J. M.; Rodriguez, A.; Chang, D. T. In *Foreign body reaction to biomaterials*, Seminars in immunology, 2008; Elsevier: 2008; pp 86-100.
130. Tang, L.; Eaton, J. W., Inflammatory responses to biomaterials. *American journal of clinical pathology* **1995,** 103, (4), 466-471.
131. Guillaume, O.; Garric, X.; Lavigne, J.-P.; Van Den Berghe, H.; Coudane, J., Multilayer, degradable coating as a carrier for the sustained release of antibiotics: preparation and antimicrobial efficacy in vitro. *Journal of controlled release* **2012,** 162, (3), 492-501.
132. Mamaeva, V.; Sahlgren, C.; Lindén, M., Mesoporous silica nanoparticles in medicine—recent advances. *Advanced drug delivery reviews* **2013,** 65, (5), 689-702.
133. McGrath, M. G.; Vrdoljak, A.; O'Mahony, C.; Oliveira, J. C.; Moore, A. C.; Crean, A. M., Determination of parameters for successful spray coating of silicon microneedle arrays. *International journal of pharmaceutics* **2011,** 415, (1), 140-149.
134. Mathews, S.; Bhonde, R.; Gupta, P. K.; Totey, S., A novel tripolymer coating demonstrating the synergistic effect of chitosan, collagen type 1 and hyaluronic acid on osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* **2011,** 414, (1), 270-276.
135. Wang, Y.; Papadimitrakopoulos, F.; Burgess, D. J., Polymeric "smart" coatings to prevent foreign body response to implantable biosensors. *Journal of controlled release* **2013,** 169, (3), 341-347.

136. Buszewski, B.; Szultka, M.; Olszowy, P.; Bocian, S.; Ligor, T., A novel approach to the rapid determination of amoxicillin in human plasma by solid phase microextraction and liquid chromatography. *Analyst* **2011,** 136, (12), 2635-2642.
137. Popescu, L. M.; Piticescu, R. M.; Rusti, C. F.; Maly, M.; Danani, A.; Kintzios, S.; Grinan, M. T. V., Preparation and characterization of new hybrid nanostructured thin films for biosensors design. *Materials Letters* **2011,** 65, (13), 2032-2035.
138. Kiilerich-Pedersen, K.; Poulsen, C. R.; Jain, T.; Rozlosnik, N., Polymer based biosensor for rapid electrochemical detection of virus infection of human cells. *Biosensors and Bioelectronics* **2011,** 28, (1), 386-392.
139. Rouget, C., Des substances amylacées dans les tissus des animaux, spécialement des Articulés (chitine). *Compt Rend* **1859,** 48, 792.
140. Hoppe-Seyler, F., Ueber chitin und cellulose. *European Journal of Inorganic Chemistry* **1894,** 27, (3), 3329-3331.
141. Dutta, P. K.; Dutta, J.; Tripathi, V., Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **2004**.
142. Schatz, C.; Viton, C.; Delair, T.; Pichot, C.; Domard, A., Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules* **2003,** 4, (3), 641-648.
143. Kofuji, K.; Qian, C.-J.; Nishimura, M.; Sugiyama, I.; Murata, Y.; Kawashima, S., Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *European Polymer Journal* **2005,** 41, (11), 2784-2791.
144. Huei, C. R.; Hwa, H.-D., Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydrate polymers* **1996,** 29, (4), 353-358.
145. Santos, C.; Seabra, P.; Veleirinho, B.; Delgadillo, I.; da Silva, J. L., Acetylation and molecular mass effects on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. *European polymer journal* **2006,** 42, (12), 3277-3285.
146. Wan, Y.; Creber, K. A.; Peppley, B.; Bui, V. T., Ionic conductivity of chitosan membranes. *Polymer* **2003,** 44, (4), 1057-1065.
147. Jing, Y.; Hao, Y.; Qu, H.; Shan, Y.; Li, D.; Du, R., Studies on the antibacterial activities and mechanisms of chitosan obtained from cuticles of housefly larvae. *Acta Biologica Hungarica* **2007,** 58, (1), 75-86.
148. Omura, Y.; Shigemoto, M.; Akiyama, T.; Saimoto, H.; Shigemasa, Y.; Nakamura, I.; Tsuchido, T., Antimicrobial activity of chitosan with different degrees of acetylation and molecular weights. *Biocontrol Science* **2003,** 8, (1), 25-30.
149. Tikhonov, V. E.; Stepnova, E. A.; Babak, V. G.; Yamskov, I. A.; Palma-Guerrero, J.; Jansson, H. B.; Lopez-Llorca, L. V.; Salinas, J.; Gerasimenko, D. V.; Avdienko, I. D., Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2 (3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/-derivatives. *Carbohydrate polymers* **2006,** 64, (1), 66-72.
150. Tsai, G. J.; Zhang, S. L.; Shieh, P. L., Antimicrobial activity of a low-molecular-weight chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan. *Journal of food protection* **2004,** 67, (2), 396-398.
151. Varum, K.; Ottoy, M.; Smidsrod, O., Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation. *Carbohydrate Polymers* **1994**.

152. Sorlier, P.; Denuzière, A.; Viton, C.; Domard, A., Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* **2001,** 2, (3), 765-772.
153. Boucard, N.; David, L.; Rochas, C.; Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A., Polyelectrolyte microstructure in chitosan aqueous and alcohol solutions. *Biomacromolecules* **2007,** 8, (4), 1209-1217.
154. Brugnerotto, J.; Desbrieres, J.; Heux, L.; Mazeau, K.; Rinaudo, M. In *Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution*, Macromolecular Symposia, 2001; Wiley-Blackwell, 111 River Street Hoboken NJ 07030-5774 USA: 2001; pp 1-20.
155. Brugnerotto, J.; Desbrières, J.; Roberts, G.; Rinaudo, M., Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. *Polymer* **2001,** 42, (25), 09921-09927.
156. Rinaudo, M.; Milas, M.; Le Dung, P., Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules* **1993,** 15, (5), 281-285.
157. Terbojevich, M.; Carraro, C.; Cosani, A.; Marsano, E., Solution studies of the chitin-lithium chloride-N, N-di-methylacetamide system. *Carbohydrate Research* **1988,** 180, (1), 73-86.
158. Terbojevich, M.; Cosani, A.; Conio, G.; Marsano, E.; Bianchi, E., Chitosan: chain rigidity and mesophase formation. *Carbohydrate research* **1991,** 209, 251-260.
159. Lamarque, G.; Lucas, J.-m.; Viton, C.; Domard, A., Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: role of various structural parameters. *Biomacromolecules* **2005,** 6, (1), 131-142.
160. Schatz, C.; Pichot, C.; Delair, T.; Viton, C.; Domard, A., Static light scattering studies on chitosan solutions: from macromolecular chains to colloidal dispersions. *Langmuir* **2003,** 19, (23), 9896-9903.
161. Sorlier, P.; Viton, C.; Domard, A., Relation between solution properties and degree of acetylation of chitosan: role of aging. *Biomacromolecules* **2002,** 3, (6), 1336-1342.
162. Hirai, A.; Odani, H.; Nakajima, A., Determination of degree of deacetylation of chitosan by $^{1}$H NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin* **1991,** 26, (1), 87-94.
163. Vårum, K. M.; Antohonsen, M. W.; Grasdalen, H.; Smidsrød, O., Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field nmr spectroscopy. *Carbohydrate Research* **1991,** 211, (1), 17-23.
164. Domard, A.; Rinaudo, M., Gel permeation chromatography of cationic polymers on cationic porous silica gels. *Polym. Commun.* **1984**, 55-58.
165. Ottøy, M. H.; Vårum, K. M.; Christensen, B. E.; Anthonsen, M. W.; Smidsrød, O., Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans. *Carbohydrate Polymers* **1996,** 31, (4), 253-261.
166. Sorlier, P.; Rochas, C.; Morfin, I.; Viton, C.; Domard, A., Light scattering studies of the solution properties of chitosans of varying degrees of acetylation. *Biomacromolecules* **2003,** 4, (4), 1034-1040.

167. Chien, R. C.; Yen, M. T.; Mau, J. L., Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate polymers* **2016,** 138, 259-264.
168. Kong, M.; Chen, X. G.; Liu, C. S.; Liu, C. G.; Meng, X. H.; Yu, L. J., Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against E. coli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008,** 65, (2), 197-202.
169. Kulikov, S.; Tikhonov, V.; Bezrodnykh, E.; Lopatin, S.; Varlamov, V., Comparative evaluation of antimicrobial activity of oligochitosans against Klebsiella pneumoniae. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **2015,** 41, (1), 57-62.
170. Sudarshan, N.; Hoover, D.; Knorr, D., Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology* **1992,** 6, (3), 257-272.
171. Chung, Y. C.; Su, Y. P.; Chen, C. C.; Jia, G.; Wang, H. L.; Wu, J. G.; Lin, J. G., Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica* **2004,** 25, (7), 932-936.
172. No, H. K.; Park, N. Y.; Lee, S. H.; Meyers, S. P., Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology* **2002,** 74, (1), 65-72.
173. Chen, Y. L.; Chou, C. C., Factors affecting the susceptibility of Staphylococcus aureus CCRC 12657 to water soluble lactose chitosan derivative. *Food Microbiology* **2005,** 22, (1), 29-35.
174. Yang, T. C.; Li, C. F.; Chou, C. C., Cell age, suspending medium and metal ion influence the susceptibility of Escherichia coli O157: H7 to water-soluble maltose chitosan derivative. *International journal of food microbiology* **2007,** 113, (3), 258-262.
175. Tsai, G. J.; Su, W. H., Antibacterial activity of shrimp chitosan against Escherichia coli. *Journal of food protection* **1999,** 62, (3), 239-243.
176. Gerasimenko, D.; Avdienko, I.; Bannikova, G.; Zueva, O. Y.; Varlamov, V., Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Applied Biochemistry and microbiology* **2004,** 40, (3), 253-257.
177. Yalpani, M.; Johnson, F.; Robinson, L., Antimicrobial activity of some chitosan derivatives. In Elsevier Science Publishers Ltd., London and New York: 1992; pp 543-548.
178. Zheng, L. Y.; Zhu, J. F., Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate polymers* **2003,** 54, (4), 527-530.
179. Tokoro, A.; Takewaki, N.; Suzuki, K.; Mikami, T.; Suzuki, S.; Suzuki, M., Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexanse and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1988,** 36, (2), 784-790.
180. Lin, S. Y.; Chan, H. Y.; Shen, F. H.; Chen, M. H.; Wang, Y. J.; Yu, C. K., Chitosan prevents the development of AOM-induced aberrant crypt foci in mice and suppressed the proliferation of AGS cells by inhibiting DNA synthesis. *Journal of cellular biochemistry* **2007,** 100, (6), 1573-1580.
181. Gibot, L.; Chabaud, S.; Bouhout, S.; Bolduc, S.; Auger, F. A.; Moulin, V. J., Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent. *International journal of biological macromolecules* **2015,** 72, 370-379.

182. He, B.; Tao, H. Y.; Liu, S. Q., Neuroprotective effects of carboxymethylated chitosan on hydrogen peroxide induced apoptosis in Schwann cells. *European journal of pharmacology* **2014,** 740, 127-134.
183. Kim, S.; Liu, Y.; Gaber, M. W.; Bumgardner, J. D.; Haggard, W. O.; Yang, Y., Development of chitosan–ellagic acid films as a local drug delivery system to induce apoptotic death of human melanoma cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2009,** 90, (1), 145-155.
184. Jiang, Z.; Han, B.; Li, H.; Li, X.; Yang, Y.; Liu, W., Preparation and anti-tumor metastasis of carboxymethyl chitosan. *Carbohydrate polymers* **2015,** 125, 53-60.
185. Aranaz, I.; Mengíbar, M.; Harris, R.; Paños, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G.; Heras, Á., Functional characterization of chitin and chitosan. *Current chemical biology* **2009,** 3, (2), 203-230.
186. Karagozlu, M. Z.; Kim, S.-K., Anti-Cancer Effects of Chitin and Chitosan Derivatives. In *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin*, Springer: 2015; pp 413-421.
187. Keong, L. C.; Halim, A. S., In vitro models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. *International journal of molecular sciences* **2009,** 10, (3), 1300-1313.
188. Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.-H.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schué, F., Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* **2012,** 84, (2), 377-410.
189. Chatelet, C.; Damour, O.; Domard, A., Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* **2001,** 22, (3), 261-268.
190. Rao, S. B.; Sharma, C. P., Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of biomedical materials research* **1997,** 34, (1), 21-28.
191. Thanou, M.; Verhoef, J.; Junginger, H., Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Advanced drug delivery reviews* **2001,** 52, (2), 117-126.
192. Blan, N. R.; Birla, R. K., Design and fabrication of heart muscle using scaffold-based tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008,** 86, (1), 195-208.
193. Deng, C.; Zhang, P.; Vulesevic, B.; Kuraitis, D.; Li, F.; Yang, A. F.; Griffith, M.; Ruel, M.; Suuronen, E. J., A collagen–chitosan hydrogel for endothelial differentiation and angiogenesis. *Tissue Engineering Part A* **2010,** 16, (10), 3099-3109.
194. Meng, S.; Liu, Z.; Shen, L.; Guo, Z.; Chou, L. L.; Zhong, W.; Du, Q.; Ge, J., The effect of a layer-by-layer chitosan–heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system. *Biomaterials* **2009,** 30, (12), 2276-2283.
195. Montembault, A.; Tahiri, K.; Korwin-Zmijowska, C.; Chevalier, X.; Corvol, M.-T.; Domard, A., A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. *Biochimie* **2006,** 88, (5), 551-564.
196. Zein, I.; Hutmacher, D. W.; Tan, K. C.; Teoh, S. H., Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* **2002,** 23, (4), 1169-1185.
197. Foster, L. J. R.; Ho, S.; Hook, J.; Basuki, M.; Marçal, H., Chitosan as a biomaterial: influence of degree of deacetylation on its physiochemical, material and biological properties. *PloS one* **2015,** 10, (8), e0135153.

198. Tokura, S.; Nishi, N.; Noguchi, J., Studies on chitin. III. Preparation of chitin fibers. *Polymer Journal* **1979,** 11, (10), 781-786.
199. Tomihata, K.; Ikada, Y., In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* **1997,** 18, (7), 567-575.
200. Wenling, C.; Duohui, J.; Jiamou, L.; Yandao, G.; Nanming, Z.; Xiufang, Z., Effects of the degree of deacetylation on the physicochemical properties and Schwann cell affinity of chitosan films. *Journal of biomaterials applications* **2005,** 20, (2), 157-177.
201. Fernández-Pan, I.; Ziani, K.; Pedroza-Islas, R.; Maté, J., Effect of drying conditions on the mechanical and barrier properties of films based on chitosan. *Drying technology* **2010,** 28, (12), 1350-1358.
202. Qun, G.; Ajun, W., Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution. *Carbohydrate Polymers* **2006,** 64, (1), 29-36.
203. López-Pérez, P. M.; Marques, A. P.; da Silva, R. M.; Pashkuleva, I.; Reis, R. L., Effect of chitosan membrane surface modification via plasma induced polymerization on the adhesion of osteoblast-like cells. *Journal of Materials Chemistry* **2007,** 17, (38), 4064-4071.
204. Sionkowska, A.; Kaczmarek, H.; Wisniewski, M.; Skopinska, J.; Lazare, S.; Tokarev, V., The influence of UV irradiation on the surface of chitosan films. *Surface science* **2006,** 600, (18), 3775-3779.
205. Sionkowska, A.; Skopinska-Wisniewska, J.; Planecka, A.; Kozlowska, J., The influence of UV irradiation on the properties of chitosan films containing keratin. *Polymer Degradation and Stability* **2010,** 95, (12), 2486-2491.
206. Nunthanid, J.; Puttipipatkhachorn, S.; Yamamoto, K.; Peck, G. E., Physical properties and molecular behavior of chitosan films. *Drug development and industrial pharmacy* **2001,** 27, (2), 143-157.
207. Feng, F.; Liu, Y.; Zhao, B.; Hu, K., Characterization of half N-acetylated chitosan powders and films. *Procedia Engineering* **2012,** 27, 718-732.
208. Chen, R. H.; Lin, J. H.; Yang, M. H., Relationships between the chain flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their casted films. *Carbohydrate Polymers* **1994,** 24, (1), 41-46.
209. Aiba, S. I., Studies on chitosan : Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. *International journal of biological macromolecules* **1991,** 13, (1), 40-44.
210. Gámiz-González, M.; Piskin, A. E.; Pandis, C.; Chatzimanolis-Moustakas, C.; Kyritsis, A.; Marí, B.; Ribelles, J. G.; Vidaurre, A., Determining the influence of N-acetylation on water sorption in chitosan films. *Carbohydrate polymers* **2015,** 133, 110-116.
211. Suh, J. K. F.; Matthew, H. W., Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* **2000,** 21, (24), 2589-2598.
212. Ogawa, K.; Yui, T.; Miya, M., Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **1992,** 56, (6), 858-862.

213. Rodrigues, L. B.; Leite, H. F.; Yoshida, M. I.; Saliba, J. B.; Junior, A. S. C.; Faraco, A. A., In vitro release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. *International journal of pharmaceutics* **2009,** 368, (1-2), 1-6.
214. Miyazaki, S.; Yamaguchi, H.; Takada, M.; Hou, W.; Takeichi, Y.; Yasubuchi, H., Pharmaceutical application of biomedical polymers. XXIX. Preliminary study on film dosage form prepared from chitosan for oral drug delivery. *Acta pharmaceutica nordica* **1990,** 2, (6), 401-406.
215. Allan, G.; Altman, L.; Bensinger, R.; Ghosh, D.; Hirabayashi, Y.; Neogi, A.; Neogi, S., Biomedical applications of chitin and chitosan. In *Chitin, chitosan, and related enzymes*, Elsevier: 1984; pp 119-133.
216. Qurashi, M.; Blair, H.; Allen, S., Studies on modified chitosan membranes. II. Dialysis of low molecular weight metabolites. *Journal of applied polymer science* **1992,** 46, (2), 263-269.

# CHAPITRE II : ETUDE DES PROPRIETES DES FILMS DE CHITOSANE ELABORES PAR SPIN-COATING

CHAPITRE II : ETUDE DES PROPRIETES DES FILMS DE CHITOSANE ELABORES PAR SPIN-COATING ..... 59
Introduction ..... 62
I. Préparation des films de chitosane ..... 63
I.1. Purification et réacétylation du chitosane ..... 63
I.1.1. Purification ..... 63
I.1.2. Réacétylation ..... 63
I.2. Préparation des solutions de chitosane ..... 64
I.3. Détermination de la viscosité des solutions de chitosane ..... 65
I.4. Adsorption d'une chaîne de polyélectrolytes sur une surface ..... 66
I.5. Préparation des substrats ..... 68
I.6. Elaboration des films de chitosane par spin-coating ..... 68
II. Détermination des épaisseurs des films de chitosane par ellipsométrie ..... 69
II.1. Effet de la concentration et de la viscosité des solutions sur les épaisseurs ..... 69
II.2. Effet du recuit des films sur les épaisseurs ..... 71
II.3. Effet du lavage des films de chitosane à l'eau acide pH 4 ..... 73
III. Etude de la mouillabilité des films de chitosane ..... 74
III.1. Technique de détermination des propriétés de mouillabilité ..... 74
III.2. Notions de « pinning » et de « tache de café » ..... 76
III.3. « Tache de café » et stabilité de la goutte sonde sur les films de chitosane ..... 78
III.4. Détermination des angles de contact en fonction du vieillissement des films ..... 80
III.4.1. Films non rincés ..... 80
III.4.2. Films recuits et neutralisés ..... 82
III.4.3. Films lavés avec une solution aqueuse d'acide acétique pH 4 ..... 83
III.5. Détermination des angles de contact statiques ..... 85
III.5.1. Effet du degré d'acétylation ..... 85
III.5.2. Effet de la masse molaire du chitosane ..... 86
III.5.3. Effet des épaisseurs des films de chitosane ..... 88
IV. Etude de l'hystérèse de contact des films de chitosane ..... 89
V. Etude de la tension et de la polarité de surface des films de chitosane ..... 91
V.1. Effet du degré d'acétylation ..... 91
V.2. Effet de la masse molaire ..... 94
V.3. Effet des épaisseurs des films de chitosane ..... 95
Conclusion ..... 98

Références: ..... 99

## Introduction

L'objet de ce chapitre est consacré aux propriétés de mouillabilité des films de chitosane élaborés par spin-coating. On étudiera l'effet des paramètres chimiques et moléculaires (masses molaires, degré d'acétylation) du chitosane, des compositions des solutions utilisées pour solubiliser le chitosane, de la neutralisation ou non des films formés et de leur vieillissement, sur les propriétés physicochimiques de ces films. Pour mener à bien cette étude, des chitosanes de propriétés moléculaires bien connues sont utilisés. En effet, des chitosanes de masses molaires (600 kg/mol et 180 kg/mol, déterminées par chromatographie d'exclusion stérique) et ré-acétylés à différents degrés d'acétylation (compris entre 1 et 55 %, déterminés par la RMN du proton) sont utilisés. La solubilisation des chitosanes a été effectuée dans des solutions aqueuses d'acide acétique et d'acide chlorhydrique.

L'étude des propriétés physicochimiques des films de chitosane a été menée par des techniques classiques de caractérisation. Parmi celles-ci, nous avons utilisé l'ellipsométrie pour déterminer les épaisseurs des films, la tensiométrie pour évaluer les angles de contact, la tension et la polarité de surface des films et la microscopie optique pour imager la morphologie des empreintes des gouttes des liquides sondes après leur séchage. Pour aller plus loin dans la compréhension des propriétés de mouillabilité des films de chitosane, en plus du choix de l'eau comme liquide sonde, nous avons également considéré la solution aqueuse d'acide acétique ayant servi à la solubilisation du chitosane pour effectuer les mesures d'angle de contact. Comme les films de chitosane gonflent lorsqu'ils sont en présence d'eau, les polarités et les tensions de surface ont été évaluées avec l'éthylène glycol et le diiodométhane.

# I. Préparation des films de chitosane

## I.1. Purification et réacétylation du chitosane

### I.1.1. Purification

La purification consiste à débarrasser le chitosane brut des impuretés et insolubles qu'il contient. Pour arriver à cela, une solution aqueuse acide de chitosane de concentration 0,5 % en masse est préparée. La quantité d'acide acétique utilisée pour solubiliser le chitosane est déterminée par stœchiométrie des unités glucosamine afin d'assurer la solubilisation du polymère tout en évitant la dégradation des chaînes polymères. Après dissolution du chitosane, la solution est filtrée avec des filtres en ester cellulosique (CME) de tailles de porosité décroissantes. Des filtres de tailles 3 µm, 1,2 µm et 0,45 µm sont utilisées pour le chitosane 600 (Mw = 600 kg/mol) et celles de tailles 3 µm, 1,2 µm, 0,45 µm et 0,22 µm pour le chitosane 180 (Mw = 180 kg/mol). Le chitosane purifié est ensuite précipité par de l'ammoniaque puis lavé par centrifugation avec de l'eau milli-Q. On s'assure d'un lavage suffisant du chitosane en comparant le pH de la solution de chitosane après chaque lavage à celui de l'eau milli-Q. Le chitosane lavé est congelé puis lyophilisé.

### I.1.2. Réacétylation

Pour réacétyler le chitosane, une solution du chitosane purifié de concentration 1 % en masse est préparée avec le même procédé qu'à l'étape de la purification. La réaction de réacétylation se déroule dans un milieu hydroalcoolique en rajoutant 900 mL de 1,2-propanediol pour 1 L de solution de chitosane.[1] Le mélange est mis sous agitation mécanique pendant 2 h puis laissé au repos pendant environ 3 h pour enlever les bulles de la solution. Une solution anhydride acétique/ 1,2-propanediol est alors préparée en utilisant 100 mL de 1,2-propanediol. La quantité d'anhydre acétique à ajouter dépend du DA ciblé. La solution anhydride acétique/ 1,2-propanediol est mise sous agitation mécanique pendant 45 min, puis ajoutée goutte à goutte dans la solution hydroalcoolique de chitosane placée sous agitation. La solution est laissée sous agitation pendant une nuit, puis le chitosane est précipité en rajoutant 50 mL d'ammoniaque et lavé avec de l'eau milli-Q. Plusieurs cycles de lavage du précipité sont effectués pour enlever le maximum possible de solvant (ammoniaque et le 1,2-propanediol) et du sous-produit de la réaction (acétate d'ammonium). Enfin, le précipité de chitosane est congelé et lyophilisé pendant 3 jours.

## I.2. Préparation des solutions de chitosane

Des analyses thermogravimétriques des différents lots de chitosane utilisés au cours de cette thèse ont été effectuées afin de déterminer leur teneur en eau et ainsi mieux contrôler les concentrations en chitosane des solutions préparées. Les mesures thermogravimétriques ont été effectuées sous flux d'hélium par un appareil ATG (TA Instruments Q500 Thermogravimetric analyser) en augmentant la température par des valeurs d'incrément de 10 °C/min jusqu'à 600 °C. Les teneurs en eau déterminées pour les différents lots de chitosane sont répertoriées dans le **Tableau 1**.

| Chitosane 600 | | Chitosane 180 | |
|---|---|---|---|
| DA (%) | Teneur en eau (% massique) | DA (%) | Teneur en eau (% massique) |
| 2,4 | 8 | 1,0 | 5 |
| 8,0 | 6 | 9,0 | 4 |
| 12,2 | 8 | 14,4 | 5 |
| 21,5 | 6 | 25,5 | 5 |
| 34,0 | 8 | 35,2 | 8 |
| 45,3 | 9 | 41,9 | 8 |
| 52,5 | 9 | 52,1 | 11 |

**Tableau 1 : Pourcentage en eau dans les différents lots de chitosane.**

Les solutions de chitosane ont été préparées en utilisant deux acides différents : l'acide acétique (AcOH) et l'acide chlorhydrique (HCl). Nous avons privilégié dans cette étude la solubilisation du chitosane par ajout d'acide en quantité stœchiométrique des unités glucosamine du chitosane. La solubilisation est effectuée sous agitation mécanique et à température ambiante. Les concentrations utilisées dans cette étude ont été choisies en rapport avec la masse molaire de chitosane pour éviter d'avoir des solutions trop diluées ou très visqueuses. Ainsi pour le chitosane de masse molaire moyenne (chitosane 180), des concentrations de 2, 1,42, 1, 0,67 et 0,5 % (m/m) en chitosane sont utilisées tandis que pour le chitosane de haute masse molaire (chitosane 600), les concentrations en chitosane sont 1, 0,67, 0,5, 0,4 et 0,33 % (m/m).

## I.3. Détermination de la viscosité des solutions de chitosane

Les viscosités des solutions de chitosane ont été déterminées à l'aide d'un rhéomètre à contrainte contrôlée (AR2000, TA Instruments) utilisant une géométrie couette. Les mesures ont été effectuées à 25 °C avec un intervalle de vitesse de cisaillement de 0,01 à 100 $s^{-1}$. La quantité minimale de solution utilisée pour les mesures est de 8 mL. Les valeurs de viscosité sont déterminées en considérant le plateau newtonien aux faibles vitesses de cisaillement (**Figure 1**).

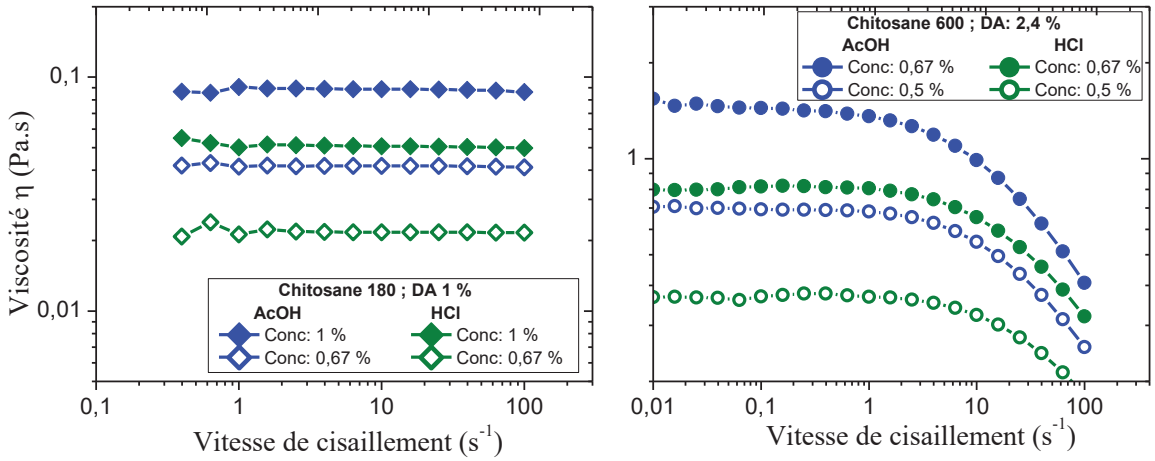



**Figure 1 : Exemple de courbes expérimentales des mesures de viscosité des solutions de chitosane (à gauche : chitosane 180 ; à droite : chitosane 600).**

Les valeurs de viscosité des différentes solutions utilisées dans cette étude ont été déterminées dans le but de trouver l'intervalle des viscosités permettant d'avoir des films de chitosane homogènes. Les viscosités obtenues sont représentées sur la **Figure 2** en fonction de la concentration en chitosane.[2, 3] Les viscosités des solutions augmentent avec la concentration en chitosane, comme reporté dans la littérature. Nous notons aussi la décroissance de la viscosité avec l'augmentation du degré d'acétylation (**Figure 2**). De tels résultats se retrouvent dans la littérature[2-4] et s'expliquent par le changement de conformations des chaînes de chitosane relié à la balance entre interactions hydrophiles/hydrophobes. Les valeurs élevées des viscosités à bas degrés d'acétylation résultent du comportement polyélectrolyte du chitosane qui se traduit par l'extension des chaînes de chitosane via les répulsions électrostatiques. La viscosité des solutions de chitosane peut dépendre fortement de la nature de l'acide utilisé pour dissoudre le polymère (organiques ou inorganiques) et des anions/contre-ions libérés par la réaction acido-basique entre l'acide et le chitosane en milieux

aqueux. Ces différences d'influence des solvants sur la viscosité proviennent de la capacité de neutralisation des groupes amine protonés, des effets de gênes stériques occasionnées par les anions se trouvant dans le milieu et les répulsions électrostatiques entre les groupes amine protonés. Les viscosités des solutions aqueuses de chitosane obtenues par ajout d'acide chlorhydrique sont légèrement plus petites que les viscosités des solutions contenant l'acide acétique. Ces différences de viscosité peuvent résulter de la taille de l'anion qui peut provoquer un encombrement stérique. Plus la taille de l'anion est grande, plus la chaîne est encombrée et plus la chaîne de chitosane devient rigide.[5] Cette rigidité des chaînes de chitosane contribue à l'augmentation de la viscosité.

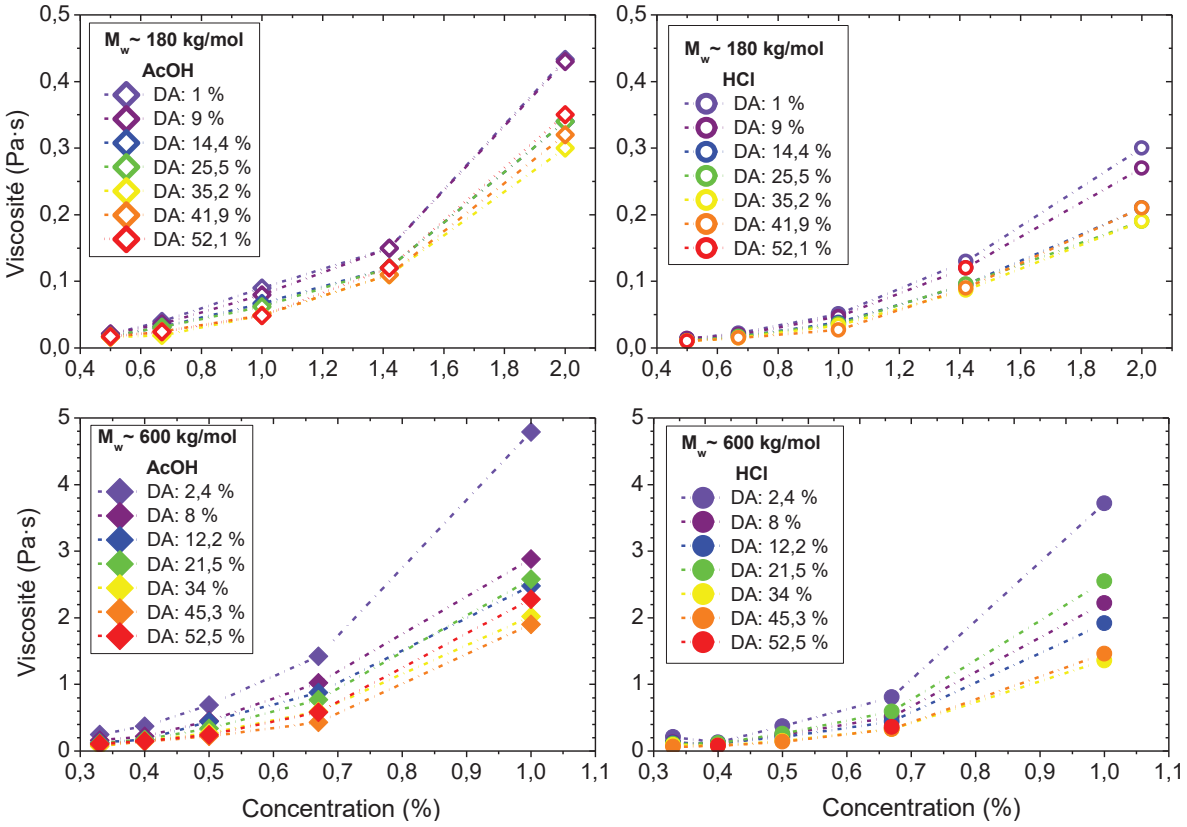



**Figure 2: Variation de la viscosité des solutions de chitosanes 600 et 180 en fonction de la concentration en chitosane dans une solution aqueuse d'acide acétique et d'acide chlorhydrique pour différents degrés d'acétylation.**

## I.4. Adsorption d'une chaîne de polyélectrolytes sur une surface

En contact avec une surface chargée, les chaînes de polyélectrolytes de charges opposées s'adsorbent sur la surface par attraction électrostatique pour neutraliser les charges surfaciques du substrat. Ce phénomène s'explique par un remplacement des contre-ions de la surface par les ions de la chaîne de polyélectrolyte et n'est possible qu'en faisant l'hypothèse que les ions de la chaîne de polyélectrolyte sont monovalents et que les interactions surface-

contre-ions et surface-solvant sont faibles pour pouvoir être remplacées par celles entre la surface et les chaînes polyélectrolytes. Les contre-ions de la surface remplacés par les ions de la chaîne sont alors libérés dans la solution et provoquent une augmentation de l'entropie du système. D'autres interactions surface-chaînes polyélectrolytes peuvent s'ajouter aux interactions électrostatiques, notamment les interactions de Van der Waals ou les liaisons hydrogène…. Ces interactions entre les chaînes et la surface du substrat entraînent une perte de degrés de liberté des chaînes et par conséquent des conformations figées de celles-ci. Les chaînes ainsi adsorbées peuvent adopter des conformations différentes à la surface du substrat : queue, train, boucle (voir **Figure 3**).

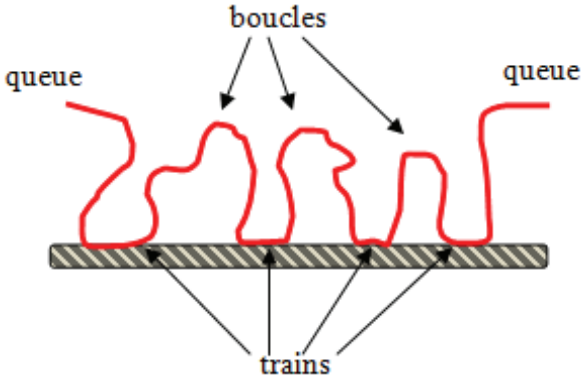



**Figure 3 : Différentes conformations d'une chaîne de polyélectrolyte sur une surface plane**

L'adsorption des polymères sur une surface est liée à leurs structures (étoiles, cycliques, linéaires, copolymères à blocs…)[6] et à celles de la surface (lisse, rugueuse, plane, sphérique…).[6-9] Sur une surface chargée, un polymère de charge opposée et un polymère neutre s'adsorbent différemment. Dans le cas des polymères de charge opposée, sous l'effet de la répulsion des sites chargés du polymère, les chaînes de polymère sont étirées avant d'être attirées par la surface chargée. Ceci conduit à la formation d'une couche dense de polymère sur la surface. Cependant, dans le cas des polymères neutres, leurs conformations en solution restent moins perturbées à l'approche de la surface et l'absence de l'étirement des chaînes mène à une structure moins dense à la surface (**Figure 4**).[6]

**Figure 4 : adsorption d'une chaîne chargée (à gauche) et d'une chaîne neutre (à droite) en interaction avec une surface.[6]**

## I.5. Préparation des substrats

Les substrats de silicium sont découpés puis nettoyés par immersion dans un mélange piranha (acide sulfurique concentré et eau oxygénée, ($H_2SO_4/H_2O_2$ ; 7/3 v/v)) chauffé à 150 °C. Les substrats sont ensuite lavés abondamment avec de l'eau milli-Q et placés dans un bain à ultra-sons avant d'être séchés par de l'air sec AeroClean-XYZ. Cette étape du nettoyage est indispensable et permet de débarrasser le substrat des traces organiques et des polluants inorganiques et elle permet également de générer des fonctions silanol. Après cette étape de nettoyage, les substrats sont placés pendant 15 minutes dans une enceinte UV pour volatiliser sous forme de $H_2O$, $CO_2$, $NO_2$… les composés organiques restants à la surface et y régénérer les fonctions silanol juste avant la modification de la surface.

## I.6. Elaboration des films de chitosane par spin-coating

Il existe différentes méthodes d'élaboration des films minces de polymères : dépôt par plasma, par pulvérisation, par dip-coating, etc. Mais la plus utilisée est le dépôt par spin-coating. Cette méthode de dépôt des films minces reste la plus adaptée pour élaborer des monocouches et des films minces de polymères homogènes et uniformes en épaisseurs allant jusqu'à 2000 nm.[10]

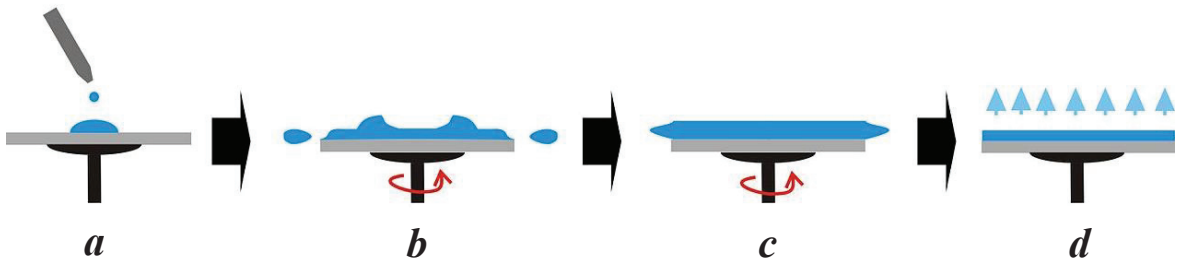



**Figure 5 : schéma des différentes étapes de la formation d'un film par spin-coating : (*a*) dépôt la goutte de solution, (*b*) début de la formation du film, (*c*) homogénéisation en épaisseur du film et (d) évaporation du solvant.**

Les principes du spin-coating peuvent être résumés en quelques étapes (**Figure 5**) : (*a*) Dépôt de la solution à spin-coater sur le substrat. (*b*) Mise en rotation de la tête du rotor. Cette étape constitue la phase d'accélération de la tête du rotor et grâce aux forces centrifuges générées par cette accélération, la solution s'étale totalement sur le substrat. (*c*) Phase de rotation à vitesse maximale constante : cette étape assure le contrôle et l'homogénéité en épaisseur du film. Au cours de cette dernière phase, la viscosité de la solution augmente suite à l'évaporation du solvant, ce qui entraîne la formation du film de polymère. Dans cette thèse,

les films ont été préparés à une vitesse de rotation de 2000 rpm pendant 5 min afin de permettre l'évaporation complète du solvant.

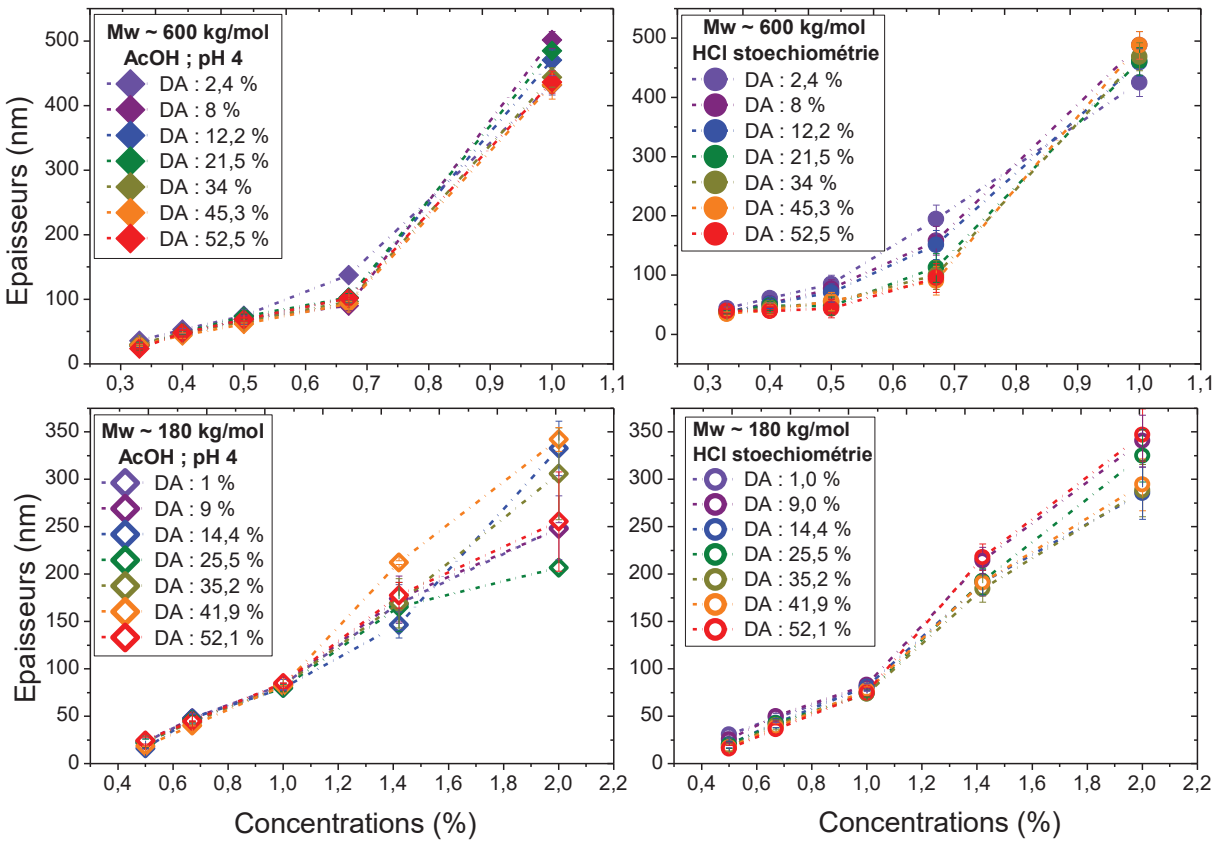
La qualité du dépôt et l'épaisseur des films minces obtenus par cette technique dépendent du solvant utilisé, de la concentration en polymère[11] et des paramètres de l'atmosphère environnante.[12]

## II. Détermination des épaisseurs des films de chitosane par ellipsométrie

Les épaisseurs des films de chitosane ont été déterminées par ellipsométrie. Cette technique repose sur le changement de polarisation de la lumière. La lumière incidente polarisée rectilignement devient polarisée elliptiquement après réflexion sur la surface. Dans cette étude, l'ellipsomètre utilisé pour les mesures est le modèle SOPRA GES-5 (Goniometer Ellipsometer Spectroscopic 5$^{th}$ generation) équipé d'une lampe à arc au xénon. L'angle d'incidence lors des mesures est fixé à 70 ° correspondant à l'angle d'incidence de Brewster du silicium. Au minimum trois mesures sont effectuées sur chaque échantillon à des endroits différents pour s'assurer de l'homogénéité des films. Les données ellipsométriques sont ensuite traitées par le logiciel d'analyse Winelli de Sopra en utilisant un modèle de Cauchy. Les ajustements ont été effectués dans l'intervalle 2 - 4,5 eV.

### II.1. Effet de la concentration et de la viscosité des solutions sur les épaisseurs

Des études approfondies ont montré que les épaisseurs des films de polymères élaborés par spin-coating sont affectées par les paramètres expérimentaux (vitesse et temps de rotation du spin-coater), les propriétés des solutions (concentration, viscosité, vitesse d'évaporation des solvants) et les paramètres environnementaux (humidité relative, température…). Différentes approches et différentes hypothèses sont utilisées dans la littérature pour expliquer la variation des épaisseurs sous l'effet des paramètres mentionnés ci-dessus.[11, 13-16] Afin de mieux comprendre la variation des épaisseurs des films obtenus dans cette étude, nous avons représenté les épaisseurs obtenues en fonction de la concentration des solutions de chitosane pour différents degrés d'acétylation et différentes masses molaires (**Figure 6**).




**<u>Figure 6</u> : Variations des épaisseurs des films de chitosanes 600 et 180 en fonction de la concentration en chitosane dans une solution aqueuse d'acide acétique et d'acide chlorhydrique.**

Les épaisseurs des films de chitosane augmentent avec la concentration en chitosane de la solution spin-coatée et varient de 25 nm à 500 nm pour le chitosane 600 et de 20 nm à 350 nm pour le chitosane 180, l'effet de l'acide utilisé (HCl ou AcOH) étant mineur. Les épaisseurs des films évoluent de manière linéaire avec la concentration en chitosane pour les faibles concentrations, c'est-à-dire des concentrations inférieures à 0,67 % et 1,42 % pour les chitosanes 600 et 180 respectivement. Au-delà de ces concentrations, on sort du domaine linéaire de la viscosité (cf **Figure 2**), ce qui explique les résultats obtenus à plus haute concentration. Cette variation linéaire entre épaisseur et concentration est en adéquation avec le modèle de Daughton et *al.*[14] Pour mieux comprendre l'effet des paramètres des solutions de chitosane sur les épaisseurs, nous avons étudié l'effet de la viscosité. Meyerhofer[15] propose un modèle dans lequel l'épaisseur dépend de la vitesse de rotation du spin-coater ($\omega$), de la viscosité de la solution ($\eta$) et de la vitesse d'évaporation du solvant ($e$) (**Équation I**):

$$h = k\omega^{-1/2}\eta_0^{1/3}e^{1/3} \propto \eta_0^{1/3} \qquad \textbf{Équation I}$$

Dans notre étude, la vitesse de rotation du spin-coater et le solvant étant fixés, nous n'avons comme seule variable que la viscosité des solutions. La variation des épaisseurs en fonction

de la viscosité (**Figure 7**) présente une pente légèrement plus grande que celle proposée par la relation de la relation de Meyerhofer.

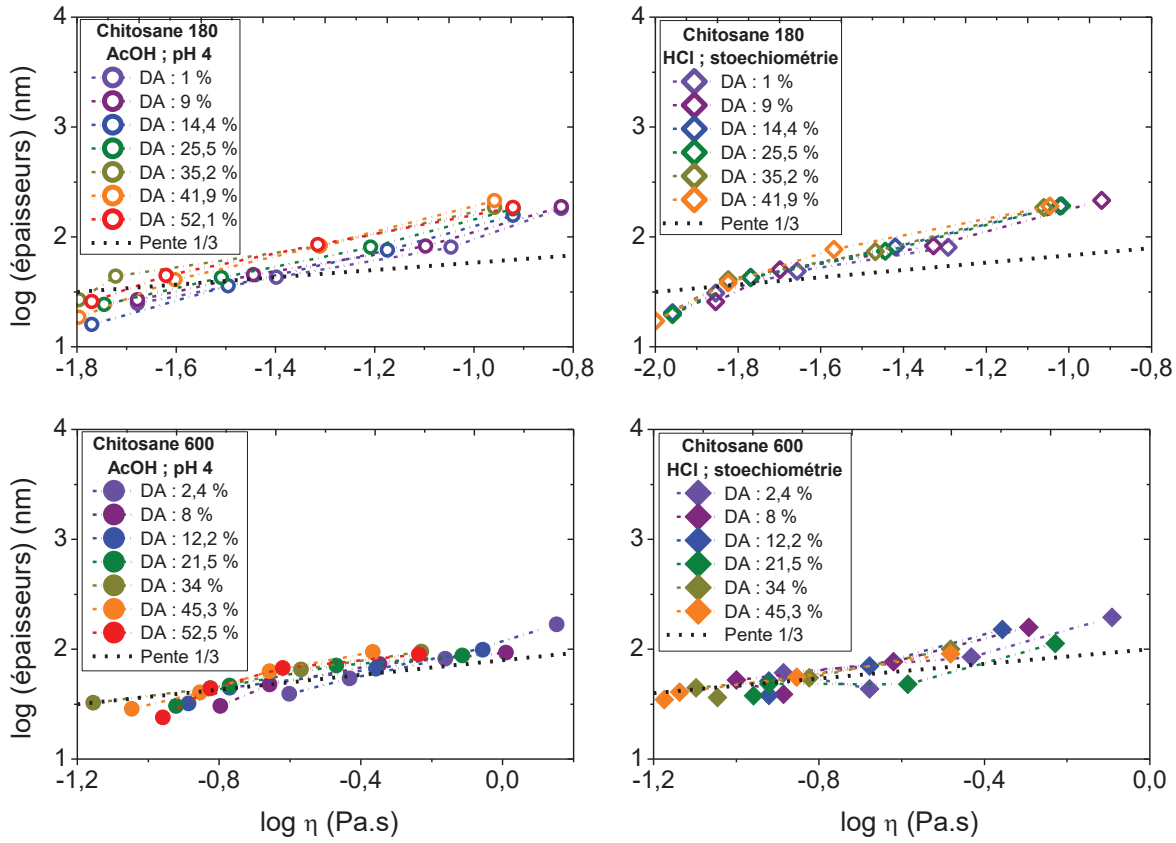



**Figure 7 : Variations des épaisseurs des films de chitosane 600 et 180 en fonction de la viscosité des solutions de chitosane dans une solution aqueuse d'acide acétique et d'acide chlorhydrique.**

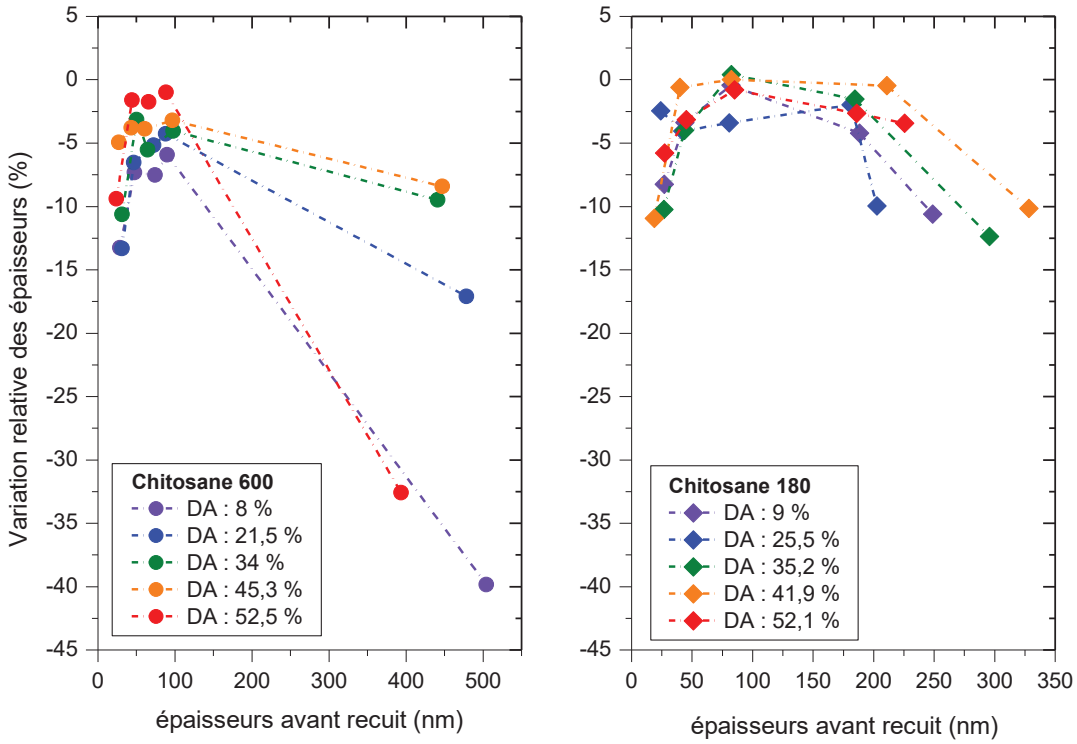
Malgré leur viscosité plus faible, les solutions de chitosane préparées avec HCl donnent des films d'épaisseurs légèrement plus grandes que les solutions préparées avec AcOH pour la même concentration en chitosane. Cela peut provenir des différences d'interaction entre les chaînes de chitosane et la surface et probablement de l'effet de la différence des forces de dissociation de AcOH et HCl sur la conformation des chaînes.

## II.2. Effet du recuit des films sur les épaisseurs

Dans le but de minimiser les effets du solvant résiduel dans les films, certains films de chitosane ont été recuits à 200 °C pendant 2 minutes après dépôt et avant caractérisations. Cette température a été choisie en référence à l'étude de l'effet de la température sur les films de chitosane effectuée par Murray et *al.*[17] Les auteurs ont effectué le recuit des films à différentes température pendant 4 h et n'ont observé par infrarouge un début de détérioration qu'au-delà de 250 °C.

La diminution relative de l'épaisseur des films de chitosane n'est pas constante. Les pourcentages des pertes d'épaisseur observés lors du recuit à 200 °C pendant 2 minutes sont représentés sur la **Figure 8**. Ces pertes pourraient s'expliquer par des différences de teneur en solvant résiduel et également par un changement de la structure des films. Trois régions différentes sont observées sur la décroissance des épaisseurs des films de chitosane.

La région I correspond aux plus faibles épaisseurs ; inférieures à 40 nm. Dans cette zone, les pertes d'épaisseur sont de l'ordre de 5 à 15 %. Ces variations peuvent être issues d'un changement de la morphologie du film et/ou d'une dégradation partielle des films de chitosane. La région II correspond aux épaisseurs comprises entre 40 nm et 200 nm. Dans cet intervalle d'épaisseur, nous observons les pertes les plus faibles aux alentours de 5 %, indépendamment du degré d'acétylation, et de la masse molaire du chitosane. La région III concerne les plus grandes épaisseurs ; supérieures à 200 et 400 nm pour les chitosanes 180 et 600 respectivement. De fortes diminutions des épaisseurs allant jusqu'à - 15 % pour le chitosane 180 et - 40 % pour le chitosane 600 sont notées dans cette région.




**<u>Figure 8</u> : Variations relatives des épaisseurs des films de chitosanes 600 et 180 en fonction de l'épaisseur initiale du film après un recuit de 2 minutes à 200 °C (films obtenus à partir d'une solution aqueuse d'acide acétique).**

## II.3. Effet du lavage des films de chitosane à l'eau acide pH 4

Dans le but de ne garder que les chaînes de chitosane adsorbées à la surface, les films de chitosane ont été lavés avec une solution aqueuse d'acide acétique à pH 4 pendant 10 minutes avant d'être séchés par de l'air sec. Après lavage, les films de chitosane perdent leurs teintes initiales qui sont liées aux épaisseurs supérieures à 40 nm et on obtient des films qui présentent la même couleur que le substrat de silicium. Les épaisseurs des films avant et après lavage sont représentées sur la **Figure 9**. Les épaisseurs des films rincés sont inférieures à 5 nm et très faibles par rapport aux épaisseurs des films avant rinçage. Par comparaison des épaisseurs des films rincés entre les deux masses molaires de chitosane, nous notons des épaisseurs légèrement plus grandes pour la plus petite masse molaire.

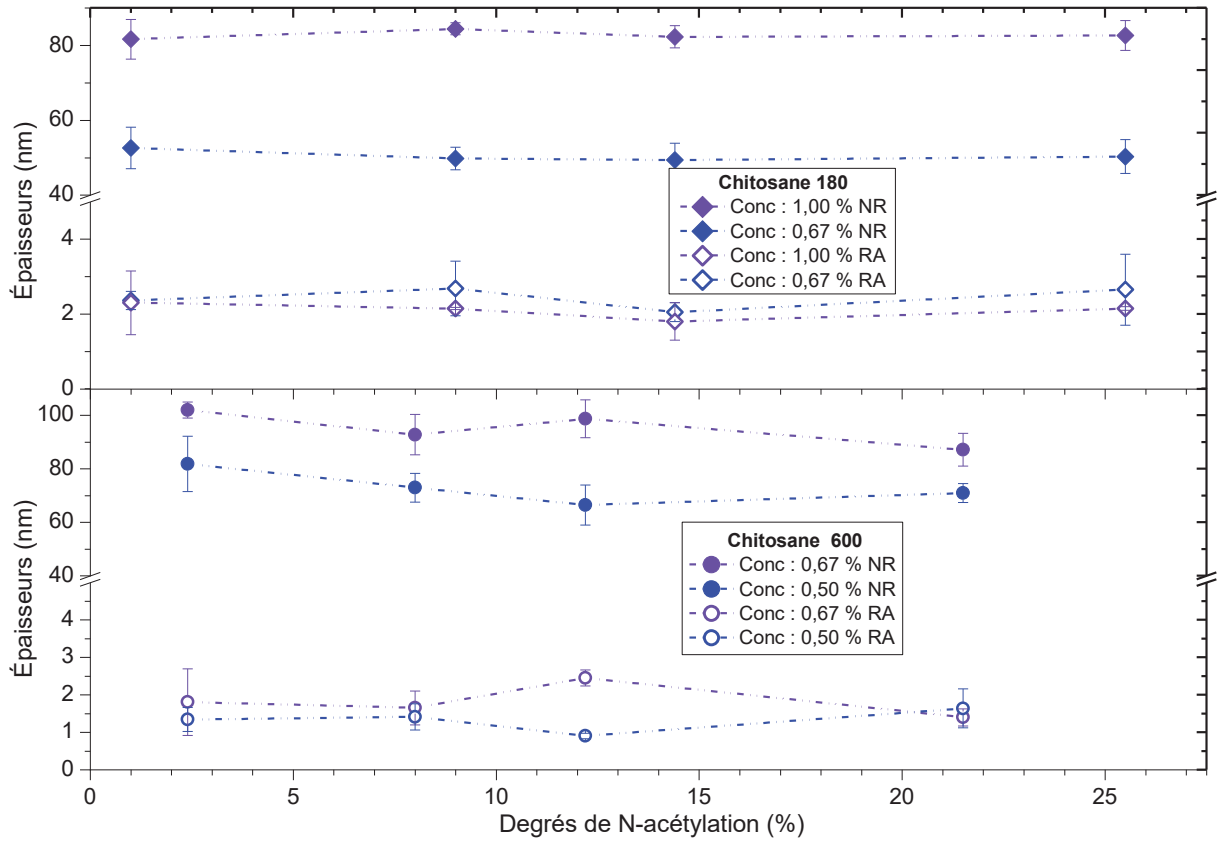



**Figure 9: Effet du lavage des films de chitosane sur l'épaisseur des films pour les chitosanes 600 et 180 (NR : films de chitosane non rincés ; RA : films de chitosane rincés par une solution aqueuse d'acide acétique pH 4 pendant 10 minutes).**

Cette différence d'épaisseur peut provenir du mode d'adsorption des chaînes de chitosane influencé par leur longueur ou de leurs conformations à la surface (queues, trains, boucles…). Pour la même masse molaire, les différences d'épaisseurs observées peuvent être expliquées par la répartition des chaînes à la surface qui doit être probablement inhomogène à l'échelle nanométrique.

## III. Etude de la mouillabilité des films de chitosane

L'étude du comportement d'une goutte de liquide en contact avec la surface d'un matériau renseigne sur plusieurs phénomènes comme illustré sur la **Figure 10** et permet d'avoir accès à plusieurs propriétés physicochimiques (mouillabilité, tension de surface, polarité…). Ces propriétés directement liées aux aspects chimiques et structurels de la surface permettent d'expliquer les propriétés d'interaction de la surface. Dans le domaine biomédical, elles sont largement utilisées pour comprendre ou corréler l'interaction des cellules bactériennes avec les biomatériaux. Ces propriétés peuvent être modulées par des modifications chimiques de la structure du polymère ou par des traitements spécifiques de la surface pour être adaptées à des applications précises.

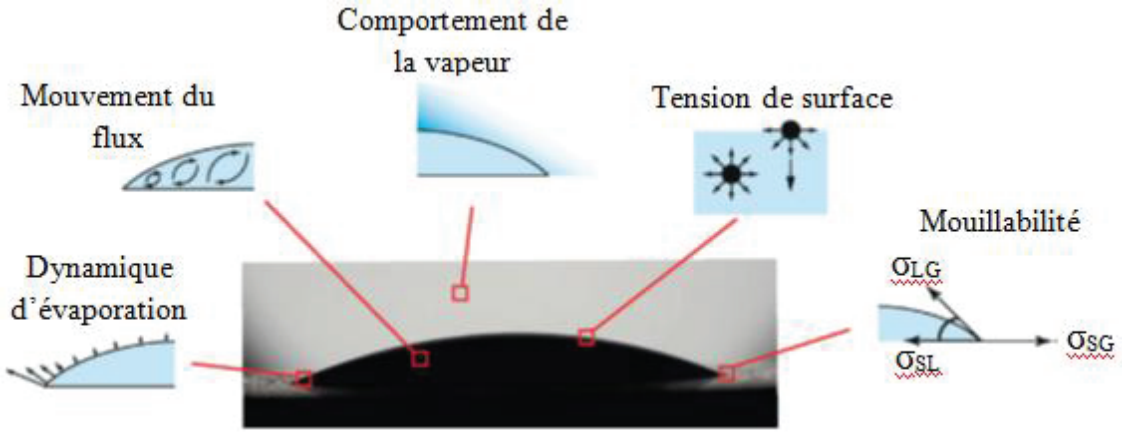



**Figure 10 : Quelques propriétés tirées du comportement d'une goutte de liquide en contact avec une surface.**[18]

### III.1. Technique de détermination des propriétés de mouillabilité

L'angle de contact est l'angle formé par la tangente de la goutte liquide déposée et le plan de la surface à la ligne de contact triple (**Figure 11**). Les mesures des angles de contact ont été effectuées à l'aide d'un tensiomètre optique de marque KRUSS. Cet appareil est doté d'une caméra permettant de visualiser la goutte du liquide sonde sur la surface et d'un logiciel Easy Drop permettant de mesurer l'angle à gauche et à droite de la goutte déposée. Le volume de la goutte déposée lors des mesures est de 1 µL. Ce volume de la goutte détachée de l'aiguille suit la loi de Tate (**Équation II**). Deux liquides sondes ont été utilisés pour les mesures : l'eau permutée milli-Q et une solution aqueuse d'acide acétique à pH 4 (solution utilisée pour dissoudre le chitosane). Pour des raisons de stabilité de la goutte déposée, les valeurs des angles de contact sont prises 10 secondes après le dépôt de la goutte. Des mesures d'angle de

contact en fonction du temps de vieillissement des films de chitosane ont été effectuées. A chaque fois, quatre mesures sont effectuées à différents endroits de la surface.

$$V = \frac{2\pi\gamma a}{\rho g} \qquad \textbf{Équation II}$$

Avec $\gamma$ : la tension de surface du liquide, $a$ : le rayon de l'orifice de l'aiguille, g : accélération de la pesanteur et $\rho$ : la masse volumique du liquide.

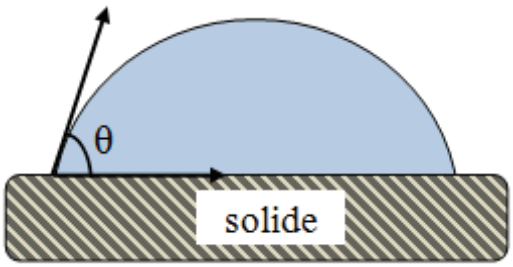



**Figure 11 : Angles de contact d'une goutte liquide déposée sur une surface.**

La mouillabilité d'une surface peut dépendre fortement de l'échelle de sa rugosité. Cependant, dans notre cas, les films étant très lisses (cf. **Chapitre. III, Section I**), cette rugosité n'est pas susceptible d'influer sur les propriétés de mouillabilité.[19, 20]

Les tensions et les polarités de surface des films de chitosane ont été déterminées par la méthode de la goutte. Du fait des fortes interactions entre la goutte d'eau et les films de chitosane (solubilisation du polymère dans certains cas), les tensions de surface ont été mesurées en utilisant le diiodométhane et l'éthylène glycol comme liquides sondes. Les propriétés de ces deux liquides sont résumées dans le **Tableau 2**.

| | Énergie de surface ($mJ/m^2$) | Composante polaire ($mJ/m^2$) | Composante apolaire ($mJ/m^2$) |
|---|---|---|---|
| Diiodométhane | 50,80 | 0 | 50,80 |
| Éthylène glycol | 47,70 | 16,80 | 30,90 |

**Tableau 2 : Energies de surface des liquides sondes utilisées pour évaluer les énergies de surface des films de chitosane.**

Dans cette étude, la méthode d'Owens-Wendt décrite par l'équation ci-dessous a été utilisée pour déterminer la tension et la polarité des films. Cette méthode donne accès aux composantes polaire et apolaire (ou dispersive) de la tension de surface $\gamma_s$ ($\gamma_s = \gamma_s^p + \gamma_s^d$).

$$(1 + \cos\theta_i)\gamma_i = 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_i^d} + 2\sqrt{\gamma_s^p \gamma_i^p} \qquad \textbf{Équation III}$$

Où $\gamma_i$, $\gamma_i^d$ et $\gamma_i^p$ sont respectivement la tension de surface totale, la composante dispersive et la composante polaire de la tension de surface totale des liquides sondes.

La polarité de surface des films est déduite de la tension de surface des films par la relation suivante :

$$P\,(\%) = \frac{\gamma_S^P}{\gamma_S} \times 100 \qquad \textbf{Équation IV}$$

### III.2. Notions de « pinning » et de « tache de café »

Pour bien décrire les propriétés de mouillabilité des surfaces, il est important de tenir compte de l'effet de l'évaporation de la goutte sur celle-ci. Ce phénomène est largement étudié dans la littérature[21-27] aussi bien sur le plan expérimental que sur le plan théorique. Une goutte d'eau de rayon *R* déposée sur une surface s'évapore lentement jusqu'à son assèchement complet. Cette évaporation au cours du temps à l'intérieur de la goutte, induit des flux de convection qui dépendent de la distance *r* du centre de la goutte aux solutés (**Figure 12**).
Ces flux de convection divergent aux bords de la goutte ($r = R$) entraînant ainsi un flux de matière du centre de la goutte vers la ligne de contact triple pour compenser l'évaporation subie (**Figure 12**). Ce phénomène dure jusqu'à l'assèchement complet de la goutte occasionnant ainsi la formation de la « tâche de café ». La formation de la « tâche de café » dépend du sens de la mobilité de la ligne de contact triple, du mode d'évaporation, des interactions entre la surface, le solvant et le soluté[28-30] et du caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface.

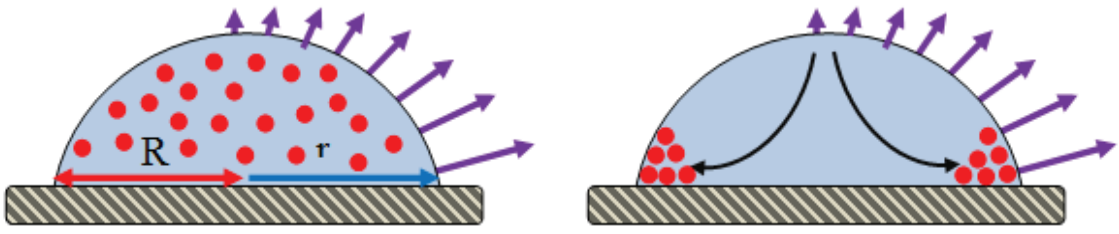



**Figure 12 : Phénomène de pinning dans une goutte déposée sur une surface**

La nature des fluides (biologiques, colloïdaux, ioniques…), leurs compositions et leurs propriétés rhéologiques conduisent à des modes d'évaporation différents et donc à des « tâches de café » de morphologies différentes.[31, 32] L'étude de l'évaporation d'une goutte de

polymère (**Figure 13**) par Kajiya et *al* montre des morphologies totalement différentes au séchage de la goutte.[31]

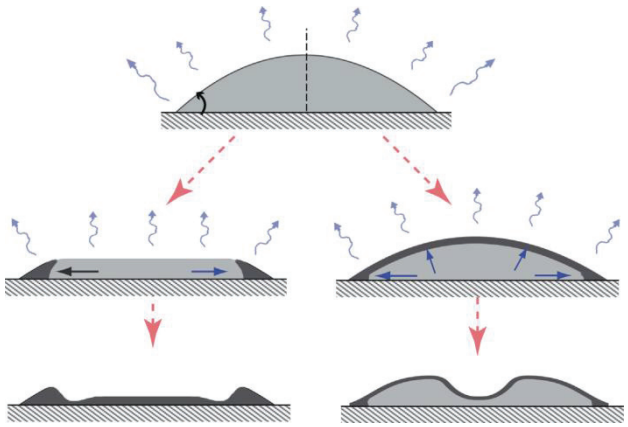
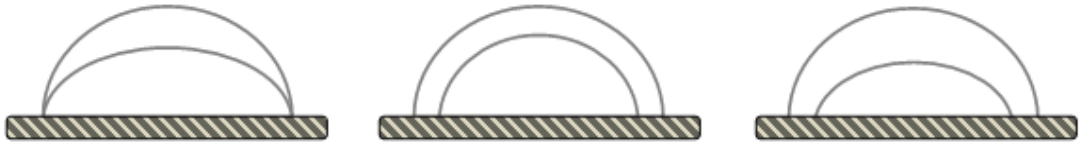


**Figure 13 : Différences de morphologies après séchage d'une goutte de polymère sur une surface.**

Trois modes distincts d'évaporation de la goutte sont décrits par Mollaret et *al*.[21] Le premier mode (**Figure 14.A**) est décrit comme un régime d'évaporation à diamètre de base de la goutte constant. Dans ce régime, le diamètre de base de la goutte reste constant tandis que la goutte d'eau s'évapore occasionnant ainsi la diminution de l'angle de contact. Dans le second régime (**Figure 14.B**), le diamètre de base de la goutte se rétracte mais l'angle de contact reste constant. Ce phénomène est observé sur les surfaces idéales et s'explique par la non-perturbation de l'équilibre de la goutte lors du déplacement de la ligne de contact triple. Dans le troisième régime considéré comme un régime mixte (**Figure 14.C**), une évaporation à diamètre de base constant succède à une diminution de l'angle de contact. Au fur et à mesure de cette évaporation, les forces de Young agissant sur la ligne de contact triple provoquent un « dé-pinning » de la goutte et par conséquent une diminution du diamètre de base de la goutte.



(A) Régime à diamètre de base constant

(B) Régime à angle de contact constant

(C) Régime mixte

**Figure 14 : Différents régimes de variation de l'angle de contact d'une goutte en contact d'une surface au cours du temps.**

### III.3. « Tache de café » et stabilité de la goutte sonde sur les films de chitosane

Les gouttes des liquides sondes (l'eau et une solution aqueuse d'acide acétique à pH 4) utilisés pour étudier les propriétés de mouillabilité des films de chitosane conduisent à des empreintes différentes après séchage de la goutte par évaporation. Ces morphologies dépendent de la nature du solvant utilisé pour former le film de chitosane, du pH du liquide sonde, du degré d'acétylation du chitosane et de l'épaisseur du film (voir **Figure 15**). Après le séchage de la goutte d'eau sur les films de chitosane formés avec l'acide acétique, deux types de morphologies apparaissent : à bas DA, un anneau très fin indiquant la marque de la goutte est observé à la ligne de contact triple, ce qui indique que le film ne s'est pas solubilisé. Aux DA plus élevés (proches de 50 %), une solubilisation partielle du film est observée. Contrairement aux films obtenus avec AcOH, la goutte d'eau solubilise tous les films obtenus avec HCl à tous les DA. Cependant, l'acide acétique à pH 4 entraîne une solubilisation partielle du film de chitosane formés avec AcOH à tous les DA. Ces comportements de la goutte d'eau sur les films formés avec AcOH sont liés aux propriétés de solubilité du chitosane. La goutte d'eau ne solubilise pas les films de chitosane de bas DA formés avec l'acide acétique alors qu'elle solubilise les films formés avec HCl ; ceci peut s'expliquer par la neutralisation du chitosane par évaporation de l'acide acétique. Ce phénomène de non solubilisation ne se produit pas sur les films secs formés à partir de solutions d'acide chlorhydrique, le chitosane étant sous forme polyélectrolyte soluble. Pour un DA donné, nous avons observé un changement de morphologie de l'empreinte de la goutte d'eau sur les films avec AcOH. En effet, aux faibles épaisseurs, la trace de la goutte est moins marquée tandis que celle-ci devient de plus en plus nette avec l'augmentation de l'épaisseur. Ces différences de morphologies des empreintes de la goutte entre les films de faibles épaisseurs et les films aux épaisseurs élevées peuvent être dues à des ruptures à l'intérieur du film qui proviendraient du gonflement-dégonflement des films dans le cas des épaisseurs élevées.

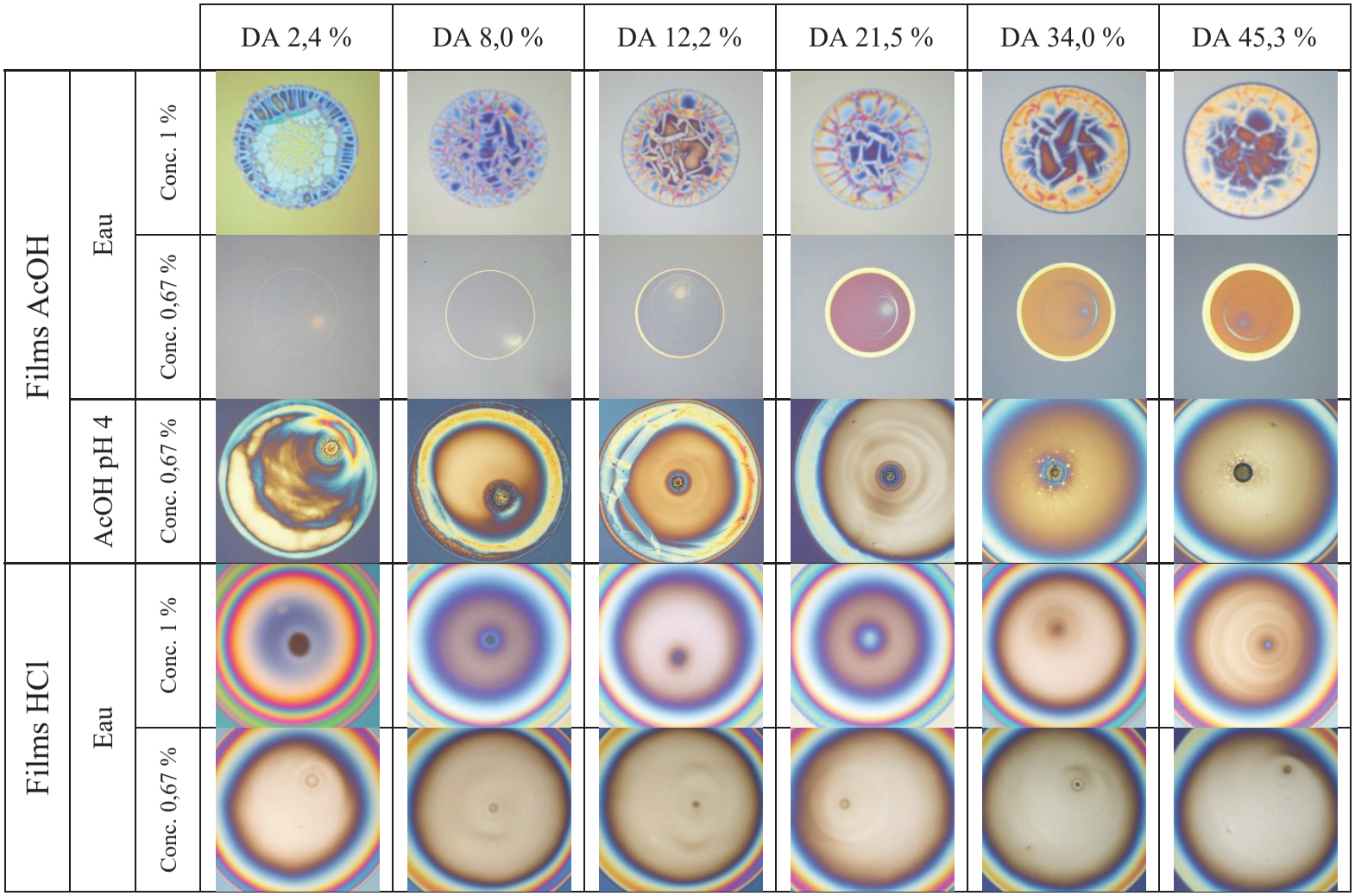
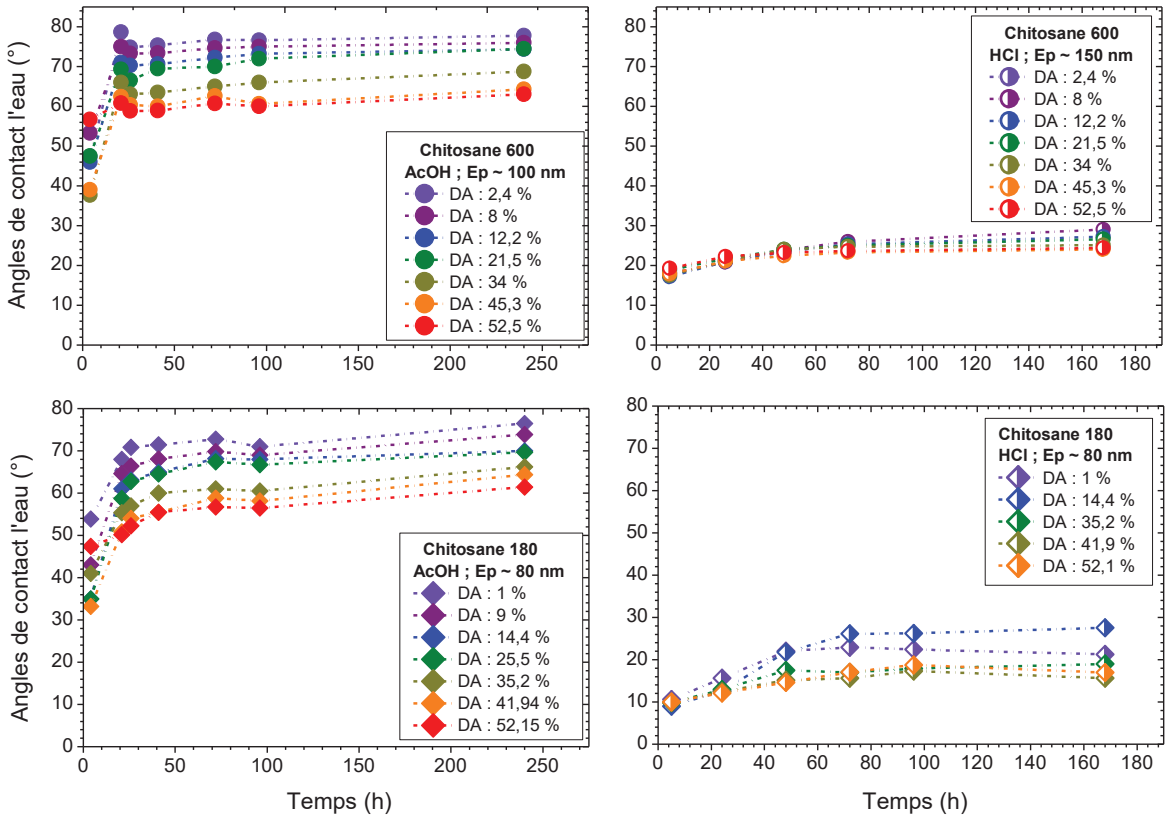



**Figure 15 : Images par microscopie optique de la trace des liquides sondes utilisées pour l'étude de la mouillabilité sur les films du chitosane 600.**

## III.4. Détermination des angles de contact en fonction du vieillissement des films

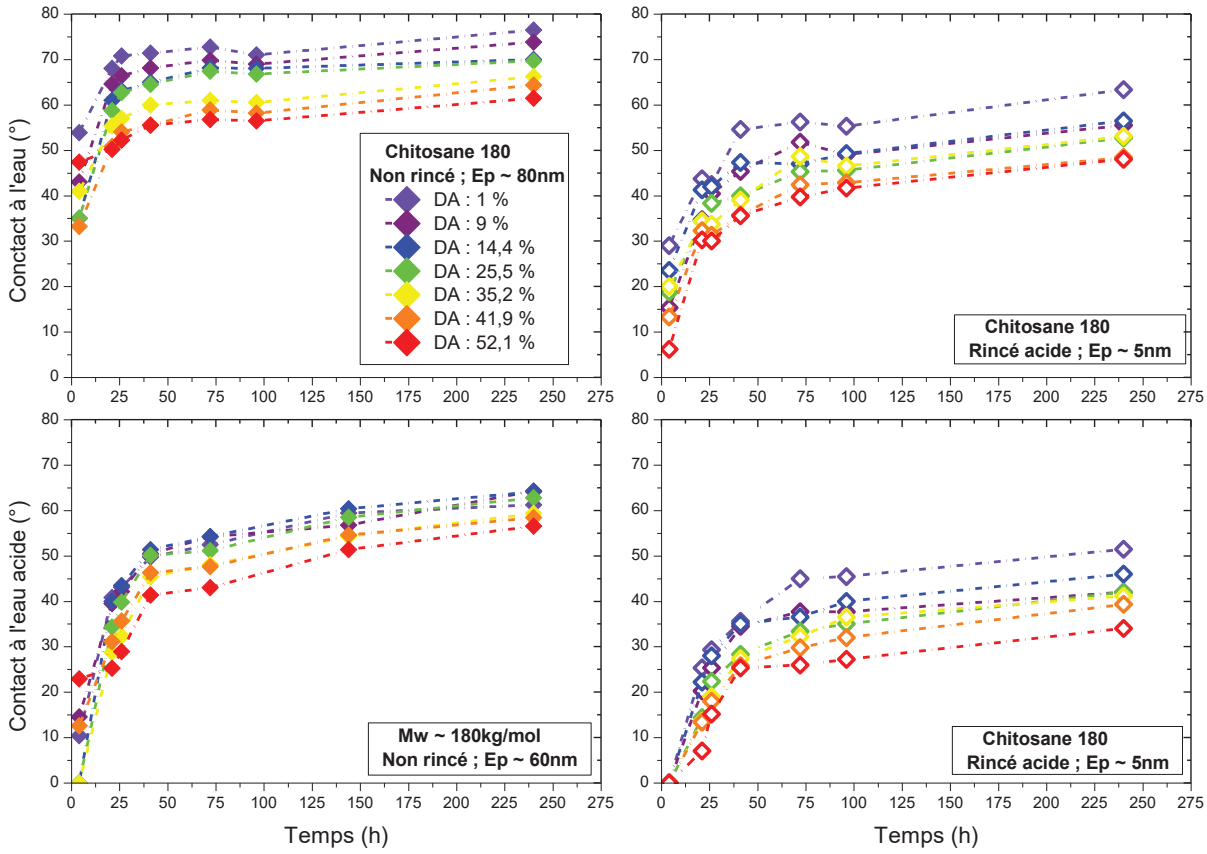
### III.4.1. Films non rincés

Les mesures d'angle de contact permettent de caractériser la mouillabilité des films de chitosane, leur sensibilité au pH, l'interaction entre les liquides sondes et les films (gonflement et solubilisation locale des films de chitosane). Les angles de contact évoluent au cours du temps et deviennent stables 24 h après la préparation des films formés avec AcOH. Ces mesures en fonction du vieillissement des films de chitosane ont pour but de comprendre les évolutions qui se produisent dans les films en fonction du temps. Cette évolution pourrait provenir de la neutralisation lente du chitosane par évaporation de l'acide acétique ou de la réorganisation des chaînes de chitosane au cours du temps. Pour les films formés avec HCl, cette neutralisation ne se produit pas, le chitosane reste sous forme ionisée et très soluble.[33] L'augmentation des angles de contact en fonction du temps sur les films avec HCl peut être due à une réorganisation des chaînes. Par comparaison, les angles de contact sont largement plus grands sur les films obtenus avec AcOH par rapport aux angles mesurés sur les films obtenus avec HCl (**Figure 16**). Cette différence s'explique par le fait que les films formés avec HCl restent plus hydrophiles, ce qui favorise l'étalement de la goutte. Des études par analyse thermogravimétrique confirment ce résultat : elles ont montré que les films de chitosane formés avec HCl sont plus hygroscopiques que les films formés avec AcOH. En effet, des films de chitosane obtenus avec HCl portés à une température de 130 °C voient leurs liaisons formées avec l'eau se rompre mais après refroidissement à température ambiante, les films récupèrent la quantité d'eau perdue.[33] Ces variations des angles de contact en fonction du temps suggèrent un effet prédominant de la neutralisation du chitosane pour les films formés avec AcOH tandis que pour les films formés avec HCl, le phénomène hygroscopique des films est persistant, ce qui signifie que la neutralisation n'intervient pas ou très peu.




**<u>Figure 16</u> : variations des angles de contact à l'eau en fonction du vieillissement des films de chitosanes 600 et 180 non rincés préparés avec AcOH et HCl pour différents degrés d'acétylation.**

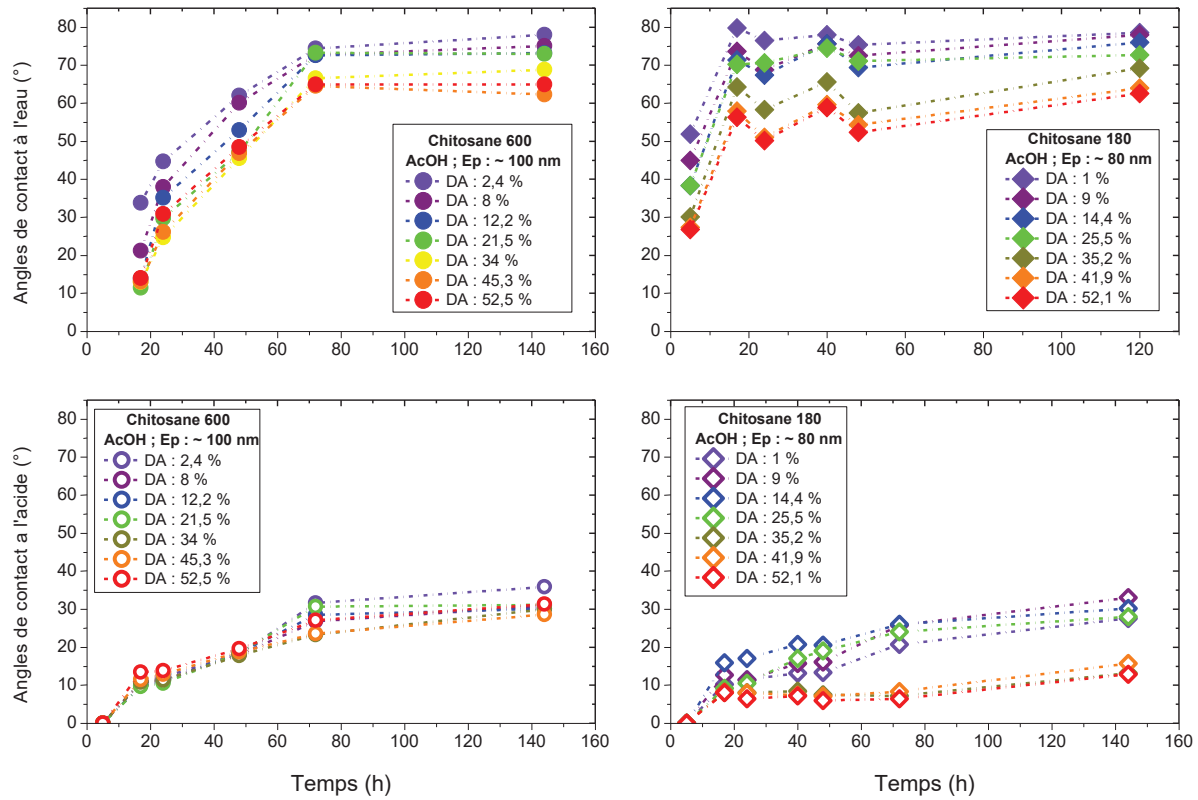
Nous avons étudié l'effet d'un pH acide du liquide sonde sur les films de chitosane. Comme les films formés avec HCl sont solubles dans le liquide sonde neutre, cette étude a été effectuée seulement sur les films obtenus avec AcOH. Les résultats de cette étude présentent une tendance similaire avec les angles de contact à l'eau sur les films formés avec AcOH mais avec des valeurs d'angles plus petites dues à l'affinité plus grande du chitosane pour les solutions aqueuses acides qui le dissolvent quel que soit le DA (**Figure 17**). A l'image des angles de contact à l'eau, ces angles changent légèrement 24 h après la préparation des films. Néanmoins, ces angles sont plus élevés que ceux obtenus avec l'eau sur les films formés avec HCl. Il est probable que l'hydratation d'un film de chitosane neutre qui s'ionise au fur et à mesure de sa dissolution soit moins efficace que l'hydratation d'un film de chitosane sous sa forme polyélectrolyte.




**<u>Figure 17</u> : Comparaison des angles de contact à l'eau et avec la solution aqueuse d'acide acétique pH 4 en fonction du vieillissement des films de chitosane 180 rincés et non rincés obtenus avec AcOH (le code couleur est le même sur les 4 graphes de la figure).**

### III.4.2. Films recuits et neutralisés

Les propriétés physicochimiques du chitosane sont fortement liées à ses paramètres structuraux et moléculaires et peuvent être modulées par des méthodes de formulation ou des prétraitements comme la neutralisation par exemple. Dans cette étude, les films de chitosane ont été neutralisés par voie vapeur par une solution aqueuse d'ammoniaque à 1 % (v/v). Les films sont au préalable recuits à 200 °C pendant 2 min pour accélérer l'évaporation du solvant. Les films recuits sont ensuite placés dans un dessiccateur en présence de la solution aqueuse d'ammoniaque pendant 1 h. En milieu aqueux AcOH, les groupes amine du chitosane sont protonés (pKa entre 6,1 et 6,4).[34, 35] Après neutralisation, les films de chitosane retrouvent leurs groupes amine libres. Les propriétés de mouillabilité en fonction du vieillissement des films neutralisés ont été déterminées afin de voir l'effet de la neutralisation et pouvoir apporter une comparaison avec les films formés avec AcOH. Dans ce but, les angles de contact à l'eau et à la solution aqueuse d'acide acétique pH 4 ont été mesurés en fonction du temps. Les résultats obtenus sont représentés sur la **Figure 18**.




**<u>Figure 18</u> : Angles de contact à l'eau et avec la solution aqueuse d'acide acétique pH 4 sur les films de chitosanes 600 et 180 neutralisés en fonction de leur vieillissement pour différents degrés d'acétylation.**

Malgré la neutralisation, les angles augmentent avec le temps avant de devenir stables 24 h après leur préparation et leur neutralisation. Ce phénomène suggère l'importance des effets de réorganisation des chaînes de chitosane en plus des effets de neutralisation des films sur les angles de contact avant les 24 h. Au-delà des 24 h, la stabilité des angles est due à la stabilité structurale des films, autrement dit, à la neutralisation et à la réorganisation des films. Des valeurs d'angle de contact similaires ont été trouvées par Noriega and *al*,[35] sur des films de chitosane neutralisés avec des solutions aqueuses de NaOH à différentes concentrations et à différents temps de neutralisation. Par comparaison avec les films formés avec AcOH non recuits et « non neutralisés » avec les vapeurs d'ammoniaque, on retrouve des valeurs légèrement différentes. Ceci suggère une neutralisation des films avec l'acide acétique au cours du temps. Ce résultat est confirmé par spectroscopie infrarouge (voir **Chapitre. III, Section II**).

### III.4.3. Films lavés avec une solution aqueuse d'acide acétique pH 4

Les films de chitosane obtenus après spin-coating sont lavés avec la solution aqueuse d'acide acétique à pH 4 ayant servi à la solubilisation du chitosane pendant 10 minutes. Le but de ce

rinçage est de ne garder sur le substrat de silicium que les chaînes de chitosane fortement adsorbées. De façon à mettre en évidence la présence du chitosane sur les surfaces rincées, en raison des faibles épaisseurs des films et de l'absence de couleur sur les surfaces rincées avec la solution aqueuse d'acide acétique à pH 4, les mesures d'angle ont été effectuée à la fois sur les surfaces rincées et sur un substrat nettoyé au piranha et placé dans l'enceinte UV. Les angles de contact obtenus sur ces films sont représentés sur la **Figure 19**. Les angles de contact à l'eau et à la solution aqueuse d'acide acétique pH 4 pour le substrat de silicium sont très bas et évoluent avec le temps. Ce caractère hydrophile du substrat de silicium nettoyé au piranha est lié à la présence des groupes silanol à la surface du substrat. La dépendance temporelle et la faible augmentation des angles sont expliquées par la lente condensation des fonctions silanol en fonctions siloxane à la surface du substrat. Par comparaison, les angles de contact sur les films rincés sont largement plus grands que sur le substrat nettoyé au piranha. A l'instar des films non rincés, les films rincés présentent des angles qui augmentent au cours du temps et qui deviennent stables à partir 24 h après la préparation.

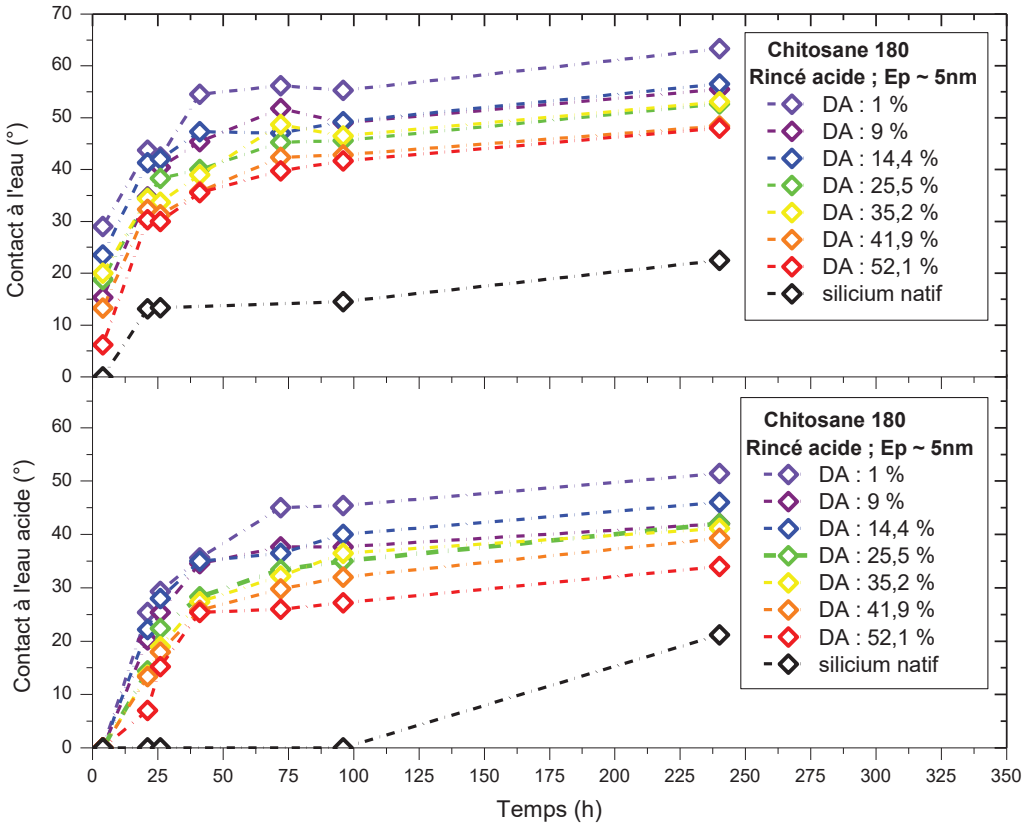



**Figure 19 : Angles de contact à l'eau et avec la solution aqueuse d'acide acétique pH 4 sur les films de chitosane 180 rincés avec la solution aqueuse d'acide acétique pH 4 pendant 10 minutes. Pour comparaison, les mesures ont également été effectuées sur le substrat de silicium nu nettoyé au piranha et placé dans l'enceinte UV pendant 15 minutes.**

Aussi bien pour l'eau que pour la solution aqueuse d'acide acétique à pH 4, les angles de contact sur les films adsorbés diminuent avec l'augmentation du degré d'acétylation. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Foster et *al*.[36] Cette décroissance des angles peut être reliée aux propriétés du chitosane en solution. La solubilité du chitosane en milieu aqueux pur dépend du degré d'acétylation : il devient plus soluble quand le degré d'acétylation augmente et tend vers les DA proches de 50 % du fait du déplacement de la balance hydrophile/hydrophobe. Cependant, certains auteurs ont observé une tendance inverse ou un manque de tendance en fonction du degré d'acétylation.[37, 38] Ces différences de tendance peuvent provenir de la source du chitosane, de la distribution statistique ou aléatoire des motifs acétylés le long de la chaîne principale du chitosane qui peut avoir une influence sur les propriétés cristallines, de la technique d'élaboration des films de chitosane, de la nature du substrat qui sont susceptibles d'impacter les résultats des mesures.

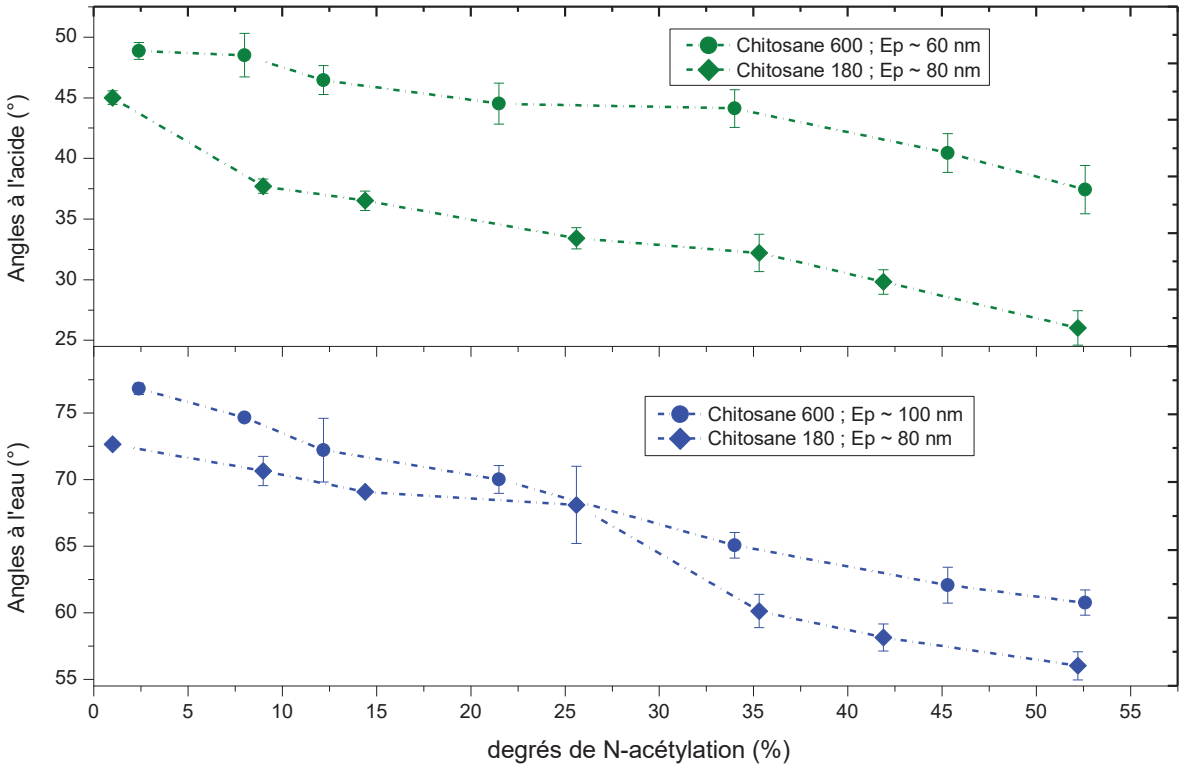
## III.5. Détermination des angles de contact statiques

L'étude de l'effet du vieillissement des films de chitosane sur les angles de contact ayant montré qu'il n'évoluaient plus à partir de 24h après leur préparation, les angles de contact statiques ont été déterminés 24 h après la préparation des films afin de s'assurer de leur stabilité ou de la minimisation de l'effet de la réorganisation des chaînes à la surface.

### III.5.1. Effet du degré d'acétylation

On retrouve dans la littérature différentes variations des angles de contact en fonction du DA sur des films de chitosane. Dans leur étude, Foster et *al*.[36] ont observé une diminution des angles de contact avec l'augmentation du DA. Tomihata et *al*.[37] quant à eux ont obtenu des angles de contact qui augmentent avec le DA. Cependant, Wenling et *al*.[38] n'ont pas observé de tendance sur la variation des angles de contact en fonction du DA. Dans notre étude, nous avons observé pour différentes masses molaires de chitosane une décroissance des angles de contact avec l'augmentation du DA (**Figure 20**). Ce phénomène peut relever des propriétés d'absorption et d'adsorption de l'eau par le chitosane en fonction de son DA. Ces propriétés sont attribuées dans la littérature[39, 40] à la densité des groupes amine et acétyle sur la chaîne principale du chitosane. Blair et *al*.[39] relient ce phénomène au pourcentage de groupes acétylé : plus le nombre de groupes acétylé diminue (*ie* plus le DA diminue), moins le chitosane est hydrophile. En effet, les auteurs ont observé dans leur étude sur des films de chitosane neutralisés avec une solution aqueuse de NaOH, un regain d'humidité des films qui diminue avec la diminution du DA. Des résultats similaires ont été observés par Nakajima et

*al.*[40] qui expliquent ce phénomène par la densité de groupes amine sur la chaîne principale. En effet, ils ont constaté que plus le nombre de groupes amine présents sur la chaîne augmente (*ie* plus le DA est petit), plus le regain d'humidité des films diminue. Beccera et *al,* sur leur étude de gonflement des films de chitosane neutralisés séparément dans des solutions de NaCl et de PBS, ont observé une augmentation du gonflement avec l'augmentation du DA. Ils attribuent ce phénomène au comportement anhydre et hydraté de la microstructure cristalline du chitosane en rapport avec son DA.[41] Les angles de contact sur les films formés avec HCl sont très similaires et ne présentent pas une tendance claire en fonction du DA (**Figure 16**).




**<u>Figure 20</u> : Angles de contact statiques à l'eau et avec la solution aqueuse d'acide acétique pH 4 obtenus 72 h après la préparation avec AcOH des films de chitosanes 600 et 180 en fontion du degré d'acétylation.**

### III.5.2. Effet de la masse molaire du chitosane

La masse molaire des chaînes de polymère étant souvent un paramètre impactant les propriétés des matériaux, nous avons décidé d'étudier son effet sur les paramètres physicochimiques des films de chitosane (angles de contact, tensions et polarités de surface). Pour ce faire, des films de chitosane d'épaisseurs très similaires ont été préparés pour les deux masses 600 et 180, et pour les deux solutions acides (AcOH et HCl). Les épaisseurs des films obtenus sont reportées sur la **Figure 21**.

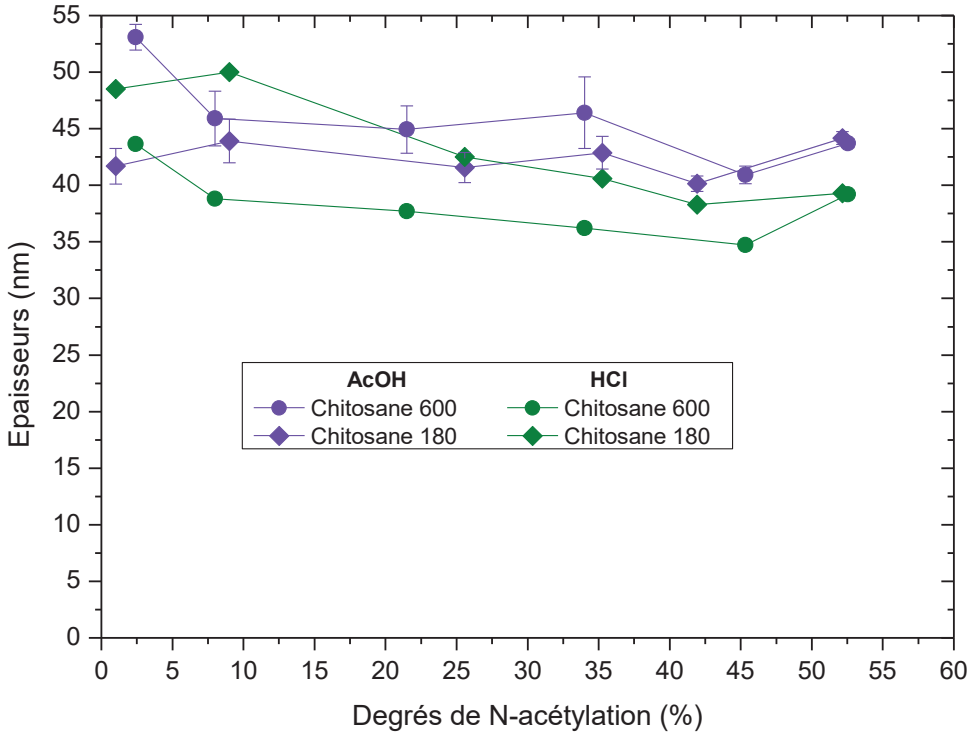



**Figure 21 : épaisseurs des films des chitosanes 180 et 600 préparés avec AcOH et HCl et utilisés pour étudier l'effet de la masse molaire.**

Les angles de contact ont été déterminés 24 h après la préparation des films. Les résultats des mesures d'angles de contact obtenus sont représentés sur la **Figure 22**.

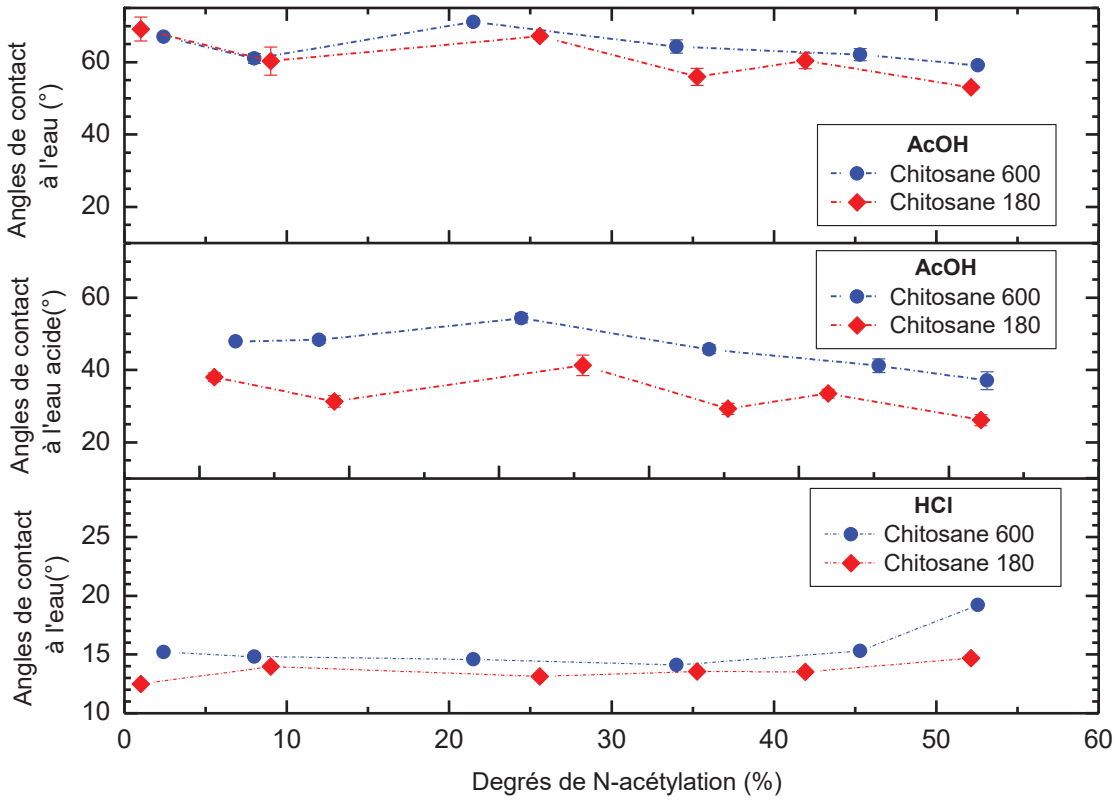



**Figure 22 : Comparaison des angles de contact à l'eau et avec la solution aqueuse d'acide acétique pH 4 en fonction du degré d'acétylation sur des films de chitosane 600 et du chitosane 180 (épaisseurs très proches (cf Figure 21).**

A un DA donné, les angles de contact à l'eau sur les films préparés avec AcOH sont légèrement plus grands sur le film avec la plus grande masse molaire. Ce résultat peut être relié à la différence du nombre d'enchevêtrements par chaîne de chitosane à la surface du substrat. Le nombre d'enchevêtrements étant d'autant plus grand que la masse molaire est élevée, le gonflement du film formé avec la plus grande masse est ralenti, ce qui limite la proportion d'eau dans le film. Cependant, le rapport entre les longueurs des chaînes des deux masses molaires étant petit (de l'ordre de 3), cette tendance peut également provenir de la nature visqueuse de la goutte liquide après la solubilisation partielle du film de chitosane. En effet, à masse molaire élevée, la solubilisation partielle du film conduit à une goutte liquide plus visqueuse qui s'étale moins rapidement que dans le cas des films à faible masse. Cependant, les angles de contact à l'eau sur les films obtenus avec HCl ne présentent pas de différence pour les deux masses molaires. En parallèle, des mesures d'angles de contact avec la solution aqueuse de AcOH à pH 4 sur les films préparés avec AcOH ont été effectuées. Les résultats montrent une tendance similaire avec les angles de contact à l'eau mais présentent pour un DA donné une différence d'angle plus marquée d'environ 10 ° entre les deux masses molaires. Cet écart des angles de contact à la solution aqueuse d'acide acétique entre les films des deux masses molaires s'explique par la solubilisation plus nette des films par l'eau acidifiée et par conséquent la nette différence du caractère visqueux de la goutte liquide déposée sur les films des deux masses.

### III.5.3. Effet des épaisseurs des films de chitosane

L'effet des épaisseurs des films de chitosane sur leurs mouillabilités a été également étudié. Pour cela, les angles de contact ont été mesurés sur des films d'épaisseurs différentes préparés par dissolution du chitosane d'une part dans AcOH et d'autre part dans HCl. Aucun effet des épaisseurs sur les angles de contact à l'eau des films préparés avec AcOH n'a été observé (cf. **Figure 23**). Cela suggère que les angles de contact à l'eau ne sont dus qu'aux propriétés moléculaires du film de chitosane. Cependant, les angles de contact à l'eau obtenus sur les films préparés avec HCl augmentent légèrement mais significativement avec l'épaisseur. La goutte d'eau solubilisant localement les films formés avec HCl, cette tendance peut provenir du ralentissement du déplacement de la ligne de contact triple lorsque les épaisseurs augmentent. Cette même tendance est observée avec les angles de contact à la solution aqueuse de AcOH à pH 4 et peuvent s'expliquer par les mêmes raisons. Les angles de contact à l'eau et à la solution aqueuse de AcOH à pH 4 obtenus avec AcOH présentent des différences assez marquées. En effet, les angles de contact sur les films non rincés présentent

des valeurs largement plus grandes que celles mesurées sur les films rincés avec la solution aqueuse de AcOH à pH 4 (**Figure 19** et **Figure 23**). Cela prouve la contribution des interactions liquide-substrat sur la valeur des angles de contact.

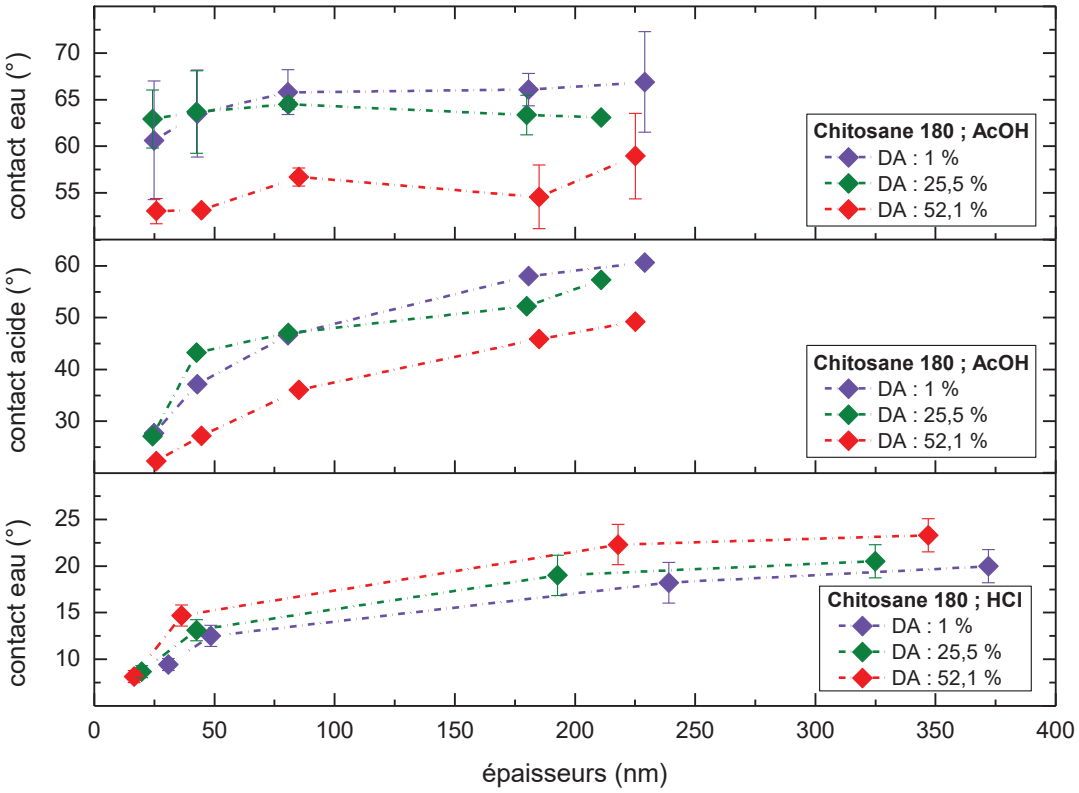



**Figure 23 : effet des épaisseurs des films de chitosane 180 préparés avec AcOH et HCl sur les angles de contact statiques à l'eau et avec la solution aqueuse d'acide acétique pH 4.**

## IV. Etude de l'hystérèse de contact des films de chitosane

L'hystérèse de contact se définit comme la différence entre l'angle de contact à l'avancée et l'angle de contact au retrait de la goutte liquide. Les angles de contact à l'avancée et au retrait de la goutte sont obtenus respectivement par gonflement de la goutte jusqu'à atteindre l'angle maximal et par retrait de la goutte jusqu'à atteindre l'angle minimal (**Figure 24**).

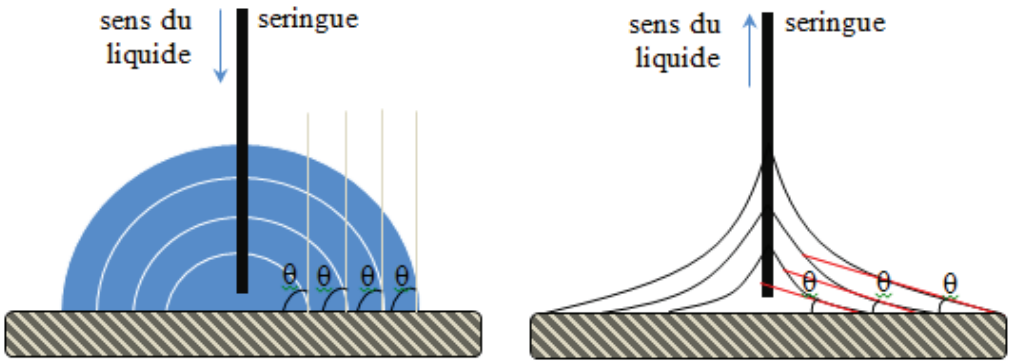



**Figure 24: Mesure de l'hystérèse d'angle de contact (à gauche : angle à l'avancée, à droite : angle au retrait).**

Les mesures de l'hystérèse de contact ont été effectuées à une vitesse de 12 µL/min lors du dépôt et du retrait de la goutte d'eau. Le volume total de la goutte à déposer a été fixé à 30 µL. Les angles de contact ont été mesurés toutes les secondes.

Selon les paramètres influençant l'hystérèse de contact, celui-ci est classé en deux catégories ; l'hystérèse thermodynamique et l'hystérèse cinétique. Les sources de l'hystérèse de contact thermodynamique sont la rugosité et l'hétérogénéité de la surface tandis que l'hystérèse de contact cinétique provient de la déformation de la surface, de la pénétration du liquide dans le film, de la mobilité ou de la réorientation des chaînes à la surface du film.

Lors des mesures de l'hystérèse de contact, les caractères des films de chitosane (lisses, homogènes et hydrophiles) n'ont permis que la détermination des angles de contact à l'avancée. Ce phénomène vient du fait que les angles au retrait sont toujours nuls. En effet, tous les films de chitosane en contact avec la goutte d'eau gonflent et restent hydrophiles quel que soit le DA. Ainsi, l'hystérèse mesurée dans cette étude est de nature cinétique. De manière générale, les angles de contact à l'avancée sont légèrement supérieurs aux angles de contact statiques. Comme pour les angles statiques, les angles à l'avancée deviennent plus petits avec l'augmentation du DA (**Figure 25**). Cette décroissance des angles à l'avancée en fonction du DA concorde bien avec les propriétés hygroscopiques du chitosane. En effet, le chitosane à bas DA contient une faible proportion d'unités acétylées, ce qui lui confère son caractère moins hydrophile comparé au chitosane de DA plus élevé.[39] En comparant les films « non neutralisés » et neutralisés, on remarque une légère différence des angles à l'avancée (**Figure 25**). Cette légère différence peut provenir de l'effet du recuit qui permet une réorganisation plus rapide des chaînes qui deviennent plus proches de leur état d'équilibre. L'effet des épaisseurs des films de chitosane sur les angles de contact à l'avancée a été étudié et les résultats montrent qu'ils augmentent quand l'épaisseur du film de chitosane diminue, que le film soit neutralisé ou pas (**Figure 25**). Ces résultats s'expliquent par l'effet de gonflement du film de chitosane par la goutte d'eau. En effet, comme on peut le constater sur la **Figure 15**, les films avec les plus grandes épaisseurs sont plus sensibles au gonflement par la goutte d'eau. Cette sensibilité facilite la pénétration de la goutte d'eau dans le film qui entraîne par conséquent la diminution des angles à l'avancée.

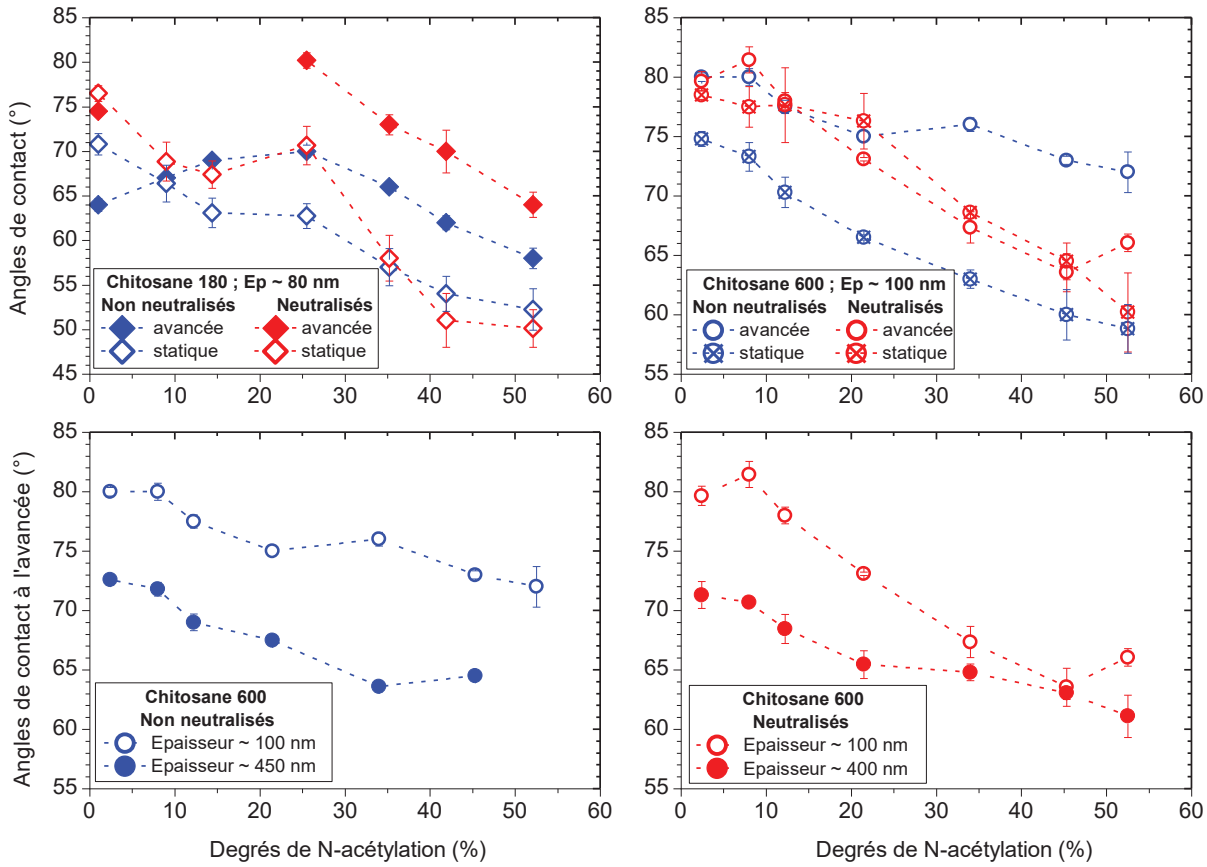



**Figure 25 : Effet du degré d'acétylation, des épaisseurs et de la neutralisation des films de chitosanes 600 et 180 sur les angles de contact à l'avancée.**

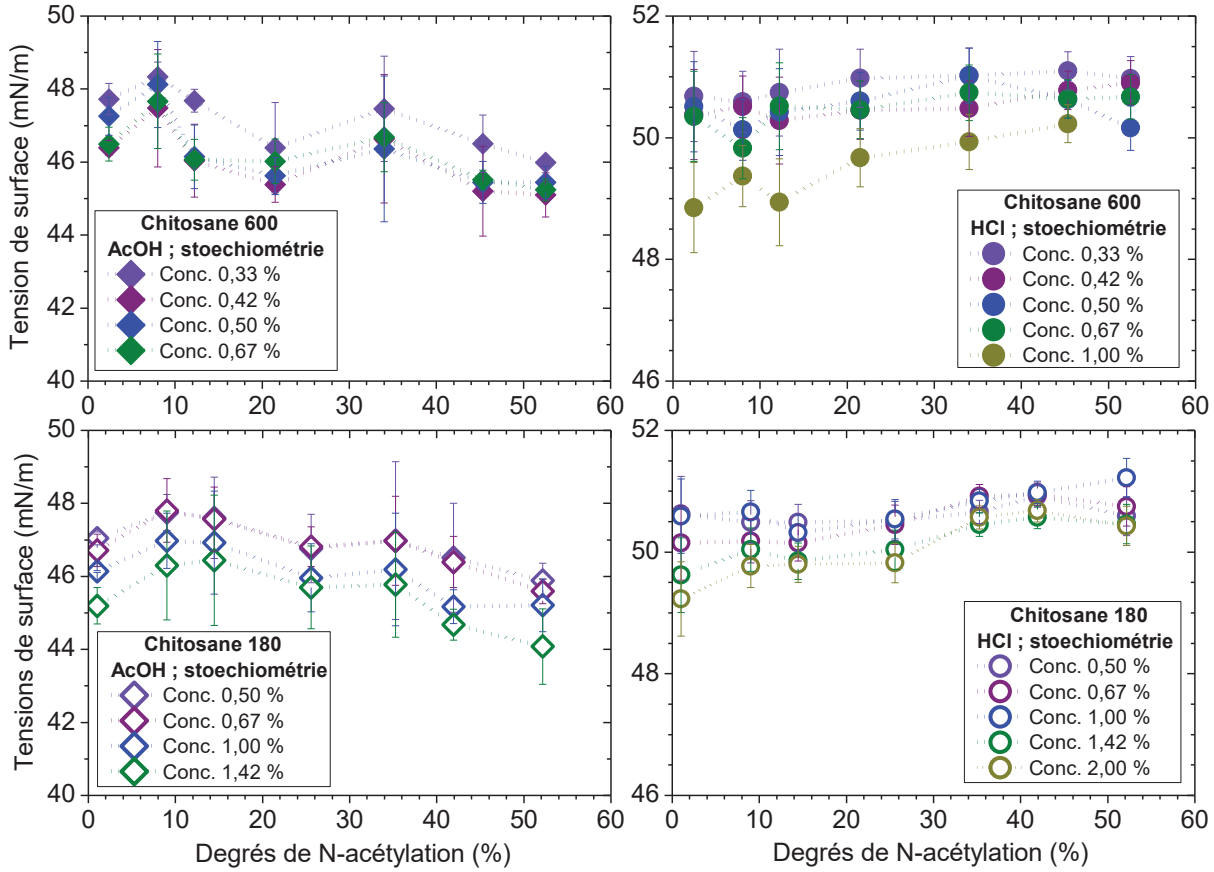
## V. Etude de la tension et de la polarité de surface des films de chitosane

Les tensions et polarités de surface rendent compte de la mouillabilité des matériaux et constituent des paramètres cruciaux pour comprendre dans le domaine biomédical les interactions entre les bactéries et les biomatériaux.[42-44] Ces paramètres dépendent indirectement de la morphologie de la surface du matériau mais aussi de ses propriétés chimiques. Busscher et *al.*[45] ont montré qu'il existe une rugosité seuil de 0,1 µm en-deçà de laquelle les valeurs d'angles de contact (dont sont déduites les tensions de surface) ne sont pas influencées. Au-delà de cette valeur, la rugosité peut soit diminuer ou augmenter les angles, soit être sans effet sur les angles. Dans notre cas, les rugosités étant très faibles comparées à cette valeur, les tensions de surface ne peuvent alors dépendre que des paramètres moléculaires et des propriétés physicochimiques du chitosane.

### V.1. Effet du degré d'acétylation

De manière générale, les tensions de surface des films de chitosane préparés avec AcOH décroissent légèrement avec l'augmentation du DA. Des tensions de surface comprises entre

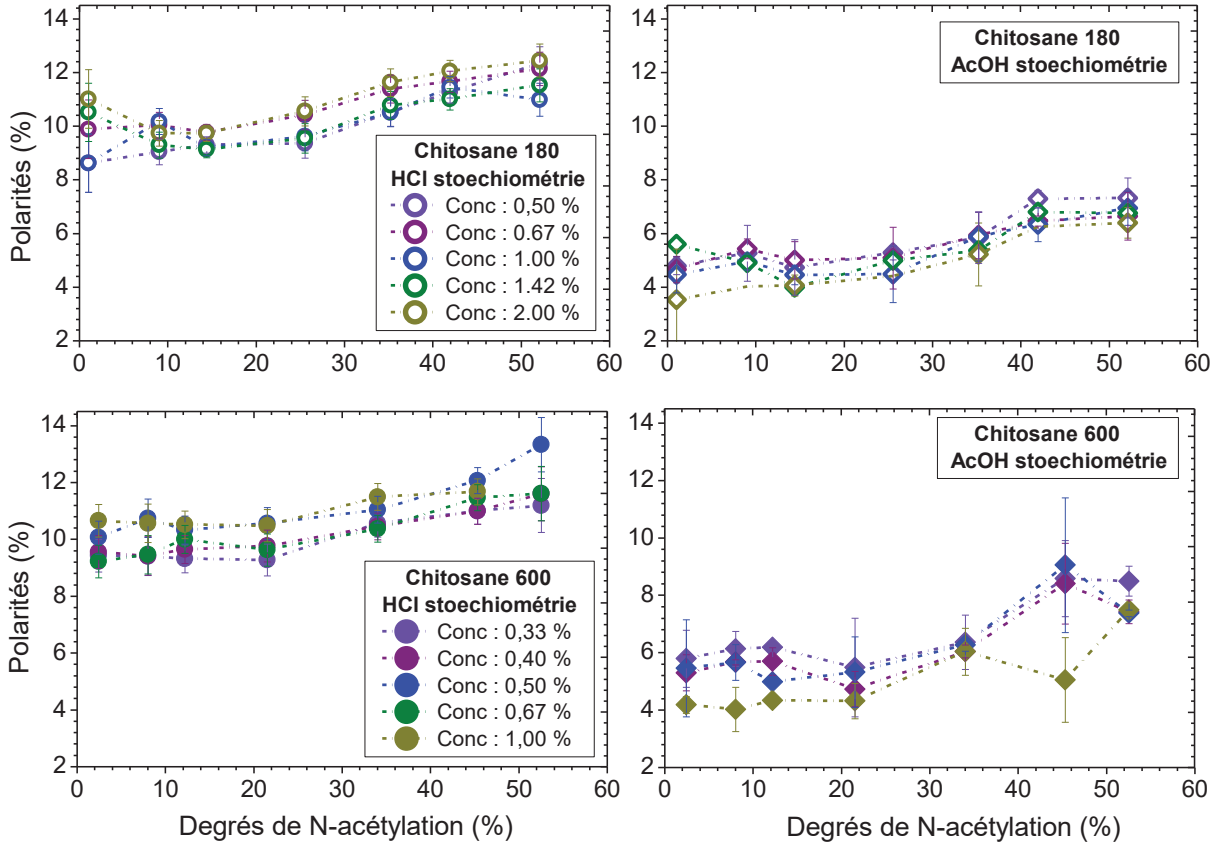
46 et 48 mN/m pour le chitosane 600 et entre 45 et 47 mN/m pour le chitosane 180 ont été obtenues à bas DA. Ces tensions de surface diminuent légèrement et varient entre 45 et 47 mN/m et entre 43 et 46 mN/m pour les chitosanes 600 et 180 respectivement à DA plus élevé. Les tensions de surface des films formés avec HCl augmentent légèrement avec le DA et sont plus grandes que les tensions de surface sur les films formés avec AcOH. A bas DA, les tensions de surface des films avec HCl varient entre 49 et 51 mN/m et entre 50 et 52 mN/m à DA plus élevé pour les deux masses molaires de chitosane (voir **Figure 26**).




**<u>Figure 26</u> : Variations des tensions de surface des films de chitosanes 600 et 180 préparés avec AcOH et HCl en fonction du degré d'acétylation.**

Des valeurs de tensions de surface plus petites (30 – 35 mN/m) de films non supportés de chitosane sont parfois rencontrées dans la littérature.[46-48] Cette différence de tension de surface peut être expliquée par la différence de rugosité entre les films supportés et les membranes de chitosane qui peut influencer indirectement la valeur de la tension de surface ou par les interactions supplémentaires que peut induire le substrat de silicium. Cependant, les polarités de surface évoluent dans le même sens et augmentent avec le degré d'acétylation pour les deux acides (**Figure 27**). A faible DA, les polarités des films sont plus petites et varient entre 2 et 6 puis entre 4 et 7 pour les chitosanes 180 et 600 respectivement. A DA plus élevé, les polarités entre les deux masses de chitosane sont presque identiques et varient entre

7 et 8. Les films obtenus avec HCl sont plus polaires et présentent des polarités de l'ordre de 10 pour les plus petits DA. Ces polarités évoluent légèrement avec le DA et passent en moyenne à 12 aux DA plus élevés (**Figure 27**).




**<u>Figure 27</u> : Variations des polarités de surface des films de chitosanes 600 et 180 préparés avec AcOH et HCl en fonction du degré d'acétylation.**

La variation de la polarité des films avec le DA relève du caractère hygroscopique du chitosane. En effet, les polarités des films augmentent avec l'augmentation du DA. Cette augmentation peut se justifier par les propriétés de solubilité du chitosane dans l'eau. Le chitosane est d'autant plus soluble dans l'eau que son DA est proche de 50-60 %. Par application de la relation utilisée pour le calcul des polarités aux valeurs de tensions de surface retrouvées dans la littérature,[46-48] des valeurs très proches de celles des films formés avec AcOH sont retrouvées. Ces variations de tensions et de polarités de surface en fonction du DA peuvent dépendre aussi de la conformation des chaînes de chitosane, de leurs densités de charges et de leurs propriétés d'interactions électrostatiques en relation avec le DA et la nature de l'acide.

## V.2. Effet de la masse molaire

Les tensions et les polarités (**Figure 28**) de surface ont été déterminées sur des films d'épaisseurs très proches de chitosane 180 et de chitosane 600 afin d'étudier l'effet de la masse molaire sur celles-ci. Les tensions de surface des films du chitosane 180 formés avec AcOH sont plus grandes que celles des films du chitosane 600 tandis que pour ceux formés avec HCl, les tensions de surface sont très proches. Ce décalage des tensions de surface des films formés avec AcOH entre les deux masses molaires peut s'expliquer par la différence de l'organisation des chaînes à la surface et du taux d'enchevêtrement en rapport avec leurs longueurs. Quant aux films formés avec HCl, sous l'effet de l'écrantage des charges positives des chaînes de chitosane par les contre-ions $Cl^-$, les chaînes se comportent comme des chaînes neutres d'où le rapprochement des tensions de surface entre les deux masses molaires. Le caractère plus hydrophile des films de chitosane obtenus avec HCl provient du fait que la constante d'équilibre permettant la réaction d'hydrolyse du chitosane est très basse pour le HCl et par conséquent ne permet pas à la réaction de se produire. En plus, HCl étant très soluble dans l'eau, la formation des sels de chlorure d'ammonium est fortement favorisée même à très faible quantité d'eau. Cela explique également la présence de sels de chlorure d'ammonium à l'état sec des films.[33] Une tendance inverse de celle des tensions de surface a été observée pour les polarités. Les polarités sont légèrement plus grandes sur les films de chitosane 600 pour les films formés avec AcOH et sur les films de chitosane 180 pour les films formés avec HCl. En référence à la variation des polarités en fonction du DA, plus le DA est grand, plus la surface est polaire.

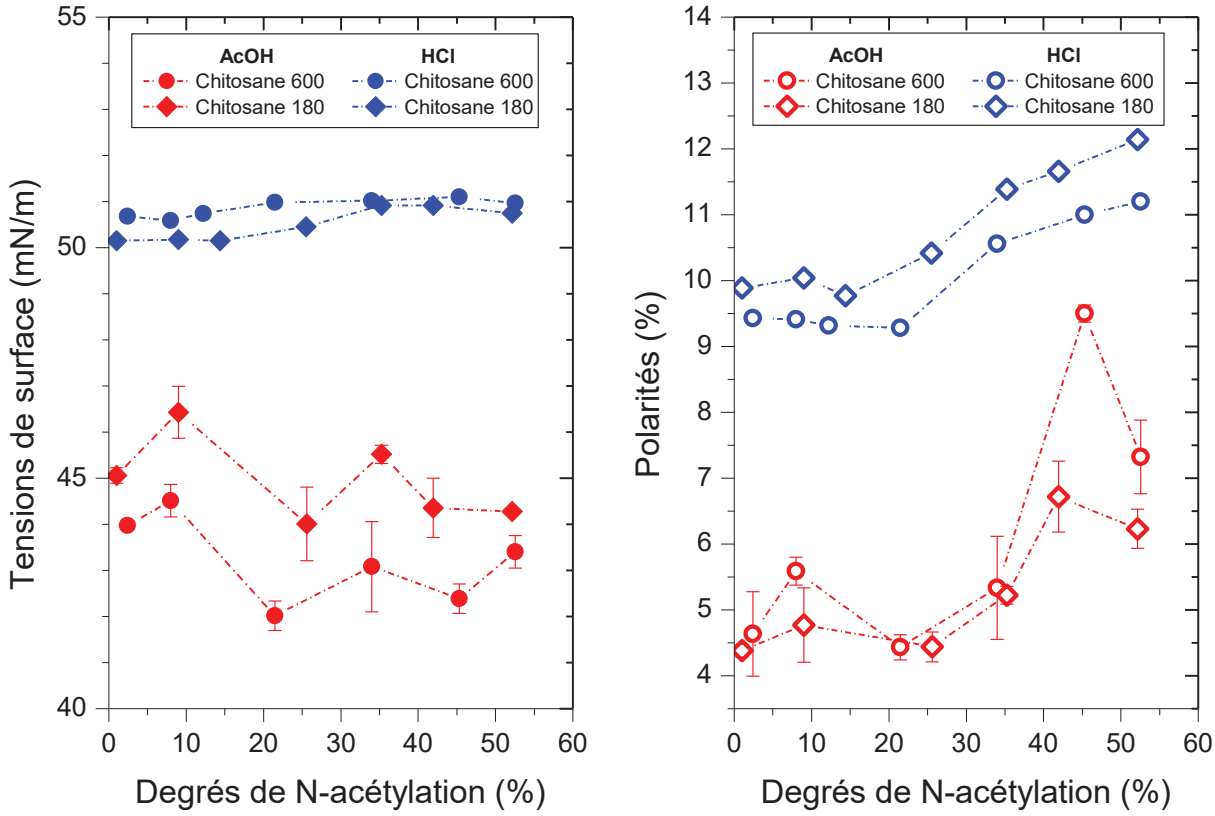



**Figure 28 : Effet de la masse molaire sur les tensions et les polarités de surface des films de chitosanes 600 et 180 préparés avec AcOH et HCl en fonction du degré d'acétylation (dans cette étude, les films de chitosanes 600 et 180 sont d'épaisseurs très proches).**

## V.3. Effet des épaisseurs des films de chitosane

Les tensions de surface sont indépendantes des épaisseurs des films de chitosane. Cette indépendance peut provenir du fait que les films sont assez épais pour empêcher les contributions du substrat de silicium aux valeurs des tensions de surface. Les tensions de surface sont de l'ordre de 46 mN/m sur les films formés avec AcOH et de 50 mN/m sur les films formés avec HCl pour toutes les épaisseurs (**Figure 29**). A l'instar des tensions de surface, les polarités ne varient pas avec les épaisseurs (**Figure 30**). Les films formés avec AcOH sont moins polaires (polarités comprises entre 5 et 10 %) que les films formés avec HCl (polarités comprises entre 10 et 15 %). Cette différence de tension de surface et de polarité entre les films peut être due à la contribution de HCl qui est susceptible de former des ions chlorure d'ammonium avec les groupes amine du chitosane. Ces ions sont susceptibles d'induire une instabilité des films et d'augmenter les interactions entre les films de chitosane et les liquides sondes.

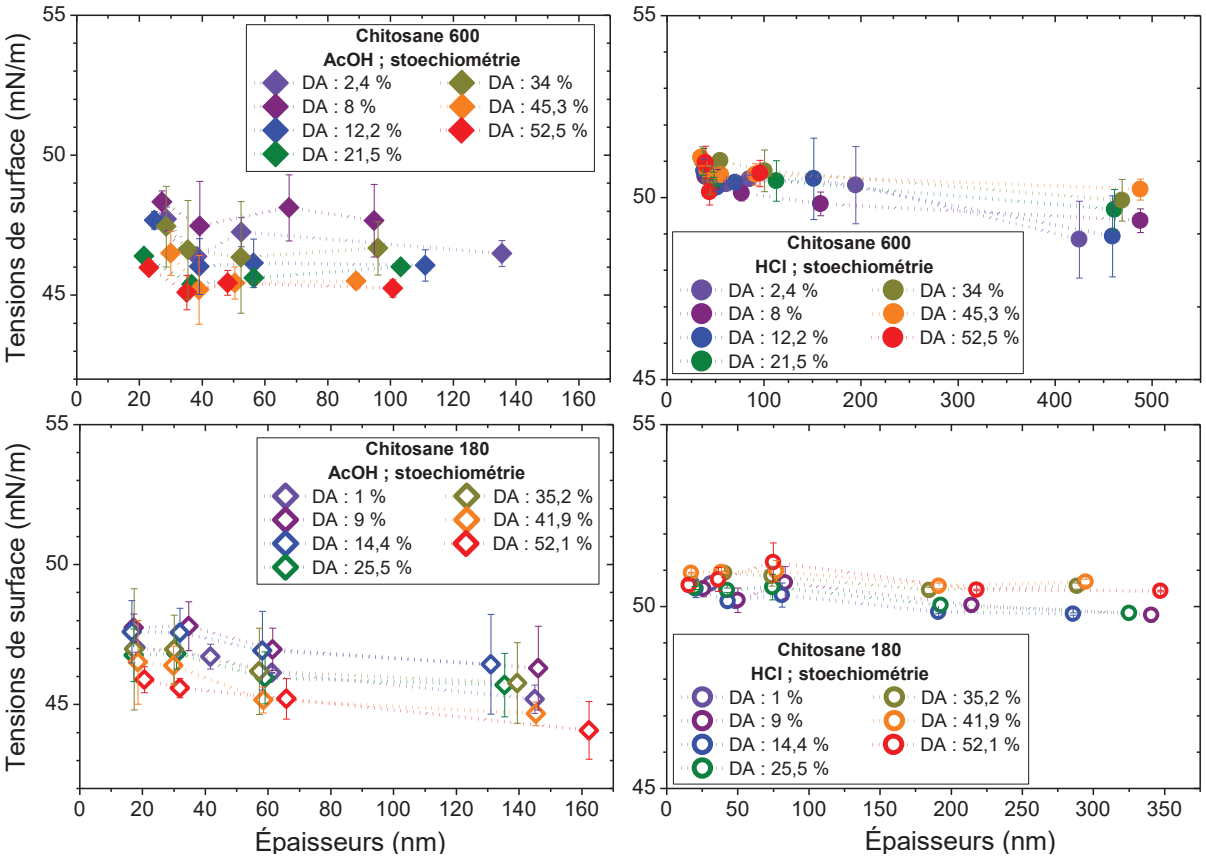



**Figure 29 : Effet des épaisseurs des films de chitosanes 600 et 180 sur les tensions de surface des films préparés avec AcOH et HCl.**

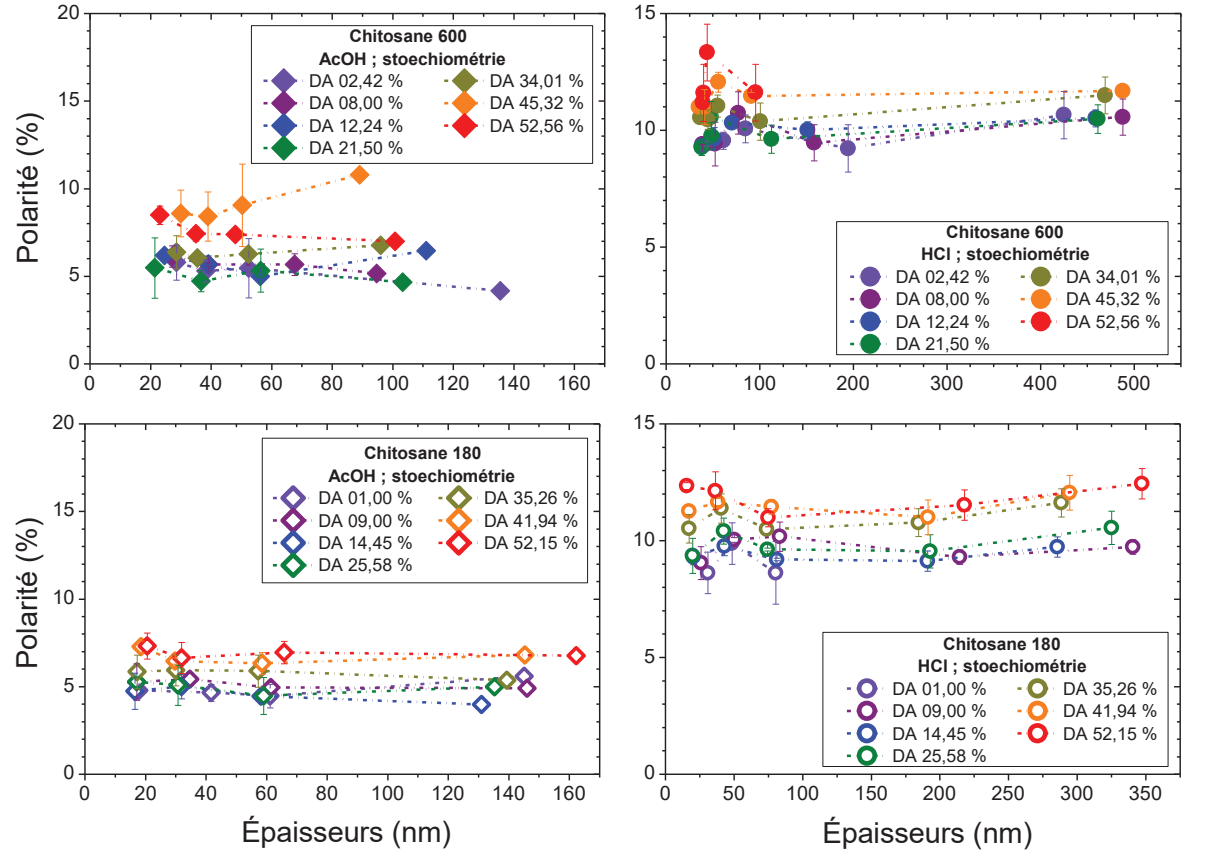



**Figure 30 : Effet des épaisseurs des films de chitosanes 600 et 180 sur les polarités de surface des films préparés avec AcOH et HCl.**

Dans le but d'étudier l'effet du vieillissement des films et de la neutralisation sur les tensions et les polarités de surface, les mesures ont été effectuées à deux temps différents (5 h et 24 h) après préparation et neutralisation. Les résultats obtenus (voir **Figure 31**) montrent une diminution des tensions et des polarités de surface avec le temps. Ce phénomène peut provenir de la stabilité des films ou de leur comportement vis-à-vis des conditions environnementales pour minimiser leurs tensions de surface. Cette décroissance des tensions et des polarités de surface avec le temps est expliquée par Amaral et *al.*[49] comme un effet de réorientation moléculaire qui peut survenir à l'interface chitosane/air lors de la préparation des films. Ils suggèrent que les groupes amine polaires peuvent se réorienter vers l'intérieur du film rendant ainsi la surface du film moins dense en groupes amine. Cette tendance est à la fois observée sur les films « non neutralisés » et neutralisés par les vapeurs d'ammoniaque. Par comparaison des films neutralisés et « non neutralisés », les tensions et les polarités de surface sont très similaires 24 h après leur préparation. Cela suggère à nouveau la neutralisation des films au cours du temps et qu'avant 24 h, les propriétés physicochimiques des films sont gouvernées par les aspects de réorganisation des chaînes, puis au-delà, soit par la stabilité chimique des films soit par la réorganisation des chaînes, soit par la combinaison des deux phénomènes.

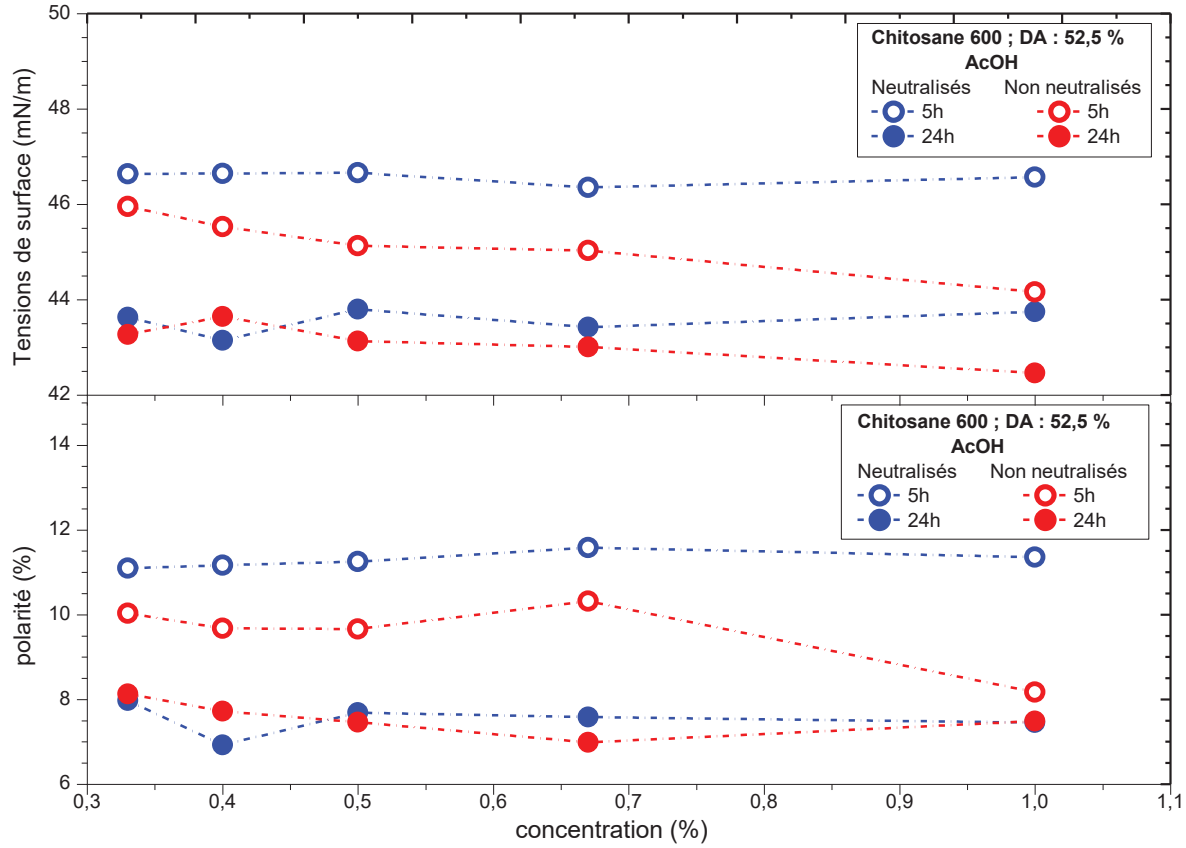



**Figure 31 : Effet du vieillissement et de la neutralisation des films de chitosane 600 (DA = 52,5 %) sur la tension et la polarité de surface.**

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié de manière détaillée et exhaustive les propriétés des films de chitosane élaborés par spin-coating. Cette étude nous a permis de mieux comprendre l'effet des paramètres moléculaires du chitosane et de certains paramètres des films sur les propriétés physicochimiques des surfaces fonctionnalisées. Nous avons également étudié dans cette partie l'évolution temporelle des propriétés physicochimiques des films. Une étude comparative des propriétés physicochimiques des films pour différents solvants du chitosane (solution aqueuse de AcOH et HCl) ainsi qu'une étude sur l'effet de la neutralisation des films par des vapeurs d'ammoniaque ont été également menées. De manière générale, les propriétés physicochimiques des films de chitosane évoluent au cours temps avant de devenir stables. Le caractère hydrophile des films de chitosane dépend fortement des paramètres moléculaires du chitosane. En effet, les films formés avec AcOH deviennent plus hydrophiles avec l'augmentation du DA et avec la diminution de la masse molaire. Cette tendance est presque absente pour les films avec HCl de fait des valeurs d'angles de contact fortement resserrées pour les différents DA et masses molaires. Cependant, nous pouvons noter que les films avec HCl sont fortement plus hydrophiles que les films avec AcOH pour un DA et une masse molaire donnés. Un effet des paramètres moléculaires a également été observé sur les tensions et polarités de surface. Cependant, ces effets sont moins importants que ceux sur les propriétés hydrophiles des films. Les tensions de surface diminuent légèrement avec l'augmentation du DA pour les films avec AcOH tandis qu'elles augmentent avec l'augmentation du DA pour les films avec HCl. Les polarités de surface évoluent dans le même sens pour les deux acides. En effet, elles augmentent avec l'augmentation du DA. Cependant, soulignons que les tensions et les polarités de surface sont plus grandes sur les films avec HCl. L'influence de l'épaisseur des films sur les propriétés physicochimiques est quasi absente et n'a été observée que sur l'angle de contact à l'avancée. Ce dernier diminue avec l'augmentation de l'épaisseur. L'étude en parallèle des propriétés physicochimiques des films de chitosane neutralisés a confirmé l'hypothèse de la neutralisation au cours du temps des films formés avec AcOH.

## Références:


1. Vachoud, L.; Zydowicz, N.; Domard, A., Formation and characterisation of a physical chitin gel. *Carbohydrate Research* **1997,** 302, (3-4), 169-177.
2. Mucha, M., Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1997,** 198, (2), 471-484.
3. Schatz, C.; Viton, C.; Delair, T.; Pichot, C.; Domard, A., Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules* **2003,** 4, (3), 641-648.
4. Wang, W.; Xu, D., Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *International journal of biological macromolecules* **1994,** 16, (3), 149-152.
5. Chen, R.; Lin, W.; Lin, J., Effects of pH, ionic strength, and type of anion on the rheological properties of chitosan solutions. *Acta polymerica* **1994,** 45, (1), 41-46.
6. Netz, R. R.; Andelman, D., Neutral and charged polymers at interfaces. *Physics reports* **2003,** 380, (1), 1-95.
7. Alexander, S., Polymer adsorption on small spheres. A scaling approach. *Journal de Physique* **1977,** 38, (8), 977-981.
8. Andelman, D.; Joanny, J. F., On the adsorption of polymer solutions on random surfaces: the annealed case. *Macromolecules* **1991,** 24, (22), 6040-6042.
9. De Gennes, P., Interactions between polymers and surfactants. *Journal of physical chemistry* **1990,** 94, (22), 8407-8413.
10. Schubert, D., Spin coating as a method for polymer molecular weight determination. *Polymer bulletin* **1997,** 38, (2), 177-184.
11. Lai, J. H., An investigation of spin coating of electron resists. *Polymer Engineering & Science* **1979,** 19, (15), 1117-1121.
12. Bornside, D. E.; Brown, R. A.; Ackmann, P. W.; Frank, J. R.; Tryba, A. A.; Geyling, F. T., The effects of gas phase convection on mass transfer in spin coating. *Journal of Applied Physics* **1993,** 73, (2), 585-600.
13. Chen, B., Investigation of the solvent-evaporation effect on spin coating of thin films. *Polymer Engineering & Science* **1983,** 23, (7), 399-403.
14. Daughton, W.; Givens, F., An Investigation of the Thickness Variation of Spun-on Thin Films Commonly Associated with the Semiconductor Industry. *Journal of The Electrochemical Society* **1982,** 129, (1), 173-179.
15. Meyerhofer, D., Characteristics of resist films produced by spinning. *Journal of Applied Physics* **1978,** 49, (7), 3993-3997.
16. Washo, B., Rheology and modeling of the spin coating process. *IBM Journal of Research and Development* **1977,** 21, (2), 190-198.
17. Murray, C. A.; Dutcher, J. R., Effect of changes in relative humidity and temperature on ultrathin chitosan films. *Biomacromolecules* **2006,** 7, (12), 3460-3465.
18. Brutin, D., *Droplet wetting and evaporation: from pure to complex fluids*. Academic Press: 2015.
19. Cassie, A.; Baxter, S., Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday society* **1944,** 40, 546-551.
20. Wenzel, R. N., Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial & Engineering Chemistry* **1936,** 28, (8), 988-994.
21. Mollaret, R.; Sefiane, K.; Christy, J.; Veyret, D., Experimental and numerical investigation of the evaporation into air of a drop on a heated surface. *Chemical Engineering Research and Design* **2004,** 82, (4), 471-480.

22. Nguyen, T. A.; Nguyen, A. V.; Hampton, M. A.; Xu, Z. P.; Huang, L.; Rudolph, V., Theoretical and experimental analysis of droplet evaporation on solid surfaces. *Chemical engineering science* **2012,** 69, (1), 522-529.
23. Sadek, C.; Schuck, P.; Fallourd, Y.; Pradeau, N.; Le Floch-Fouéré, C.; Jeantet, R., Drying of a single droplet to investigate process–structure–function relationships: a review. *Dairy science & technology* **2015,** 95, (6), 771-794.
24. Semenov, S.; Starov, V.; Rubio, R.; Agogo, H.; Velarde, M., Evaporation of sessile water droplets: Universal behaviour in presence of contact angle hysteresis. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011,** 391, (1), 135-144.
25. Semenov, S.; Starov, V.; Rubio, R.; Agogo, H.; Velarde, M., Evaporation of sessile water droplets in presence of contact angle hysteresis. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena* **2012,** 7, (4), 82-98.
26. Tsai, P.; Lammertink, R. G.; Wessling, M.; Lohse, D., Evaporation-triggered wetting transition for water droplets upon hydrophobic microstructures. *Physical review letters* **2010,** 104, (11), 116102.
27. Xu, W.; Choi, C.-H., Effects of surface topography and colloid particles on the evaporation kinetics of sessile droplets on superhydrophobic surfaces. *Journal of Heat Transfer* **2012,** 134, (5), 051022.
28. Lin, S.-Y.; Yang, K.-C.; Chen, L.-J., Effect of Surface Hydrophobicity on Critical Pinning Concentration of Nanoparticles To Trigger the Coffee Ring Formation during the Evaporation Process of Sessile Drops of Nanofluids. *The Journal of Physical Chemistry C* **2015,** 119, (6), 3050-3059.
29. Nguyen, T. A.; Hampton, M. A.; Nguyen, A. V., Evaporation of nanoparticle droplets on smooth hydrophobic surfaces: the inner coffee ring deposits. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013,** 117, (9), 4707-4716.
30. Uno, K.; Hayashi, K.; Hayashi, T.; Ito, K.; Kitano, H., Particle adsorption in evaporating droplets of polymer latex dispersions on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Colloid & Polymer Science* **1998,** 276, (9), 810-815.
31. Kajiya, T.; Nishitani, E.; Yamaue, T.; Doi, M., Piling-to-buckling transition in the drying process of polymer solution drop on substrate having a large contact angle. *Physical Review E* **2006,** 73, (1), 011601.
32. Zeid, W. B.; Brutin, D., Influence of relative humidity on spreading, pattern formation and adhesion of a drying drop of whole blood. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2013,** 430, 1-7.
33. Demarger-Andre, S.; Domard, A., Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state. *Carbohydrate Polymers* **1994,** 23, (3), 211-219.
34. Kwang-hee, K. P., Acid-Base Equilibria and Related Properites of Chitosan. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **1983,** 4, (2), 68-72.
35. Noriega, S. E.; Subramanian, A., Consequences of neutralization on the proliferation and cytoskeletal organization of chondrocytes on chitosan-based matrices. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* **2011,** 2011.
36. Foster, L. J. R.; Ho, S.; Hook, J.; Basuki, M.; Marçal, H., Chitosan as a biomaterial: influence of degree of deacetylation on its physiochemical, material and biological properties. *PloS one* **2015,** 10, (8), e0135153.
37. Tomihata, K.; Ikada, Y., In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* **1997,** 18, (7), 567-575.
38. Wenling, C.; Duohui, J.; Jiamou, L.; Yandao, G.; Nanming, Z.; Xiufang, Z., Effects of the degree of deacetylation on the physicochemical properties and Schwann cell affinity of chitosan films. *Journal of biomaterials applications* **2005,** 20, (2), 157-177.

39. Blair, H. S.; Guthrie, J.; Law, T. K.; Turkington, P., Chitosan and modified chitosan membranes I. Preparation and characterisation. *Journal of Applied Polymer Science* **1987,** 33, (2), 641-656.
40. Nakajima, T.; Sugai, K.; Itoh, H., Studies on water sorption for polymers: sorption of water-vapor by chitosan. *Kobunshi Ronbunshu* **1980,** 37, (11), 705-710.
41. Becerra, J.; Sudre, G.; Royaud, I.; Montserret, R.; Verrier, B.; Rochas, C.; Delair, T.; David, L., Tuning the hydrophilic/hydrophobic balance to control the structure of chitosan films and their protein release behavior. *AAPS PharmSciTech* **2017,** 18, (4), 1070-1083.
42. Busscher, H. J.; Weerkamp, A. H., Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiology Letters* **1987,** 46, (2), 165-173.
43. Pratt-Terpstra, I. H.; Weerkamp, A. H.; Busscher, H. J., On a relation between interfacial free energy-dependent and noninterfacial free energy-dependent adherence of oral streptococci to solid substrata. *Current Microbiology* **1988,** 16, (6), 311-313.
44. Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic press: 2004.
45. Busscher, H.; Van Pelt, A.; De Boer, P.; De Jong, H.; Arends, J., The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloids and Surfaces* **1984,** 9, (4), 319-331.
46. López-Pérez, P. M.; Marques, A. P.; da Silva, R. M.; Pashkuleva, I.; Reis, R. L., Effect of chitosan membrane surface modification via plasma induced polymerization on the adhesion of osteoblast-like cells. *Journal of Materials Chemistry* **2007,** 17, (38), 4064-4071.
47. Sionkowska, A.; Kaczmarek, H.; Wisniewski, M.; Skopinska, J.; Lazare, S.; Tokarev, V., The influence of UV irradiation on the surface of chitosan films. *Surface science* **2006,** 600, (18), 3775-3779.
48. Sionkowska, A.; Skopinska-Wisniewska, J.; Planecka, A.; Kozlowska, J., The influence of UV irradiation on the properties of chitosan films containing keratin. *Polymer Degradation and Stability* **2010,** 95, (12), 2486-2491.
49. Amaral, I.; Cordeiro, A.; Sampaio, P.; Barbosa, M., Attachment, spreading and short-term proliferation of human osteoblastic cells cultured on chitosan films with different degrees of acetylation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2007,** 18, (4), 469-485.

# CHAPITRE III : ETUDE DE LA STRUCTURE ET DE LA MORPHOLOGIE DES FILMS DE CHITOSANE

CHAPITRE III : ETUDE DE LA STRUCTURE ET DE LA MORPHOLOGIE DES FILMS DE CHITOSANE ..... 103
Introduction ..... 106
I. Etude de la morphologie des films de chitosane par AFM ..... 107
I.1. Principe de la technique AFM ..... 107
I.2. Effet des différents acides et du degré d'acétylation ..... 107
I.3. Effet de l'épaisseur des films de chitosane ..... 108
I.4. Effet du recuit des films de chitosane ..... 109
II. Caractérisation par spectroscopie infrarouge des films de chitosane ..... 110
II.1. Effet des acides acétique et chlorhydrique sur la structure chimique des films de chitosane ..... 110
II.2. Effet de la température et de la neutralisation sur la structure des films de chitosane 113
III. Etude de la structure des films par réflectivité de neutrons ..... 115
III.1. Introduction à la conformation des polyélectrolytes faibles ..... 115
III.1.1. Effet du pH sur l'ionisation et la conformation des polyélectrolytes faibles ..... 115
III.1.2. Conformation des chaînes de polyélectrolytes faibles en interaction avec une surface ..... 116
III.1.3. Comportement en solution des chaînes de polyélectrolytes faibles ..... 119
III.2. Détermination de la structure des films ..... 120
III.2.1. Interaction neutron matière ..... 120
III.2.2. Méthode de variation de contraste ..... 121
III.2.3. Détermination de la réflectivité ..... 121
III.2.4. Principe de la réflectivité des neutrons ..... 123
III.3. Partie expérimentale ..... 124
III.3.1. Préparation des échantillons ..... 124
III.3.2. Méthode de traitement des données de réflectivité ..... 125
III.4. Résultats expérimentaux ..... 126
III.4.1. Effet du degré d'acétylation ..... 126
III.4.2. Effet des épaisseurs des films de chitosane ..... 128
III.4.3. Effet du pH ..... 131
III.4.4. Effet de la longueur des chaînes de chitosane ..... 134
Conclusion ..... 137

Références ..... 138

## Introduction

Ce troisième chapitre de la thèse vient compléter l'étude sur la caractérisation physicochimique des films de chitosane. Le principal objectif de ce chapitre est l'étude des propriétés morphologiques et structurales des films de chitosane déposés à la surface du silicium afin de mieux comprendre la dépendance de ces propriétés aux paramètres moléculaires et physicochimiques des films de chitosane. En effet, nous nous sommes intéressés tout d'abord à l'étude des propriétés chimiques des films et l'influence de la température, de la neutralisation et de la nature de l'acide (AcOH ou HCl) sur ces propriétés. Cette étude de la structure chimique des films sera complétée par une étude de l'aspect morphologique des films. Dans ce dernier cas, nous avons analysé les films en AFM en vue de comprendre leur organisation à la surface du silicium et l'impact des paramètres moléculaires du chitosane (DA, masse molaire) et de certains facteurs (température, recuit, épaisseur,…) sur cette organisation. En plus de ces deux études, le comportement des films de chitosane à l'interface avec un liquide ($D_2O$) à différents pH a été exploré. Ici, nous avons sondé l'effet de la longueur des chaînes, du DA et des épaisseurs sur la structure des films à leurs interfaces avec $D_2O$. La structure des films a été déterminée par la réflectivité des neutrons à l'interface film/liquide. Le gonflement des films est déduit des courbes de profil de densité obtenues de cette réflectivité. Cette étude permettra de rendre compte du gonflement des films de chitosane et élucider leur sensibilité aux liquides sondes (eau et eau acidifiée à pH 4) constatée lors de l'évaluation des propriétés de mouillabilité (**Chapitre II**).

Ce chapitre est introduit par l'étude de la morphologie des films par AFM pour élucider certaines différences de propriétés des films notamment les différences d'épaisseur liées à l'acide utilisé, au recuit des films, au DA,… observées dans le **chapitre II**. Cette partie sera suivie de la détermination de la structure chimique des films par IR afin d'évaluer si elle existe la contribution des paramètres chimiques des films à ces différences de propriétés. Enfin, les propriétés de gonflement des films de chitosane sont évaluées pour comprendre la sensibilité des chaînes de chitosane au pH et l'effet des paramètres moléculaires sur le gonflement.

# I. Etude de la morphologie des films de chitosane par AFM

## I.1. Principe de la technique AFM

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique de caractérisation qui permet de déterminer la morphologie d'une surface à travers les interactions entre une pointe et la surface. Le principe de l'AFM consiste à focaliser un faisceau laser à l'extrémité de la pointe et de mesurer sa déflection. En effet, le faisceau laser incident est réfléchi par la pointe puis transmis à une photodiode qui permet de mesurer cette déflection (**Figure 1**). La déflection correspond à une variation de la distance pointe-échantillon et peut être ajustée par la boîte piézoélectrique sur laquelle l'échantillon à imager est fixé. Il existe différents modes d'acquisitions d'image par AFM ; dans notre cas d'étude, nous avons travaillé en mode oscillant. Les études de morphologie ont été effectuées avec un AFM Nano-observer (Concept Scientific Instruments) et les images obtenues ont été traitées par le logiciel de traitement d'image Gwyddion. Les pointes utilisées pour étudier la morphologie des films ont une raideur 40 N/m et ont été fournies par Bruker.

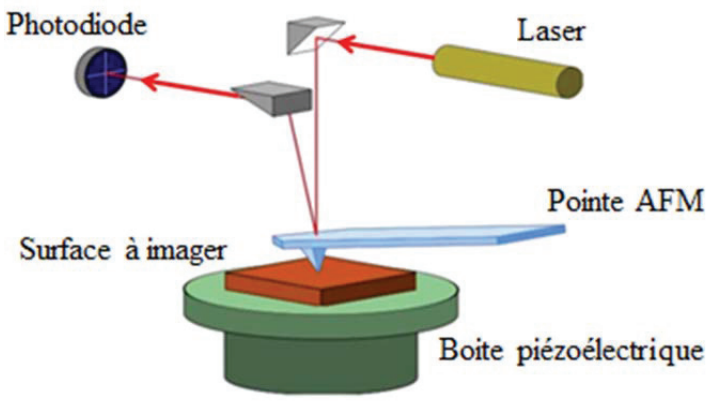



**Figure 1 : schéma du fonctionnement de la microscopie à force atomique.**

## I.2. Effet des différents acides et du degré d'acétylation

L'effet sur la morphologie des films des paramètres moléculaires du chitosane (DA, masse molaire), des épaisseurs des films de chitosane et du type d'acide utilisé pour préparer les solutions a été étudié. Les solutions de chitosane ont été préparées en utilisant AcOH et HCl comme acides pour solubiliser le chitosane en milieu aqueux. Les solutions aqueuses acides ont ensuite été utilisées pour former des films par spin-coating. Après le dépôt, les épaisseurs sont déterminées par ellipsométrie puis la morphologie est caractérisée. Dans le but d'étudier l'effet de l'acide utilisé pour dissoudre le chitosane sur la morphologie des films, des solutions de chitosane de concentrations similaires sont préparées avec AcOH et HCl. Les morphologies obtenues par AFM sont présentées dans la **Figure 2**.

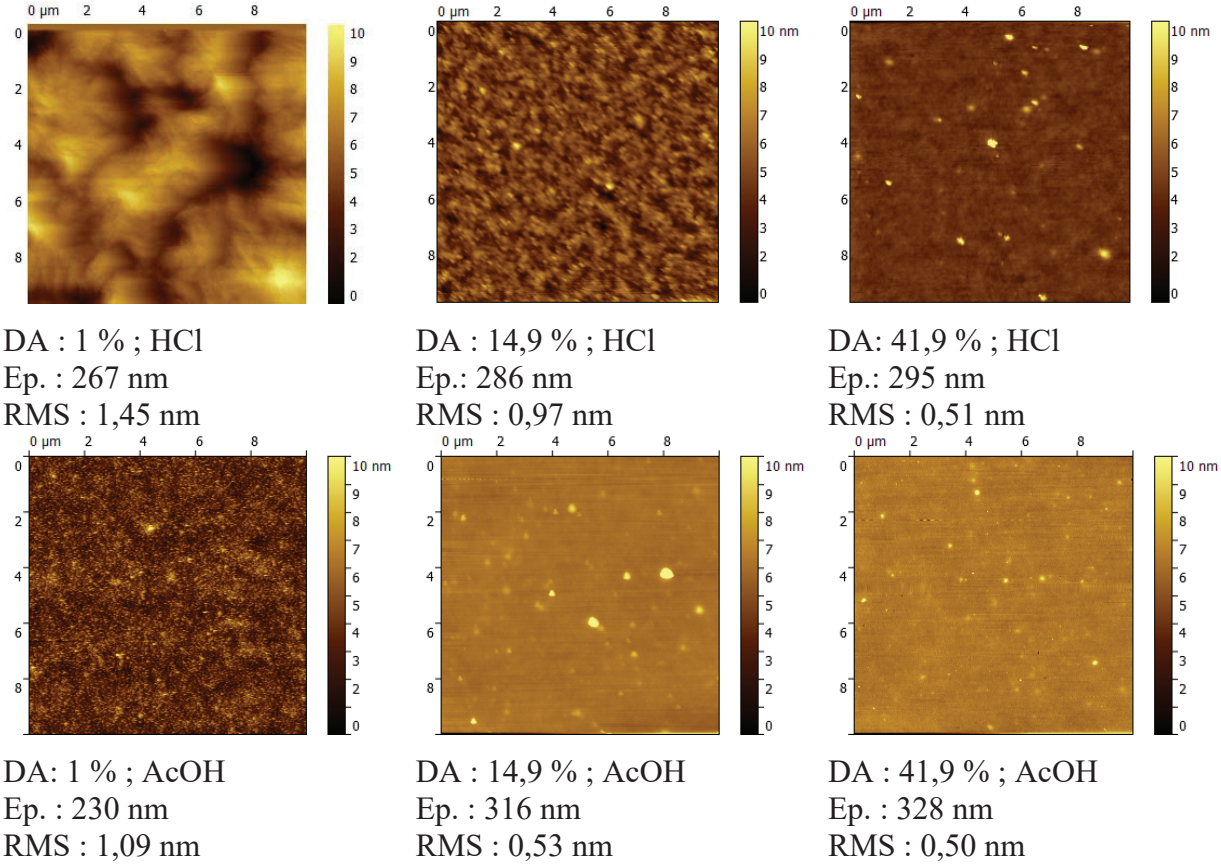



**Figure 2 : Effet du type d'acide (AcOH et HCl) et degré d'acétylation sur la morphologie des films obtenus avec le chitosane 180. (Ep. : Epaisseur, RMS. : Root Mean Square)**

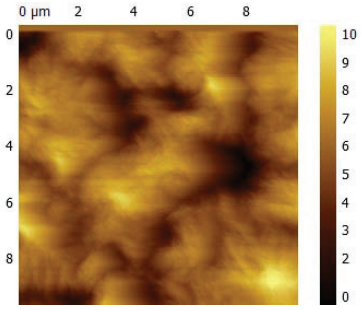
Les films obtenus dans l'ensemble de cette étude présentent des rugosités moyennes très faibles (< 2 nm). Néanmoins, des différences peuvent être observées suivant l'acide utilisé pour former les films, notamment aux faibles DA. En effet, les rugosités sont plus grandes lorsque HCl est utilisé. Ces différences de rugosité peuvent s'expliquer par la différence de comportement du chitosane vis-à-vis de ces deux acides. En effet, les films préparés avec AcOH sont (partiellement) neutralisés (par évaporation de l'acide acétique lors du séchage) tandis que les films obtenus avec HCl restent sous forme de polyélectrolytes chargés avec la formation de sels de chlorure d'ammonium entre les fonctions amine du chitosane et les molécules de HCl.

Pour le même acide et pour la même concentration en polymère, nous avons également observé des différences de morphologie des films de chitosane en fonction du DA. De manière générale, la rugosité des films diminue lorsque le DA augmente (**Figure 2**).

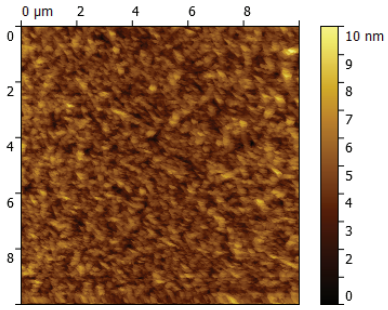
### I.3. Effet de l'épaisseur des films de chitosane

Dans le but de mieux cerner l'évolution de la rugosité des films de chitosane en fonction des épaisseurs, différents films de différentes épaisseurs ont été analysés par AFM. Seules les

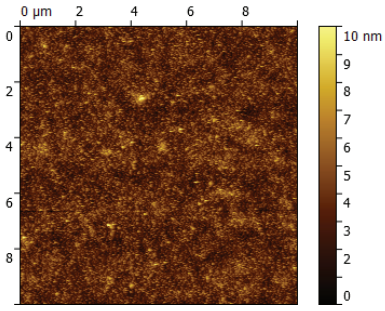
images à DA 1 % sont représentées dans cette section. Cependant, elles restent représentatives de ce qui est observé pour les autres DA (Cf **Annexe A**). De manière générale, les films présentent des rugosités inférieures à 2 nm qui diminuent légèrement avec les épaisseurs (**Figure 3**). Cette faible variation de la rugosité des films en fonction des épaisseurs peut s'expliquer par une différence d'organisation des chaînes à la surface induite par la différence de viscosité des solutions utilisées pour la préparation des films par spin-coating. Néanmoins, la faible différence de rugosité entre les différentes épaisseurs montre que cet effet reste mineur dans notre cas d'étude. Murray et Dutcher ont observé une tendance similaire entre des films d'épaisseur inférieure à la centaine de nanomètres et des films d'épaisseur supérieure.[1] En effet, les auteurs ont montré dans leur étude que les films ayant des épaisseurs inférieures à la centaine de nanomètres étaient très lisses avec des rugosités d'environ 1 nm.



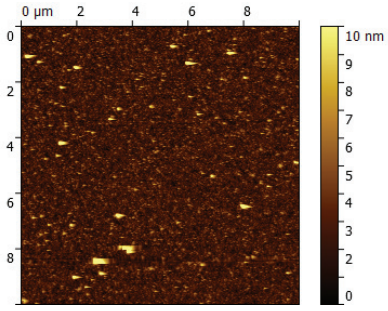
DA : 1 % ; HCl
Ep. : 267 nm
RMS : 1,45 nm



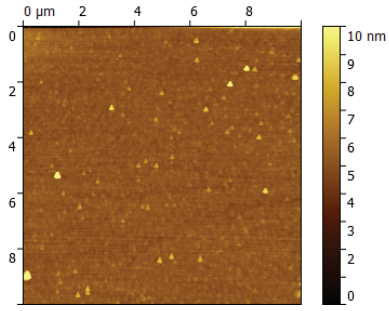
DA : 1 % ; HCl
Ep. : 81 nm
RMS : 1,10 nm



DA : 1 % ; AcOH
Ep. : 230 nm
RMS : 1,09 nm



DA : 1 % ; AcOH
Ep. : 80 nm
RMS : 1,13 nm



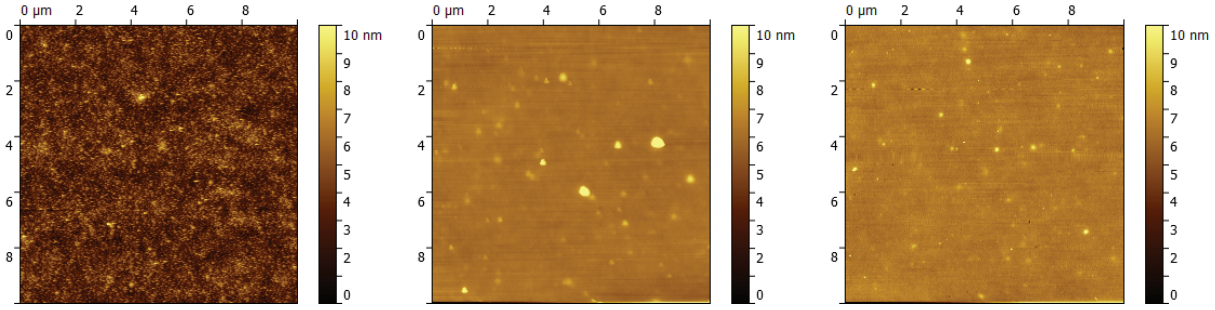
DA : 1 % ; AcOH
Ep. : 25 nm
RMS : 0,48 nm

**Figure 3 : Effet de l'épaisseur sur la morphologie des films de chitosane obtenus avec le chitosane 180.**

## I.4. Effet du recuit des films de chitosane

Dans le but d'accélérer l'évaporation de l'acide acétique résiduel, les films de chitosane sont recuits (voir les paramètres du recuit dans le **chapitre II, paragraphe II.2**) avant d'être analysés par AFM. Les morphologies obtenues sont présentées sur la **Figure 4**. Les rugosités

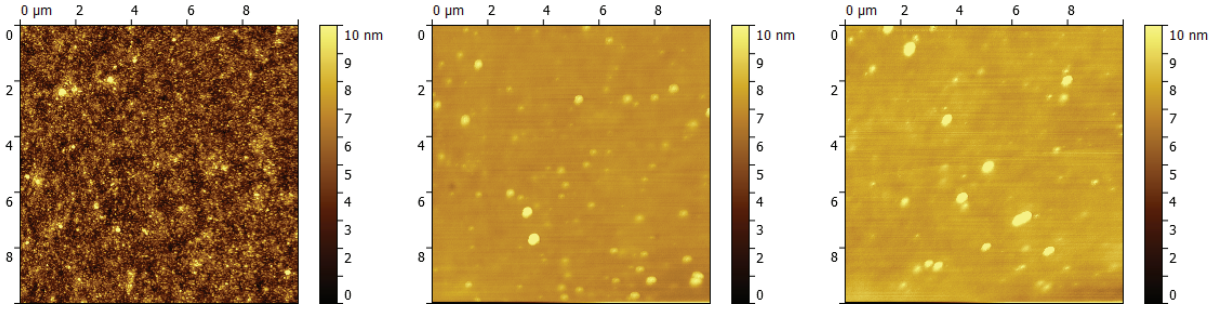
des films sont inférieures à 2 nm, à la fois pour les films recuits et non recuits. Néanmoins, nous observons en général une légère augmentation de la rugosité des films après le recuit à 200 °C. Ce phénomène peut provenir d'une éventuelle dégradation ou de changement de structure cristalline des films à la surface du substrat notamment avec l'évaporation des molécules d'eau présentes dans les films.[2]



DA : 1 %
Ep. : 230 nm
RMS : 1,09 nm

DA : 14,4 %
Ep. : 316 nm
RMS : 0,53 nm

DA : 41,9 %
Ep. : 328 nm
RMS : 0,50 nm



DA : 1 %
Ep. : 179 nm
RMS : 1,55 nm

DA : 14,4 %
Ep. : 244 nm
RMS : 0,52 nm

DA : 41,9 %
Ep. : 295 nm
RMS : 0,70 nm

**Figure 4 : Effet du recuit sur la morphologie des films de chitosane obtenus avec le chitosane 180. En haut : films de chitosane non recuits ; En bas : films de chitosane recuits.**

# II. Caractérisation par spectroscopie infrarouge des films de chitosane

## II.1. Effet des acides acétique et chlorhydrique sur la structure chimique des films de chitosane

Afin de mieux comprendre l'effet de AcOH et de HCl sur la structure chimique des films de chitosane, les chitosanes purifiés ont été d'abord analysés par spectroscopie infrarouge pour servir de référence (**Figure 6**). Les degrés d'acétylation des différents chitosanes sont déterminés par la méthode de Domszy et Roberts[3] ($DA = (A_{1655} \,/\, A_{3450}) * 100/1{,}33$) puis comparés à ceux déterminés par la RMN du proton (voir **Tableau 1**). La méthode de calcul avec les lignes de base considérées est représentée sur la **Figure 5**.

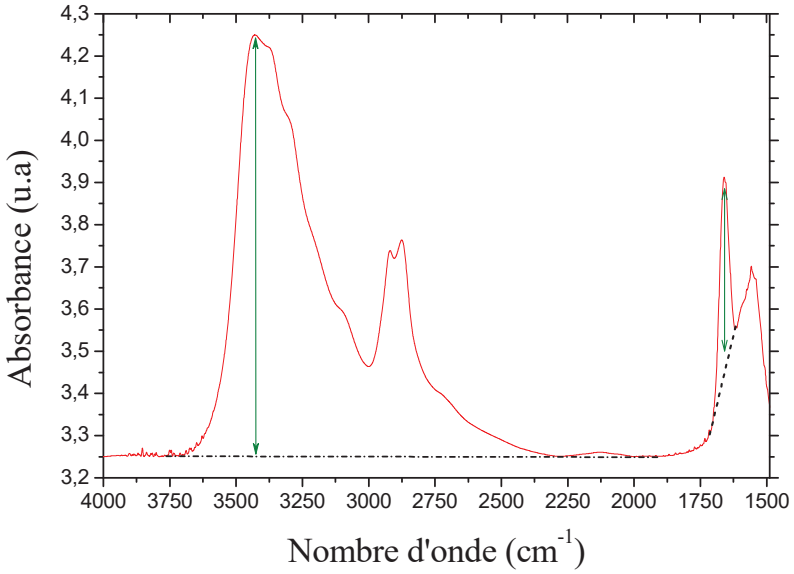



**Figure 5 : Illustration de la méthode détermination du DA des lots et des films de chitosane par IR.**

| Chitosane 600 | | Chitosane 180 | |
|---|---|---|---|
| RMN $^1$H | Infrarouge | RMN $^1$H | Infrarouge |
| 2,4 | 4,4 | 1,0 | 3,9 |
| 8,0 | 14 | 9,0 | 15,4 |
| 12,2 | 24 | 14,4 | 22,4 |
| 21,5 | 33,7 | 25,6 | 24,6 |
| 34,0 | 37,6 | 35,3 | 41 |
| 45,3 | 47,7 | 41,9 | 49 |
| 52,6 | 52,3 | 52,2 | 55,3 |

**Tableau 1 : Récapitulatif des valeurs de DA déterminées par la RMN du proton et par IR des différents lots de chitosane.**

De manière générale, les DA déterminés par infrarouge sont plus grands que ceux déterminés par RMN $^1$H surtout aux faibles DA. Cette différence entre les DA peut provenir d'un éventuel manque de sensibilité de la méthode IR aux faibles DA. Ces spectres mettent en évidence le caractère neutre des chitosanes avec l'apparition de la bande de vibration du groupe $-NH_2$ vers 1598 cm$^{-1}$ pour les faibles DA. Cette bande est légèrement décalée aux DA élevés et apparaît aux alentours de 1550 cm$^{-1}$ (**Figure 6**).

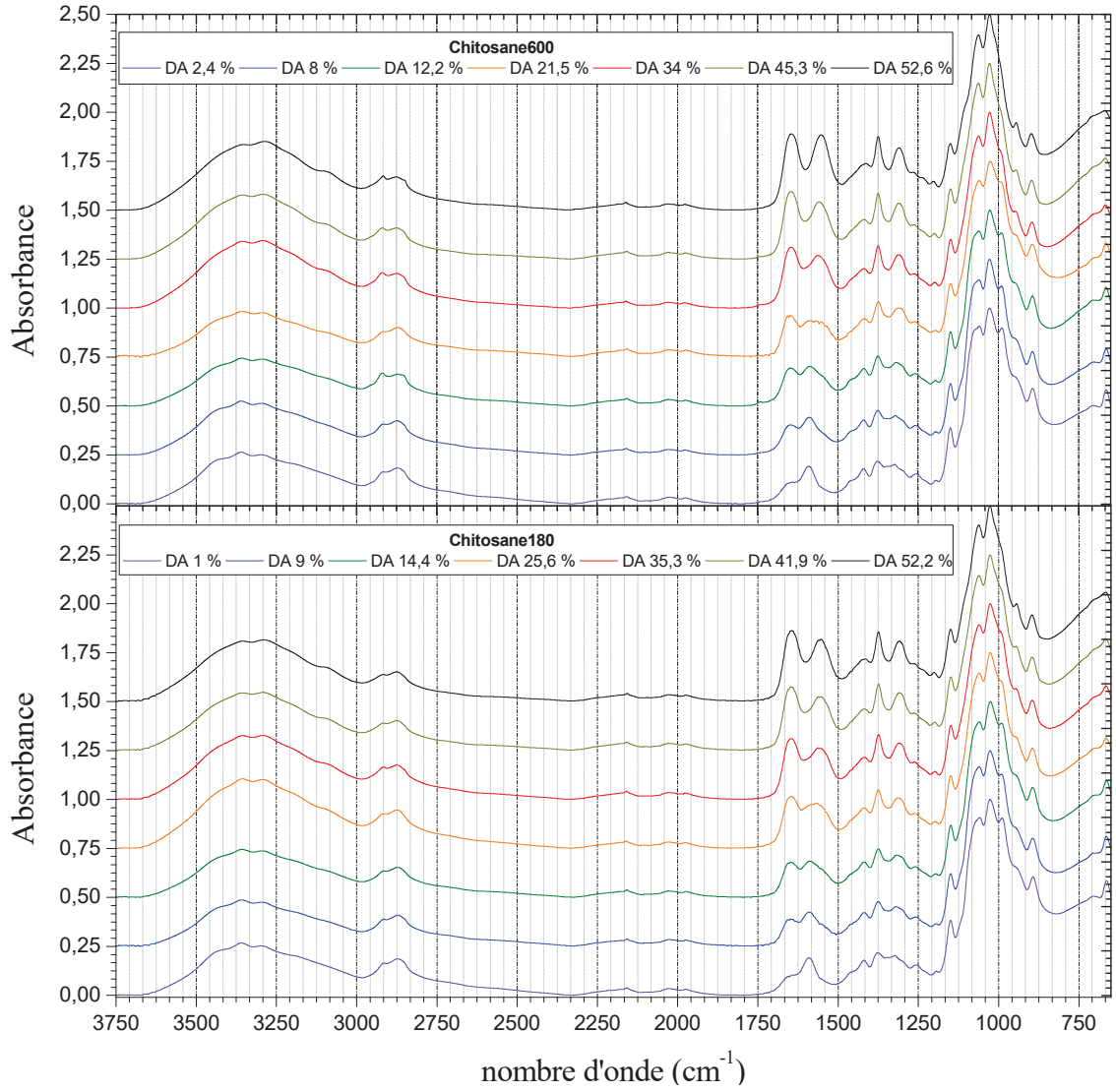



**Figure 6 : spectres infrarouge des chitosanes 600 et 180 pour les différents DA. Les spectres ont été décalés verticalement de A = n × 0,25 pour des raisons de lisibilité.**

Les spectres infrarouges des films de chitosane obtenus avec AcOH et HCl (**Figure 7**) prouvent la présence de sels de chlorure d'ammonium dans le cas des films formés avec HCl par le décalage des bandes de vibration du -$NH_2$ des chitosanes bruts situées vers 1598 $cm^{-1}$ vers les bandes de vibration du $–NH_3^+$ qui se situent vers 1515 $cm^{-1}$ et 1615 $cm^{-1}$. Cependant, les films obtenus avec AcOH présentent des pics très proches de ceux du $–NH_2$ des chitosanes bruts. Ceci prouve que AcOH n'est plus présent dans les films alors que HCl reste présent dans le film. Ainsi, les films formés avec AcOH se neutralisent relativement rapidement par simple évaporation sans avoir à subir de traitement spécifique, tandis que les films formés avec HCl restent chargés sur des durées beaucoup plus longues.[4]

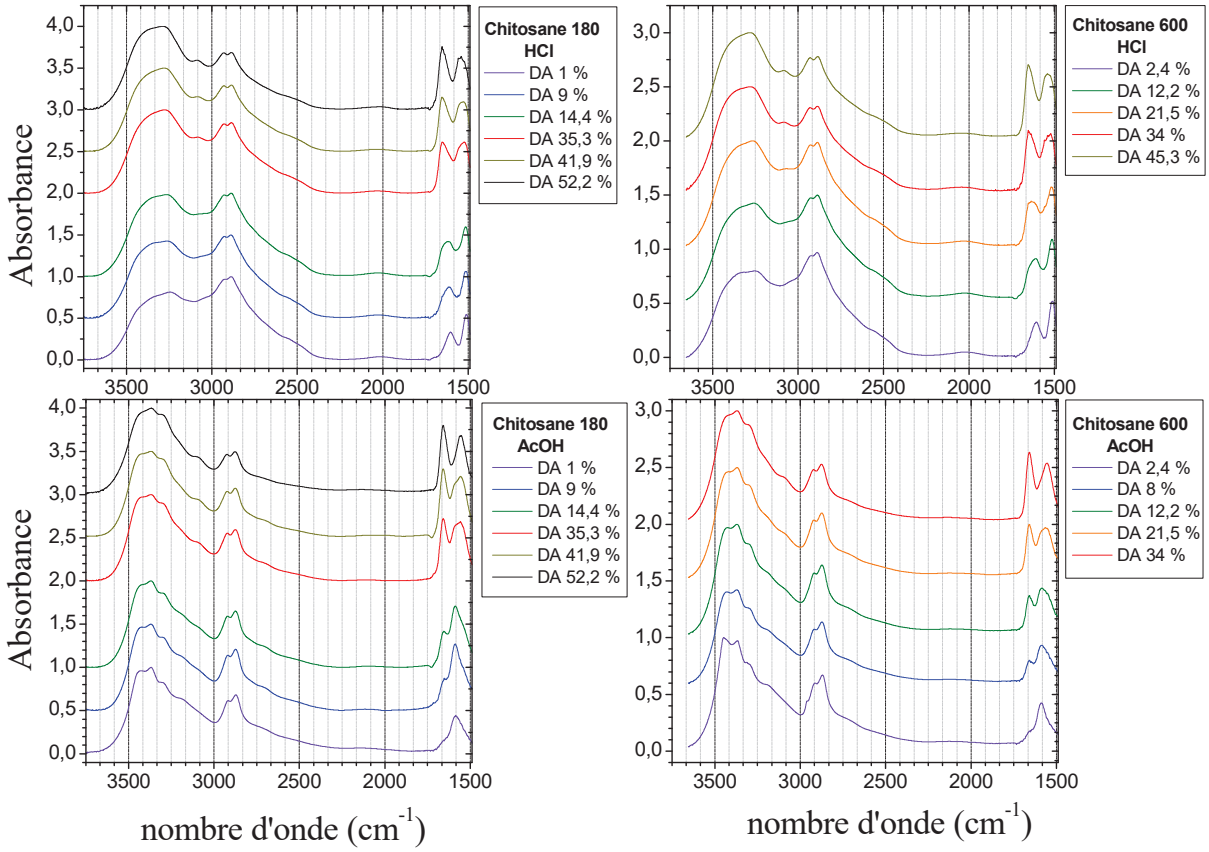



**Figure 7 : Etude par infrarouge de l'effet de AcOH et de HCl sur la structure des films de chitosane**

## II.2. Effet de la température et de la neutralisation sur la structure des films de chitosane

D'une part, des films ont été recuits à 100 °C et 150 °C pendant 4 h pour enlever le solvant résiduel. La température d'ébullition de l'AcOH étant d'environ 118 °C, ces deux températures sont largement suffisantes pour évaporer le solvant sans pour autant détériorer thermiquement les films de chitosane.[1] D'autre part, des films ont été neutralisés par des vapeurs d'ammoniaque comme décrit dans le **chapitre II**. La finalité de ces deux traitements reste la même : convertir les ions $-NH_3^+$ en $-NH_2$. Cette conversion se traduit en infrarouge par l'apparition (et l'augmentation de son intensité) de la bande de vibration des groupes $-NH_2$ associée à une diminution, voire même la disparition, de la bande de vibration des groupes $-NH_3^+$.[4, 5] Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 8**. Pour mieux rendre compte de l'impact du recuit et de la neutralisation sur les propriétés chimiques des films de chitosane et ainsi apporter une comparaison entre ces différents traitements, les différents DA des films recuits, non recuits et neutralisés ont été déterminés.

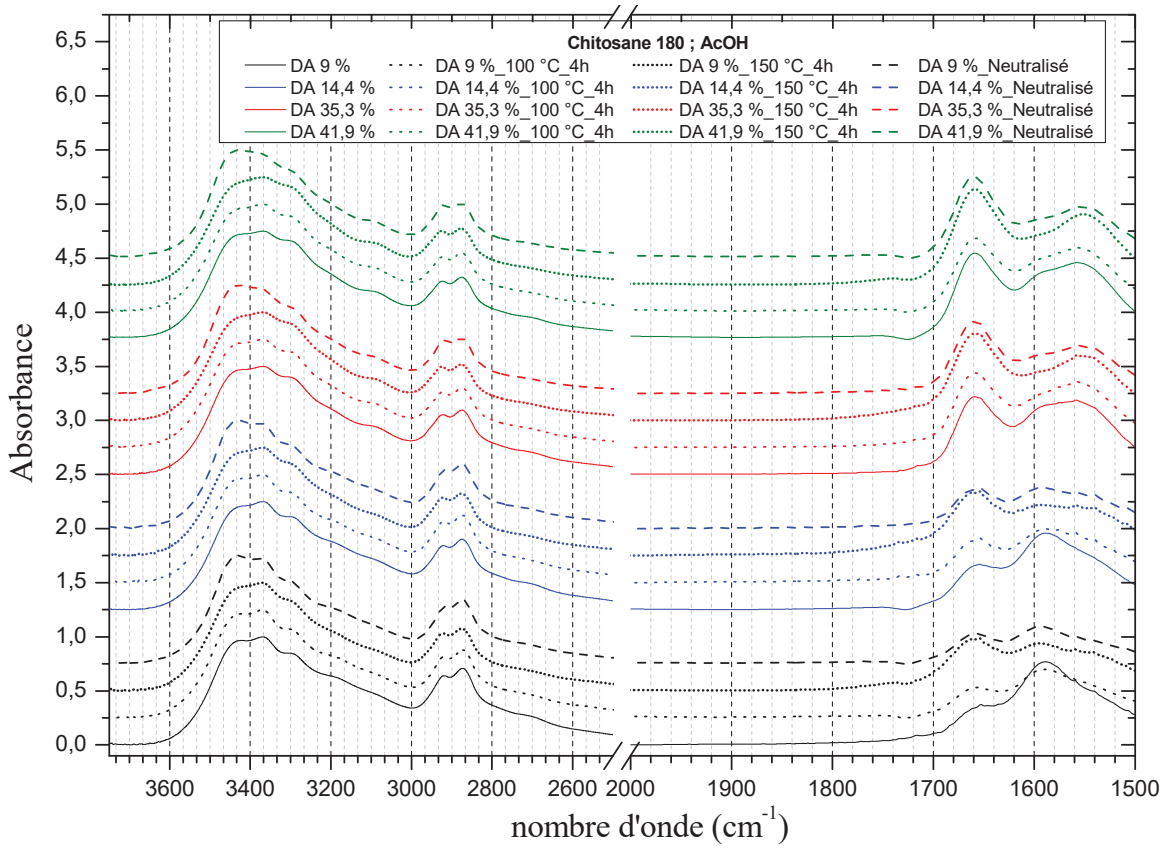



**Figure 8 : Effet du recuit et de la neutralisation sur la structure chimique des films.**

Les valeurs des DA apparents des films de chitosane sont rapportées dans le **Tableau 2**. Les pics considérés dans la détermination du DA apparent permettront de rendre compte d'une part de l'effet de la désorption des molécules d'eau à travers le pic à 3450 $cm^{-1}$ incluant aussi la contribution des liaisons –OH de l'eau. D'autre part, de la présence excessive ou non de $-NH_3^+$ à travers le pic à 1650 $cm^{-1}$. Du fait de la contribution des ions chlorure d'ammonium à la valeur du DA à cause de la superposition du pic de ces ions et de la fonction amine, les DA apparents n'ont été calculés que pour les films de chitosane obtenus avec AcOH. De façon générale, les films de chitosane non recuits et non neutralisés avec les vapeurs d'ammoniac présentent des valeurs de DA légèrement inférieures aux DA obtenus avec les chitosanes bruts. Après le recuit des films à 100 °C, le DA apparent reste légèrement différent de celui des films non recuits. Cependant, à 150 °C, les DA apparents deviennent fortement supérieurs. Ces effets du recuit sur les DA viennent d'une potentielle altération de l'intensité du pic de référence à 3450 $cm^{-1}$ due à l'évaporation des molécules d'eau des films de chitosane. Cette même tendance est observée par Murray et Dutcher qui expliquent eux aussi ce phénomène par la même raison.[1] Les films neutralisés avec les vapeurs d'ammoniac présentent dans l'ensemble des DA similaires aux DA des films non recuits et non neutralisés.

Cette similitude des DA confirme le caractère neutre des films de chitosane obtenus avec AcOH.

| Chitosane 600 | | | | | Chitosane 180 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| RMN | IR | | | | RMN | IR | | | |
| Bruts | NR | 100 °C | 150 °C | Neut. | Bruts | NR | 100 °C | 150 °C | Neut. |
| 8,0 | 6,8 | 10 | 19,2 | 15,2 | 9,0 | 8,2 | 8,5 | 16,6 | 10,8 |
| 12,2 | 12,5 | 17,3 | 22,5 | 15,2 | 14,4 | 11,7 | 13,7 | 21,2 | 13,8 |
| 21,5 | 22,8 | 19,6 | 28,7 | 23,8 | 35,3 | 32,5 | 33,7 | 39,7 | 34,9 |
| 34,0 | 35,2 | 34,7 | 45 | 36,8 | 41,9 | 39 | 34,6 | 47,8 | 43 |

**Tableau 2 : Récapitulatif des valeurs de DA (%) obtenues par recuit à différentes températures et après neutralisation des films de chitosane formés avec AcOH. Bruts : lots de chitosane réacétylé ; NR : non recuits ; 100 °C : films de chitosane recuits à 100 °C ; 150 °C : films de chitosane recuits à 150 °C ; Neut. : neutralisés.**

# III. Etude de la structure des films par réflectivité de neutrons

## III.1. Introduction à la conformation des polyélectrolytes faibles

### III.1.1. Effet du pH sur l'ionisation et la conformation des polyélectrolytes faibles

Le degré d'ionisation des polyélectrolytes faibles est directement lié au pH du milieu. Dans le cas de chaînes portant des amines, le degré d'ionisation augmente lorsque le pH diminue. Cependant, cette augmentation est limitée dans un intervalle de pH qui dépend des propriétés de solubilité du polyélectrolyte dans le milieu considéré. La variation du degré d'ionisation est également liée à la concentration en polyélectrolyte et à la taille des chaînes. En effet, des études par titration potentiométrique ont montré une augmentation du degré d'ionisation des chaînes de chitosane avec la diminution de leur concentration.[6] Cet effet est lié à la concentration et à la distribution des contre-ions dans le milieu. En milieu dilué, les contre-ions écrantent moins les charges, ce qui favorise les répulsions électrostatiques entre les monomères et induit par conséquence une augmentation de l'ionisation. La même tendance est observée avec la diminution du degré d'acétylation du chitosane.[7]

La conformation des chaînes de polyélectrolytes faibles dépend du coefficient de dissociation α (**Figure 9**). En effet, lorsque celui-ci est nul, les chaînes adoptent une conformation en pelote et quand il est proche de l'unité, les chaînes deviennent fortement étirées. Cependant, à un coefficient de dissociation α inférieur à l'unité, la conformation des chaînes reste liée à la concentration en polymère : le rayon de giration des chaînes augmente quand leur concentration diminue, conséquence de la baisse de la force ionique associée à la réduction de la concentration en contre-ions. De ce fait, les répulsions électrostatiques augmentant, il en

résulte un déploiement des chaînes polymères. A $\alpha \approx 1$ (expansion maximale des chaînes), le rayon de giration est indépendant de la concentration en polymère.[8]

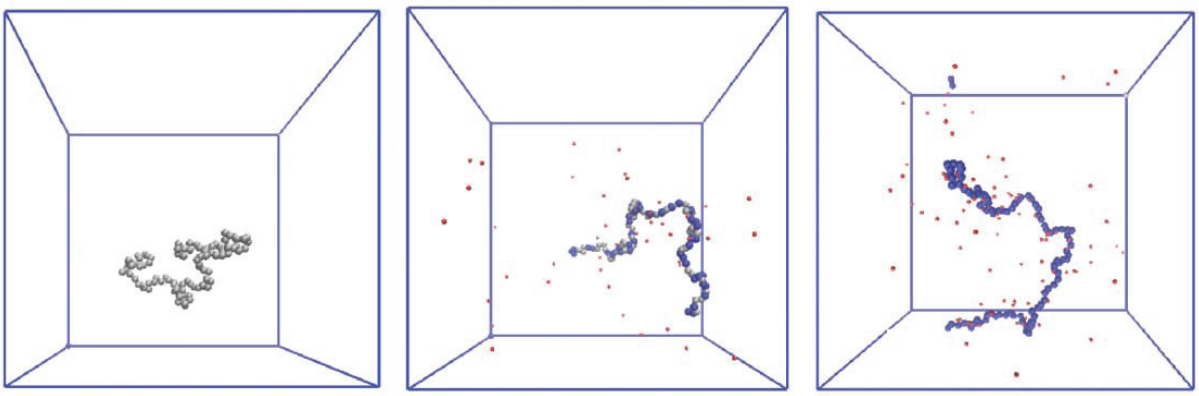


**Figure 9 : Effet du degré d'ionisation des chaînes de polyélectrolytes sur leurs conformations en solution. De la gauche à droite: α = 0, 0,5, 1. Code couleur: en gris, monomères non chargés, en bleu, monomères chargés, en rouge, les ions $H^+$.**

### III.1.2. Conformation des chaînes de polyélectrolytes faibles en interaction avec une surface

L'interaction des polyélectrolytes avec une surface et leur organisation sur celle-ci sont des phénomènes très complexes et leur compréhension nécessite la prise en compte de plusieurs paramètres. Parmi ces paramètres, on peut notamment citer les interactions entre les monomères chargés des polyélectrolytes, la densité de charge de la surface, la concentration en polyélectrolyte et en sel dans la solution, l'échelle d'étude…

Pour mieux décrire ces phénomènes d'interactions entre les chaînes de polyélectrolyte faible et une surface chargée, nous allons introduire le modèle de Dobrynin.[9-11] On considère une surface chargée de densité de charge $\sigma$ et des chaînes de polyélectrolyte faible possédant $N$ monomères en interaction, chacun de longueur $b$, la fraction de monomères chargés étant notée $f$. Notons $D_e^0$ la taille d'une pelote de la chaîne de polyélectrolyte (**Figure 10**).

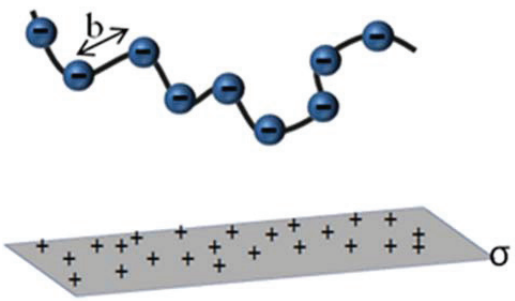



**Figure 10 : schéma représentatif de l'interaction entre une chaîne de polyélectrolyte et une surface de charge opposée.**

On peut définir alors les grandeurs suivantes :

- La densité de charge seuil d'adsorption $\sigma_s = l_B^{-2}(fN)^{-3}$
- La densité de charge surfacique $\sigma^*$ à laquelle les chaînes adsorbées à la surface commencent à s'enchevêtrer : $\sigma^* = (b^2 u^{2/3} f^{1/3} N)^{-1}$ avec $u$ le paramètre d'interaction défini par : $l_B / b$ ; $l_B$ est la longueur de Bjerrurn et correspond à la distance de séparation à laquelle les interactions entre deux charges élémentaires est comparable à l'énergie thermique $k_B T$ avec $k_B$ la constante de Boltzmann et $T$ la température.
- La densité de charge $\sigma_e$ de transition de la configuration 2D à la configuration 3D des chaînes adsorbées : $\sigma_e = \frac{f}{b^2}$
- La densité de charge $\sigma_{def}$ au-delà de laquelle les chaînes adsorbées sont compressées dans la direction perpendiculaire de la surface : $\sigma_{def} = b^{-1} l_B^{-1} f^{-1} N^{-3/2}$
- L'épaisseur des chaînes adsorbées D en fonction de la densité de charges surfaciques :

| Densité de charges σ | $\sigma < \sigma_{def}$ | $\sigma_{def} < \sigma < \sigma_e$ | $\sigma > \sigma_e$ |
|---|---|---|---|
| Epaisseur $D$ | $(l_B f N \sigma)^{-1}$ | $b^{2/3}(l_B f \sigma)^{-1/3}$ | $D_e^0 (\sigma / \sigma_e)^{1/3}$ |

En régime dilué :

A faible densité de charge surfacique, la conformation des chaînes à la surface est faiblement influencée. Les chaînes s'adsorbent alors en adoptant des conformations relatives à leurs propriétés électrostatiques. A partir d'une densité de charge $\sigma$ supérieure à $\sigma_s$ ($\sigma > \sigma_s$), l'interaction entre les chaînes commence à devenir de plus en plus importante et la distance les séparant devient plus grande que la distance séparant le bout chaîne libre de la surface. Les chaînes ainsi adsorbées sont contraintes par les répulsions électrostatiques à se confiner dans des cellules de dimension $R = (\frac{fN}{\sigma})^{1/2}$ appelées cellules de Wigner (**Figure 11**). Cette conformation des chaînes à la surface vient des interactions répulsives exercées par l'ensemble des chaînes de densité de charges effectives $efN/R^2$ sur une chaîne considérée comme isolée. Dans ces conditions, l'épaisseur de la couche des chaînes varie en $\sigma^{-1}$et dépend d'une loi de puissance en $N^{1}$ avec le degré de polymérisation de la chaîne. Quand la densité de charges surfacique atteint la densité de charges $\sigma_{def}$ qui induit une compression des chaînes adsorbées dans la direction perpendiculaire à la surface, l'épaisseur de la couche devient indépendante du degré de polymérisation des chaînes et varie en $\sigma^{-1/3}$.

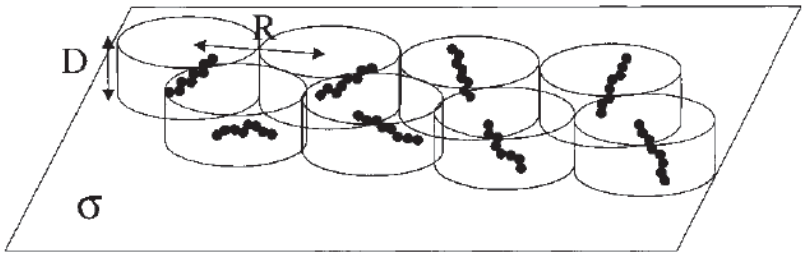



**Figure 11 : Représentation de l'adsorption des chaînes de polyélectrolytes en milieu dilué sur une surface par le modèle de Wigner.**

En régime semi-dilué :

Au-delà de la densité de charge surfacique d'enchevêtrement des chaînes $\sigma^*$, les chaînes s'auto-organisent à la surface de manière dense avec un écart entre les chaînes voisines de la taille de la longueur de corrélation des chaînes $\xi$ (**Figure 12.A**). Cette conformation des chaînes sous formes de pelotes de tailles $D_e^0$ est induite par les répulsions électrostatiques inter-chaînes. L'épaisseur de la couche ainsi formée est proportionnelle à $\sigma^{-1/3}$ et est gouvernée par le gain d'énergie apporté par les attractions électrostatiques due aux charges de la surface et la perte d'entropie émanant de la compression des chaînes. A une densité de charge très grande $\sigma > \sigma_e$, une structure à trois dimensions se forme. Cela provient du fait que les attractions entre les chaînes et la surface ne sont pas suffisantes pour compresser les chaînes à une échelle inférieure à $D_e^0$. Dans cette configuration, l'interaction des chaînes avec le champ effectif créé par les autres chaînes prédomine sur celle créée par la chaîne. L'épaisseur du film varie alors en $\sigma^{1/3}$. Cette variation de l'épaisseur avec la densité de charge vient de la balance entre les attractions électrostatiques surface-polyélectrolytes et les répulsions entre monomères chargés de la chaîne de polyélectrolyte. Dans ce type de régime, le profil de densité de la couche de polyélectrolyte est assimilé à un empilement de pelotes de taille croissante avec la distance à partir de la surface (**Figure 12.B**).

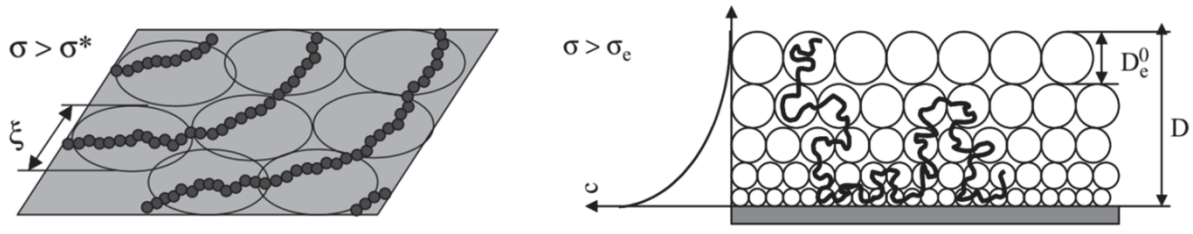



**Figure 12 : Effet de la densité de charges surfaciques sur la conformation des chaînes de polyélectrolyte en régime semi dilué.**

En résumé, l'épaisseur de la couche adsorbée sur une surface de densité de charge σ évolue de manière non linéaire avec celle-ci (**Figure 13**).

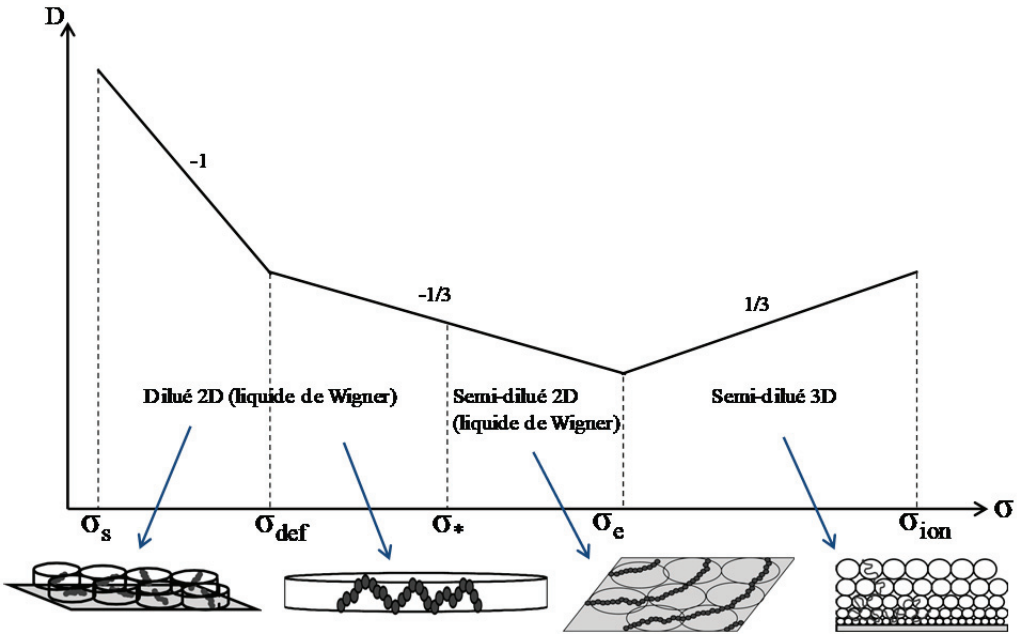



**Figure 13: Variation de l'épaisseur d'une couche de polyélectrolyte faible adsorbée sur une surface en fonction de la densité de charge surfacique.**

### III.1.3. Comportement en solution des chaînes de polyélectrolytes faibles

Les interactions et la conformation des chaînes de polyélectrolytes faibles en solution dépendent de la densité de charge des chaînes, de la nature du solvant, du degré d'ionisation des charges lié au pH du milieu, de la concentration en polymère, de la nature hydrophile ou hydrophobe du polymère, et de la présence ou non de sel dans le milieu. Le chitosane étant considéré comme un polyélectrolyte hydrophobe, nous allons focaliser cette étude de conformation en solution sur les polyélectrolytes hydrophobes. De manière générale, une chaîne de polyélectrolyte isolée, dans un milieu ne contenant pas de sel adopte une conformation étirée, formée de pelotes (**Figure 14**) dont la taille dépend de la qualité du solvant.[12] Dans le cas d'une chaîne fortement chargée, la conformation dévient fortement dépendante de la condensation de Manning.

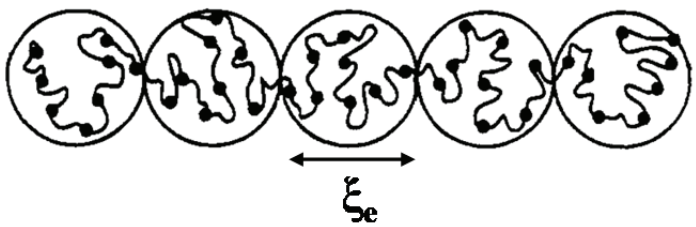



**Figure 14 : Représentation schématique d'une chaîne de polyélectrolyte faiblement chargée et ses blobs électrostatiques en solution. Schéma tiré de [12]**

Comme mentionné précédemment, la structure des polyélectrolytes hydrophobes en solution est liée à leur concentration dans le milieu. Cette dépendance permet de définir une concentration critique de transition $C^*$ entre les structures des chaînes dans le milieu. Ainsi,

en-deçà de cette concentration, le milieu est dit de régime dilué et au-delà, régime semi-dilué. En régime dilué, la longueur de corrélation est largement plus grande que la distance entre deux perles et la conformation des chaînes dépend de cette distance (**Figure 15.A**). Le rayon des perles formées dans ce régime varie en $C^{-1/4}$. Dans le régime semi-dilué, l'augmentation de la concentration en polyélectrolyte fait tendre la valeur de la longueur de corrélation vers celle séparant deux perles adjacentes. A un même ordre de grandeur entre ces deux paramètres, les interactions entre les perles deviennent écrantées et par conséquence, un blob ne pourra plus contenir qu'une seule perle (**Figure 15.B**). Le rayon des perles adopte alors une variation en $C^{-1/3}$.[13]

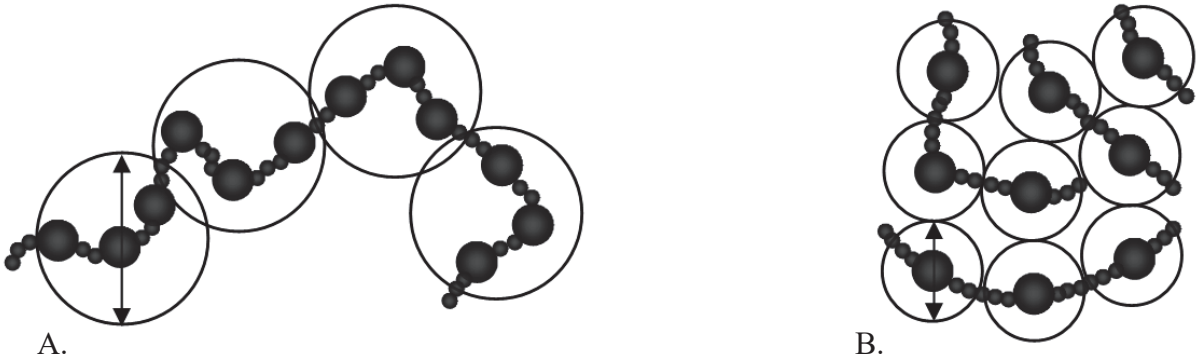



**Figure 15 : Représentation schématique des chaînes de polyélectrolyte en solution : A. régime dilué; B. régime semi-dilué. Schéma adapté de.[13]**

## III.2. Détermination de la structure des films

### III.2.1. Interaction neutron matière

Les neutrons possèdent la faculté de pénétrer très profondément la matière et d'interagir fortement avec les noyaux atomiques de celle-ci. Cette forte pénétration des neutrons dans la matière est due à leur neutralité (absence de charge) qui induit une absence d'interactions entre ceux-ci et les électrons de la matière. L'amplitude de ces interactions est décrite par la longueur de diffusion cohérente *b* caractéristique du pouvoir de diffusion de chaque atome. Cette grandeur, difficile à obtenir théoriquement, est déterminée expérimentalement puis tabulée[14, 15] (voir **Tableau 3**). Elle varie de manière non systématique avec le numéro atomique, dépend de la direction du spin nucléaire et peut varier fortement entre deux isotopes.[14] Un exemple typique de ce décalage est observé entre l'hydrogène (H ou $^{1}$H) et le deutérium (D ou $^{2}$H) qui présentent des longueurs de diffusion cohérente de $-0{,}374.10^{-12}$ cm et $0{,}667.10^{-12}$ cm respectivement. La diffusion cohérente à laquelle est associée la longueur de diffusion cohérente est la seule diffusion qui permet de déterminer la structure. La densité de longueur de diffusion neutronique d'une molécule, noté *Nb*, correspond au contraste

neutronique intrinsèque d'une espèce ; elle est obtenue à partir des longueurs de diffusion des atomes qui la composent et est donc caractéristique de sa composition chimique. Elle est définie par la relation :

$$Nb = \sum_i \frac{b_i}{V} \qquad \textbf{Équation I}$$

avec $b_i$ la longueur de diffusion cohérente des atomes constituant la molécule et $V$ le volume de la molécule.

| Longueur de diffusion cohérente $b$ ($10^{-12}$ cm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $^1$H | D | C | O | N | Si |
| -0,374 | 0,667 | 0,665 | 0,580 | 0,936 | 0,415 |
| Densité de longueur de diffusion Nb ($10^{-6}$ Å$^{-2}$) | | | | | |
| $H_2O$ | $D_2O$ | $SiO_2$ | Si (Cristal) | | |
| -0,56 | 6,38 | 3,40 | 2,07 | | |

**Tableau 3 : Longueurs et densités de longueur de diffusion de quelques atomes et molécules.**

### III.2.2. Méthode de variation de contraste

La variation de contraste est d'une grande importance pour l'étude de la diffusion des neutrons par un système ou la réflectivité des neutrons sur une interface. Le principe de la variation de contraste consiste à substituer un atome d'un matériau ou d'un solvant par un de ses isotopes dans le but d'induire une forte variation de la longueur de diffusion sans pour autant modifier de façon significative les propriétés physicochimiques et structurales du matériau. Le plus souvent cette substitution concerne l'hydrogène qui est remplacé par le deutérium. La substitution de l'hydrogène par le deutérium permet de faire varier le contraste et de diminuer la diffusion incohérente.

### III.2.3. Détermination de la réflectivité

Considérons un faisceau de neutrons se réfléchissant sur une interface plane entre deux milieux semi-infinis de densités de longueur de diffusion cohérentes $\rho_1$ et $\rho_2$. Deux cas peuvent être envisagés selon la nature de l'interface : le cas idéal de l'interface abrupte (absence de rugosité et d'interdiffusion entre les deux milieux) et le cas réel où l'interface peut être rugueuse. Dans les deux cas, une réflectivité est obtenue ; on parle de réflectivité de Fresnel dans le cas de la surface idéale. La réflectivité sur une surface est définie comme étant le rapport entre les intensités du faisceau réfléchi et du faisceau incident. De manière générale, elle est donnée par la relation :

$$\frac{R(q)}{R_F(q)} = \left| \int_0^{+\infty} \frac{d\rho}{dz} \exp(2iqz) \cdot dz \right|^2 \qquad \textbf{Équation II}$$

Avec $q$ le vecteur d'onde des neutrons exprimé par la relation : $q = \frac{2\pi}{\lambda} \sin\theta$.

Dans les conditions de la réflectivité de Fresnel, un vecteur d'onde critique $q_c$ est défini et est donné par la relation :

$$q_C = \sqrt{4\pi(\rho_2 - \rho_1)} \qquad \textbf{Équation III}$$

Pour des valeurs de $q$ inférieures à cette valeur critique, la réflectivité est totale ($R(q < q_C) = R_F(q) = 1$). Pour $q > q_c$ la Réflectivité de Fresnel est dépendante de cette valeur critique et s'écrit :

$$R_F(q) = \left| \frac{1 - \left(1 - \left(\frac{q_c}{q}\right)^2\right)^{1/2}}{1 + \left(1 - \left(\frac{q_c}{q}\right)^2\right)^{1/2}} \right|^2 \qquad \textbf{Équation IV}$$

Dans cas de l'interface réelle, l'expression de la réflectivité devient plus complexe et les courbes de réflectivité obtenues se différencient de celle de la réflectivité de Fresnel par l'apparition des franges périodiques (franges de Kiessig) (**Figure 16**) dont la période $\Delta q$ est donnée par la relation :

$$\Delta q = \frac{2\pi}{d} \qquad \textbf{Équation V}$$

(avec $d$ l'épaisseur du film gonflée sur la surface du cristal de silicium dans notre cas d'étude).

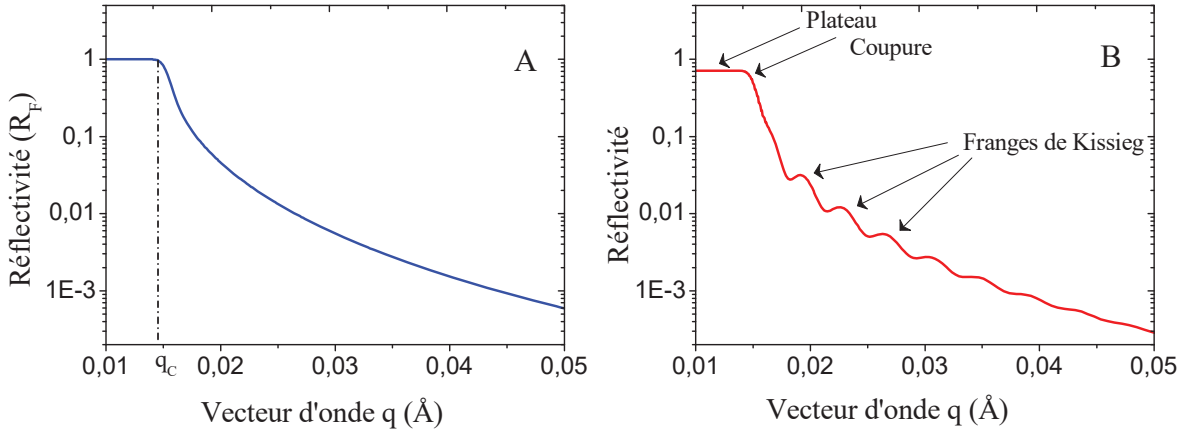



**Figure 16: Représentation semi-logarithmique de la réflectivité de Fresnel $R_F$ (A) et de la réflectivité R sur un film de chitosane (B).**

En pratique, et dans le cas de multicouches, la réflectivité est très souvent affectée par les facteurs de rugosité et d'interdiffusion entre les couches. L'effet de ces deux facteurs se traduit par une atténuation des franges de Kiessig, qui devient très marquée aux grands $q$.[16]

### III.2.4. Principe de la réflectivité des neutrons

Les mesures de réflectivité ont été effectuées en utilisant la technique du temps de vol (time of flight) qui consiste à fixer l'angle d'incidence du faisceau de neutrons et effectuer un balayage sur une gamme de longueurs d'onde disponibles du faisceau (typiquement 2 Å à 25 Å). Deux angles d'expérience ont été choisis lors de la première campagne de cette étude : -1 ° et -1,8 ° (dont les gammes de q sont $1{,}32.10^{-2}$ – 1,43 et $7{,}37.10^{-3}$– $7{,}97.10^{-1}$ $Å^{-1}$ respectivement) ; un seul lors de la deuxième campagne : -1,34 ° (dont la gamme de q est $8{,}33.10^{-3}$ – 1,9 $Å^{-1}$). Dans ce mode de réflectivité, on détermine le temps de vol des neutrons pour arriver au détecteur situé à une distance *L* de la source. Connaissant ces deux paramètres, la longueur d'onde des neutrons est déterminée par la relation de De Broglie :

$$\lambda = \frac{h}{mv} = \frac{h}{m} \cdot \frac{t}{L} \qquad \textbf{Équation VI}$$

(*h*: la constante de Planck $6{,}62.10^{-34}$ $m^2 \cdot kg \cdot s^{-1}$ et $m = 1{,}675.10^{-27}$ kg la masse du neutron)

Les neutrons provenant de la source de neutrons passent par le guide de neutrons puis arrivent directement dans le collimateur mis sous vide. Les neutrons qui ressortent du collimateur sont ensuite envoyés vers l'échantillon. Ainsi le faisceau incident est réfléchi par l'échantillon vers le détecteur (**Figure 17**).

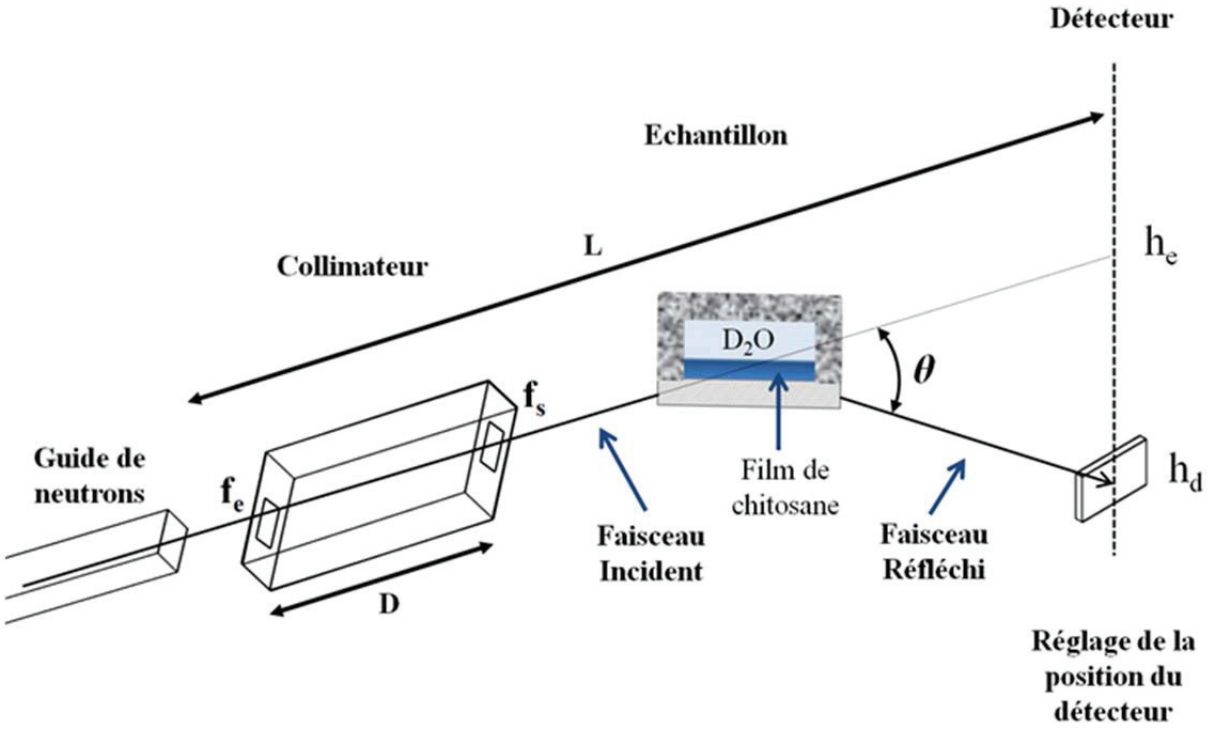



**Figure 17 : Schéma de la technique de réflectivité des neutrons sur une interface solide/liquide.**

L'étude de la réflectivité des neutrons se fait généralement sur quatre types d'interfaces : air/liquide, solide/solide, air/solide et solide/liquide (**Figure 18**). Dans cette étude, les expériences ont été effectuées à l'interface solide/liquide. La géométrie du système permettant de garder les échantillons en contact avec le solvant ($D_2O$) durant les expériences est présentée sur la **Figure 19**.

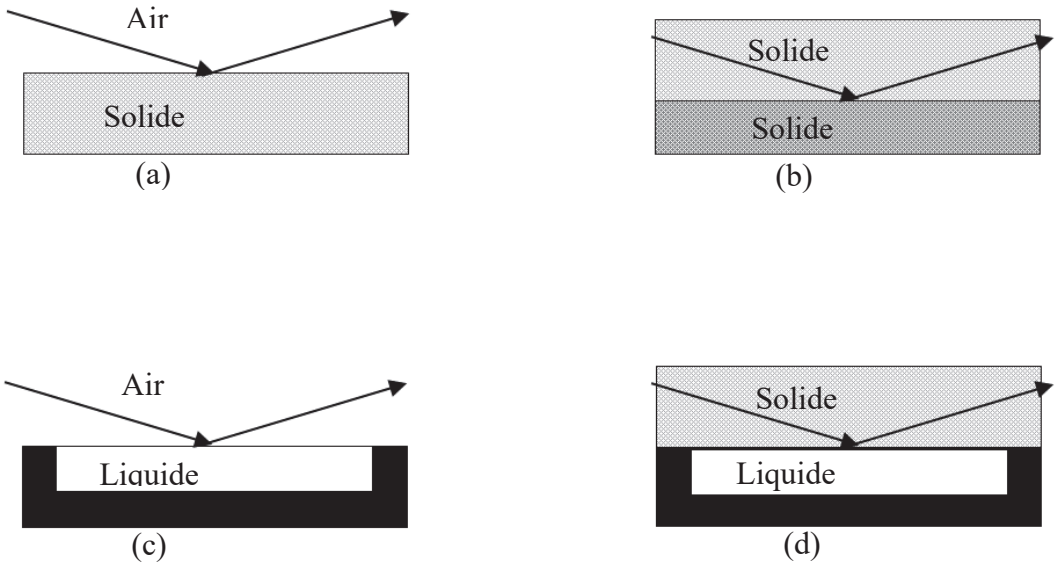



**Figure 18 : Différentes configurations d'étude de la réflectivité des neutrons sur une interface**

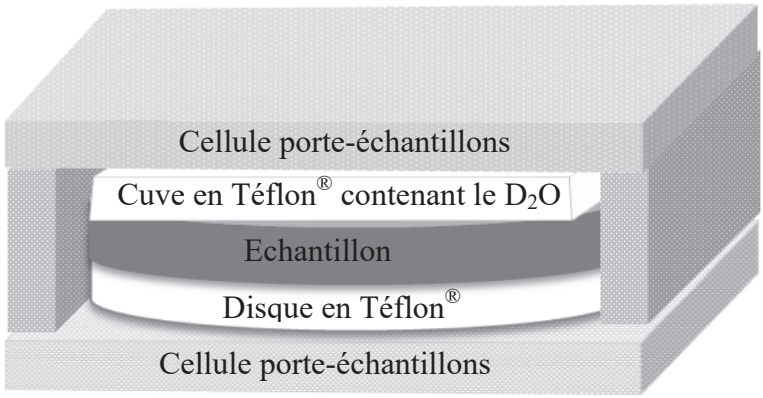



**Figure 19 : Schéma de la géométrie du porte-échantillons pour les mesures de la réflectivité des neutrons. Ce porte-échantillons maintient ensemble les pièces en Téflon® et l'échantillon de façon à maintenir le liquide de façon étanche sur le substrat de Si.**

## III.3. Partie expérimentale

### III.3.1. Préparation des échantillons

Pour mieux comprendre le comportement structural des films de chitosane en fonction de leurs paramètres moléculaires (masse moléculaire, degré d'acétylation, longueur des chaînes,…) dans des milieux de pH différents, nous avons effectué des expériences de

réflectivité des neutrons. Ces expériences ont été réalisées au laboratoire Léon Brillouin CEA-Saclay sous la supervision de Fabrice COUSIN et Didier LAIREZ. Pour mener cette étude, les films de chitosane ont été élaborés par spin-coating sur des cristaux de silicium de forme circulaire de diamètre 5 cm et d'épaisseur 0,5 cm. Du fait de la solubilité des films de chitosane obtenus avec les solutions d'acide chlorhydrique à n'importe quel pH, nous avons choisi d'effectuer ces expériences avec les films obtenus avec les solutions d'acide acétique. L'étude de la réflectivité a été effectuée en utilisant des solutions de $D_2O$ à différents pH (8,1, 7,1, 6,1, 5,5 et 4,4) de concentration en sel NaCl 10 mM pour stabiliser les pH et limiter les effets de force ionique entre les différents pH. Ces pH lus correspondent à des pH réels de 8,5, 7,5, 6,5, 5,9, et 4,8 respectivement d'après la relation ($pD = pH_{lu} + 0,40$) de Long et Glasoe.[17] Des films d'épaisseurs inférieures à la centaine de nanomètres ont été choisis lors de cette étude de façon à rester, même une fois les films gonflés, dans la gamme de profils mesurables par réflectivité de neutrons. $D_2O$ a été choisi dans cette étude pour son bon contraste avec les polysaccharides, sa faible diffusion incohérente et pour pouvoir observer le plateau de réflectivité totale (pour $q < q_c$), impossible à observer à l'interface Si-$H_2O$.

### III.3.2. Méthode de traitement des données de réflectivité

Les résultats de réflectivité présentés dans la suite de ce chapitre ont été obtenus en faisant un ajustement numérique des données brutes avec le logiciel *Pasimat* développé au LLB par Didier LAIREZ. Le modèle multicouche a été considéré pour le traitement. Cependant, dans notre cas, nous n'avons considéré qu'une seule couche de chitosane sur la surface du cristal de silicium. Les paramètres d'ajustement utilisés lors de ces traitements de données sont les densités de longueurs de diffusion des différents milieux (cristal de silicium, film de chitosane et l'eau lourde), l'épaisseur de la couche de chitosane et la rugosité à l'interface chitosane gonflé/eau lourde (la rugosité à la surface du wafer de silicium a été considérée comme nulle). Avec ce modèle, nous avons déterminé : le plateau de réflectivité, l'épaisseur à l'état gonflé des films et les profils de densité des films de chitosane. Un exemple d'ajustement d'une courbe de réflectivité et le profil de densité correspondant est présenté dans la **Figure 20**. Le profil de densité des films correspond à la variation de la concentration en chitosane dans la direction verticale (z) à partir de la surface du cristal. De manière générale, il est représenté par la fraction volumique, déterminé par la relation :

$$\emptyset(z) = \frac{\rho(z) - \rho_{(D_2O)}}{\rho_{Chi} - \rho_{(D_2O)}} \qquad \textbf{Équation VII}$$

Avec $\rho(z)$ la densité de longueur de diffusion dans le film, $\rho_{Chi}$ la densité de longueur de diffusion du chitosane sec et $\rho_{(D_2O)}$ la densité de longueur de diffusion du $D_2O$. La densité de longueur de diffusion du chitosane a été calculée par la relation :

$$\rho_{Chi} = (4{,}40 - 0{,}61 * DA).10^{-6}\text{Å}^{-2} \qquad \textbf{Équation VIII}$$

Le gonflement des films de chitosane est déterminé en considérant l'inverse de la fraction volumique en monomères.

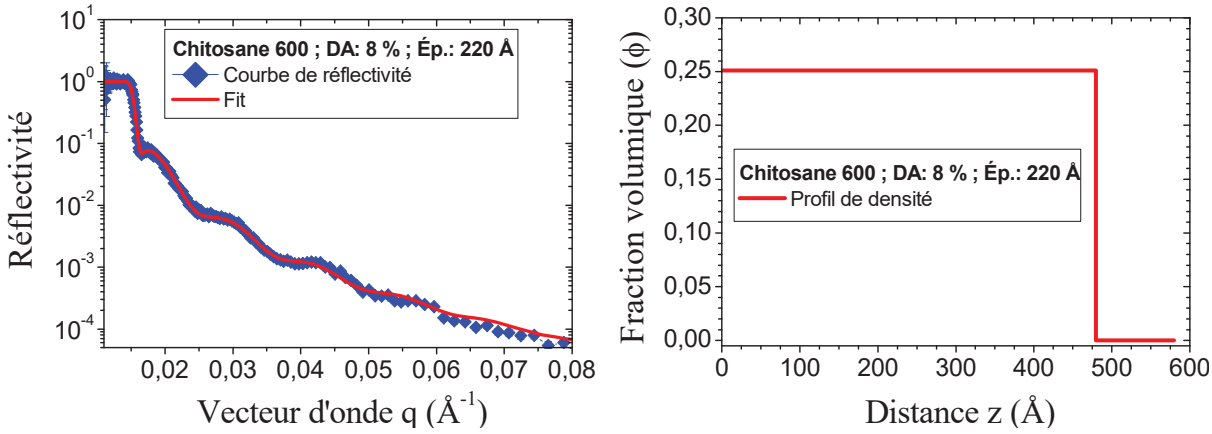



**Figure 20 : Courbe de réflectivité et exemple d'ajustement et de profil de densité obtenus sur un film de chitosane de DA 8 % et d'épaisseur 220 Å en contact avec du $D_2O$ à pH 8.**

## III.4. Résultats expérimentaux

### III.4.1. Effet du degré d'acétylation

Pour mieux faire apparaître l'effet du degré d'acétylation sur les résultats de réflectivité, des films d'épaisseurs proches ont été sélectionnés. Nous nous sommes contentés dans cette partie de représenter les courbes de réflectivité et de profils de densité à pH 7,1 (**Figure 21**), car les films sont presque insensibles au pH pour un DA donné (**voir Section III.4.3** : **effet du pH**). Nous observons comme dans le cas de l'effet du pH des courbes qui présentent des différences par la présence ou non de franges. En effet, les franges deviennent de moins en moins marquées à mesure que le DA augmente, pour devenir invisibles pour les DA > 20 %. En effet, à DA élevé, les courbes de réflectivité présentent des profils mous à cause de la forte rugosité et de l'interdiffusion à l'interface solide/$D_2O$. Ces phénomènes, souvent observés avec les films hydrogels de polymère,[18] ne permettant pas de tirer nécessairement de bonnes informations des courbes de réflectivité, nous nous sommes limités au DA (≤ 15 %) pour lesquels la présence de ces phénomènes est très faible.

Les courbes de profils de densité issues des ajustements des données de réflectivité sur l'effet du DA sont présentées sur la **Figure 21**. Visiblement, les chaînes de chitosane présentent des profils de concentration différents en fonction du DA. Les profils de densité des films sont

très abrupts notamment à bas DA. Autrement dit, les films présentent une rugosité et une interdiffusion faibles. Cela signifie que les surfaces des films à l'état gonflé sont très plates et que la concentration à proximité de la surface est la même que la concentration au cœur du film. En effet, pour un pH fixé, les chaînes de chitosane deviennent plus étirées quand le DA augmente. Les pH du liquide sonde étant proches du pH neutre, ce phénomène peut relever de l'effet du DA sur la solubilité du chitosane en milieu aqueux ou de son caractère hydrophile.[19] Ces résultats concordent avec l'augmentation du gonflement des films de chitosane avec le DA (**Figure 22**).

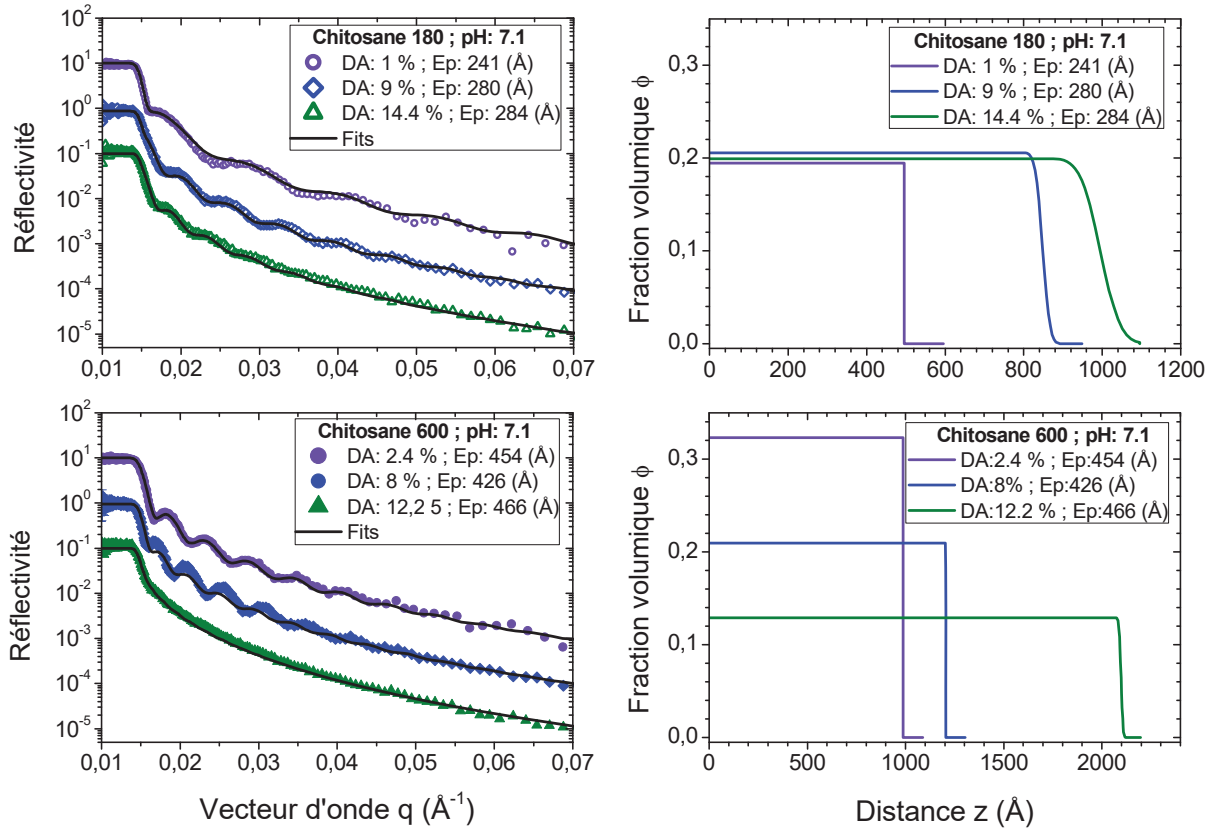



**Figure 21 : Courbes de réflectivité des neutrons et de profils de densité des films de chitosane d'épaisseurs assez proches en fonction du DA et à pH 7,1 du $D_2O$. En haut : le chitosane 180. En bas : le chitosane 600.**

Les résultats de gonflement tirés de cette étude sont présentés sur la **Figure 22**. L'effet des épaisseurs étant faible pour un DA donné, nous avons considéré la moyenne du gonflement sur toutes les épaisseurs des films afin d'avoir un aperçu global de l'effet du DA sur le gonflement des films de chitosane. Malgré la diminution du rayon de giration des chaînes de chitosane avec l'augmentation du DA prouvée par Schatz et *al.*[20], pour un pH fixé, le gonflement des films de chitosane augmente avec l'augmentation du DA. En effet, pour des pH variant entre 6,1 et 8,1, le gonflement des films varie en moyenne autour de 2 pour le DA 1%, autour de 3 pour les DA proches de 10 %, puis à environ 3,5 - 4 pour les DA proches de

15 %. La différence des longueurs des chaînes entre les trois DA de chaque masse étant très faible, cette différence de gonflement des films de chitosane en fonction du DA vis-à-vis du pH peut être expliquée par les propriétés hydrophiles du polymère. En effet, le chitosane étant plus hydrophile à mesure que son DA augmente (cf. **Chapitre 2**), il gonfle davantage.[21] Cette différence de comportement des films de chitosane peut également provenir de l'effet de la cristallinité. En effet, le chitosane étant d'autant plus cristallin que son DA est faible, cette cristallinité réduit l'accès à certains sites du chitosane par l'eau et limite par conséquence son taux de gonflement.[22]

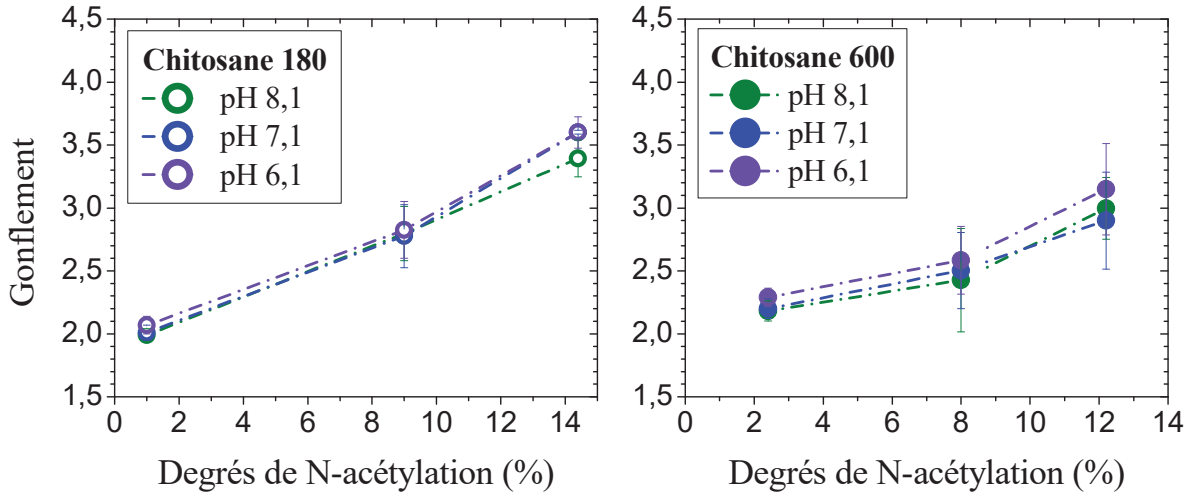



**Figure 22 : Gonflement des films en fonction du degré d'acétylation pour différents pH du $D_2O$. A gauche : le chitosane 180. A droite : le chitosane 600.**

### III.4.2. Effet des épaisseurs des films de chitosane

Dans le but de déterminer l'effet des épaisseurs des films de chitosane sur le gonflement de ceux-ci, des films avec trois épaisseurs différentes ont été préparés pour chaque DA. Pour observer en détail cet effet, les courbes de réflectivité issues des données expérimentales et les ajustements théoriques sont représentées sur la **Figure 23**. De manière générale, ces courbes présentent des différences de gonflement d'une épaisseur à l'autre. En effet, les franges de Kiessig sont plus marquées aux plus grandes épaisseurs et celles-ci deviennent de plus en plus larges avec la diminution des épaisseurs des films. Ces résultats sont à la fois observés pour le chitosane 180 et pour le chitosane 600. Les profils de densité obtenus des ajustements théoriques des données de réflectivité sur l'effet des épaisseurs des films de chitosane sont représentés sur la **Figure 24**. Ces profils montrent des épaisseurs à l'état gonflé des films qui suivent la même tendance que les épaisseurs sèches. En effet, les épaisseurs à l'état gonflé augmentent avec l'augmentation des épaisseurs sèches. Ces variations montrent bien la dépendance du profil de densité des films à leurs épaisseurs sèches.

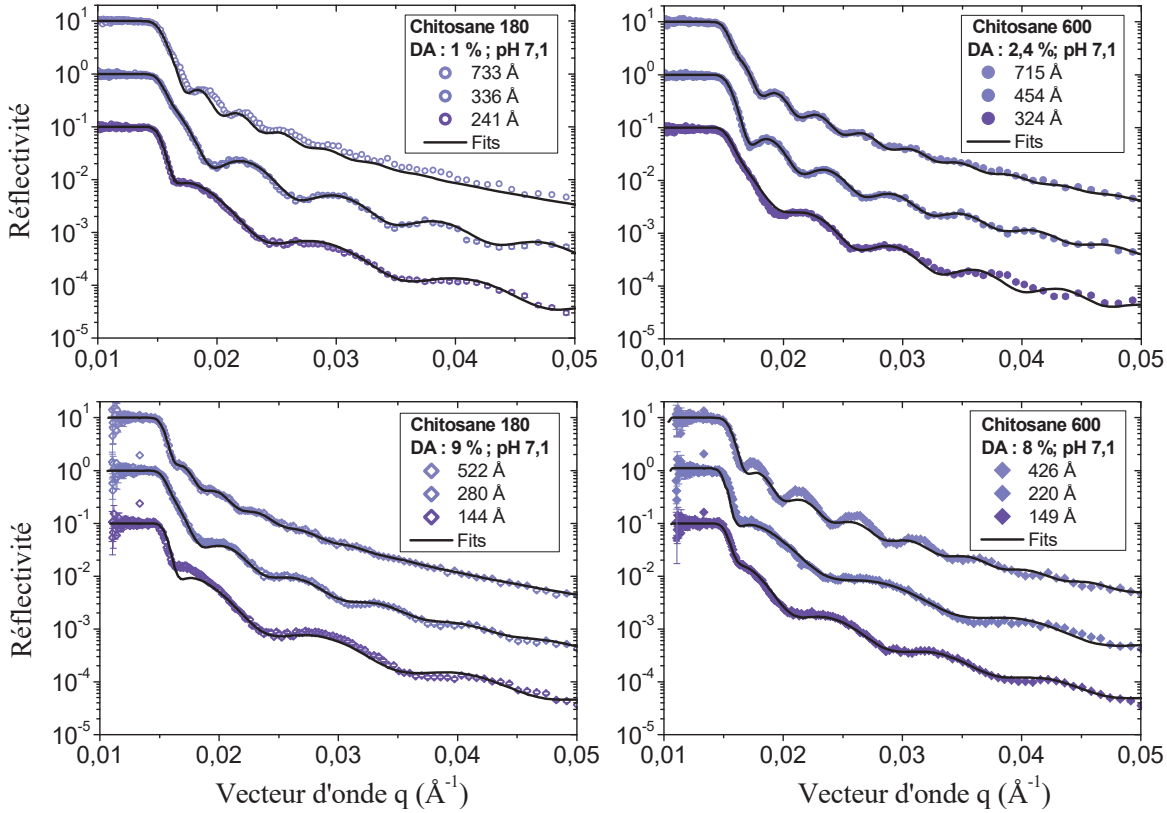



**Figure 23 : Courbes de réflectivité des neutrons sur des films de chitosane de même DA et d'épaisseurs sèches différentes en contact avec du $D_2O$ à pH 7,1. A gauche: chitosane 180 DA 1 % en haut et chitosane 180 DA 9 % en bas. A droite : chitosane 600 DA 2,4 % en haut et chitosane 600 DA 8 % en bas.**

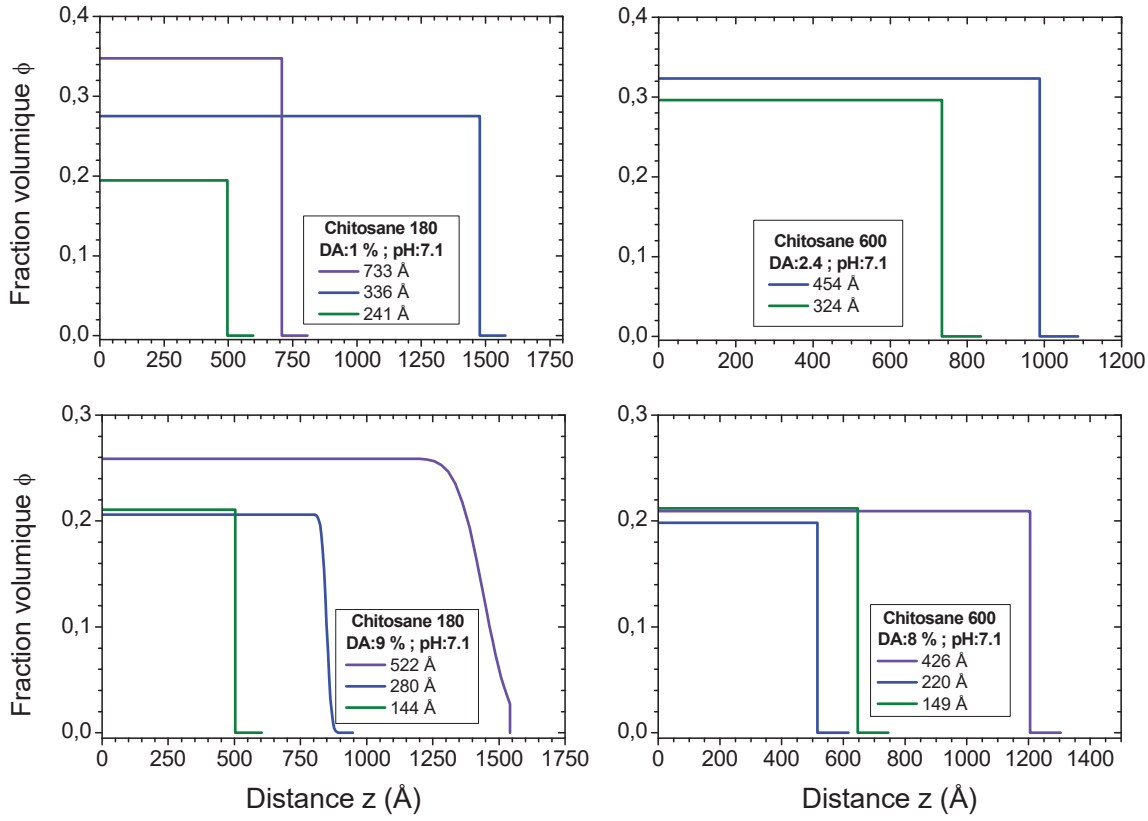



**Figure 24 : Effet des épaisseurs des films de chitosane sur la variation des profils de densité des films de chitosane 180 et 600 à bas DA et à pH 7,1.**

Les gonflements extraits des courbes de réflectivité sont représentés sur la **Figure 25**. Le gonflement de films de différentes épaisseurs est quasi-identique dans la gamme d'épaisseurs étudiée pour les DA 1 et 2,4 %. Cependant, aux DA plus élevés, le gonflement des films diminue de façon plus nette avec l'augmentation des épaisseurs. Cette variation du gonflement peut provenir des phénomènes d'interactions interchaînes et chaînes-surface. En effet, aux plus grandes épaisseurs, la densité de charges étant plus grande, les interactions chaînes-surfaces deviennent plus prépondérantes et tendent à compresser les chaînes dans la direction perpendiculaire à la surface et mènent par conséquent à des gonflements plus petits. Cependant, aux plus faibles épaisseurs, les interactions de répulsion interchaînes sont plus présentes et poussent les chaînes à s'étirer le maximum possible conduisant ainsi à des gonflements plus grands. Cette tendance peut également provenir du caractère hydrophile du substrat de silicium qui rend la couche de chitosane proche de la surface plus gonflée.

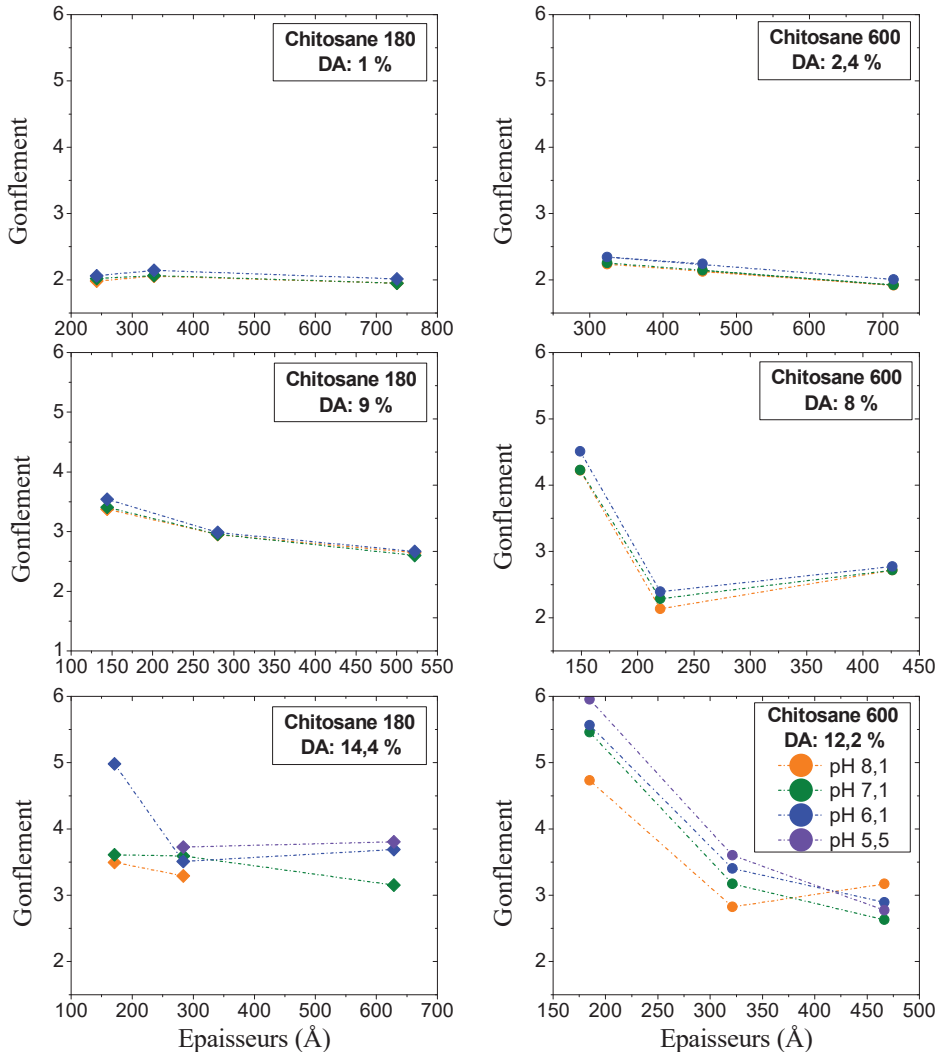



**Figure 25 : Gonflement des films de chitosane en fonction de leurs épaisseurs sèches pour différents pH du $D_2O$. A gauche : le chitosane 180 à différents DA. A droite : le chitosane 600 à différents DA. Le code de couleurs de la légende est le même pour toute la figure : orange : pH 8,1 ; vert : pH 7,1 ; bleu : pH 6,1 ; violet : pH 5,5.**

### III.4.3. Effet du pH

L'étude de la sensibilité au pH des films de chitosane a été effectuée en déterminant le gonflement des films en fonction du pH. Pour cela des solutions de $D_2O$ équilibrées à différents pH de 4,5, 5,5, 6,1, 7,1 et 8,1 ont été utilisées. Les courbes de réflectivité des différents échantillons à différents pH sont représentées sur la **Figure 26**. On remarque la très grande similitude des courbes de réflectivité obtenues à pH 8,1, 7,1, et 6,1 ; ceci indique que la structure des films de chitosane de DA compris entre 1 % et 10 % ne change que très peu. A partir du pH 5,5, les franges de Kiessig sont décalées vers les petits q, indiquant un léger gonflement des échantillons. A pH 4,5, les franges de Kiessig disparaissent totalement, ce qui est indicatif de la dissolution du film dans la solution de $D_2O$. Les échantillons présentent pour certains des gonflements différents en fonction du pH ; ils sont présentés sur la **Figure 28**. Les profils de densité tirés des ajustements de l'effet du pH du $D_2O$ sur la réflectivité des films de chitosane sont présentés sur la **Figure 27**. Nous constatons dans cette étude qu'à un DA et une épaisseur donnés, les profils de densité présentent une faible sensibilité au pH. En considérant par exemple un pKa de 6,1, le taux d'ionisation des chaînes de chitosane passe de 0,01, 0,09 et 0,5 pour les pH 8,1, 7,1 et 6,1 respectivement. Ces valeurs de taux d'ionisation quoique faibles restent très différentes. Ces valeurs suggèrent que la faible sensibilité des courbes de profil de densité au pH, doit être dû à la densité d'interactions interchaînes qui est suffisamment importante pour figer la structure du système sur la gamme de pH considérée plutôt qu'au taux d'ionisation des chaînes. Ce comportement similaire des profils de densité des chaînes de chitosane est également observé sur le gonflement presque constant des films en fonction du pH

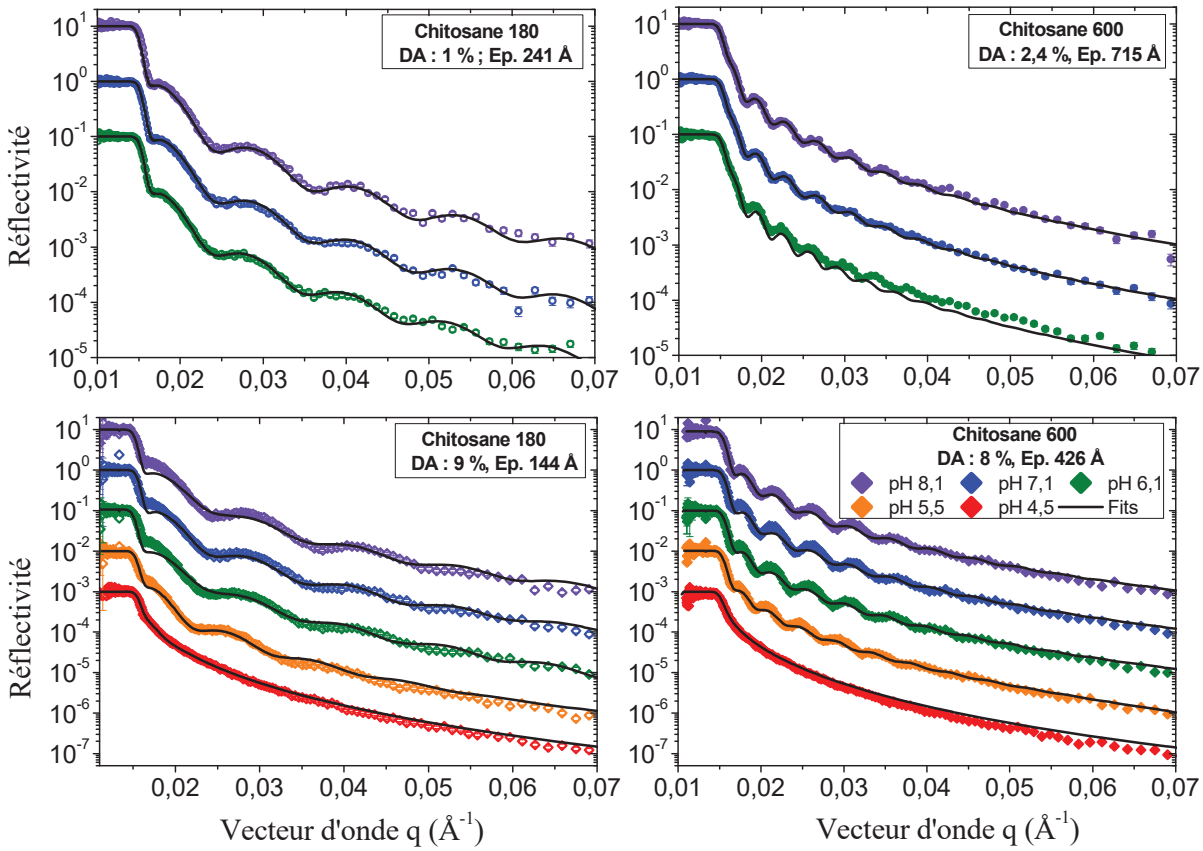



**Figure 26 : Courbes de réflectivité des neutrons des films de chitosane en fonction du pH de $D_2O$. A gauche : le chitosane 180 pour les DA 1% et 9 %. A droite : le chitosane 600 pour les DA 2,4 % et 8 %.**

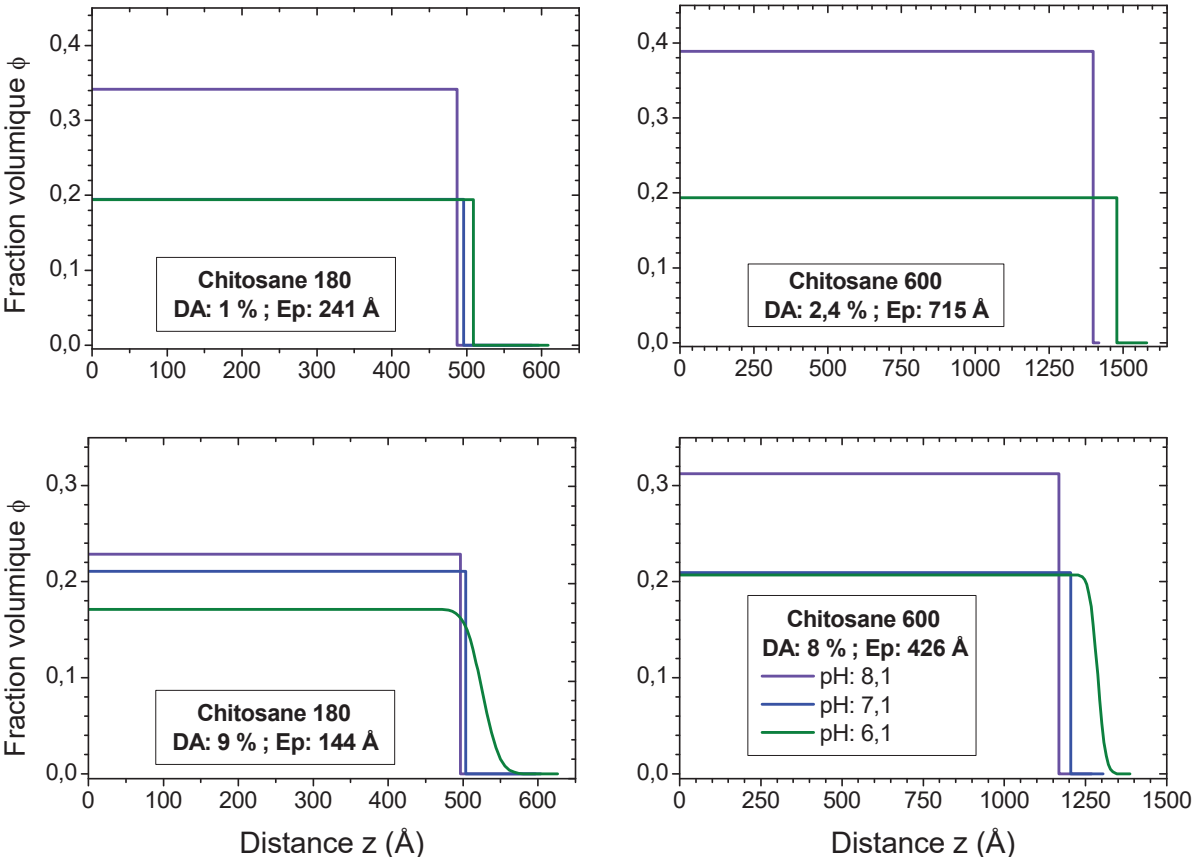



**Figure 27 : profils de densité des chaînes de chitosane en fonction du pH de l'eau lourde.**

Dans le but de bien visualiser l'effet du pH sur le gonflement des films, nous avons considéré le gonflement sur toutes les épaisseurs et pour chaque DA. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 28**. Il apparaît clairement que le DA présente l'effet le plus important sur le gonflement. En effet, un gonflement très similaire des films de chitosane est observé lorsque le pH de la solution de $D_2O$ diminue pour les DA inférieurs à 10 %. Cependant, pour les DA supérieurs à 10 %, le gonflement augmente légèrement avec la diminution du pH. Cette augmentation du gonflement des films de chitosane avec la diminution du pH est liée à l'étirement des chaînes en fonction du pH. En effet, la diminution du pH du milieu augmente le taux d'ionisation des unités D-glucosamine et la densité de charges le long des chaînes de chitosane. Cette augmentation de la densité de charges induit une augmentation du caractère hydrophile du chitosane, une augmentation des forces de répulsion entre les unités chargées du chitosane et par conséquent une augmentation de l'étirement des chaînes.

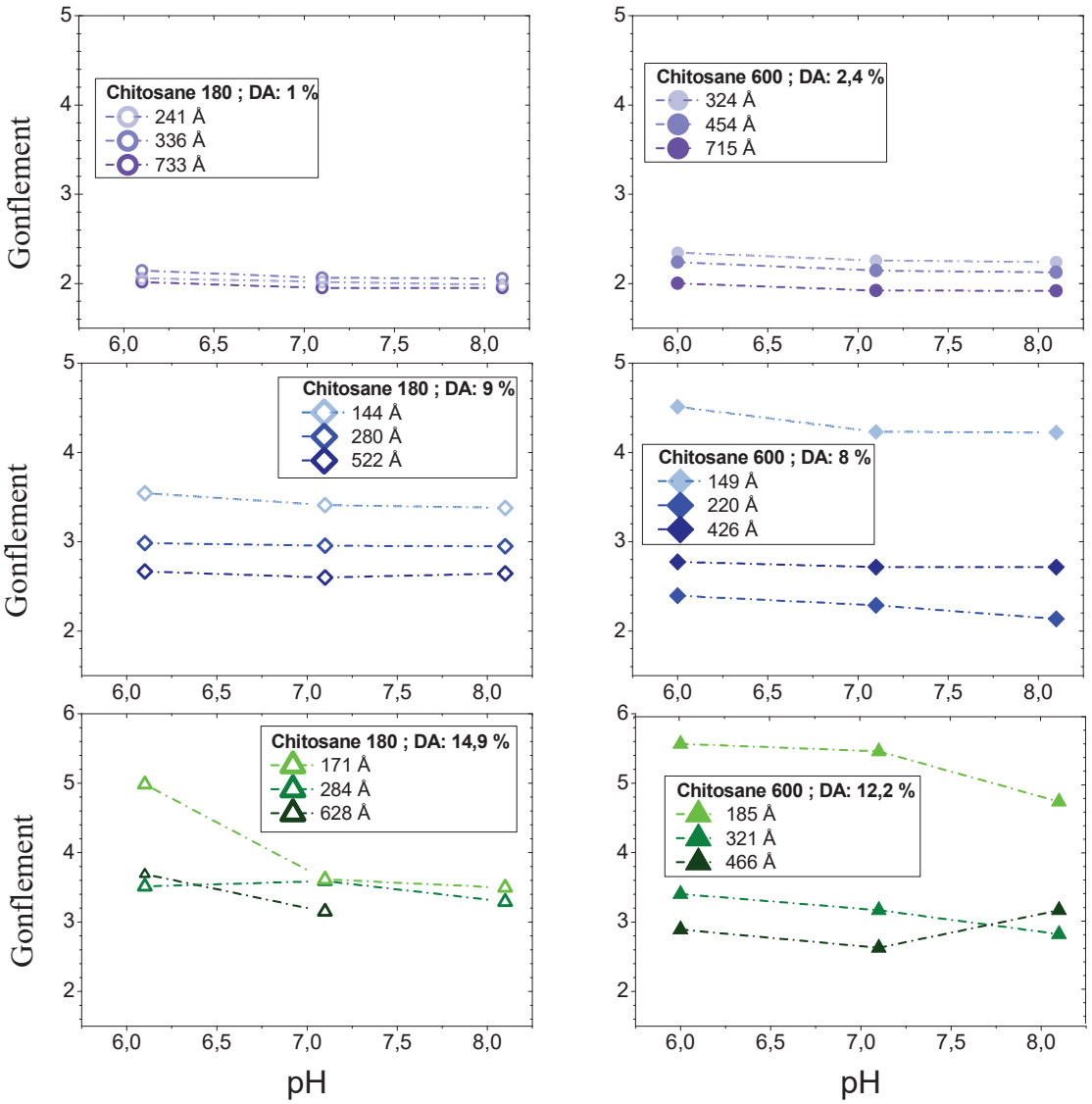



**Figure 28 : Gonflement des films de chitosane en fonction du pH du $D_2O$ pour différents DA. A gauche : le chitosane 180 et à droite : le chitosane 600.**

### III.4.4. Effet de la longueur des chaînes de chitosane

Afin de bien observer l'effet de la masse molaire du chitosane sur la réflectivité, nous avons considéré des films d'épaisseurs proches et de faibles DA (**Tableau 4**). Pour des épaisseurs similaires et des DA proches, les courbes de réflectivité du chitosane 600 présentent des franges plus étirées que celles du chitosane 180 (**Figure 29**). Cette différence est observée à tous les pH et est plus marquée aux plus grands DA.

| Chitosane 180 | | Chitosane 600 | |
|---|---|---|---|
| DA (%) | Épaisseurs (Å) | DA (%) | Épaisseurs (Å) |
| 1 | 336 | 2,4 | 324 |
| 9 | 144 | 8 | 149 |
| 14,4 | 171 | 12,2 | 185 |

**Tableau 4: Épaisseurs des films de chitosane considérées dans l'étude de l'effet de la longueur des chaînes de chitosane.**

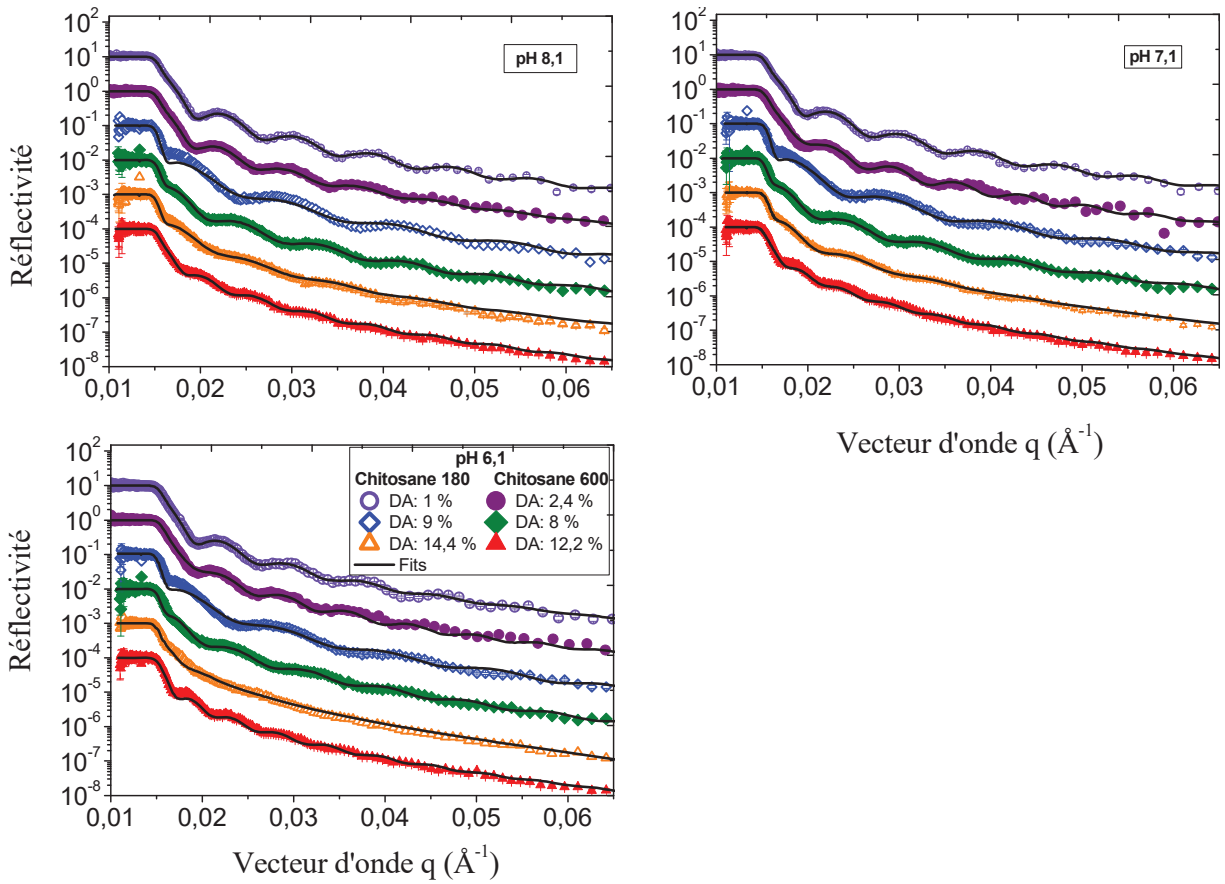
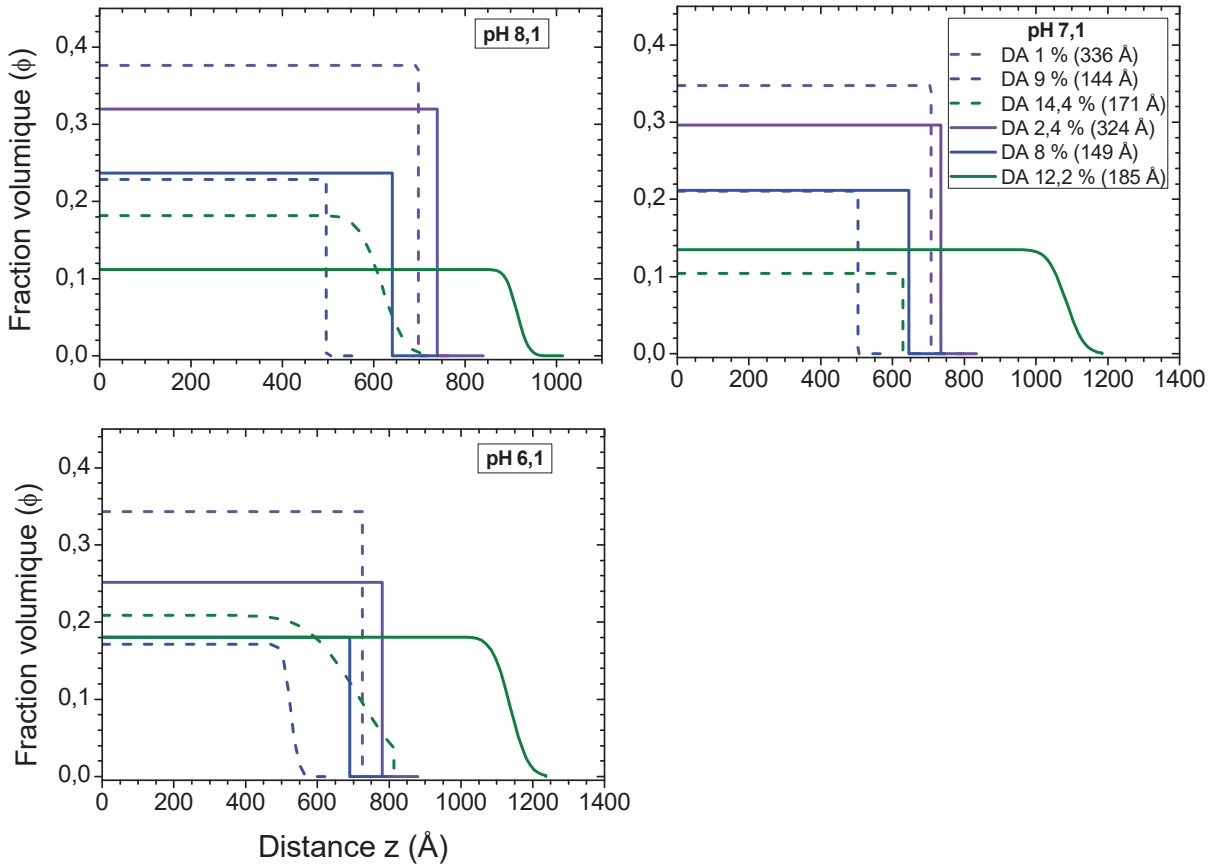



**Figure 29 : Courbes de réflectivité des films d'épaisseurs proches pour les chitosanes 180 et 600 pour différents DA et différents pH du $D_2O$.**

Les courbes de profils de densité obtenues des ajustements des courbes de réflectivité sur l'étude de l'effet de la masse molaire sont représentées sur la **Figure 30**. Nous notons de

manière générale une dépendance des profils de densité à la masse molaire du chitosane. Cependant, cette dépendance est à considérer avec le DA. En effet, à bas DA (< 2,5 %), les profils de densité sont très similaires entre les deux masses et à tous les pH. Cela suggère qu'à faible DA, les chaînes s'étirent très peu et de manière similaire. Ce résultat se confirme par les valeurs faibles et proches de gonflement obtenues pour les faibles DA entre les deux chitosanes (**Figure 31**). Ce phénomène a également été observé dans le **Chapitre II (Section III.3)** sur les empreintes de la goutte d'eau sur les films d'épaisseurs faibles et de faibles DA. Des profils de densité différents sont ensuite observés avec l'augmentation du DA (compris entre 8 % et 15 %). Dans cet intervalle de DA, les chaînes du chitosane 600 deviennent plus étirées. Cette différence d'étirement des chaînes peut provenir d'une différence de sensibilité au pH des films en rapport avec le DA.




**<u>Figure 30</u> : Profil de densité des films de chitosane d'épaisseurs proches pour les chitosanes 180 et 600 pour différents DA et différents pH du $D_2O$.**

Les résultats de gonflement obtenus des deux différents chitosanes sont présentés sur la **Figure 31**. Ces résultats montrent qu'à des DA et épaisseurs proches, les films du chitosane 600 gonflent plus que ceux du chitosane 180. Cette différence de gonflement entre les deux chitosanes confirme une contribution de la longueur des chaînes au gonflement des films. En effet, Berth et Dautzenberg ont montré que le rayon de giration des chaînes de chitosane

augmente avec l'augmentation de la masse molaire.[23] Ces résultats peuvent aussi provenir des propriétés de cristallinité des films de chitosane. D'une part, Wan et *al*.[24] ont montré que la cristallinité des films de chitosane augmente avec la diminution de la masse molaire ce qui peut limiter le gonflement des films du chitosane 180 et d'autre part, Kurita et *al*.[25] ont prouvé qu'à DA identique (13 %), le chitosane 600 est plus hygroscopique que le chitosane 180 du fait d'une perte de cristallinité du chitosane 600.

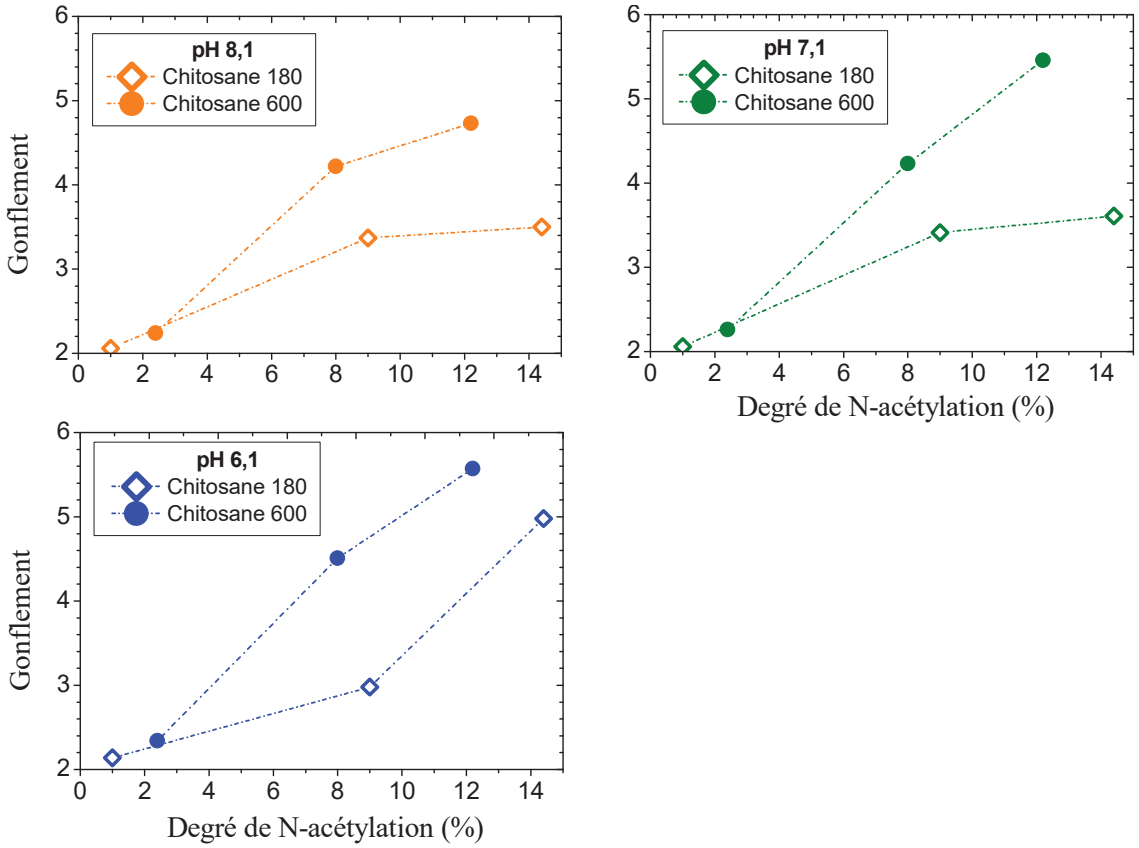



**Figure 31 : Gonflement des films de chitosane en fonction du DA pour deux masses molaires (longueur des chaînes) pour différents DA et différents pH du $D_2O$ (épaisseur des films cf tableau 4).**

## Conclusion

L'analyse des structures et de la morphologie des films de chitosane a permis de bien comprendre leur dépendance aux paramètres moléculaires et physicochimiques (DA, masse molaire, épaisseur) et environnementaux (température, pH, neutralisation, nature de l'acide,…).

Les films de chitosane présentent des morphologies dépendantes de la nature de l'acide (AcOH et HCl), du DA et de l'épaisseur des films. De manière générale, les films sont légèrement moins rugueux avec AcOH. Une diminution de la rugosité des films avec la diminution des épaisseurs est également observée d'une part et d'autre part avec l'augmentation du DA. Cependant, ces rugosités sont très faibles (< 2 nm) et cela se retrouve dans les résultats de réflectivité des neutrons avec les profils de densité très abrupts. Les différents traitements (recuit, neutralisation) des films de chitosane, ont permis par l'analyse de leur structure chimique par IR de confirmer la neutralisation au cours du temps des films obtenus avec AcOH (moins de 24 h). L'analyse de la structure des films par la réflectivité des neutrons (gonflement et profil de densité des films) présente des résultats plus sensibles aux paramètres moléculaires (DA, masse molaire) qu'à l'épaisseur, et au pH. En effet, le gonflement des films augmente avec l'augmentation du DA. Pour des épaisseurs proches, le gonflement est plus grand avec les films du chitosane 600.

## **Références** :


1. Murray, C. A.; Dutcher, J. R., Effect of changes in relative humidity and temperature on ultrathin chitosan films. *Biomacromolecules* **2006,** 7, (12), 3460-3465.
2. Okuyama, K.; Noguchi, K.; Miyazawa, T.; Yui, T.; Ogawa, K., Molecular and crystal structure of hydrated chitosan. *Macromolecules* **1997,** 30, (19), 5849-5855.
3. Domszy, J. G.; Roberts, G. A., Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. *Macromolecular chemistry and Physics* **1985,** 186, (8), 1671-1677.
4. Demarger-Andre, S.; Domard, A., Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state. *Carbohydrate Polymers* **1994,** 23, (3), 211-219.
5. Noriega, S. E.; Subramanian, A., Consequences of neutralization on the proliferation and cytoskeletal organization of chondrocytes on chitosan-based matrices. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* **2011,** 2011.
6. Rinaudo, M.; Pavlov, G.; Desbrieres, J., Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer* **1999,** 40, (25), 7029-7032.
7. Sorlier, P.; Denuzière, A.; Viton, C.; Domard, A., Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* **2001,** 2, (3), 765-772.
8. Nová, L.; Uhlík, F.; Košovan, P., Local pH and effective p KA of weak polyelectrolytes–insights from computer simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**.
9. Dobrynin, A. V.; Deshkovski, A.; Rubinstein, M., Adsorption of polyelectrolytes at an oppositely charged surface. *Physical review letters* **2000,** 84, (14), 3101.
10. Dobrynin, A. V.; Deshkovski, A.; Rubinstein, M., Adsorption of polyelectrolytes at oppositely charged surfaces. *Macromolecules* **2001,** 34, (10), 3421-3436.
11. Dobrynin, A. V.; Rubinstein, M., Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in Polymer Science* **2005,** 30, (11), 1049-1118.
12. Dobrynin, A. V.; Colby, R. H.; Rubinstein, M., Scaling theory of polyelectrolyte solutions. *Macromolecules* **1995,** 28, (6), 1859-1871.
13. Dobrynin, A. V.; Rubinstein, M., Hydrophobic polyelectrolytes. *Macromolecules* **1999,** 32, (3), 915-922.
14. Grillo, I., Small-angle neutron scattering and applications in soft condensed matter. In *Soft matter characterization*, Springer: 2008; pp 723-782.
15. Sears, V. F., Neutron scattering lengths and cross sections. *Neutron news* **1992,** 3, (3), 26-37.
16. Cousin, F.; Menelle, A. In *Neutron reflectivity*, EPJ Web of Conferences, 2015; EDP Sciences: 2015; p 01005.
17. Glasoe, P. K.; Long, F., Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide1, 2. *The Journal of Physical Chemistry* **1960,** 64, (1), 188-190.
18. Li, M.; Bresson, B.; Cousin, F.; Fretigny, C.; Tran, Y., Submicrometric films of surface-attached polymer network with temperature-responsive properties. *Langmuir* **2015,** 31, (42), 11516-11524.
19. Varum, K.; Ottoy, M.; Smidsrod, O., Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation. *Carbohydrate Polymers* **1994**.

20. Schatz, C.; Viton, C.; Delair, T.; Pichot, C.; Domard, A., Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules* **2003,** 4, (3), 641-648.
21. Feng, F.; Liu, Y.; Zhao, B.; Hu, K., Characterization of half N-acetylated chitosan powders and films. *Procedia Engineering* **2012,** 27, 718-732.
22. Suh, J.-K. F.; Matthew, H. W., Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* **2000,** 21, (24), 2589-2598.
23. Berth, G.; Dautzenberg, H., The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* **2002,** 47, (1), 39-51.
24. Wan, Y.; Creber, K. A.; Peppley, B.; Bui, V. T., Ionic conductivity of chitosan membranes. *Polymer* **2003,** 44, (4), 1057-1065.
25. Kurita, K.; Tomita, K.; Tada, T.; Ishii, S.; Nishimura, S. I.; Shimoda, K., Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1993,** 31, (2), 485-491.

# CHAPITRE IV : CARACTERISATION BIOLOGIQUE DES FILMS DE CHITOSANE

CHAPITRE IV : CARACTERISATION BIOLOGIQUE DES FILMS DE CHITOSANE.. 141
Introduction et contexte de l'étude ..... 143
I. Partie expérimentale ..... 145
I.1. Préparation des films de chitosane ..... 145
I.2. Préparation du milieu de culture des bactéries ..... 145
I.3. Méthode de culture des bactéries sur les films de chitosane ..... 146
I.4. Tests de sensibilité des bactéries aux antibiotiques ..... 147
I.5. Techniques d'observation de l'adhésion des bactéries ..... 147
II. Résultats expérimentaux ..... 148
II.1. Adhésion et prolifération des bactéries *E. coli* ..... 148
II.2. Adhésion et prolifération des bactéries *Klebsiella pneumoniae* ..... 150
II.3. Adhésion et prolifération des bactéries *Staphylococcus aureus* ..... 152
II.4. Effet non toxique des films de chitosane sur les bactéries *E. coli* ..... 153
II.5. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques ..... 154
III. Discussion des résultats expérimentaux ..... 155
III.1. Effet des paramètres moléculaires ..... 155
III.2. Effet des paramètres physicochimiques ..... 157
Conclusion ..... 160
Références ..... 161

## Introduction et contexte de l'étude

Ce chapitre s'inscrit dans le cadre d'un projet collaboratif entre le laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères de l'université de Lyon (UMR 5223), le Laboratoire de Chimie Bactérienne (UMR 7283, Tâm Mignot et Julie Tréguier) et le Laboratoire Adhésion et Inflammation (Inserm U1067, CNRS UMR 7333, Olivier Théodoly) de l'université d'Aix-Marseille. Ce projet vise à apporter une solution pour lutter contre la résistance des bactéries aux antibiotiques. Ce phénomène d'antibio-résistance ne cesse de prendre de l'ampleur et constitue actuellement une menace sanitaire d'échelle mondiale. Ce phénomène naturel est accentué par la consommation excessive d'antibiotiques. Selon un rapport rendu public en juin 2015 par le Ministère de la Santé,[1] la France consommerait 30 % de plus d'antibiotiques que la moyenne européenne et 3 fois plus que les Pays-Bas, la Suède ou la Norvège. De nos jours, les infections dues à l'antibio-résistance touchent plus de 150.000 personnes/an en France et 12.500 personnes en meurent directement. Selon des études prévisionnelles, en l'absence d'une politique efficace de lutte contre l'antibio-résistance, ce phénomène entraînerait plus de 10 millions de décès/an à travers le monde en 2050 et le coût estimé pour résoudre ce problème s'élèverait à plus de 100.000 milliards de milliards de dollars.[2]

L'antibio-résistance est également responsable de certaines infections nosocomiales. En effet, certaines bactéries isolées en milieu hospitalier telles que le *Staphylococcus aureus,* le *Staphylococcus pneumoniae,* l'*Escherichia coli*,… sont résistantes aux antibiotiques. Le traitement actuel de ces infections se fait par injection intraveineuse d'antibiotiques qui nécessitent le plus souvent une hospitalisation prolongée des patients, ce qui impose à la communauté un effort financier important. Par conséquent, proposer une solution aux traitements de ces infections limiterait les hospitalisations prolongées, les dépenses médicales et la mortalité dues à ces infections.

Un des buts de ce projet est de parvenir à un dispositif de diagnostic rapide qui permettrait de déterminer les antibiotiques les plus efficaces plus de façon plus simple et plus rapide que les méthodes « traditionnelles » de détermination (sur gélose ou VITEK ®).

Pour mener à bien cette étude et éviter tout problème lié à la reproductibilité des tests biologiques, des films de chitosane de paramètres moléculaires (DA et masse molaire) bien contrôlés et de propriétés physicochimiques, morphologiques et structurales bien maîtrisées (Cf **Chapitres II et III**) ont été utilisés. Le choix du chitosane comme support d'adhésion des

bactéries est lié à ses propriétés intéressantes de bio-adhésion.[3, 4] Différentes souches de bactéries (*Escherichia Coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus*) ont été choisies pour mener cette étude. Les résultats présentés dans ce chapitre sont une évaluation biologique des films de chitosane. En effet, ils illustrent l'adhésion et la prolifération des bactéries sur les films. L'analyse biologique des films de chitosane a été effectuée par les laboratoires LCB (Laboratoire de Chimie Bactérienne, UMR 7283) et LAI (Laboratoire Adhésion et Inflammation, Inserm U1067, CNRS UMR 7333) de Marseille.

# I. Partie expérimentale

## I.1. Préparation des films de chitosane

Les films de chitosane utilisés dans cette étude ont été préparés par spin-coating sur des substrats transparents de verre pour faciliter les caractérisations optiques nécessaires en biologie. L'objectif étant d'avoir des films d'une épaisseur inférieure à la centaine de nanomètres, des solutions de chitosane de concentrations de 0,67 % et 0,5 % pour le chitosane 600 et de 1 % et 0,67 % pour le chitosane 180 ont été choisies. Les différents paramètres moléculaires de la bibliothèque de chitosanes utilisée dans cette étude sont présentés dans le **Tableau 1**.

| Source | Masse $M_w$ (kg/mol) | DA (%) | Dispersité (Đ) |
|---|---|---|---|
| Crevette | ~ 180 | 1,0 | 1,78 |
| | | 9,0 | 1,82 |
| | | 14,4 | 1,87 |
| | | 25,5 | 1,84 |
| | | 35,2 | 1,78 |
| | | 41,9 | 1,66 |
| | | 52,1 | 1,56 |
| Calamar | ~ 600 | 2,4 | 1,39 |
| | | 8,0 | 1,44 |
| | | 12,2 | 1,40 |
| | | 21,5 | 1,43 |
| | | 34 | 1,41 |
| | | 45,3 | 1,52 |
| | | 52,6 | 1,37 |

**Tableau 1 : Caractéristiques moléculaires des différents chitosanes utilisés dans cette étude.**

## I.2. Préparation du milieu de culture des bactéries

La solution de culture des bactéries a été préparée à partir d'une solution mère de LB (lysogeny broth) à 37 °C. Cette solution est constituée de 10 g/L de bacto-casitone (BD, 225930), 5 g/L d'extrait de levure bacto (BD 212750), 5 g/L de NaCl (Biosciences, RC-0,93) en concentration et de l'eau osmosée ajustée par du $MgCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, et du KCl dans le but d'obtenir des concentrations de 0,46 µg/L, 6,15 µg/L, 3,21 µg/L et 5,02 µg/L de Mg, K, Ca et de Zn respectivement. La solution de culture est ainsi obtenue par dispersion des bactéries dans cette solution mère de LB (densité optique D.O. = 0,5). La solution est ensuite

diluée pour avoir une D.O. d'environ 0,01. Les différentes souches de bactéries utilisées dans cette étude sont mentionnées dans le **Tableau 2**.

| *Escherichia coli* (Gram négatif) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| K17 | MG 1655 | ECc 53 | ECc 106 | ECc 219 | ECc 227 | ECc 668 | ECc 673 | ECc 677 | ECc 678 | ECc 687 | ECc 695 | ECc 698 | ECc 704 | ECc 727 | ECc 746 | ECc 750 |

| *Klebsiella pneumoniae* (Gram négatif) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ATCC 600703 | LM21 | LM21 Δ wec A | LM21 Δ wzm | LM21 Δ wzx |

| *Staphylococcus aureus* (Gram positif) | | | |
|---|---|---|---|
| COL | USA 300 | Newman | NCTC 8325 |

**Tableau 2 : Tableaux récapitulatifs des différentes souches de *E. coli*, de *K. pneumoniae* et de *S. aureus* testées sur les films de chitosane (Les noms attribués aux différentes souches de bactéries représentent des codes internes).**

## I.3. Méthode de culture des bactéries sur les films de chitosane

Les tests sur les films sont effectués en utilisant des canaux milli-fluidiques (sticky-slide VI 0.4, IBIDI) pour maximiser le nombre de tests sur chaque surface. Les films sont d'abord hydratés par de l'eau à travers les canaux (**Figure 1.A**). Après l'étape d'hydratation, la solution contenant les bactéries est déposée sur les films par les canaux milli-fluidiques (**Figure 1.B**). Les canaux milli-fluidiques permettent de faciliter le contact entre les bactéries et le film de chitosane, de réduire la quantité de bactéries en suspension et de travailler avec des solutions peu concentrées en bactéries. Une fois le dépôt effectué, un rinçage sous flux par une pompe à travers les canaux milli-fluidiques est effectué dans le but d'évacuer les bactéries en suspension qui n'ont pas adhéré et de maintenir le champ d'observation clair (**Figure 1.C**).

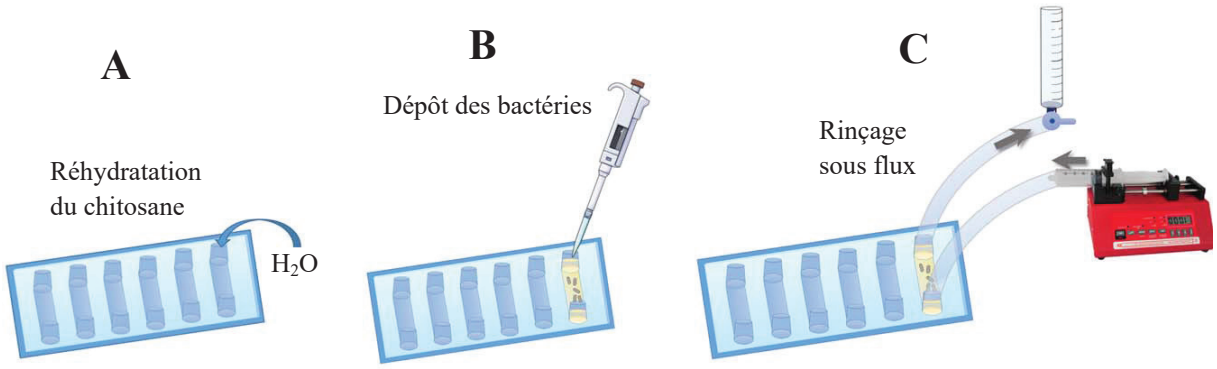



**Figure 1 : tests de culture des bactéries sur les films de chitosane ; A : réhydratation du film de chitosane ; B : dépôt des bactéries par les canaux milli-fluidiques ; C : rinçage sous flux par le milieu de culture (flux de rinçage : 1 à 1,5 mL/min puis 1,5 à 5 mL/min ; flux de travail : 3 mL/h).**

## I.4. Tests de sensibilité des bactéries aux antibiotiques

Les tests de sensibilité des bactéries ont été principalement effectués sur les souches *E. coli* (*E. coli K12, ECc 227 et ECc 687*). Les différents antibiotiques utilisés dans cette étude sont l'ampicilline (Amp), l'ertapénem (ERT) et le mecillinam (MEC). Pour tous les antibiotiques testés, une même concentration en bactéries a été utilisée. La solution de bactéries est déposée sur la surface de chitosane à travers les canaux millifluidiques. A chaque canal millifluidique, une concentration différente d'antibiotique est rajoutée. Après l'ajout de l'antibiotique à travers les canaux millifluidiques, une image de l'évolution de la morphologie des bactéries est prise toutes les 2 – 3 minutes. Les tests avec l'ampicilline ont été effectués avec un milieu LB contenant 100 µg/L d'ampicilline. Les effets de l'ertapénem et du mecillinam sur les bactéries ont été évalués sous différentes concentrations. A la fin des acquisitions et pour chaque antibiotique, la plus petite concentration entraînant la mort des bactéries a été considérée comme étant la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les concentrations minimales inhibitrices obtenues de cette étude sont comparées à celles obtenues par le système VITEK®.

## I.5. Techniques d'observation de l'adhésion des bactéries

L'observation de l'adhésion et de la prolifération des bactéries sur les films de chitosane a été effectuée par microscopie optique et par microscopie à contraste interférentiel par réflexion (MCIR). Le premier permet d'observer les bactéries à la surface des films et le second de visualiser les zones de contact entre les bactéries et la surface. Le principe du MCIR est basé sur l'interférence des lumières réfléchies par les bactéries et le substrat. Une partie de la lumière incidente $I_0$ est réfléchie en premier par le substrat pour donner une première onde réfléchie. L'onde transmise par le substrat est ensuite réfléchie à nouveau par les bactéries pour donner une onde réfléchie $I_2$ (**Figure 2**). L'interférence des ondes $I_1$ et $I_2$ permet une augmentation du contraste et par conséquent une visualisation claire des zones de contact qui apparaissent très sombres.

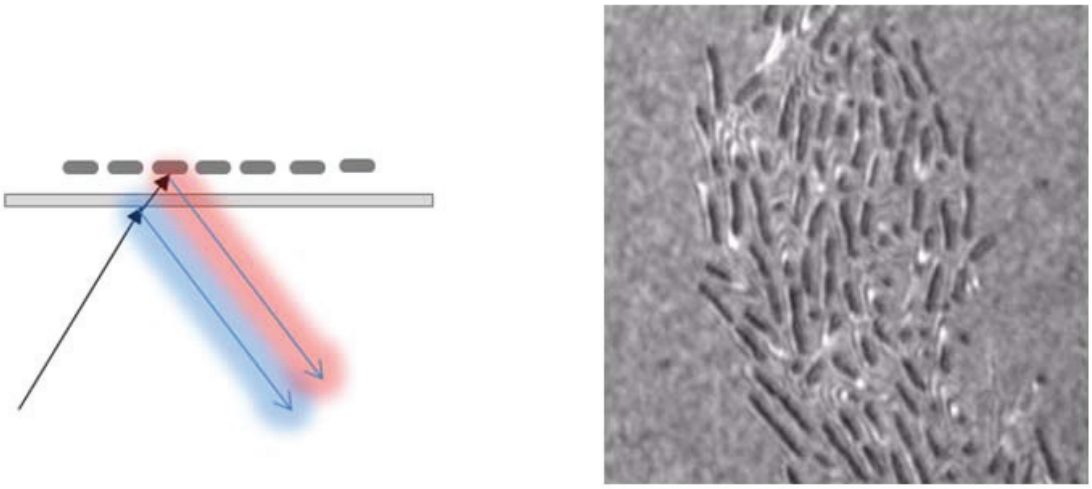


**Figure 2 : principe du microscope de contraste interférentiel (à gauche) permettant la visualisation des zones de contact entre les bactéries et la surface (à droite).**

# II. Résultats expérimentaux

## II.1. Adhésion et prolifération des bactéries *E. coli*

Avant d'étudier directement l'effet des paramètres moléculaires du chitosane et des propriétés physicochimiques des films de chitosane sur les réponses biologiques des bactéries, nous avons d'abord effectué des tests d'adhésion des bactéries *E. coli* K17 à la fois sur des substrats de verre recouverts et non recouverts de chitosane. Les tests biologiques sont d'abord effectués sur des substrats de verre nus (non recouverts de chitosane) qui vont servir de référence pour l'adhésion et la prolifération de *E. coli* K17 sur les films de chitosane de différents degrés d'acétylation. Les résultats d'adhésion sont présentés sur la **Figure 3.C**. Les résultats montrent une adhésion très faible des bactéries sur ces substrats nus. Les mêmes tests sont ensuite effectués sur des substrats de verre recouverts de chitosane puis rincés par une solution aqueuse d'acide acétique à pH 4 dans le but de ne garder qu'une monocouche de chitosane adsorbée sur les substrats de verre. Contrairement aux substrats de référence, les substrats de verre recouverts de chitosane puis rincés présentent une adhésion de *E. coli* K17 (**Figure 3.C**). Ces résultats montrent l'importance de la présence du chitosane sur les substrats de verre pour l'adhésion des bactéries.

Dans le but d'étudier l'effet des paramètres moléculaires du chitosane et les propriétés physicochimiques des films, les tests de culture bactérienne ont été effectués sur des films non rincés de chitosane de différents DA, de différentes masses molaires et d'épaisseurs inférieures à la centaine de nanomètres. Le choix de mener cette étude sur des films non rincés vient de leur caractère lisse et homogène. Les résultats obtenus sont résumés dans le

**Tableau 3.A**. Ces résultats montrent une adhésion initiale de *E. coli* K17 sur tous les films de chitosane. L'adhésion des bactéries est suivie de leur prolifération sur les films de chitosane. Cependant, l'adhésion et la prolifération des bactéries dans le temps suivant un métabolisme normal n'ont été observées que pour le DA 52,1 % du chitosane 180 (**Figure 3.B**). Une prolifération des bactéries a également été observée avec le DA 2,4 % du chitosane 600 mais le métabolisme de prolifération est altéré : des contraintes physiques entraînant une torsion des bactéries ont été remarquées (**Figure 3.A**). A l'issue de ces premiers tests de *E. coli* K17, d'autres souches de *E. coli* ont été testées pour confirmer les résultats des films du chitosane 180 (DA 52,1 %). Les résultats d'adhésion et de prolifération de ces différentes souches sont présentés dans le **Tableau 3.B**. Nous avons observé que plus de 80 % des souches de *E. coli* testées présentent, comme dans le cas de *E. coli* K17, une adhésion et une prolifération suivant leur métabolisme normal.

**A**

| | DA (%) | Conc. | Adésion t0 | Prolifération | Morphologie |
|---|---|---|---|---|---|
| Chitosane 180 | 1 | 0,67% | + | + | - |
| | 1 | 1% | + | + | - |
| | 35,2 | 0,67% | + | + | + /- |
| | 41,9 | 0,67% | + | + | + /- |
| | 52,1 | 0,67% | + | + | + |
| | 52,1 | 1,30% | + | + | + |
| Chitosane 600 | 2,4 | 0,50% | + | + | - |
| | 2,4 | 0,67% | + | + | - |
| | 52,5 | 0,50% | + | + | - |
| | 52,5 | 0,67% | + | + | - |

**B**

| Souches | Adhésion |
|---|---|
| K12 | + |
| MG1655 | + |
| ECc 227 | + |
| ECc 219 | + |
| ECc 53 | + |
| ECc 106 | + |
| ECc 704 | + |
| ECc 727 | - * |
| ECc 678 | + |
| ECc 677 | + |
| ECc 668 | + |
| ECc 773 | + |
| ECc 687 | + |
| ECc 746 | - * |
| ECc 750 | - |
| ECc 698 | + |
| ECc 695 | - |

* métabolisme anormal

**Tableau 3 : récapitulatif des résultats d'adhésion et de prolifération des bactéries *E. Coli* sur les films de chitosane. B : chitosane 180, DA 52,1 %.**

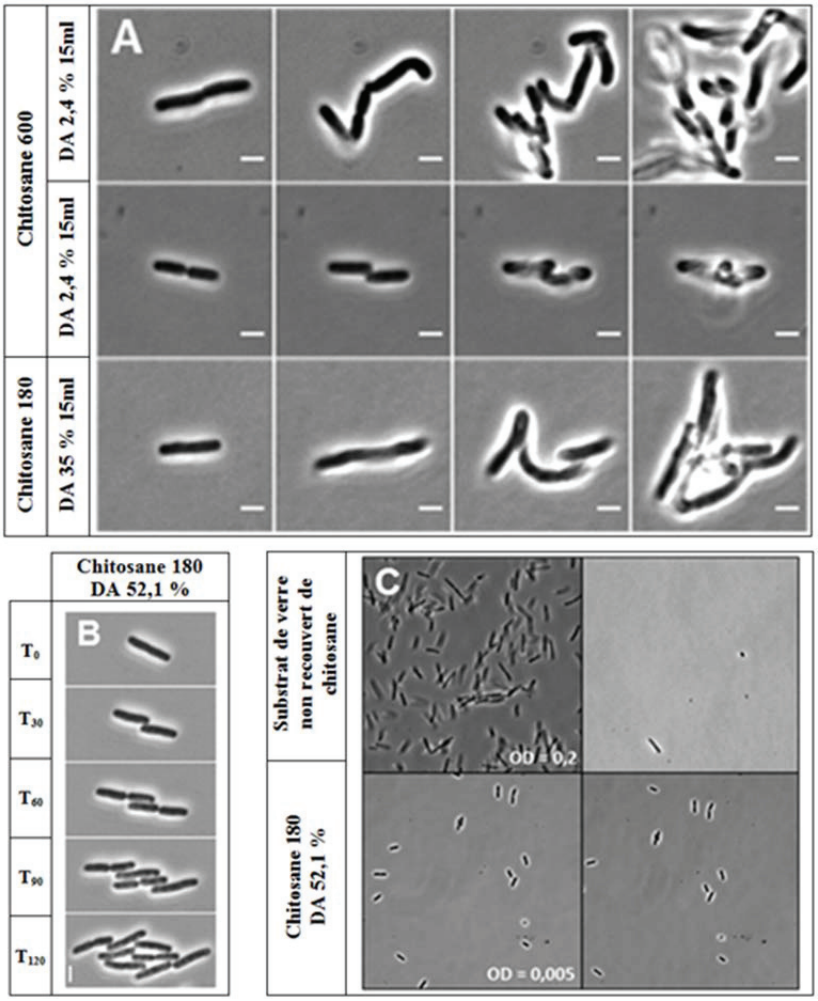



**Figure 3 : adhésion et prolifération de *E. coli* sur les films de chitosane. (A) : Chitosane 180 DA 35 % et Chitosane 600 DA 2,4 %. (B) : Chitosane 180, DA 52,1 %. (C) : Différence entre substrats recouvert et non recouvert de chitosane (gauche : dépôt des bactéries sans rinçage; droite : après rinçage sous flux par le milieu de culture).**

## II.2. Adhésion et prolifération des bactéries *Klebsiella pneumoniae*

L'adhésion de différentes souches (ATCC 700603 et LM21) et de différents mutants du *K. pneumoniae* sur les films de chitosane a été également étudiée. Les résultats de cette étude sont résumés dans le **Tableau 4**. A l'instar des bactéries *E.coli*, la souche de *K. pneumoniae* (ATCC 700603) présente une adhésion et une prolifération normale sur les films de chitosane 180 (DA 52,1 %) (**Figure 4.A et Figure 4.B**). Contrairement à la souche *E. coli*, l'adhésion des bactéries *K. pneumoniae* est observée avec une épaisseur du chitosane 180 (DA 52,1 %) un peu plus grande. En plus de ce DA, nous avons observé une adhésion et une prolifération des bactéries *K. pneumoniae* sur les films à DA 21,5 et 34 % du chitosane 600. Cependant, des adhésions partielles ont été également observées sur d'autres DA (**Tableau 4**). Les tests d'adhésion de la souche *K. pneumoniae* (LM 21) sur les films de chitosane ont également montré une adhésion de cette souche sur les films à DA 21,5 % du chitosane 600 et 52,1 % du

chitosane 180. Des perturbations du métabolisme des bactéries *K. pneumoniae* (LM21 Δ wec A) lors de leur prolifération sur les films du chitosane 600 (DA 34 %) ont été notées (**Figure 4.C**).

| | Paramètres chitosane | | | Réponses biologiques | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Source | DA (%) | Conc. (%) | KP700603 | LM21 |
| Test 1 | Chitosane 180 | 1,0 | 0,67 | - | - |
| | | 9,0 | 0,67 | - | - |
| | | 14,4 | 0,67 | - | |
| | | 25,5 | 0,67 | - | |
| | | 35,2 | 0,67 | - | |
| | | 41,9 | 0,67 | - | |
| | | 52,1 | 0,67 | - | |
| | Chitosane 600 | 2,4 | 0,67 | + | |
| | | 8,0 | 0,67 | - | |
| | | 12,2 | 0,67 | + | |
| | | 21,5 | 0,67 | +++ | |
| | | 34 | 0,67 | +++ | +++ |
| | | 45,3 | 0,67 | ++ | |
| | | 52,6 | 0,67 | ++ | |
| Test 2 | Chitosane 180 | 1,0 | 1,3 | - | + |
| | | 9,0 | 1,3 | +++ | +++* |
| | | 14,4 | 1,3 | +++ | |
| | | 35,2 | 1,3 | +++ | |
| | | 41,9 | 1,3 | + | |
| | | 52,1 | 1,3 | +++ | +++ |
| | Chitosane 600 | 2,4 | 0,4 | - | |
| | | 21,5 | 0,4 | +++ | |
| | | 34 | 0,4 | + | |
| | | 45,3 | 0,4 | +++ | |

**Tableau 4 : récapitulatif des résultats d'adhésion et de prolifération des bactéries K. pneumoniae sur les films de chitosane : « + » adhésion et prolifération ; « - » ni adhésion ni prolifération ; « * » métabolisme anormal ; Conc (%) : concentration en masse de chitosane (Cf chapitre II, section II.1 pour les épaisseurs correspondantes).**

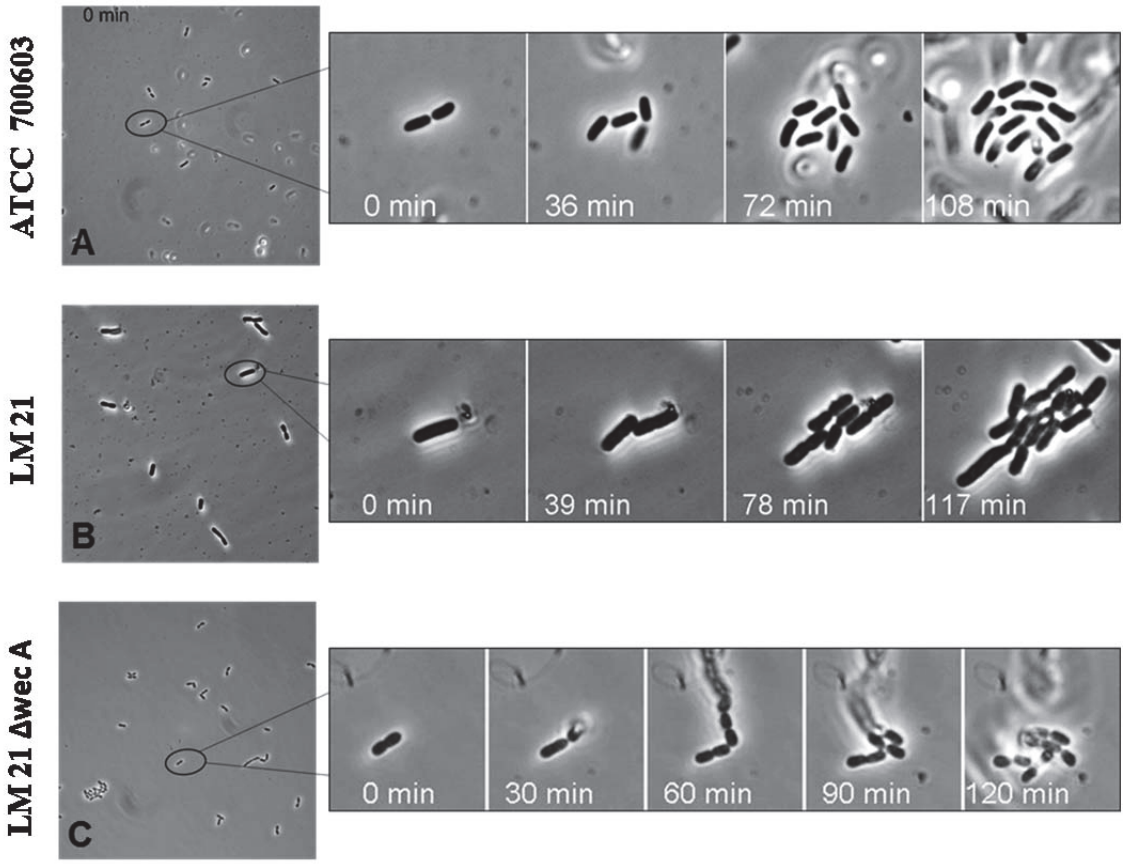



**Figure 4 : Adhésion et prolifération des bactéries *K. pneumoniae* sur les films de chitosane. (A) Adhésion de *K. pneumoniae* ATCC 700603 sur le chitosane 180 (DA 52,1 %, Conc : 1,3 %). (B) Adhésion de *K. pneumoniae* LM21 sur le chitosane 180 (DA 52,1 %, Conc : 1,3 %). (C) Adhésion de *K. pneumoniae* LM21 Δwec A sur le chitosane 600 (DA 34 %, Conc : 0,67 %).**

## II.3. Adhésion et prolifération des bactéries *Staphylococcus aureus*

Les différentes souches de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus, « staphylocoque doré »*) (NCTC 8325, COL, USA 300 et Newman) utilisées dans cette étude présentent une adhésion et une prolifération sur les films de chitosane 180 (DA 52,1 %) (**Figure 5.A**). Cependant, une adhésion de ces différentes souches a également été observée sur les substrats de verre non recouverts de chitosane. Dans le but d'évaluer l'effet du chitosane sur l'adhésion de ces différentes bactéries, les forces d'adhésion des bactéries ont été déterminées à la fois sur les substrats recouverts et non recouverts de chitosane. Pour cela, les bactéries adhérentes sont soumises à des flux du milieu de culture à différentes contraintes de cisaillement. Les résultats ont montré que le détachement des bactéries sur les surfaces intervient à partir d'une contrainte de cisaillement de 1,2 dyn/cm$^2$ (soit 0,12 Pa) pour les substrats non recouverts de chitosane et à partir de 20 dyn/cm$^2$ (2 Pa) sur les substrats recouverts de chitosane (**Figure**

**5.B** et **Figure 5.C**). Ces études ont également prouvé la possibilité d'adhésion de la souche *S. aureus* (NCTC 8325) sur le chitosane 180 (DA 1 %).

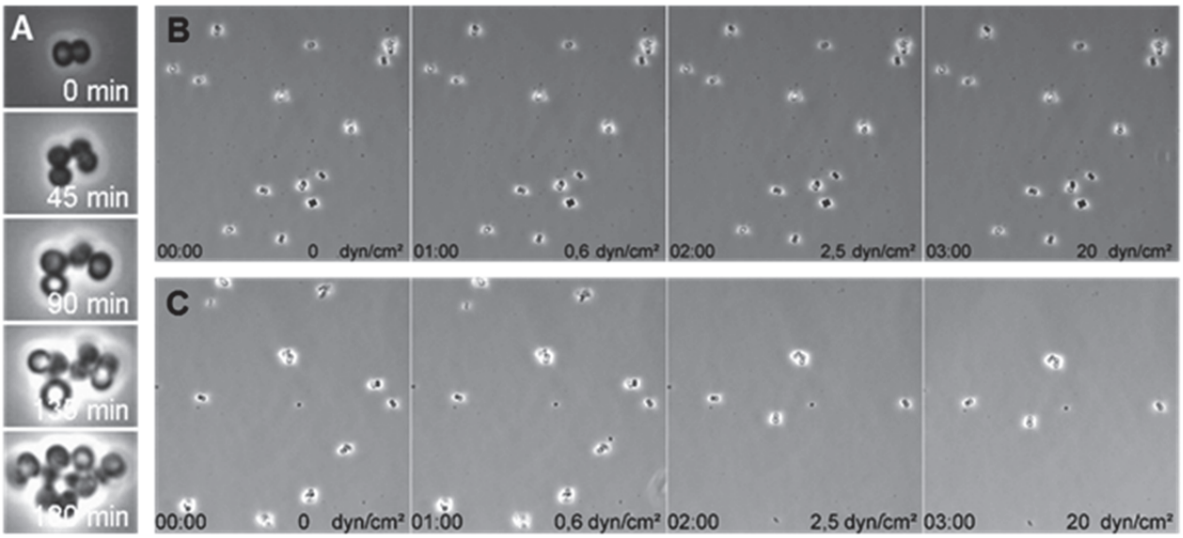



**Figure 5 : (A) Adhésion et prolifération des bactéries *S. aureus* sur le chitosane 180 (DA 52,1 %, Conc : 0,67 %). (B) Resistance aux flux hydrodynamiques du LB des bactéries *S. aureus* adhérents sur le chitosane 180 (DA 52,1 %, Conc : 0,67 %). (C) sur le substrat de verre.**

## II.4. Effet non toxique des films de chitosane sur les bactéries *E. coli*

Le caractère non toxique des films de chitosane a été déterminé sur les films du chitosane 180 (DA 52,1 %). Pour cela, l'effet du chitosane sur le temps de génération des bactéries et l'effet à long terme du contact entre le chitosane et les bactéries sur la prolifération ont été étudiés (**Figure 6**). A l'issue de ces études, le temps de génération des bactéries *E. coli* à 27 °C est estimé à 39 min. Cependant, ce temps est très élevé par rapport au temps de génération à 37 °C des bactéries qui est de l'ordre de 20 min.[5] Cet écart peut découler de la différence des conditions expérimentales, notamment la température. L'effet non toxique du chitosane 180 (DA 52,1 %) a été prouvé en faisant proliférer les bactéries sur le film et les laissant en contact avec celui-ci pendant 72 h. Après 72 h, le milieu de la culture est renouvelé avec du milieu neuf. A l'issue de ces étapes, une nouvelle prolifération suivant un métabolisme normal des bactéries *E. coli* a été observée (**Figure 6.D**).

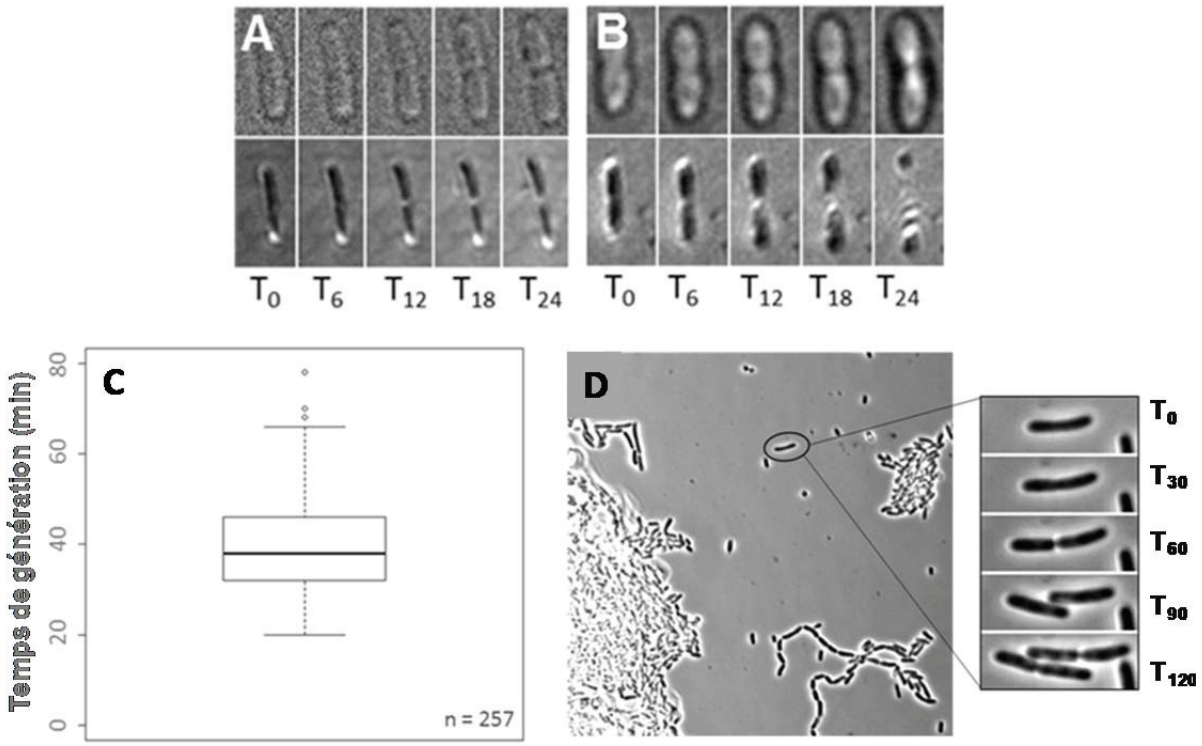



**Figure 6 : Adhésion et prolifération des bactéries *E. coli* K12 : (A) sur le chitosane 180 (DA 52,1 %, Conc: 0,67 %) ; (B) sur le chitosane 600 (DA 2,4 %, Conc : 0,67 %). (C) Temps de génération moyenne au bout de n = 257 divisions des bactéries *E. coli* K12 sur le chitosane 180 (DA 52,1 %, Conc : 0,67 %) à 27 °C. (D) Reprise de la prolifération des bactéries *E. coli* K12 sur le chitosane 180 (DA 52,1 %, Conc: 0,67 %) après 72 h de contact avec le chitosane 180 (DA 52,1 %, Conc : 0,67 %).**

## II.5. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

Les résultats de cette étude montrent une sensibilité des bactéries *E. coli* à tous les antibiotiques testés. En présence d'ampicilline dans le milieu LB, les bactéries de la souche *E. coli* K12 augmentent en taille de façon continue et perdent en même temps leur capacité à se diviser. Au bout d'une heure d'observation, un changement de morphologie des bactéries est observé. Ce changement continu conduit à des ruptures de la membrane plasmique et par conséquent à la mort cellulaire des bactéries (**Figure 7.A**). Les tests de sensibilité aux antibiotiques en fonction de la concentration ont permis de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et l'effet des antibiotiques sur la croissance des bactéries (**Figure 7.B, C, D et E**). Ces valeurs sont généralement comparables à celles obtenues par VITEK® pour l'ETP et plus petites pour le MEC, prouvant ainsi l'efficacité de la méthode (**Tableau 5**).

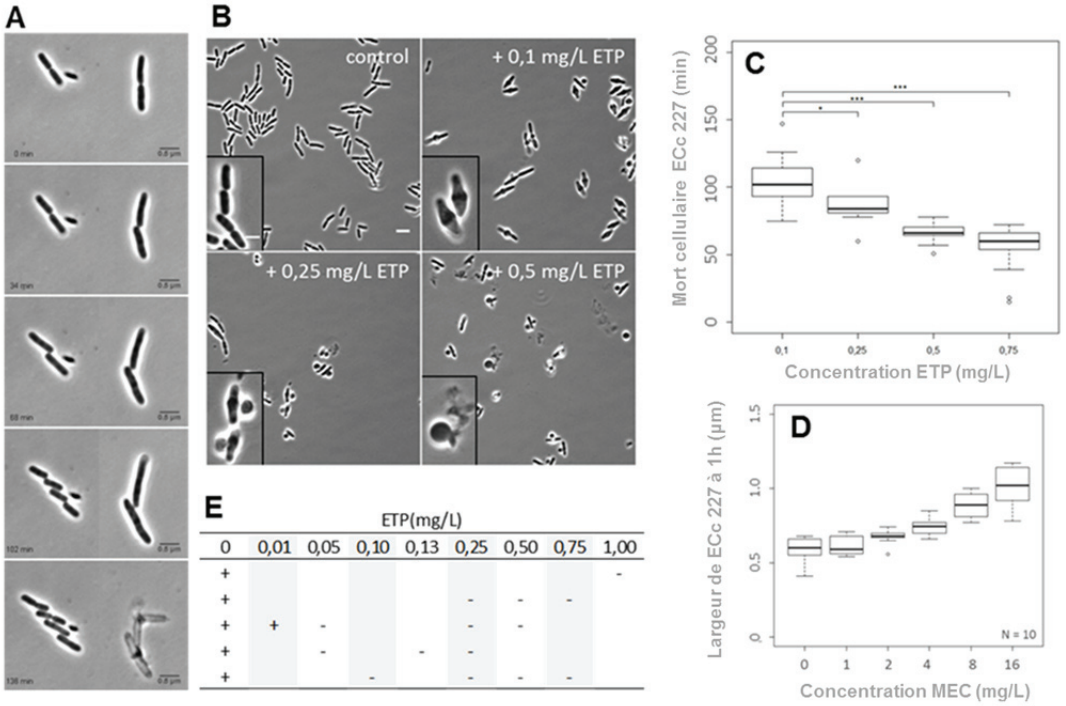



**Figure 7: (A) Effet de l'AMP sur la croissance de *E. coli K12*. (B) Effet de la concentration de l'ETP sur la croissance de *ECc 227*. (C) Effet de la concentration de l'ETP sur la durée de vie de *ECc 227*. (D) Effet de la concentration en MEC sur la taille de *ECc 687*. (E) Prolifération de *ECc 227* en fonction de la concentration en ETP (« + » prolifération de *ECc 227*, « - » effet bactéricide ou bactériostatique de l'ETP). Chaque ligne du tableau représente un test différent.**

| | *ECc 227* | | *ECc 687* | | *ECc 698* | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Vitek ®** | **Chitosane** | **Vitek ®** | **Chitosane** | **Vitek ®** | **Chitosane** |
| **ETP** | ≤ 0,5 S | ≤ 0,01 S | 4 R | 0,5 - 1 S | | |
| **MEC** | 8 S | ≤ 8 S | 2 S | 0,5 - 1 S | ≤ 1 S | ≤ 0,5 S |
| **AMP** | | | > 16 R | > 32 R | ≤ 2 S | ≤ 2 S |

**Tableau 5 : Comparaison des résultats de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par VITEK® et sur le chitosane (S : sensibilité, R : résistance).**

# III. Discussion des résultats expérimentaux

## III.1. Effet des paramètres moléculaires

Les résultats issus des tests d'adhésion présentent en général une adhésion initiale des bactéries sur tous les films de chitosane. Cette adhésion provient de la présence de chitosane sur les substrats de verre étant donné l'absence d'adhésion sur les substrats de référence. En effet, les unités N-acétyl-D-glucosamine du chitosane peuvent jouer un rôle chimio attracteur et faciliter l'adhésion de certaines bactéries.[6, 7] L'adhésion des bactéries est suivie de leur prolifération sur les films de chitosane. Cependant, l'adhésion et la prolifération des bactéries

dans le temps suivant un processus de métabolisme normal n'ont été observées que pour certains DA. En effet, suivant les tests effectués, nous avons observé une bonne adhésion et prolifération des bactéries *E. coli* sur les films du chitosane 180, DA 52,1 % ; des bactéries *K. pneumoniae* sur les films de 52,1 % (chitosane 180), 21,5 et 34 % du chitosane 600 et des bactéries *S. aureus* sur les DA 1 % et 52,1 % du chitosane 180. Cette différence de réponse biologique vis-à-vis des plus petits DA s'explique par la densité de groupes amines protonés sur la chaîne principale.[8-12] En effet, ce phénomène vient des interactions électrostatiques entre les groupes amines chargés positivement et les charges négatives des bactéries. Ces interactions peuvent se manifester de deux manières : soit par un changement des propriétés de perméabilité de la membrane des cellules qui provoque un déséquilibre de la pression osmotique interne de la bactérie et par conséquent une inhibition de la croissance bactérienne[13, 14] ; soit par une hydrolyse des peptidoglycanes de la bactérie qui provoque ensuite une fuite des électrolytes intracellulaires tels les ions potassium et d'autres petites molécules (protéines, acides nucléiques, glucose…).[15-18] Ces résultats concordent bien avec des résultats de la littérature[8, 19-21] qui ont prouvé que le chitosane est d'autant plus bactériostatique ou antibactérien que son DA est faible. Le manque ou le faible taux d'adhésion des bactéries *E. coli* et leur torsion durant la prolifération sur les films de chitosane 600 apparait être contraire à certains résultats de la littérature.[22-24] En effet, il est rapporté que la masse molaire présente plus d'influence que le DA sur l'adhésion des bactéries et que les chitosanes de plus petites masses présentent un caractère bactéricide ou bactériostatique plus prononcé que les chitosanes de masse molaire élevée.[25] Cependant, on retrouve beaucoup de résultats contradictoires sur ce sujet. Rhoades et Roller[26] et No et *al.*[27] montrent l'absence d'activité antibactérienne des oligosaccharides et des unités D-glucosamines tandis que Jeon et *al.* [28] concluent sur la nécessité d'avoir des chitosanes de masses supérieures à 10 kg/mol pour observer une inhibition des bactéries. Raafat et *al.* [29] ont observé quant à eux un comportement similaire de l'activité antibactérienne du chitosane au-delà 10 kg/mol. Ainsi, il est difficile de porter directement une conclusion sur l'effet de la masse molaire sur l'adhésion des bactéries étant donnée l'influence des autres facteurs intrinsèques du chitosane et des facteurs environnementaux dont la sous-estimation peut conduire à des conclusions erronées. Une prolifération des bactéries a également été observée sur d'autres DA des chitosanes 180 et 600, mais le métabolisme de prolifération est altéré : une torsion des bactéries, particulièrement visible au moment de la division, a été remarquée. L'adhésion des bactéries *E. coli* sur une surface intervient généralement suite à une série de changements de leur morphologie. Cependant, lors de l'adhésion, les bactéries peuvent subir

des contraintes physiques dues à leur contact avec la surface et aux bactéries adjacentes déjà attachées à la surface. Ces contraintes physiques peuvent entraîner une inhibition de la rotation de leurs flagelles et par conséquent une altération de leur physiologie.[30] L'adhésion des bactéries *E. coli* sur les surfaces est facilitée par la sécrétion d'une substance polymérique extracellulaire et une altération de leur charge de surface.[31, 32] La masse molaire du chitosane peut également être à l'origine de la perturbation du métabolisme des bactéries conduisant à leur torsion. Ce phénomène peut être observé à la fois pour les chitosanes de faible ou de forte masse molaire. A faible masse molaire, le chitosane peut passer à travers la membrane des bactéries, se lier avec leur ADN et empêcher la synthèse de l'ARNm.[33-36] A masse molaire plus élevée, les chaînes ne pouvant pas traverser la membrane, le chitosane forme une enveloppe autour de la bactérie, empêchant les nutriments nécessaire à la vie de la bactérie de passer et entraînant par conséquent une lyse de la bactérie.[37-40] Les différences observées sur les propriétés d'adhésion et de prolifération des bactéries d'une même espèce sur les films de chitosane peuvent provenir de leur différence d'âge ou étape de croissance. En effet, l'électronégativité des bactéries d'une même espèce peut varier avec leur croissance.[41] La souche *S. aureus* CCRC 12657 en fin de phase de sa croissance exponentielle présente plus de sensibilité aux dérivés maltose du chitosane tandis que la souche *E. coli* O157:H7 présente une grande sensibilité au milieu lors de sa phase de croissance exponentielle.[42, 43] Ces résultats d'adhésion peuvent également relever de la différence des propriétés chimiques de la surface des bactéries (Gram positif ou négatif) et qui peuvent se comporter différemment avec les paramètres du milieu (pH, température, force ionique…). Cependant, des conclusions différentes sur ce sujet sont présentes dans la littérature. No *et al.* [27] puis Chung *et al.*[44] ont montré que les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles aux effets antibactériens du chitosane tandis que Zhong *et al.*[45] ont observé le contraire. Un troisième facteur pouvant, expliquer la différence de ces résultats est la présence ou non de flagelles, de pilus ou de fimbrae sur la surface des bactéries.

## III.2. Effet des paramètres physicochimiques

L'adhésion des bactéries sur des surfaces est très sensible aux propriétés physicochimiques des surfaces. Pour mieux comprendre cette sensibilité, les propriétés physicochimiques des différents films de chitosane utilisés dans cette étude ainsi que les résultats d'adhésion et de prolifération des bactéries sont représentées dans le **Tableau 6**. Ces résultats physicochimiques sont obtenus 24 h après la préparation des films. Les résultats physicochimiques des films de chitosane testés avec les bactéries *E. coli* sont assez similaires.

En effet, les tensions de surface, les polarités de surface et des angles de contact varient très peu pour des DA consécutifs d'un même chitosane ou entre les DA proches mais de masses molaires différentes. Ces faibles variations des paramètres physicochimiques entre les différents films de différents DA montrent que l'adhésion et la prolifération des bactéries *E. coli* sont presque indépendantes de ceux-ci. Nous notons également par le DA 52,1 % du chitosane 180, une absence de l'effet de l'épaisseur sur l'adhésion et la prolifération des bactéries *E. coli*. Cependant, nous devons noter que dans notre étude, l'adhésion des bactéries s'effectue sur des surfaces légèrement hydrophiles. Cette adhésion sur les surfaces hydrophiles peut être expliquée dans le cas des bactéries *E. coli* par le rôle du flagelle dans le processus d'adhésion. En effet, sur les surfaces hydrophiles, les flagelles adhérents sont partiellement attachés à la surface, entraînant ainsi un mouvement aléatoire des filaments comparable à celui d'une chaîne de polymère attachée à la surface d'un colloïde. Ce mouvement des filaments crée des gênes stériques qui peuvent empêcher l'adhésion supplémentaire de flagelles et par conséquence diminuer le taux d'adhésion des bactéries. Cependant, sur les surfaces hydrophobes, la première adhésion s'effectue comme sur les surfaces hydrophiles, mais au cours du temps, les flagelles changent de conformation et s'attachent sur toute leur longueur à la surface. Cet attachement sera l'objet de la diminution du mouvement des filaments et des gênes stériques et favorisera par conséquent l'adhésion de nouveaux flagelles.[46]

| Sources | DA (%) | Epaisseurs (nm) | Angles (°) | Tensions de surface (mN/m) | Polarités | Réponses biologiques | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Adhésion | Morphologie |
| Chitosane 180 | 1 | ~ 50 | 63,5 ± 4,66 | 47,03 ± 0,44 | 5 ± 0,49 | + | - |
| | | ~ 80 | 65,8 ± 2,40 | 45,23 ± 0,02 | 4,95 ± 0,68 | + | - |
| | 35,2 | ~ 50 | 60,8 ±1,20 | 46,11 ± 1,22 | 6,55 ± 0,87 | + | +/- |
| | 41,9 | ~ 50 | 57,3 ± 0,98 | 45,9 ± 0,70 | 6,60 ± 0,18 | + | +/- |
| | 52,1 | ~ 50 | 53,2 ± 0,35 | 45,35 ± 0,34 | 7,28 ± 0,89 | + | + |
| | | ~ 150 | 54,6 ± 3,42 | 43,35 ± 0,34 | 9,50 ± 0,57 | + | + |
| Chitosane 600 | 2,4 | ~ 50 | 68,8 ± 1,34 | 46,25 ± 0,19 | 4,86 ± 0,63 | + | - |
| | | ~ 100 | 67,3 ± 1,06 | 46,16 ± 0,47 | 4,16 ± 0,29 | + | - |
| | 52 ,5 | ~ 50 | 58,9 ± 0,77 | 43,13 ± 0,44 | 7,46 ± 0,11 | + | - |
| | | ~ 100 | 55,3 ± 1,77 | 45,46 ± 0,30 | 6,99 ± 0,55 | + | - |

**Tableau 6 : récapitulatif des propriétés physicochimiques des films de chitosane et de l'adhésion des bactéries *E. coli*.**

A l'instar des résultats d'adhésion et de prolifération des bactéries *E. coli* sur les films de chitosane, l'adhésion et la prolifération des bactéries *K. pneumoniae* restent presque insensibles aux propriétés physicochimiques (tensions de surface, polarités de surface et angles de contact) des films. Cependant, nous pouvons noter un effet de l'épaisseur des films du chitosane 180 (**Tableau 7**). En effet, nous remarquons une absence d'adhésion et de prolifération des bactéries *K. pneumoniae* sur les films du chitosane 180, d'épaisseur environ 50 nm tandis que, pour les films d'épaisseur d'environ 150 nm, nous observons une bonne adhésion et bonne prolifération des bactéries *K. pneumoniae*.

| | Sources | DA (%) | Epaisseurs | Angles (°) | Tensions de Surface (mN/m) | Polarité | Réponses biologiques | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | KP700603 | LM21 |
| Test 1 | Chitosane 180 | 1,0 | ~ 50 nm | 63,5 ± 4,66 | 47,03 ± 0,44 | 5 ± 0,49 | - | |
| | | 9,0 | | 61,3 ± 2,51 | 47,19 ± 0,87 | 5,7 ± 0,37 | - | |
| | | 14 ,4 | | 62,4 ±0,91 | 46,95 ± 0,88 | 5,5 ± 0,69 | - | |
| | | 25,5 | | 63,7 ± 4,41 | 46,43 ± 0,54 | 5,9 ± 1,14 | - | |
| | | 35,2 | | 60,8 ±1,20 | 46,11 ± 1,22 | 6,55 ± 0,87 | - | |
| | | 41,9 | | 57,3 ± 0,98 | 45,9 ± 0,70 | 6,6 ± 0,18 | - | |
| | | 52,1 | | 53,2 ± 0,35 | 45,35 ± 0,34 | 7,28 ± 0,89 | - | |
| | Chitosane 600 | 2,4 | ~ 100 nm | 67,3 ± 1,06 | 46,16 ± 0,47 | 4,16 ± 0,29 | + | |
| | | 8 ,0 | | 64,6 ±1,41 | 46,75 ± 1,29 | 5,15 ± 0,77 | - | |
| | | 12,2 | | 63,7 ± 0,42 | 46,46 ± 0,56 | 6,45 ± 0,16 | + | |
| | | 21,5 | | 63,2 ±1,10 | 46,45 ± 0,61 | 4,66 ± 0,61 | +++ | |
| | | 34,0 | | 61,4 ± 2,90 | 46,01 ± 0,94 | 6,76 ± 0,82 | +++ | +++ |
| | | 45,3 | | 56,9 ± 1,48 | 45,7 ± 0,27 | 10,79 ± 1,47 | ++ | |
| | | 52,5 | | 55,3 ± 1,77 | 45,46 ± 0,30 | 6,99 ± 0,55 | ++ | |
| Test 2 | Chitosane 180 | 1,0 | ~ 150 nm | 66,1 ± 1,72 | 44,84 ± 0,50 | 5,89 ±1,88 | - | + |
| | | 9,0 | | 64,4 ± 1,13 | 45,25 ± 1,49 | 7,89 ± 1,11 | +++ | +++* |
| | | 14,4 | | 61,2 ± 1,34 | 45,18 ± 1,78 | 8,26 ± 0,39 | +++ | |
| | | 35,2 | | 58,3 ± 0,98 | 44,76 ± 1,43 | 8,76 ± 1,17 | +++ | |
| | | 41,9 | | 54,8 ± 1,62 | 44,38 ± 0,42 | 9,76 ± 1,62 | + | |
| | | 52,1 | | 54,6 ± 3,42 | 43,35 ± 0,34 | 9,50 ± 0,57 | +++ | +++ |
| | Chitosane 600 | 2,4 | ~ 50 nm | 68,8 ± 1,34 | 46,25 ± 0,19 | 4,86 ± 0,63 | - | |
| | | 21,5 | | 65,1 ± 1,55 | 45,04 ± 0,49 | 5,17 ± 0,61 | +++ | |
| | | 34,0 | | 62,8 ± 1,13 | 45,39 ± 1,76 | 6,21 ± 0,23 | + | |
| | | 45,3 | | 59,1 ± 2,54 | 44,33 ± 1,23 | 7,42 ± 0,41 | +++ | |

**Tableau 7 : récapitulatif des propriétés physicochimiques des films de chitosane et de l'adhésion des bactéries *K. pneumoniae*.**

## Conclusion

De manière générale, les différents résultats des tests biologiques sur les films de chitosane sont fortement liés aux paramètres moléculaires. Cette étude a révélé de manière reproductible la possibilité de faire adhérer différentes souches de bactéries (*E. Coli, S. aureus* et *K. pneumoniae*) sur des films de chitosane de même paramètres moléculaires (DA 52,1 %, masse molaire 180 kg/ mol) sans altérer leur physiologie (comportement, phénotype de prolifération) mais aussi sur des films de paramètres moléculaires différents. Les résultats d'adhésion et de prolifération obtenus dans cette étude prouvent la possibilité de moduler l'adhésion des différentes souches bactéries en ajustant les paramètres moléculaires du chitosane. Les tests de résistance aux antibiotiques des bactéries étudiées au cours de ces caractérisations biologiques, ont conduit à des concentrations minimales inhibitrices très cohérentes avec celles des techniques actuelles. Cette cohérence des tests de sensibilité aux antibiotiques montre l'efficacité des surfaces développées et leur potentielle utilisation pour le diagnostic rapide. A l'issue de cette étude, il peut être envisagé de développer des surfaces combinant plusieurs formulations de chitosane sélectives quant aux bactéries visées.

## **Références** :


1. Carlet, J.; Le Coz, P., Tous ensemble, sauvons les antibiotiques. *Paris, Ministère des Affaires sociales, de la Santé et des Droits des femmes* **2015**.
2. O'Neill, J., Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on antimicrobial resistance* **2014**, 1-16.
3. Henriksen, I.; Green, K. L.; Smart, J. D.; Smistad, G.; Karlsen, J., Bioadhesion of hydrated chitosans: an in vitro and in vivo study. *International journal of pharmaceutics* **1996,** 145, (1-2), 231-240.
4. Takeuchi, H.; Yamamoto, H.; Niwa, T.; Hino, T.; Kawashima, Y., Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharmaceutical research* **1996,** 13, (6), 896-901.
5. Sezonov, G.; Joseleau-Petit, D.; D'Ari, R., Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology* **2007,** 189, (23), 8746-8749.
6. Li, X.; Roseman, S., The chitinolytic cascade in Vibrios is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004,** 101, (2), 627-631.
7. Meibom, K. L.; Li, X. B.; Nielsen, A. T.; Wu, C. Y.; Roseman, S.; Schoolnik, G. K., The Vibrio cholerae chitin utilization program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004,** 101, (8), 2524-2529.
8. Andres, Y.; Giraud, L.; Gerente, C.; Le Cloirec, P., Antibacterial effects of chitosan powder: mechanisms of action. *Environmental technology* **2007,** 28, (12), 1357-1363.
9. Benhabiles, M.; Salah, R.; Lounici, H.; Drouiche, N.; Goosen, M.; Mameri, N., Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food hydrocolloids* **2012,** 29, (1), 48-56.
10. Fei Liu, X.; Lin Guan, Y.; Zhi Yang, D.; Li, Z.; De Yao, K., Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of applied polymer science* **2001,** 79, (7), 1324-1335.
11. Gerasimenko, D.; Avdienko, I.; Bannikova, G.; Zueva, O. Y.; Varlamov, V., Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Applied Biochemistry and microbiology* **2004,** 40, (3), 253-257.
12. Shigemasa, Y.; Minami, S., Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **1996,** 13, (1), 383-420.
13. Hadwiger, L.; Kendra, D.; Fristensky, B.; Wagoner, W., Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. In *Chitin in nature and technology*, Springer: 1986; pp 209-214.
14. Shahidi, F.; Arachchi, J. K. V.; Jeon, Y. J., Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science & technology* **1999,** 10, (2), 37-51.
15. Chen, C. S.; Liau, W. Y.; Tsai, G. J., Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *Journal of food protection* **1998,** 61, (9), 1124-1128.
16. Devlieghere, F.; Vermeulen, A.; Debevere, J., Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food microbiology* **2004,** 21, (6), 703-714.

17. Fang, S. W.; Li, C. F.; Shih, D. Y., Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *Journal of food protection* **1994,** 57, (2), 136-140.
18. Papineau, A. M.; Hoover, D. G.; Knorr, D.; Farkas, D. F., Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology* **1991,** 5, (1), 45-57.
19. Takahashi, T.; Imai, M.; Suzuki, I.; Sawai, J., Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochemical Engineering Journal* **2008,** 40, (3), 485-491.
20. Tsai, G. J.; Su, W. H.; Chen, H. C.; Pan, C. L., Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries science* **2002,** 68, (1), 170-177.
21. Tsai, G. J.; Zhang, S. L.; Shieh, P. L., Antimicrobial activity of a low-molecular-weight chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan. *Journal of food protection* **2004,** 67, (2), 396-398.
22. Jing, Y.; Hao, Y.; Qu, H.; Shan, Y.; Li, D.; Du, R., Studies on the antibacterial activities and mechanisms of chitosan obtained from cuticles of housefly larvae. *Acta Biologica Hungarica* **2007,** 58, (1), 75-86.
23. Omura, Y.; Shigemoto, M.; Akiyama, T.; Saimoto, H.; Shigemasa, Y.; Nakamura, I.; Tsuchido, T., Antimicrobial activity of chitosan with different degrees of acetylation and molecular weights. *Biocontrol Science* **2003,** 8, (1), 25-30.
24. Tikhonov, V. E.; Stepnova, E. A.; Babak, V. G.; Yamskov, I. A.; Palma-Guerrero, J.; Jansson, H. B.; Lopez-Llorca, L. V.; Salinas, J.; Gerasimenko, D. V.; Avdienko, I. D., Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2 (3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/-derivatives. *Carbohydrate polymers* **2006,** 64, (1), 66-72.
25. Sekiguchi, S.; Miura, Y.; Kaneko, H.; Nishimura, S.; Nishi, N.; Iwase, M.; Tokura, S., Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers. In *Food hydrocolloids*, Springer: 1994; pp 71-76.
26. Rhoades, J.; Roller, S., Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and environmental microbiology* **2000,** 66, (1), 80-86.
27. No, H. K.; Park, N. Y.; Lee, S. H.; Meyers, S. P., Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology* **2002,** 74, (1), 65-72.
28. Jeon, Y. J.; Park, P. J.; Kim, S. K., Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate polymers* **2001,** 44, (1), 71-76.
29. Raafat, D.; Von Bargen, K.; Haas, A.; Sahl, H.-G., Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and environmental microbiology* **2008,** 74, (12), 3764-3773.
30. Tuson, H. H.; Weibel, D. B., Bacteria–surface interactions. *Soft matter* **2013,** 9, (17), 4368-4380.
31. Eboigbodin, K.; Newton, J.; Routh, A.; Biggs, C., Bacterial quorum sensing and cell surface electrokinetic properties. *Applied microbiology and biotechnology* **2006,** 73, (3), 669-675.

32. Otto, K.; Hermansson, M., Inactivation of ompX causes increased interactions of type 1 fimbriated Escherichia coli with abiotic surfaces. *Journal of bacteriology* **2004,** 186, (1), 226-234.
33. Chien, R. C.; Yen, M. T.; Mau, J. L., Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate polymers* **2016,** 138, 259-264.
34. Kong, M.; Chen, X. G.; Liu, C. S.; Liu, C. G.; Meng, X. H.; Yu, L. J., Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against E. coli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008,** 65, (2), 197-202.
35. Kulikov, S.; Tikhonov, V.; Bezrodnykh, E.; Lopatin, S.; Varlamov, V., Comparative evaluation of antimicrobial activity of oligochitosans against Klebsiella pneumoniae. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **2015,** 41, (1), 57-62.
36. Sudarshan, N.; Hoover, D.; Knorr, D., Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology* **1992,** 6, (3), 257-272.
37. Cuero, R.; Osuji, G.; Washington, A., N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. *Biotechnology Letters* **1991,** 13, (6), 441-444.
38. Li, L. H.; Deng, J. C.; Deng, H. R.; Liu, Z. L.; Li, X. L., Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films. *Chemical Engineering Journal* **2010,** 160, (1), 378-382.
39. Li, X. F.; Feng, X. Q.; Yang, S.; Fu, G. Q.; Wang, T. P.; Su, Z. X., Chitosan kills Escherichia coli through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydrate Polymers* **2010,** 79, (3), 493-499.
40. Tokura, S.; Ueno, K.; Miyazaki, S.; Nishi, N., Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. In *New Macromolecular Architecture and Functions*, Springer: 1996; pp 199-207.
41. Tsai, G. J.; Su, W. H., Antibacterial activity of shrimp chitosan against Escherichia coli. *Journal of food protection* **1999,** 62, (3), 239-243.
42. Chen, Y. L.; Chou, C. C., Factors affecting the susceptibility of Staphylococcus aureus CCRC 12657 to water soluble lactose chitosan derivative. *Food Microbiology* **2005,** 22, (1), 29-35.
43. Yang, T. C.; Li, C. F.; Chou, C. C., Cell age, suspending medium and metal ion influence the susceptibility of Escherichia coli O157: H7 to water-soluble maltose chitosan derivative. *International journal of food microbiology* **2007,** 113, (3), 258-262.
44. Chung, Y. C.; Su, Y. P.; Chen, C. C.; Jia, G.; Wang, H. L.; Wu, J. G.; Lin, J. G., Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica* **2004,** 25, (7), 932-936.
45. Zhong, Z.; Xing, R.; Liu, S.; Wang, L.; Cai, S.; Li, P., Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. *Carbohydrate Research* **2008,** 343, (3), 566-570.
46. Friedlander, R. S.; Vogel, N.; Aizenberg, J., Role of flagella in adhesion of Escherichia coli to abiotic surfaces. *Langmuir* **2015,** 31, (22), 6137-6144.

# CHAPITRE V : GREFFAGE CHIMIQUE COVALENT DE CHITOOLIGOSACCHARIDES SUR DES SURFACES DE SILICIUM

CHAPITRE V : GREFFAGE CHIMIQUE COVALENT DE CHITOOLIGOSACCHARIDES SUR DES SURFACES DE SILICIUM ..... 165
Introduction ..... 167
I. Généralités sur la chimie click ..... 168
II. Etude du greffage en solution de quelques substrats modèles ..... 169
II.1. Méthodes expérimentales ..... 170
II.1.1. Protocole expérimental du greffage en solution ..... 170
II.1.2. Techniques de caractérisation ..... 171
II.2. Résultats et discussion ..... 172
III. Greffages chimiques des chitooligosaccharides sur des surfaces de silicium ..... 181
III.1. Généralités sur la fonctionnalisation des surfaces ..... 181
III.1.1. Nettoyage des surfaces de silicium ..... 182
III.1.2. Silanisation ..... 182
III.1.3. Azidation ..... 184
III.1.4. Réaction « Click » azoture/alcyne sur des surfaces planes ..... 184
III.2. Méthodes expérimentales ..... 185
III.2.1. Nettoyage des substrats de silicium ..... 185
III.2.2. Silanisation des substrats ..... 186
III.2.3. Azidation des substrats ..... 186
III.2.4. Greffage des chitooligosaccharides sur les substrats ..... 186
III.3. Méthodes de caractérisation ..... 187
III.3.1. Analyse des surfaces par spectroscopie IR ..... 187
III.3.2. Analyse des surfaces par spectroscopie de masse TOF-SIMS ..... 187
III.4. Résultats et discussion ..... 188
III.4.1. Silanisation des surfaces de silicium ..... 189
III.4.2. Azidation du silane ..... 193
III.4.3. Greffage des chitooligosaccharides ..... 194
Conclusion ..... 199
Références ..... 200

## Introduction

Ce chapitre de la thèse est consacré au greffage chimique covalent par « grafting to » de dérivés propargyl de chitooligosaccharides (COS) sur des surfaces de silicium. Le but de cette étude est de parvenir à des surfaces fonctionnalisées qui pourraient, comme dans le cas des surfaces modifiées par adsorption, servir pour des études d'interaction entre les surfaces et les bactéries. Le choix de la méthode de greffage par « grafting to » s'impose du fait que les polysaccharides ne sont pas polymérisables. Les dérivés propargyl de COS utilisés dans cette étude ont été synthétisés au laboratoire. En effet, le laboratoire dispose d'une expertise dans la fonctionnalisation de COS par des fonctions réactives susceptibles de réagir sur des surfaces fonctionnelles adaptées.

Le greffage des COS a été effectué en trois étapes. D'abord les surfaces de silicium ont été fonctionnalisées par un monochlorosilane. Une fois cette étape effectuée, le chlore terminal du silane a été substitué par une fonction azoture issue d'une solution saturée de $NaN_3$. Enfin, le greffage entre les dérivés propargyl de COS et les fonctions azotures a été réalisé en milieu aqueux d'acide chlorhydrique pour former des cycles triazoles. Cependant, avant d'effectuer le greffage des surfaces de silicium, des greffages en solution entre les COS et des molécules modèles ont été d'abord effectués afin de trouver un mode opératoire optimisé.

Les différents produits issus des greffages en solutions ont été caractérisés par spectroscopie RMN du proton, spectroscopie infrarouge et spectrométrie de masse MALDI-TOF pour valider le mode opératoire. Les brosses de COS formées sur les surfaces de silicium ont été caractérisées par microscopie AFM, spectroscopie infrarouge, spectrométrie de masse TOF-SIMS, ellipsométrie et tensiométrie pour déterminer respectivement la morphologie, la structure chimique, les épaisseurs et la mouillabilité des brosses. Ainsi, en première partie est présenté le greffage en solution des COS avec des molécules modèles et en deuxième partie la synthèse chimique des brosses de COS sur les surfaces de silicium.

La présence de ce chapitre dans cette thèse est d'une grande importance puisqu'il traite de la chimie « click » de polysaccharides sur des surfaces planes. A notre connaissance, ce sujet est rarement abordé dans la littérature ou fait souvent l'objet de greffage sur des nanoparticules.

## I. Généralités sur la chimie click

L'approche de la chimie « click » a été introduite dans la synthèse organique pour la première fois en 2001 par Sharpless et *al*. [1] Cette chimie a pour objectif de former de manière simple et efficace des liaisons carbone-hétéro-atomiques entre de petites molécules ; elle répond à un certains nombres de critères. Les réactions de la chimie « click » nécessitent des conditions expérimentales simples et doivent conduire à des produits uniques et stables avec un bon rendement. La purification des produits doit se faire avec des méthodes de purification simples (non chromatographiques). Les réactions ne doivent pas être sensibles aux solvants et les sous-produits issus des réactions doivent être inoffensifs. Cette chimie, développée initialement pour la synthèse organique, va très rapidement s'étendre dans le domaine des matériaux polymères pour la synthèse de polymères hyperbranchés et pour la fonctionnalisation des polymères linéaires.[2-4]

Les réactions de la chimie « click » peuvent s'effectuer dans des solvants polaires et apolaires. Les solvants ou mélanges de solvants couramment utilisés dans la littérature sont le diméthylformamide, le tétrahydrofurane, le diméthylsulfoxyde, l'acétone, le chloroforme, ou des mélanges de solvants comme le mélange acétone /eau,…[5] Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser l'eau légèrement acidifiée avec l'acide chlorhydrique (HCl) de façon à solubiliser efficacement les COS.

Les réactions de la chimie « click » sont souvent catalysées par différents sels de cuivre avec parfois des sels oxydants ou réducteurs et des bases réactionnelles. Dans cette étude, le sulfate de cuivre penta hydraté et l'ascorbate de sodium ont été utilisés comme catalyseur et oxydant respectivement.

Parmi les réactions de la chimie « click », la plus répandue est la cycloaddition 1,3-dipolaire. Cette réaction consiste à coupler un composé 1,3-dipolaire (azotures) et un composé dipolarophile (alcynes) pour former un cycle triazole ; elle a été découverte pour la première fois par Michael à la fin du XIX$^{ème}$ siècle. Dans les années 60, cette réaction est améliorée par Huisgen et est réalisée à des températures élevées.[6] Cependant, il a été démontré que dans ces conditions, la réaction de cycloaddition alcyne/azoture n'est pas stéréospécifique et conduit à un mélange d'isomères (cf. **Figure 1**).[7]

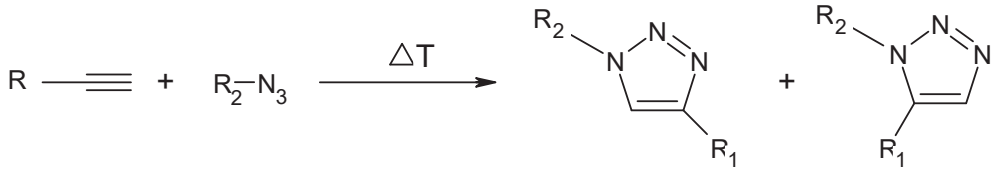



**Figure 1 : Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire alcyne/azoture réalisée sous température (85–120 °C).**

Ce n'est qu'à partir de 2001 que la réaction est reprise et catalysée par des sels de Cu(I) à température ambiante par Medal et Tornøe.[8] Le premier mécanisme réactionnel (**Figure 2**) a été proposé en 2002 par Rostovtsev et *al.* [9] et il sera confirmé par Rodionov et *al.*[10]

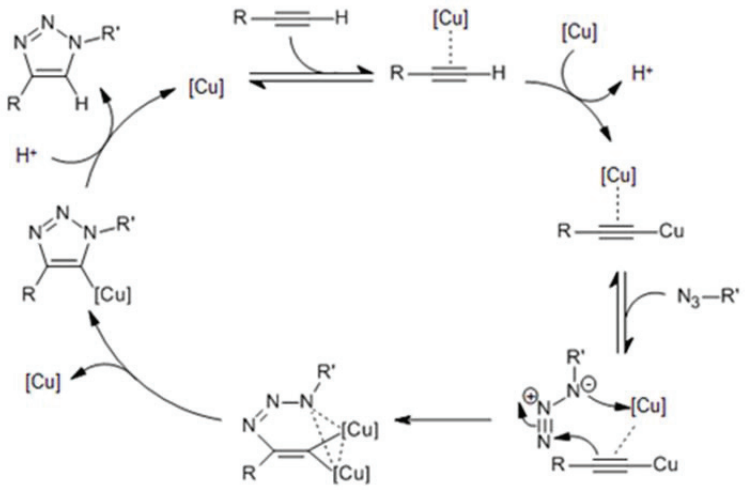



**Figure 2 : Mécanisme réactionnel de la réaction de cyclo-addition 1,3-dipolaire alcyne/azoture (schéma réactionnel extrait de [11]).**

## II. Etude du greffage en solution de quelques substrats modèles

Afin de s'affranchir des problèmes intrinsèques aux réactions à l'interface solide-liquide, nous avons entrepris une étude préliminaire en solution afin de trouver un protocole expérimental optimisé qui pourra ensuite être transféré au greffage sur les surfaces. La molécule modèle choisie est hydrosoluble et simple à caractériser. Il s'agit du O-(2-azidoéthyl)-O'-méthyl-triéthylène glycol (PEG-$N_3$) (**Figure 3**). L'objectif étant de greffer des COS (COS A et B) (**Figure 3**) sur les surfaces de silicium, nous avons mis en évidence le succès du greffage en solution des COS par le protocole optimisé. La méthode de synthèse et les résultats des caractérisations des COS sont résumés dans l'**annexe B**.

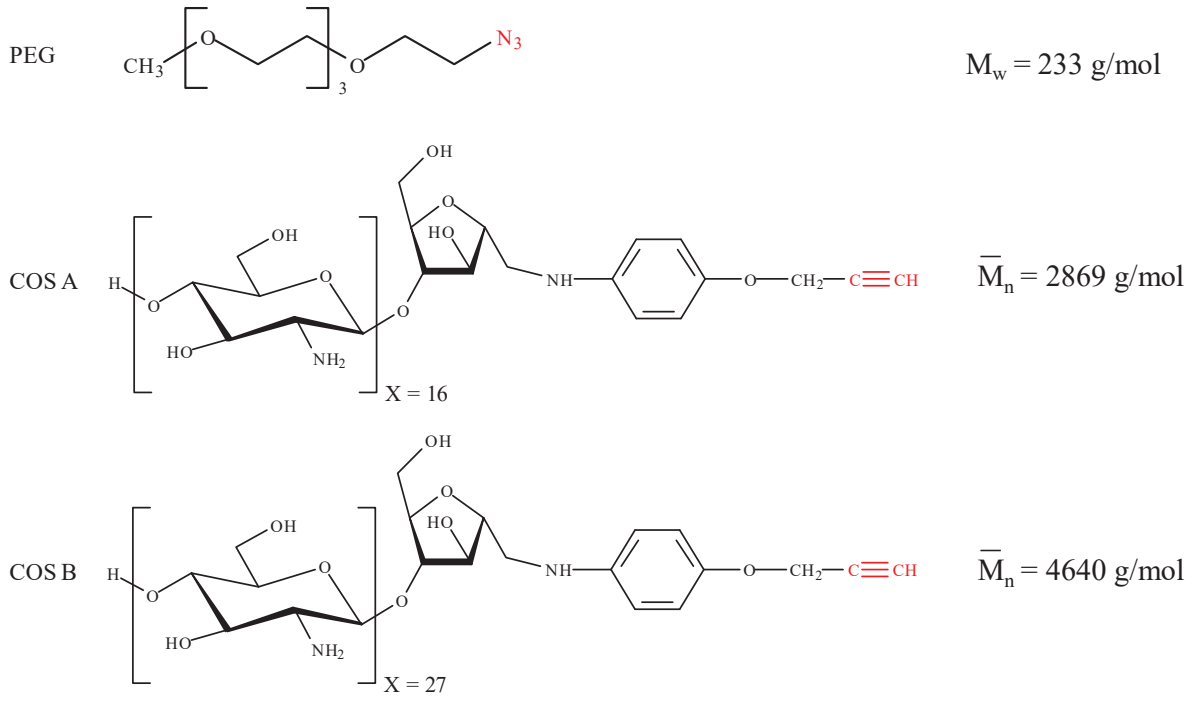



**Figure 3 : Structures chimiques de PEG-$N_3$ et de COS A et B utilisés dans cette étude de greffage en solution.**

## II.1. Méthodes expérimentales

### II.1.1. Protocole expérimental du greffage en solution

Le greffage en solution des COS sur les substrats modèles est réalisé en se basant sur des protocoles de la littérature.[12-15] Une masse de 60 mg des dérivés propargyl de COS (degré de polymérisation moyen X : 16 ou 27) est dissoute dans 10 mL d'une solution aqueuse de HCl à pH 4. Le PEG-$N_3$ (5 éq. molaire par rapport à la fonction alcyne) est ajouté dans le milieu. La solution est dégazée pendant 15 min par bullage d'argon. Le sulfate de cuivre pentahydraté ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 6 éq. molaire par rapport à la fonction alcyne) et l'ascorbate de sodium (18 éq. molaire par rapport à la fonction alcyne) sont dissous séparément chacun dans 2,5 mL d'eau pure. Ces solutions sont ajoutées successivement dans le milieu réactionnel maintenu sous argon. Le mélange réactionnel est laissé sous argon et mis sous agitation à température ambiante pendant 72 h. La solution est ensuite lavée par dialyse dans l'eau pure en utilisant des membranes (SPECTRUM Labs) en ester de cellulose de seuil de coupure 1000 g/mol. La solution est enfin congelée puis lyophilisée pour récupérer le produit. Le produit obtenu est d'un aspect poudreux. Les masses de produits récupérés après le greffage sont de 40 mg pour le couplage COS A-*bloc*-PEG et 36 mg pour le couplage COS B-*bloc*-PEG. Ces masses correspondent à des rendements massiques respectifs de 61,5 et 57 %.

### II.1.2. Techniques de caractérisation

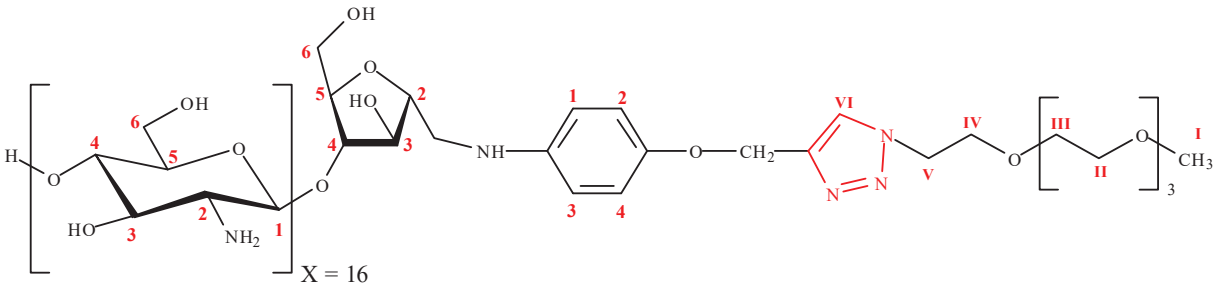
Après le greffage, les produits issus des différentes réactions en solution (copolymères COS A-*bloc*-PEG et COS B-*bloc*-PEG) sont caractérisés par spectroscopie infrarouge (IR), spectroscopie RMN du proton et spectrométrie de masse MALDI-TOF.

#### II.1.2.1. Analyses par spectroscopie infrarouge

Les analyses infrarouges des différents échantillons ont été effectuées en mode ATR diamant en utilisant un spectromètre IR Nicolet iS 10 équipé d'un détecteur HgCdTe (MCT) refroidi à une température proche de celle de l'azote. Ce détecteur permet d'avoir un très bon rapport signal sur bruit. L'acquisition des spectres a été effectuée dans la gamme spectrale 4000 – 650 $cm^{-1}$ avec une résolution de 4 $cm^{-1}$ et un nombre de scans de 128. Les spectres IR obtenus de ces analyses ont été traités par le logiciel OMNIC$^{TM}$ Spectra.

#### II.1.2.2. Analyses par spectroscopie RMN du proton

Les analyses par la RMN du proton des produits de couplage ont été effectuées par un spectromètre Bruker AVANCE III fonctionnant à 400 MHz. Les données obtenues de ces expériences ont été traitées par le logiciel Topspin. Les échantillons sont dissous dans du $D_2O$ en présence de TSP (acide triméthylsilylpropanoïque) pour fixer le pic de référence à 0 ppm et de HCl pour faciliter la solubilisation. Une quantité de matière de 10 mg est dissoute dans 0,7 ml de $D_2O$ pour la préparation des tubes. Les expériences ont été réalisées à température ambiante avec 128 scans.




COS A-*bloc*-PEG (X~16): **RMN $^{1}$H:** ($D_2O$, 298 K, 400 MHz): δ (ppm) = 8,25 (s, $H^{IV}$, 1H), 7,70 – 7,10 (d, $H^{1-4}$ Ar, 4H), 4,94 (d, $H^{1}$ GlcN, 16H), 4,40 – 4,05 (m, $H^{2-5}$ amf, 4H), 4,05 – 3,40 (m, $H^{3-6}$ GlcN, $H^{6}$ amf, $CH_2N$, $H^{II-III}$, $H^{IV-V}$, 100H), 3,4 – 3,30 (s, $H^{I}$, 3H), 3,30 – 3,10 (m, $H^{2}$ GlcN, 16H)

COS B-*bloc*-PEG (X~27): **RMN $^{1}$H:** ($D_2O$, 298 K, 400 MHz): δ (ppm) = 8,25 (s, $H^{IV}$, 1H), 7,70 – 7,10 (d, $H^{1-4}$ Ar, 4H), 4,94 (d, $H^{1}$ GlcN, 27H), 4,40 – 4,05 (m, $H^{2-5}$ amf, 4H), 4,05 – 3,40 (m, $H^{3-6}$ GlcN, $H^{6}$ amf, $CH_2N$, $H^{II-III}$, $H^{IV-V}$, 155H), 3,4 – 3,30 (s, $H^{I}$, 3H), 3,30 – 3,10 (m, $H^{2}$ GlcN, 27H) (**Ar** : aromatique, **GlcN** : glucosamine, **amf** : 2,5-anhydro-D-mannofuranose).

#### II.1.2.3. Analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les spectres MALDI-TOF ont été acquis par un spectromètre Voyager – DE STR (AB Sciex, Framingham, MA) équipé d'un laser à azote (337 nm, impulsions 3 ns). L'acquisition des spectres a été effectuée en mode linéaire et réflectron. Les ions ont été accélérés par un potentiel de 20 kV. Les spectres de masse ont été obtenus après un nombre d'acquisition égal à 300. Une calibration externe de l'analyseur de masse a été effectuée par un mélange de peptides (peptides de Sequazyme$^{TM}$ standards kit, AB Sciex). L'acide 2,5-dihydroxybenzoïque fourni par Sigma-Aldrich a été utilisée comme matrice dans toutes les expériences. La matrice et les échantillons ont été dissous dans l'eau à une concentration de 10 mg/mL. Un mélange de 45 µL de la solution de la matrice et 5 µL de la solution de l'échantillon a ensuite été préparé pour le dépôt sur la lame d'analyse. Des gouttes de volume 0,5 µL du mélange ont été déposées sur la lame puis séchées à température ambiante.

### II.2. Résultats et discussion

Le greffage en solution des COS a été effectué avec un PEG-$N_3$ commercial de faible masse molaire (233 g/mol) dans le but de faciliter la caractérisation du produit de greffage. Nous avons choisi de travailler en milieu aqueux d'acide chlorhydrique qui est un bon solvant à la fois pour les réactifs et pour les catalyseurs utilisés dans cette étude notamment le $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ et l'ascorbate de sodium. La réaction a été réalisée sous argon et à température ambiante pendant 72 h (**Figure 4**). Après greffage, le produit de la réaction est lavé par dialyse avec une membrane d'ester de cellulose de seuil de coupure suffisamment grand (1000 g/mol) pouvant permettre l'élimination de l'excès de catalyseurs et de PEG-$N_3$ non réagi.

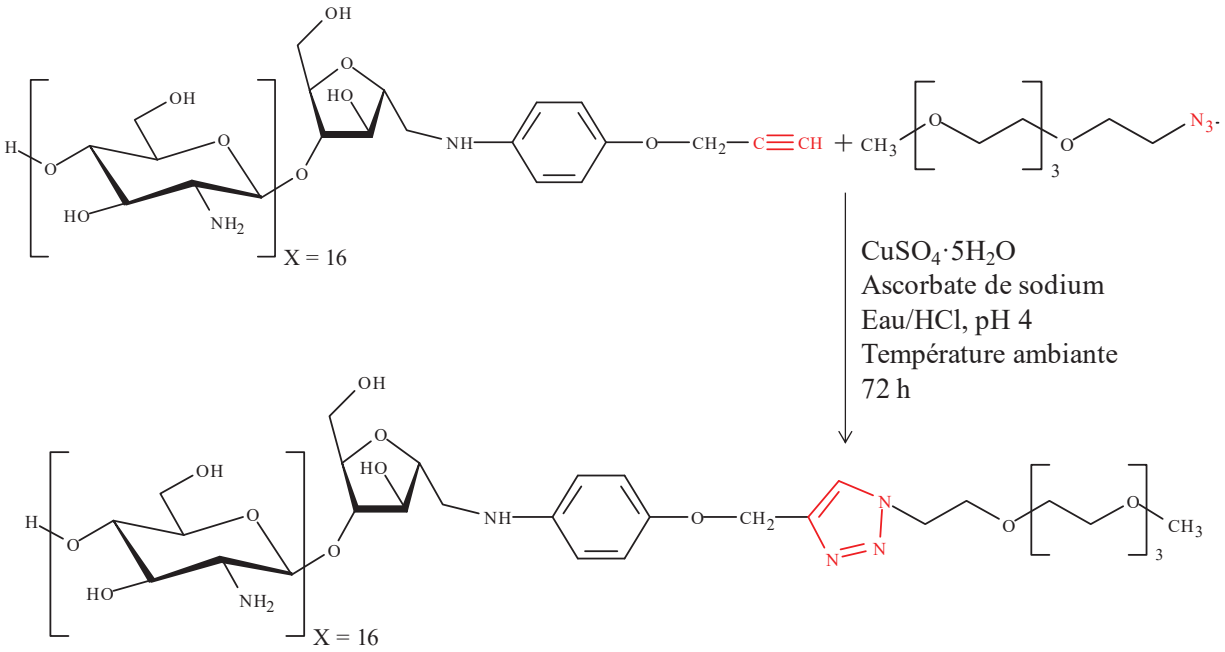



**Figure 4 : Schéma de la réaction de greffage en solutions du PEG-$N_3$ et du COS A.**

Les spectres infrarouges des produits de départ montrent bien des bandes de vibrations caractéristiques correspondant aux fonctions alcyne et azoture. Le PEG montre une bande de vibration intense aux alentours de 2100 $cm^{-1}$ qui correspond à la bande de vibration de la fonction azoture $–N_3$.[13, 14, 16-18] Les COS terminés par le groupe propargyle, révèlent des signaux de vibration vers 3400 - 3300 $cm^{-1}$ correspondant à la fonction alcyne (**Figure 5**).[19] Après le couplage du PEG-$N_3$ avec les COS terminés alcyne (COS A et COS B), nous notons la disparition des bandes de vibration de la fonction azoture et de la fonction alcyne sur les produits de greffage et l'apparition d'une nouvelle bande de vibration aux environs de 1650 $cm^{-1}$ qui correspond à la formation du cycle 1,2,3-triazole (**Figure 5**).[17]

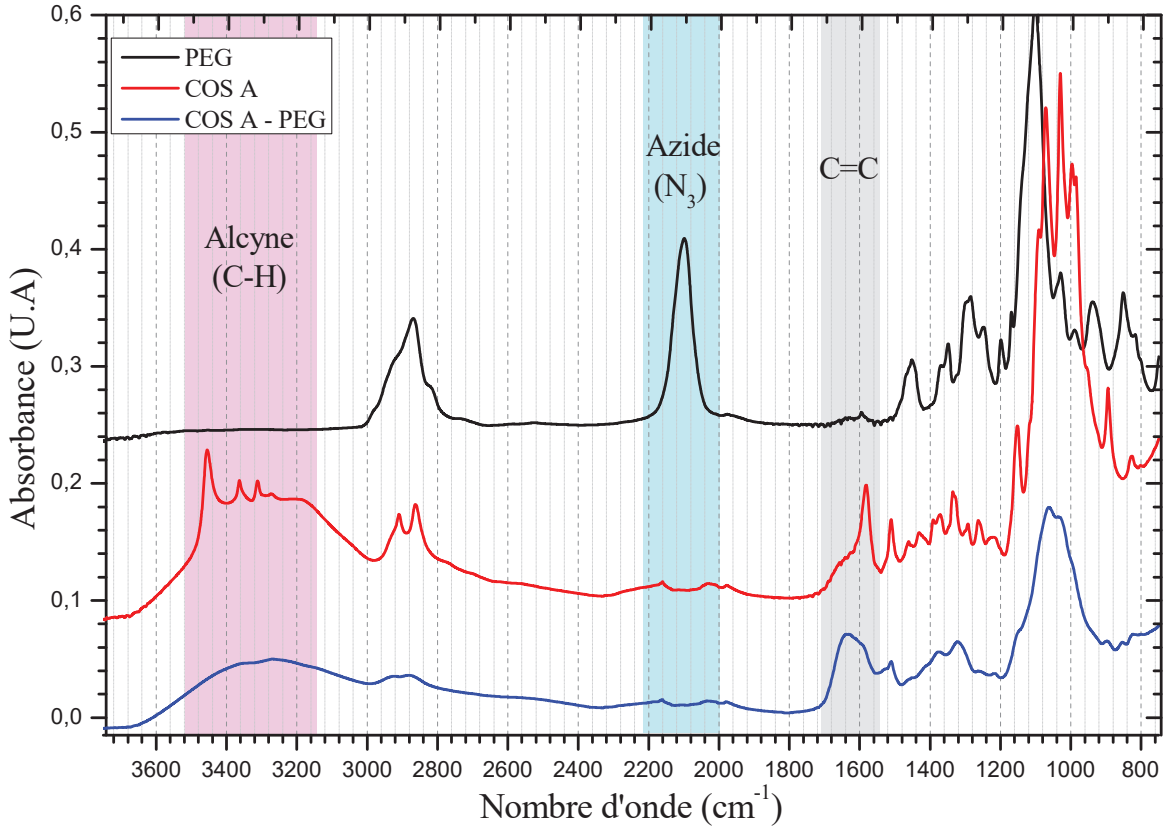



**Figure 5 : Spectres IR du COS A, du PEG-$N_3$ et du produit de couplage COS A-*bloc*-PEG (les spectres ont été décalés pour faciliter la lecture).**

Dans le but de faciliter l'identification des pics des spectres des produits de couplage par spectrométrie de masse MALDI-TOF, nous avons d'abord analysé les produits de départ (COS A et B, PEG-$N_3$). Les spectres obtenus sont présentés sur la **Figure 6**. Les résultats montrent des spectres avec des pics de valeurs m/z : 208,1 uma (**Figure 6*a***), 1121,6, 1282,7, 1443,8, 1605,9 uma,… (**Figure 6*b***), 1282,6, 1443,7, 1604,7, 1765,8 uma,… (**Figure 6*c***) qui correspondent respectivement aux pics attendus du PEG-$N_3$, du COS A et du COS B. Le pic de la masse mono isotopique théorique du PEG-$N_3$ était attendu à 233,1 uma. Cependant, ce pic apparaît à 208,1 uma au lieu de 233,1 uma. Ce phénomène peut être dû à une éventuelle transformation dans le spectromètre de masse de la fonction azoture en une amine primaire. Concernant les spectres des COS A et B, ils présentent une distribution de pics espacés de 161 g/mol. Cet écart entre les pics est dû aux motifs répétitifs des unités glucosamine ($C_6H_{11}O_4N$), mettant en évidence que les produits COS A et B sont composés de différents degrés de polymérisation de chaînes oligomères.

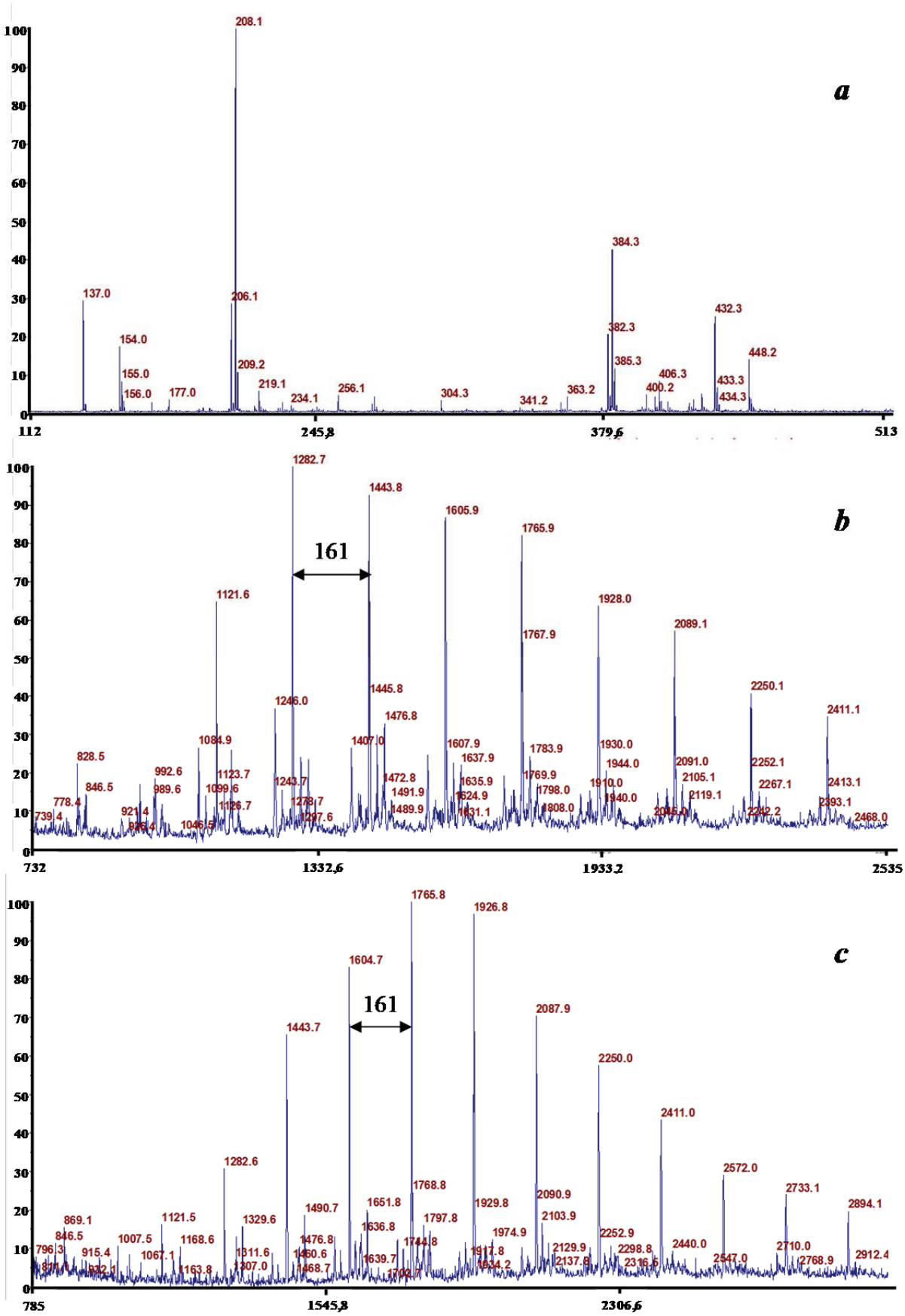



**Figure 6 : Spectres de masse MALDI-TOF des composés oligomères utilisés pour le greffage en solution : *a*) PEG-$N_3$ ; *b*) : COS A et *c*) : COS B.**

Les résultats des analyses de spectrométrie de masse MALDI-TOF effectuées sur les produits de greffage sont présentés sur la **Figure 7**. Les spectres des copolymères COS A-*bloc*-PEG et COS B-*bloc*-PEG présentent différentes distributions de pics qui correspondent toutes aux couplages attendus. De manière générale, les couplages des COS avec le PEG-$N_3$ montrent des pics équivalents aux masses molaires des produits censés se former. Dans le cas du couplage COS A-*bloc*-PEG, nous observons à 1515,8 uma un pic de la masse expérimentale du couplage entre les chaînes de COS (X = 6) et celles du PEG ainsi que des pics à 1677,5, 1837,5, 2001,8 uma,… qui correspondent respectivement à X = 7, 8, 9,… du COS A-*bloc*-PEG. Ces pics, comme dans le cas des spectres des produits de départ sont espacés de 161 g/mol (masse molaire de l'unité glucosamine). Le copolymère COS A-*bloc*-PEG (**Figure 7**) qui correspond au plus petit degré de polymérisation moyen en nombre du bloc COS (X = 16) montre deux distributions de pics. Les pics de ces deux distributions sont décalés entre eux de 2 uma. Le copolymère COS B-*bloc*-PEG (**Figure 7**) qui représente le plus grand degré de polymérisation moyen en nombre du bloc COS (X = 27) présente trois distributions de pics différentes. Deux premières distributions dont le décalage entre les pics correspond à la différence de la masse molaire des adduits utilisés pour effectuer les analyses (39 g/mol et 23 g/mol pour le potassium et le sodium respectivement). Une troisième distribution décalée de 63 g/mol de la première distribution est notée. Cette nouvelle distribution peut correspondre à une possible complexation des motifs glucosamine par l'excès des sels de cuivre utilisés comme catalyseur pour le greffage. Cette complexation des motifs glucosamine est fonction de l'acidité du milieu réactionnel. En effet, Kwang-hee et *al.* ont montré qu'une forte interaction coopérative entre le chitosane et les ions cuivrique ($Cu^{2+}$) était possible en solution aqueuse dans un domaine de pH > 5,1.[20] Ainsi, cette méthode d'analyse nous a permis de mettre en évidence le succès des couplages en solution des COS A et B avec le PEG-$N_3$.

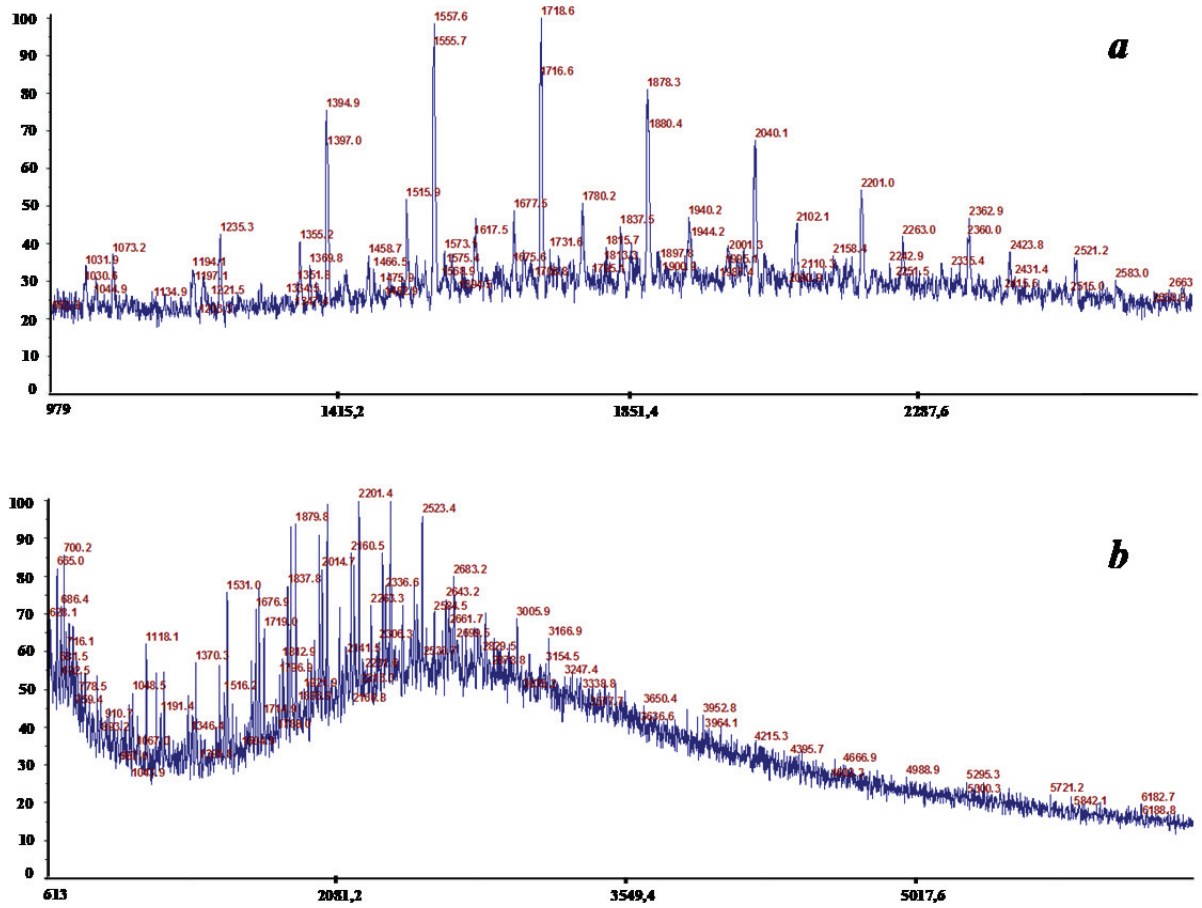



**Figure 7 : Spectres de masse MALDI-TOF des produits issus des différents greffages en solution: *a*) COS A-*bloc*-PEG ; *b*) COS B-*bloc*-PEG.**

Dans le but de confirmer les résultats obtenus par spectroscopie IR et spectrométrie de masse MALDI-TOF sur la formation du cycle triazole, nous avons caractérisé par la spectroscopie RMN du proton les produits issus de la réaction de couplage entre COS A ou B et PEG-$N_3$. Il est largement rapporté dans la littérature que le proton du cycle triazole formé par la fonction azoture et la fonction alkyle apparaît entre 7,45 et 8,45 ppm.[21-23] Les spectres de RMN $^1$H obtenus sont présentés sur les **Figure 8** et **Figure 9**. Nous notons pour les COS terminés alcyne le signal caractéristique de l'alcyne à 2,9 ppm. La fonction azoture ne présentant pas de proton, la mise en évidence de sa présence sur le PEG-$N_3$ est validée par spectroscopie infrarouge et par spectrométrie MALDI-TOF. Les spectres de RMN $^1$H des différents produits de greffage combinent bien les pics des signaux des produits de départ. En effet, nous notons clairement la présence du signal lié aux protons du groupe $CH_3$ du PEG à 3,3 ppm et le signal à 3,1 ppm correspondant aux protons $H^2$ du motif glucosamine. Nous observons également après couplage la disparition du signal à 2,9 ppm lié au proton de la fonction alcyne des COS. A cela s'ajoute l'apparition à 8,3 ppm du signal lié au proton du cycle 1,2,3-triazole censé se

former d'après la littérature. Les valeurs des intégrales des signaux des produits de couplage notamment les signaux des protons $H^2$ GlcN à 3,1 ppm (Intégrales : 16H et 27H pour les produits de couplage COS A-*bloc*-PEG et COS B-*bloc*-PEG respectivement), des protons $H^I$ du groupe $CH_3$ du PEG à 3,3 ppm (Intégrale : 3H) et des protons $H^{1-4}$ du cycle aromatique à 7,2 et 7,5 ppm (Intégrale : 4H) et du proton du cycle 1,2,3-triazole à 8,3 ppm (Intégrale : 1H) montrent que les produits obtenus correspondent comme attendu aux produits de couplage COS-*bloc*-PEG.

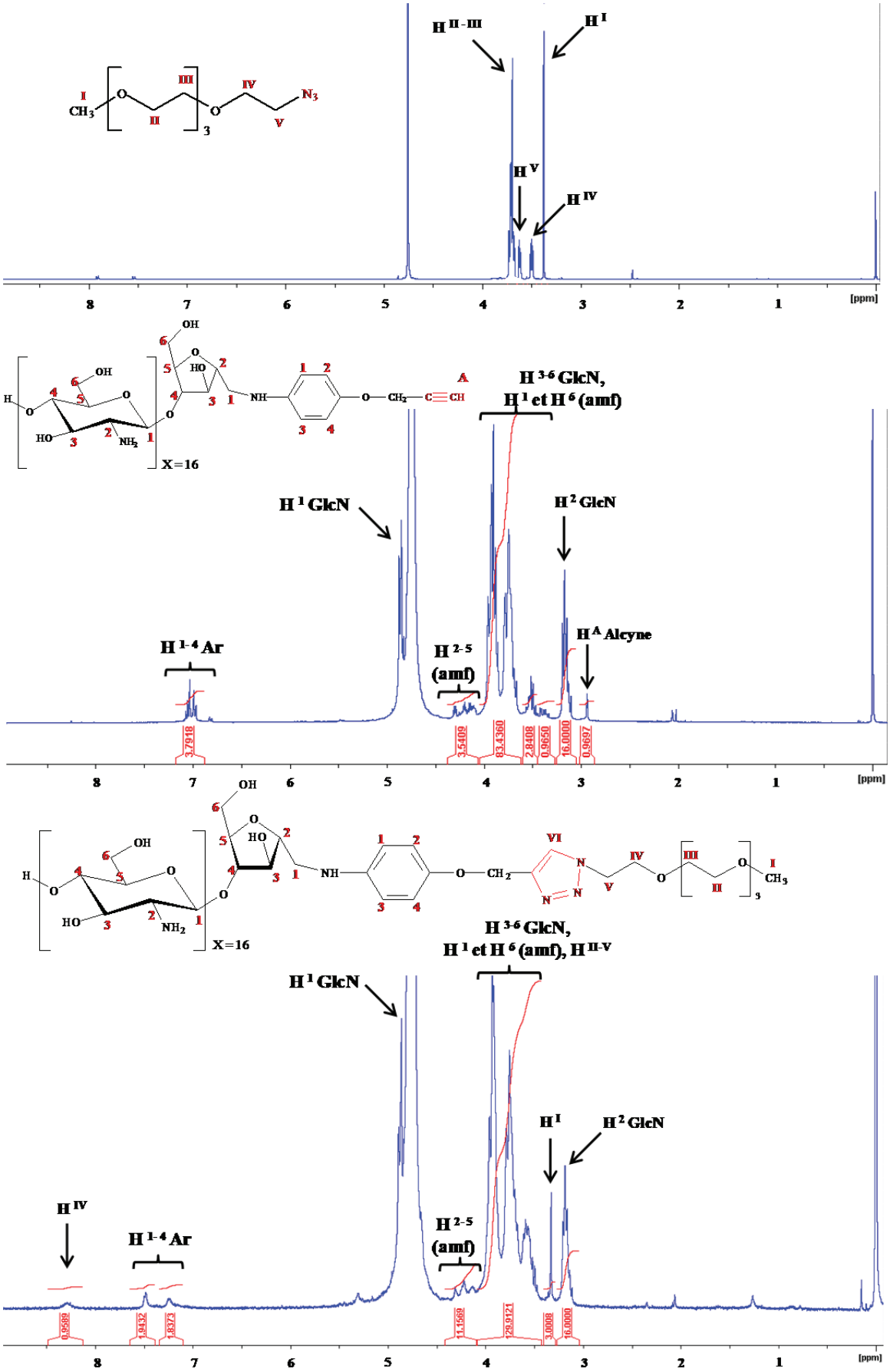



**Figure 8 : Spectres de RMN $^{1}H$ ($D_2O$, 400 MHz) du PEG-$N_3$, du COS A et du COS A-*bloc*-PEG.**

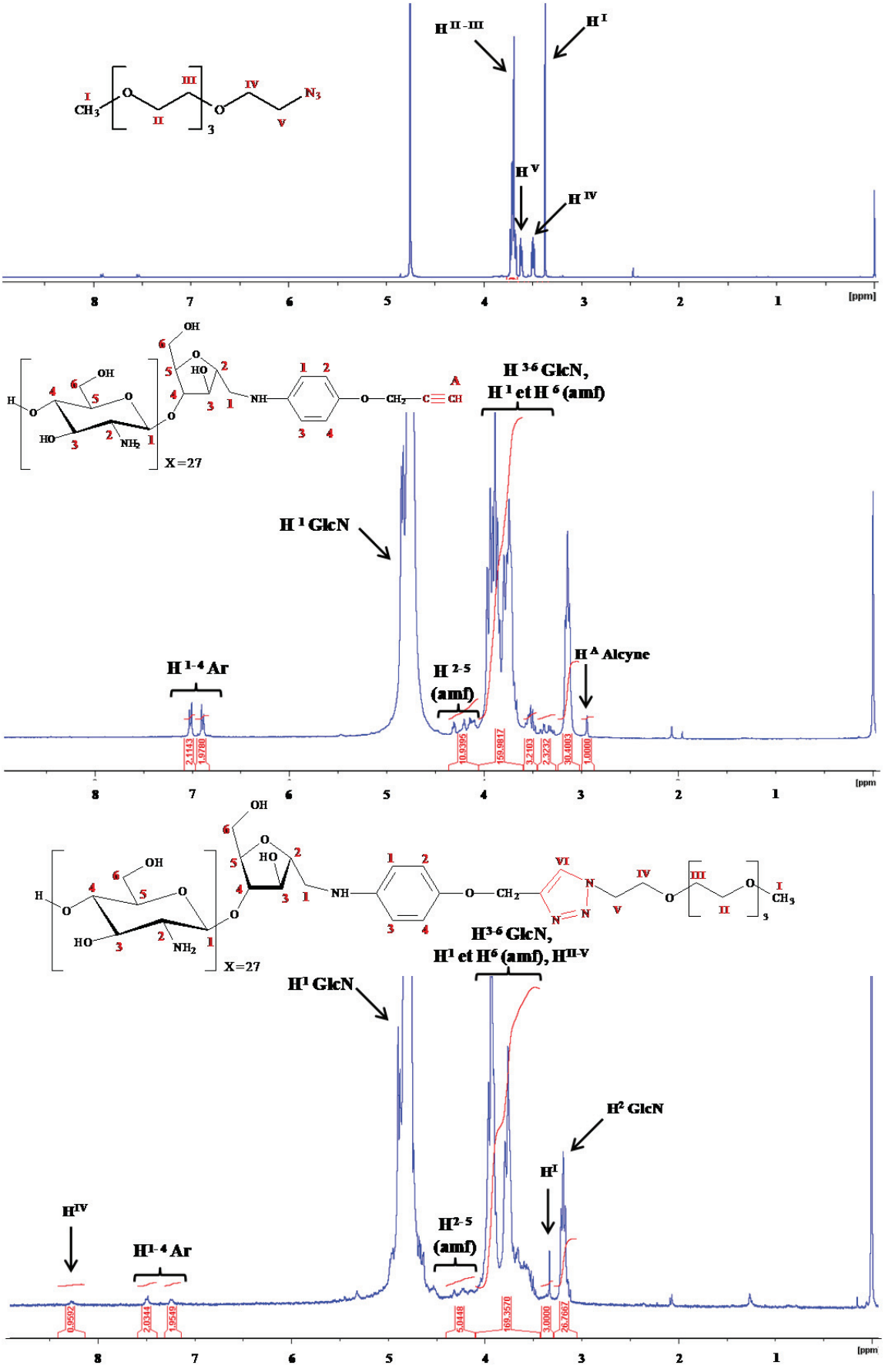



**Figure 9 : Spectres de RMN 1H (D2O, 400 MHz) du PEG-N3, du COS B et du COS B-bloc-PEG.**

# III. Greffages chimiques des chitooligosaccharides sur des surfaces de silicium

## III.1. Généralités sur la fonctionnalisation des surfaces

Le greffage chimique covalent présente de nombreux avantages, en particulier, il permet une fixation covalente stable, localisée et contrôlée des chaînes de polymères à la surface. Cette technique offre aussi la possibilité de combiner sur une même surface des greffages de polymères de propriétés différentes et ainsi préparer des surfaces polyfonctionelles (brosses polydisperses, brosses mixtes…).[24] La liaison chimique entre les chaînes de polymère et une surface peut être créée de deux manières : soit entre des chaînes polymères dont les extrémités sont fonctionnalisées par des fonctions réactives avec une surface préalablement modifiée avec des fonctions réactives compatibles avec celles des chaînes de polymère (« grafting to »), soit par polymérisation de monomères à partir d'amorceurs préalablement fixés à la surface (« grafting from ») (**Figure 10**).

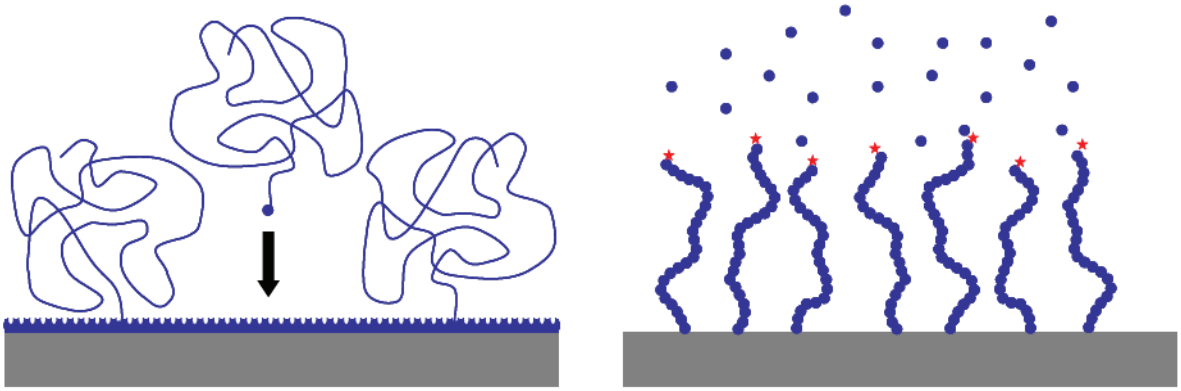


**Figure 10 : Méthodes de greffage chimique covalent sur une surface (à gauche : le « grafting to » ; à droite : le « grafting from » ; schéma extrait de la thèse de Guillaume SUDRE) [25]**

Le « grafting to » présente l'avantage de maîtriser les caractéristiques des chaînes polymères en amont. En dehors de ces avantages, le « grafting to » est le seul moyen de pouvoir greffer des brosses de polysaccharides sur des surfaces. Ainsi, c'est cette méthode que nous avons choisie pour effectuer le greffage des COS sur les surfaces de silicium.

Le greffage chimique des polymères peut être effectué sur différents types de surfaces, organiques et inorganiques. En l'absence de fonctions réactives sur la surface, celle-ci peut être activée par plasma, irradiation UV ou gamma, oxydation chimique… pour générer des fonctions réactives. Dans le cas spécifique de surfaces inorganiques, telles que le silicium et le verre par exemple, et en cas de non compatibilité entre les fonctions réactives de la surface et du polymère, il existe une étape intermédiaire très connue pour fonctionnaliser la surface : la

silanisation. Cette étape permet de greffer d'abord sur la surface un silane possédant des fonctions compatibles avec les fonctions réactives du polymère. Le greffage covalent par « grafting to » peut être réalisé en solution ou en masse. Dans ce dernier cas, la surface activée est recouverte du polymère à greffer qui est ensuite chauffé à une température supérieure à sa température de transition vitreuse pour faciliter la mobilité des chaînes, et ainsi, permettre le greffage. Cependant, cette méthode de greffage en masse ne peut pas s'appliquer aux polysaccharides car ces derniers possèdent une température de transition vitreuse supérieure à leur température de dégradation. [26]

### III.1.1. Nettoyage des surfaces de silicium

La réaction entre un polymère et une surface nécessite que la surface soit propre et qu'elle présente les fonctions chimiques requises pour la réaction. Ainsi toute modification chimique d'une surface doit primordialement commencer par une étape de nettoyage et d'activation de la surface. Parmi les méthodes de nettoyage et d'activation d'une surface, les plus connues et plus utilisées sont le nettoyage par une solution *piranha* (mélange à proportions variables, généralement 70/30 ou 2/1 (v/v) d'acide sulfurique $H_2SO_4$ et de peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$) et l'activation par plasma. Ces deux procédés de nettoyage combinés permettent de débarrasser la surface de ses impuretés organiques et inorganiques (gaz, acides gras, sels, ions métalliques…) et de générer des groupes silanol (Si-OH) qui vont permettre la réaction. Il a été prouvé par Carim et *al*.[27] que ces méthodes de nettoyage permettent d'avoir jusqu'à 5 groupes silanol par $nm^2$ à la surface du silicium.

### III.1.2. Silanisation

La silanisation consiste à établir des liaisons covalentes fortes entre une surface et un organosilane de formule générale X-Si-($R_1$)($R_2$)($R_3$). Cette technique a été initiée par Plueddeman[28] à la fin des années 1970 sur des surfaces d'oxydes métalliques et de verres. Aujourd'hui, cette technique est utilisée sur d'autres types de surfaces pour des applications en optique, électronique, et biologie.[29-35] L'organosilane peut être de nature mono, di, tri ou tétra-fonctionnel.

La réaction des organosilanes sur une surface est influencée par divers facteurs : la nature du solvant, le pH, la température, la nature du silane (mono, di, trifonctionnel) et la longueur de la chaîne principale carbonée.

Les réactions de silanisation peuvent avoir lieu dans des solvants aqueux et des solvants organiques anhydres. Cependant, ces types de solvants influencent différemment la réaction.

En milieux aqueux, la réaction de silanisation (**Figure 11**) est déclenchée par une hydrolyse des groupes hydrolysables du silane qui provoque une condensation des molécules entre elles et avec les fonctions silanol du substrat.[36, 37] La polymérisation des silanes conduit à un réseau tridimensionnel à la surface du substrat. Un excès d'eau dans le milieu réactionnel peut entraîner une réticulation des molécules du silane entre elles et conduire ainsi à formation de structures très complexes à la surface du substrat.[36, 38]

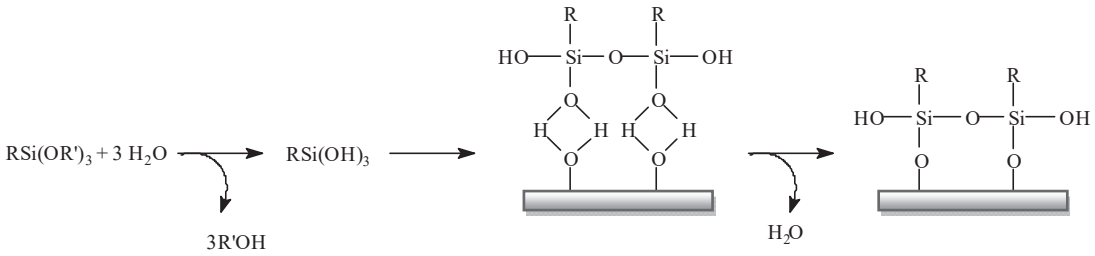



**Figure 11 : Schéma réactionnel d'un organosilane en milieu aqueux avec les groupes silanol d'une surface.**

En milieux organiques anhydres, l'absence de molécules d'eau dans le milieu empêche l'hydrolyse des groupes hydrolysables du silane. La réaction de silanisation se produit alors par une autocatalyse directe. Deux étapes sont décrites lors de la silanisation dans les milieux anhydres (**Figure 12**). Une première attaque nucléophile de l'oxygène d'un groupe hydrolysable du silane sur le pont de silane suivie d'une hétéro-condensation entre les autres groupes hydrolysables du silane et les fonctions silanol de la surface.[39] Dans certains cas, le caractère hydrophile du groupe terminal du silane peut intervenir dans le processus de silanisation. En milieu anhydre, le greffage du silane se fait de manière horizontale et conduit à une couche de silane bien ordonnée. Il a été rapporté par Lee[40] que du fait des gênes stériques occasionnées par certaines molécules de silane et du nombre limité de fonctions silanol à la surface, seuls au maximum deux groupes hydrolysables du silane peuvent réagir.

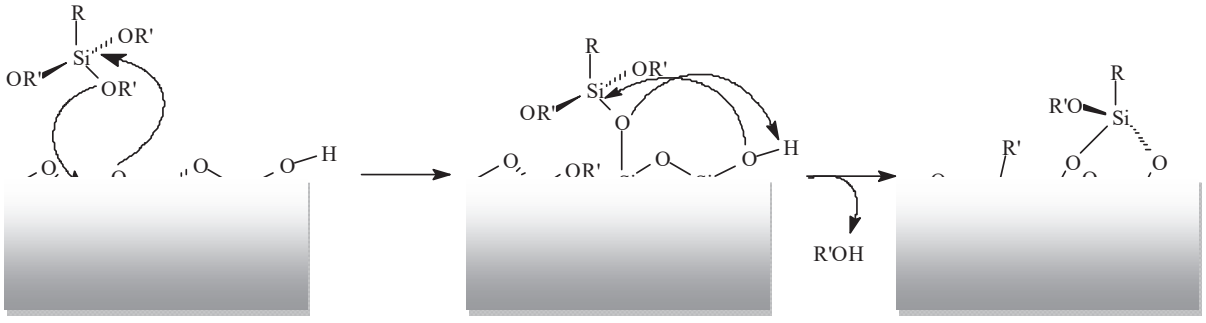



**Figure 12 : Schéma réactionnel d'un organosilane en milieu anhydre avec les groupes silanol d'une surface.**

Le greffage des organosilanes à la surface d'un substrat est fortement influencé par la température expérimentale.[41] En effet, il existe pour chaque organosilane une température

critique[42, 43] qui dépend du nombre de carbones de la chaîne principale de l'organosilane. En dessous de cette température critique, la cinétique de formation de la monocouche d'organosilane est lente et homogène et au-dessus, on obtient une formation rapide et moins organisée (sous forme d'îlots) de la couche de silane.[42]

### III.1.3. Azidation

L'azidation est le plus souvent une réaction de substitution d'un atome halogène X (X = Cl, Br, I,…), d'un groupe hydroxyle ou carboxylique par une fonction azoture ($N_3$). La substitution du groupe hydroxyle nécessitant une étape intermédiaire, l'azidation par substitution d'un atome halogène est couramment utilisée pour les greffages sur les surfaces. Cette dernière peut se réaliser facilement dans les solvants organiques courants et mélanges de solvants (toluène, N,N-diméthylformamide, méthanol, hexaméthylphosphoramide, acétonitrile/eau…), en milieu aqueux en présence ou non de catalyseurs (NaI, KI,…) à haute température ou à température ambiante (**Figure 13**). Cependant, Peigen et *al*.[44] ont montré que la cinétique d'azidation, le rendement, et la distribution à la surface peuvent être fortement influencés par le solvant. Différents sels d'azoture sont utilisés dans la littérature[45-48] pour réaliser l'azidation.

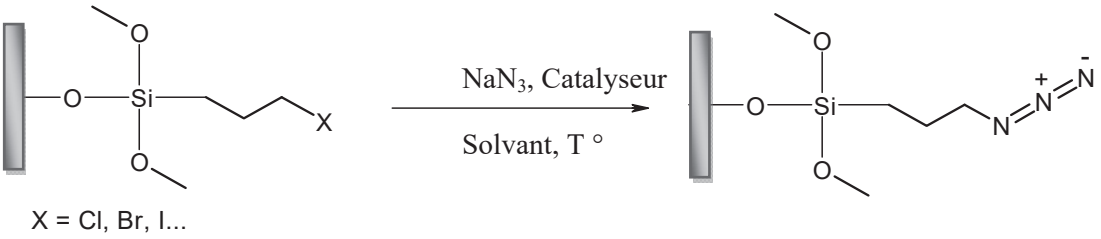



**Figure 13 : Schéma général de l'azidation par substitution d'un halogène.**

### III.1.4. Réaction « Click » azoture/alcyne sur des surfaces planes

Les propriétés de la chimie « click » azoture/alcyne, telles que la régiosélectivité, la non dépendance au pH et à la nature du solvant ont permis son transfert de la solution aux surfaces.[49] Les premières réactions de « click » sur des surfaces ont été réalisées sur des surfaces d'or par Collman et *al*.[50] Leur étude reposait sur le greffage de ferrocènes sur des surfaces d'or via la réaction de « click » azoture/alcyne. Ces réactions ont été par la suite reprises et étendues aux surfaces de verre, silicium,… La réaction « click » azoture/alcyne sur des surfaces de silicium (voir **Figure 14**) a été introduite par Lummerstorfer et Hoffmann.[24] Cette réaction constitue l'exemple typique de la réaction de Huisgen sur des surfaces de silicium en l'absence de système catalytique. Deux différentes techniques de « click » sur les

surfaces sont mentionnées dans la littérature : la chimie « click » en solution et le « microcontact printing ». La première, plus utilisée, peut nécessiter ou non l'utilisation de systèmes catalytiques. En effet, il a été montré que la chimie « click » impliquant des groupes acétylène riches en électrons nécessite un système catalytique de sels de cuivre et que celui-ci permettait d'accélérer la réaction d'un facteur $10^7$ par rapport à la réaction sans système catalytique.[9] Le « microcontact printing » a l'avantage d'être rapide et ne nécessite pas de système catalytique. Son principe est basé sur une application directe et sous pression d'un tampon (PDMS) préalablement imbibé de la solution contenant le polymère (dérivé alcyne) à greffer sur la surface fonctionnalisée (azoture).[51, 52]

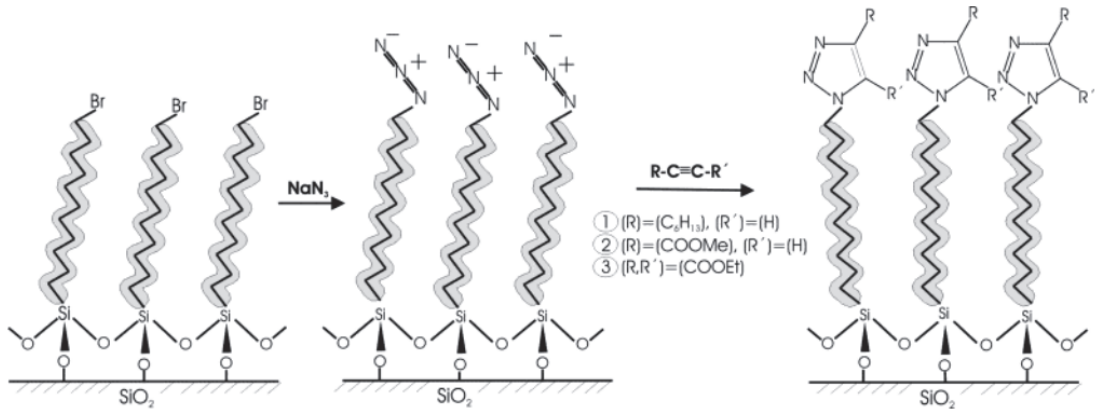



**Figure 14 : Schéma de la première réaction « click » azoture/alcyne sur des surfaces de silicium.[24]**

Différents types de catalyseurs et de solvants sont utilisés pour réaliser la réaction de cyclo-addition 1 ,3 dipolaire.[5] Dans le cas spécifique de la réaction « click » azoture/alcyne, le Cu(I) est souvent utilisé, soit directement, soit en passant par le Cu(II) en présence d'un sel réducteur tel que l'ascorbate de sodium. Dans certains cas, les catalyseurs sont accompagnés de bases. La réaction « click » de polymères synthétiques sur des surfaces planes est largement répandue dans la littérature, mais celle de polysaccharides reste à ce jour très rare.

## III.2. Méthodes expérimentales

### III.2.1. Nettoyage des substrats de silicium

Les substrats de silicium découpés en des surfaces de dimensions 15 mm × 15 mm sont nettoyés par un mélange *piranha* constitué d'acide sulfurique concentré 96 % ($H_2SO_4$) et de l'eau oxygénée 40 % ($H_2O_2$) (7/3) chauffé à 150 °C. Ce mélange exothermique est un oxydant très fort particulièrement efficace pour nettoyer les surfaces. Après le nettoyage, les surfaces sont abondamment rincées avec de l'eau permutée (résistivité = 18 MΩ·cm) et mis dans le bain à ultra-sons avant d'être séchées par de l'air comprimé en bouteille (*Aeroclean XYZ)*. Le

nettoyage est complété par l'activation des surfaces dans une enceinte UV *plasma cleaner* pendant 15-20 min. Cette étape d'activation se caractérise par une forte hydrophilie de la surface validée par une mesure d'angle de contact à l'eau.

### III.2.2. Silanisation des substrats

La silanisation des surfaces de silicium par le silane (3-chloropropyl)trimethoxysilane a été effectuée en phase liquide dans des conditions anhydres. Après le nettoyage des surfaces de silicium au *piranha* et leur activation par UV/Ozone pour générer les fonctions silanol (Si-OH), elles sont directement placées dans un réacteur à fond plat par l'intermédiaire d'un cristallisoir. Le réacteur est mis sous balayage argon pendant 15 min. Un volume de 300 µL du silane est dissout dans 17 mL de toluène anhydre (1,75 % de silane en volume du toluène) puis la solution de silane est transférée par canulation dans le réacteur. L'enceinte du réacteur est maintenue sous argon pendant 3 h à température ambiante. Après silanisation, les surfaces sont lavées par du toluène puis séchées à l'argon.

### III.2.3. Azidation des substrats

L'azidation de la monocouche de silane greffée sur les surfaces de silicium a été réalisée dans du DMF anhydre. Pour cela, une solution de DMF saturée par du $NaN_3$ a été préparée en introduisant 0,5 g de $NaN_3$ dans 50 mL de DMF. L'azidation a été catalysée par des sels de KI. La solution de KI est obtenue en dissolvant 0,1 g de KI dans 20 mL de DMF. Les surfaces de silicium modifiées par le silane sont placées dans le réacteur à fond plat, la solution de $NaN_3$ puis celle de KI sont transférées successivement dans le réacteur par canulation. Le réacteur est ensuite protégé de toute lumière et placé dans l'étuve à 80 °C pendant 72 h. Les surfaces sont ensuite lavées plusieurs fois par du DMF puis par du toluène pour faciliter leur séchage.

### III.2.4. Greffage des chitooligosaccharides sur les substrats

Dans cette étape finale du greffage, les COS modifiés par des dérivés propargyl sont greffés sur les fonctions azotures introduites dans la deuxième étape pour former des fonctions triazole. Le greffage des COS est effectué dans les heures qui suivent l'azidation. Le COS fonctionnalisé alcyne (30 mg) est dissous dans 4 mL d'une solution aqueuse de HCl à pH 4. Les surfaces fonctionnalisées azotures sont placées dans le réacteur mis sous flux d'argon. La solution de COS est ajoutée dans le réacteur par une canule. Les catalyseurs $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ et l'ascorbate de sodium sont dissous séparément dans 2 mL d'eau pure chacun en quantité 6 et

18 équivalents molaires de la fonction alcyne respectivement. Les deux solutions de catalyseurs sont ajoutées successivement dans le milieu réactionnel maintenu sous balayage d'argon. Le réacteur est ensuite placé dans l'étuve à température ambiante pendant 72 h. Après le greffage, les surfaces sont lavées par une solution aqueuse de HCl à pH 4 puis séchées par de l'air sec.

## III.3. Méthodes de caractérisation

Les surfaces sont caractérisées par ellipsométrie pour évaluer l'épaisseur de la couche greffée, par tensiométrie pour déterminer les angles de contact, par microscopie à force atomique pour déterminer la morphologie des couches et par spectroscopie infrarouge et spectrométrie TOF-SIMS pour déterminer la composition chimique de la surface et les liaisons chimiques établies au cours des différentes étapes du greffage. Les techniques de mesures des épaisseurs et des angles de contact sont décrites dans le **chapitre II** et la microscopie à force atomique dans le **chapitre III**. Ici nous allons seulement présenter la technique IR sur les surfaces et celle du TOF-SIMS.

### III.3.1. Analyse des surfaces par spectroscopie IR

Les caractérisations par infrarouge ont été effectuées par réflexion totale atténuée (ATR) sur des cristaux de silicium de forme trapézoïdale d'angle de base de 45 ° et de dimensions 70×10×1 mm. Un système prêté par le laboratoire Science et Ingénierie de la Matière Molle (Yvette TRAN, UMR 7615) et adapté à la taille des cristaux a été utilisé pour faire passer le signal dans les cristaux. Le spectromètre est le même que celui utilisé pour la caractérisation des produits de greffage en solution (**paragraphe II.1.2.1**). La gamme spectrale explorée lors de l'acquisition de spectres a été délimitée entre 4000 et 1500 $cm^{-1}$ (le silicium absorbe fortement le rayonnement infrarouge pour les nombres d'onde inférieurs à 1500 $cm^{-1}$, ce qui rend les spectres difficilement exploitables). Dans le but d'améliorer la qualité des spectres, la résolution a été fixée à 4 $cm^{-1}$ et le nombre d'acquisitions à 524 scans.

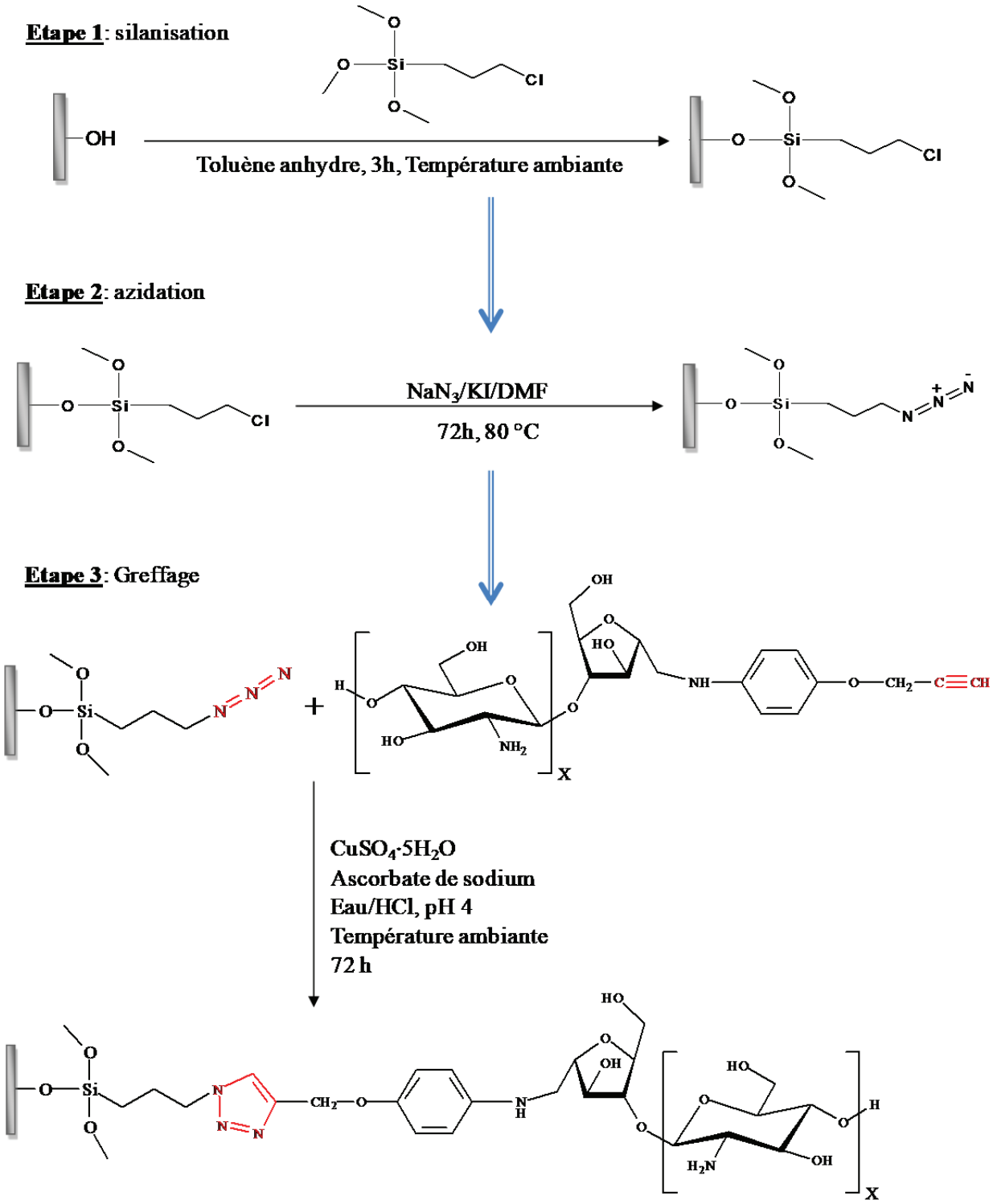
### III.3.2. Analyse des surfaces par spectroscopie de masse TOF-SIMS

La technique de caractérisation ToF-SIMS est une spectrométrie de masse de surface basée sur l'analyse des ions secondaires obtenus lors du bombardement de la surface par des ions primaires. Elle permet de déterminer la composition chimique élémentaire et moléculaire de l'extrême-surface d'un matériau (profondeur d'information limitée d'une à quelques monocouches). Elle est d'une grande sensibilité mais la quantification des données reste

complexe. Les échantillons ont été analysés sous ultra vide par un appareillage TOF-SIMS PHI TRIFT III (ions $Au^+$ de 22 keV). Les spectres ont été traités par le logiciel WinCadence®.

## III.4. Résultats et discussion

Le greffage des COS sur les surfaces de silicium a été effectué en trois étapes : *i)* la silanisation, *ii)* l'azidation et *iii)* le greffage « click » azoture/alcyne. D'abord les surfaces de silicium sont modifiées par une monocouche de (3-chloropropyl)triméthoxysilane dans le toluène anhydre, à température ambiante et sous atmosphère d'argon pour éviter les phénomènes de condensation. Le choix du silane s'est orienté vers le (3-chloropropyl)triméthoxysilane du fait de la réactivité de son chlore terminal et de la longueur de sa chaîne carbonée courte qui peut limiter son adsorption à la surface. Dans la deuxième étape, le chlore de l'organosilane est substitué par la fonction azoture dans le DMF saturé par $NaN_3$ en présence d'iodure de potassium (KI) à 80 °C pendant 72 h. La troisième étape qui correspond au greffage « click » des fonctions alcyne des COS avec les fonctions azoture de la surface est effectuée en milieu aqueux pH 4 (équilibré avec HCl) en présence des sels de cuivre et d'ascorbate de sodium. D'après la littérature, la réaction « click » azoture/alcyne peut s'effectuer à température ambiante ou à des températures allant jusqu'à 120 °C. Cependant, les COS étant très sensibles à la température, nous avons toujours réalisé le greffage à température ambiante pour éviter la moindre dégradation.




### III.4.1. Silanisation des surfaces de silicium

Après silanisation, des mesures d'angles de contact à l'eau sont effectuées sur les surfaces afin de vérifier le succès du greffage du silane. Les surfaces étant très hydrophiles (angles nuls) après leurs activations par traitement *piranha* et irradiation UV, cette étape de caractérisation permettra par le changement des propriétés de mouillabilité de la surface,

d'émettre des hypothèses sur l'état de greffage du silane. Les angles de contact après le greffage du (3- chloroprolyl)triméthoxysilane sont de l'ordre de 76 °. Ces angles de contact sont obtenus au bout de 3 h de greffage. Ce fort changement de la nature hydrophile de la surface de silicium est cohérent avec l'hypothèse.

Les épaisseurs de la couche de silane greffées à la surface sont déterminées par ellipsométrie. Les épaisseurs des couches de silane varient entre 0,6 et 0,8 nm. Ces valeurs d'épaisseur pour la couche de silane correspondent typiquement à celles d'une monocouche de silane.[53-55]

Les spectres IR obtenus après l'étape de la silanisation (**Figure 19**) montrent des bandes de vibration aux alentours de 2930 $cm^{-1}$ et 2955 $cm^{-1}$. Ces bandes de vibration correspondent aux bandes de vibration caractéristiques des groupes CH et $CH_2$ respectivement du silane. Ceci confirme le succès du greffage du silane sur les cristaux de silicium.

En plus de l'infrarouge, les échantillons ont été analysés aussi par spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (TOF-SIMS). Les spectres obtenus pour l'étape de la silanisation sont représentés sur la **Figure 15**.

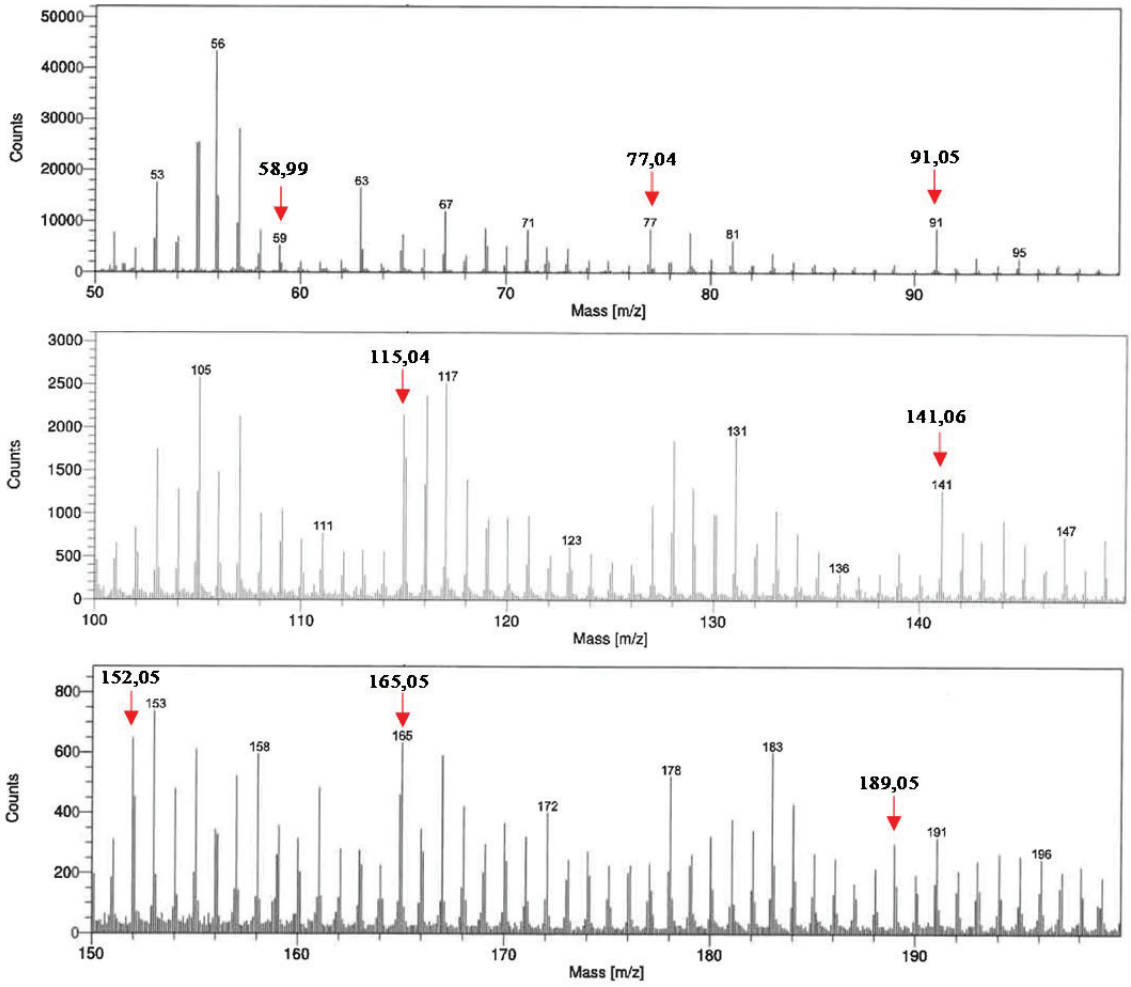



**Figure 15 : Spectre de masse TOF-SIMS en mode positif après le greffage du (3-chloropropyl) triméthoxysilane suivi d'un rinçage de la surface de silicium (m/z augmente d'un graphe à l'autre).**

Les spectres de masse TOF-SIMS en mode positif des échantillons après la silanisation, (silanisation avec rinçage) présentent des ions moléculaires relatifs à des structures aromatiques notamment les pics détectés à m/z = 77,04, 91,05 et 115,04 qui correspondent respectivement aux ions secondaires suivants : $C_6H_5^+$, $C_7H_7^+$ et $C_9H_7^+$ (**Figure 15**). Le pic à m/z = 27,97 ($Si^+$) (non illustré) indique la détection du substrat. En mode négatif, nous avons également remarqué la présence de certains pics caractéristiques du silicium. Ces pics apparaissent aux valeurs de m/z : 59,96 ($SiO_2^-$), 76,97 ($SiO_3H^-$) et 136,95 ($SiO_3H^-$ + $SiO_2^-$) et peuvent provenir du fait que la surface n'est pas totalement couverte. Le pic à m/z = 58,99 en mode positif peut correspondre à un fragment du silane ($SiCH_3O^+$) mais il est de faible intensité (**Figure 15**). Les isotopes du chlore qui peuvent provenir du silane ont également été observés (m/z = 34,96 et 36,96) (**Figure 16**). Il était attendu que le silane soit davantage détecté par ToF-SIMS (notamment via des signatures moléculaires plus spécifiques) mais la détection de signatures aromatiques et azotées pourrait indiquer une contamination d'extrême surface.

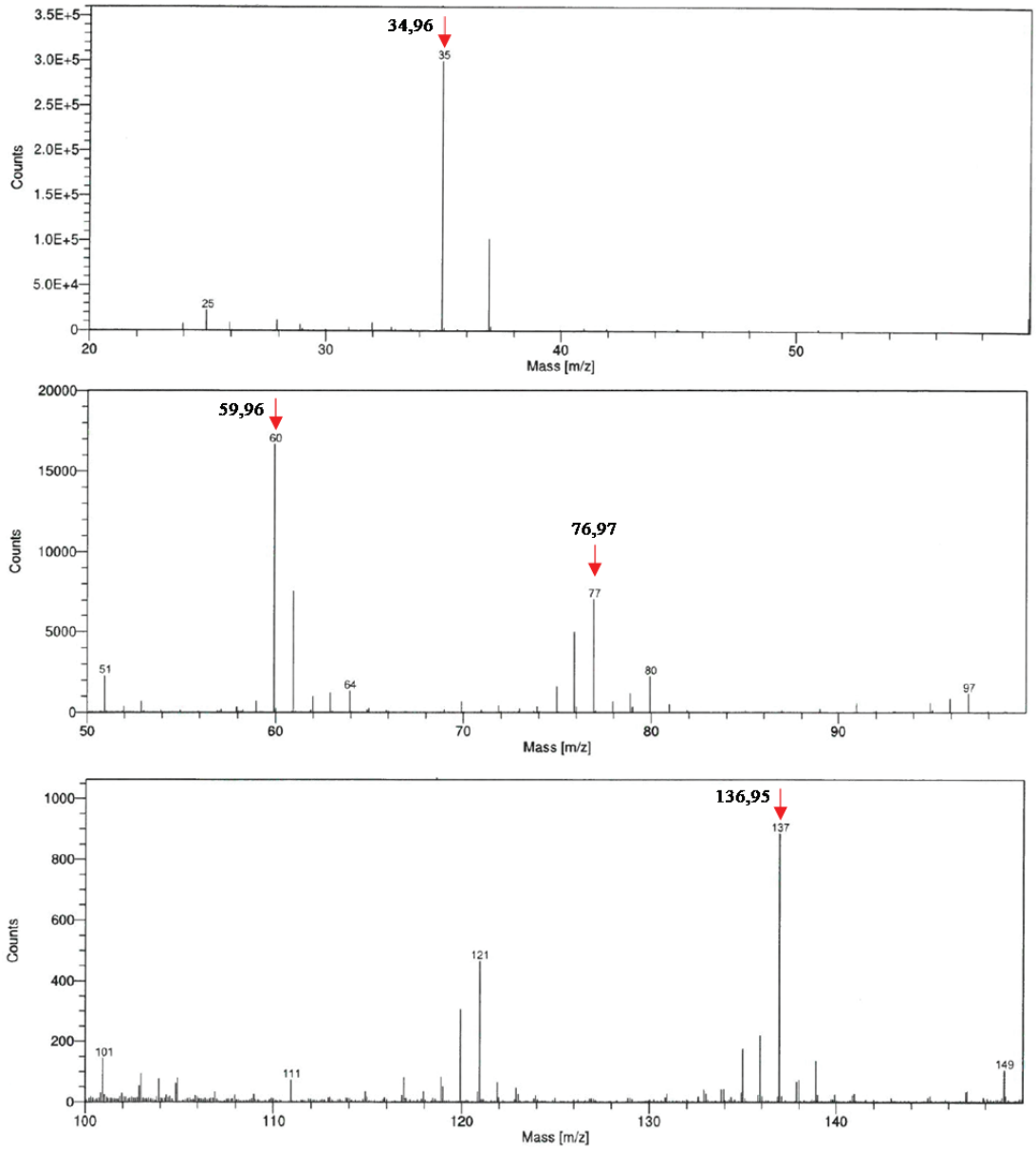



**Figure 16 : Spectre de masse TOF-SIMS en mode négatif après le greffage du (3-chloropropyl) triméthoxysilane suivi d'un rinçage de la surface de silicium (m/z augmente d'un graphe à l'autre).**

L'opération de rinçage pouvant être à l'origine d'une contamination, les spectres de masse TOF-SIMS en mode positif des échantillons greffés (silanisation avec rinçage) (**Figure 15**) ont alors été comparés à des spectres des échantillons de référence (silanisation sans rinçage) (**Figure 17**). Les résultats sont très similaires et l'origine des signatures aromatiques reste donc à déterminer.

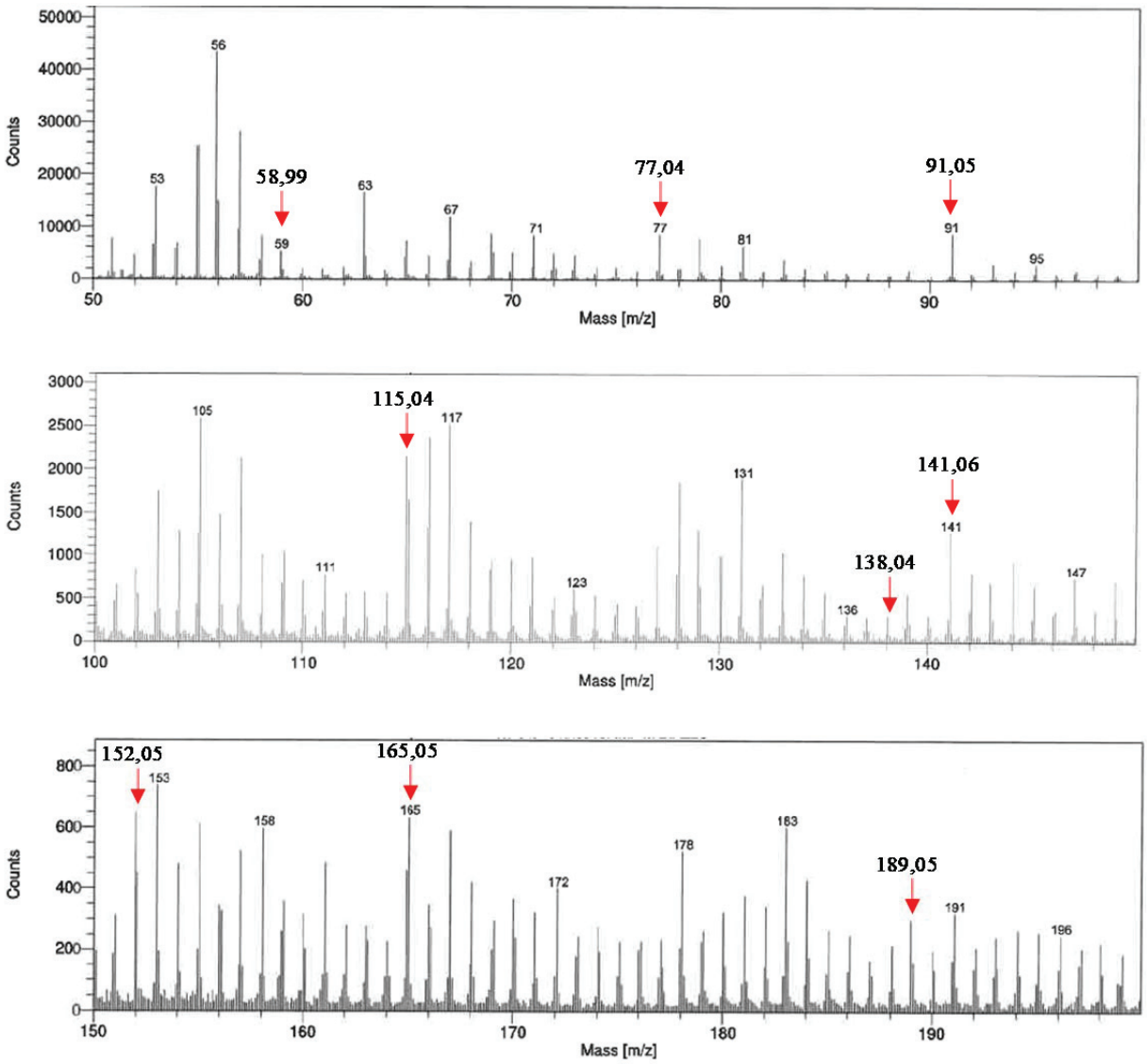



**Figure 17 : Spectre de masse TOF-SIMS en mode positif après greffage du (3-chloropropyl) triméthoxysilane et sans rinçage de la surface de silicium (m/z augmente d'un graphe à l'autre).**

### III.4.2. Azidation du silane

La substitution du chlore de la monocouche de silane par l'azoture ($N_3$) dans le DMF en présence du $NaN_3$ a d'abord été caractérisée par la mesure de l'angle de contact. Les angles de contact après azidation diminuent par rapport à ceux de l'étape de silanisation (76 °) et sont compris entre 64 ° et 68°. Une légère augmentation des épaisseurs est notée après cette étape. Les épaisseurs obtenues varient entre 1,06 nm et 1,15nm, au lieu 0,6 et 0,8 nm avant azidation.

Les spectres de masse TOF-SIMS en mode négatif de l'étape d'azidation (**Figure 18**) confirment la présence d'ions azotés. Ces ions sont détectés à m/z = 26,00 et m/z = 42,00 et correspondent aux ions $CN^-$ et $CNO^-$ respectivement mais ces ions ont également été détectés en surface des échantillons après silanisation. Il faut donc rechercher des signatures

moléculaires plus spécifiques et nous avons observé en mode positif un pic moléculaire de faible intensité à m/z = 161,02 qui est susceptible de correspondre à la substitution du chlore par la fonction azoture ($SiO_3C_3N_3H_7^+$). C'est toutefois à nouveau une signature de faible intensité ne démontrant pas un recouvrement significatif de la surface.

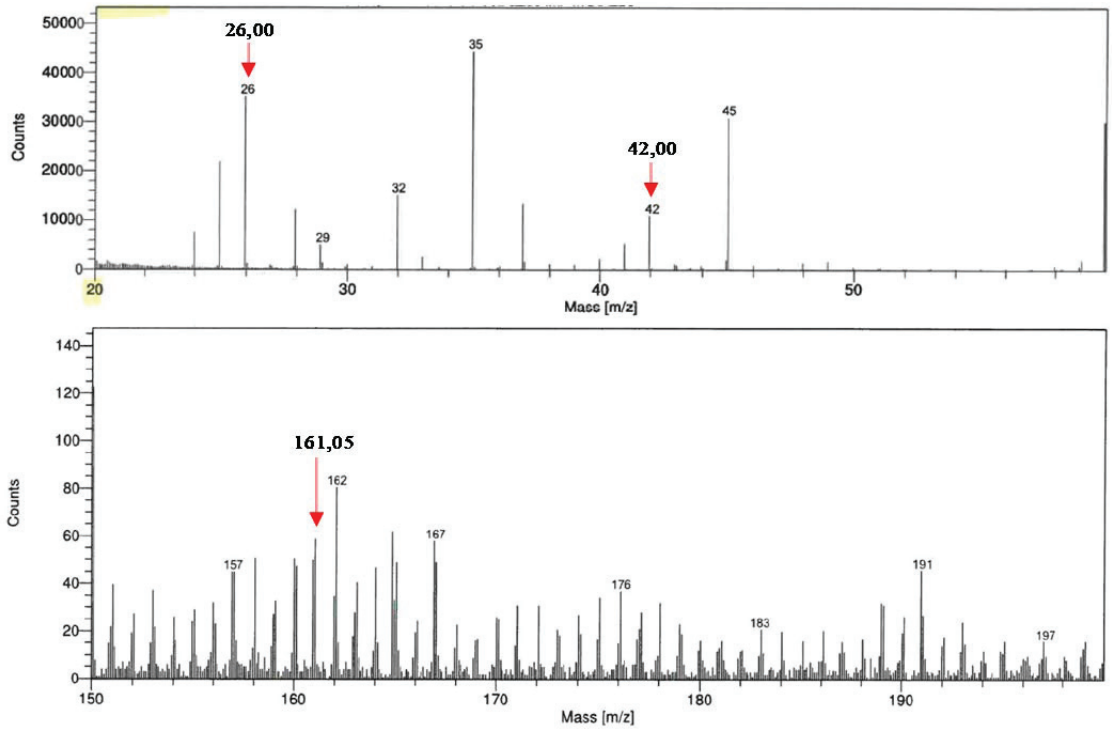



**Figure 18 : Spectres de masse TOF-SIMS en mode positif des surfaces après l'azidation.**

L'azidation a été également caractérisée par spectroscopie IR. En effet, la substitution du chlore par l'azoture se caractérise par l'apparition d'une bande de vibration intense à 2100 $cm^{-1}$ (**Figure 19**).[13, 14, 16-18]

### III.4.3. Greffage des chitooligosaccharides

Comme pour les étapes précédentes du greffage, les angles de contact ont été d'abord mesurés sur les brosses de COS. Les angles déterminés avec l'eau sur ces brosses varient entre 55 et 62 °. Des valeurs du même ordre ont été trouvées sur les films de chitosane déposés par spin-coating (cf. **Chapitre II, Section III.5.3**). Cette similitude des valeurs des angles de contact entre les films de chitosane et les brosses de COS combinée à la différence des angles entre les trois étapes du greffage suggèrent la réussite de la modification de la surface. Les épaisseurs de surfaces greffées augmentent largement comparées à l'azidation. Elles varient entre 2,7 nm et 3,5 nm. Cette augmentation des épaisseurs peut provenir d'une présence de COS à la surface. La validation de la structure chimique des brosses de COS a été effectuée par spectroscopie IR (**Figure 19**). En effet, le succès du greffage entre la fonction alcyne des

COS et la fonction azoture à la surface peut être mis en évidence de deux manières. D'une part, par les liaisons C-H et C=C caractéristiques du cycle triazole formé. Comme ces liaisons sont déjà présentes dans les molécules de départ (présence des liaisons C-H dans le motif répétitif des COS, dans l'anhydromanno-furanose (amf) et dans le cycle benzénique et la présence des liaisons C=C dans le cycle benzénique), elles peuvent se superposer aux pics du triazole et rendre la distinction moins nette. Cependant, on observe bien le pic vers 1650 $cm^{-1}$ qui est caractéristique de la liaison C=C du triazole. D'autre part, par la disparition complète du signal de vibration à 2100 $cm^{-1}$ lié à la fonction azoture qui n'est plus présente à la surface. Cette bande de vibration à 2100 $cm^{-1}$ reste inchangée après avoir réalisé les mêmes étapes de greffage en l'absence des catalyseurs ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ et l'ascorbate de sodium), ce qui confirme le succès du greffage.

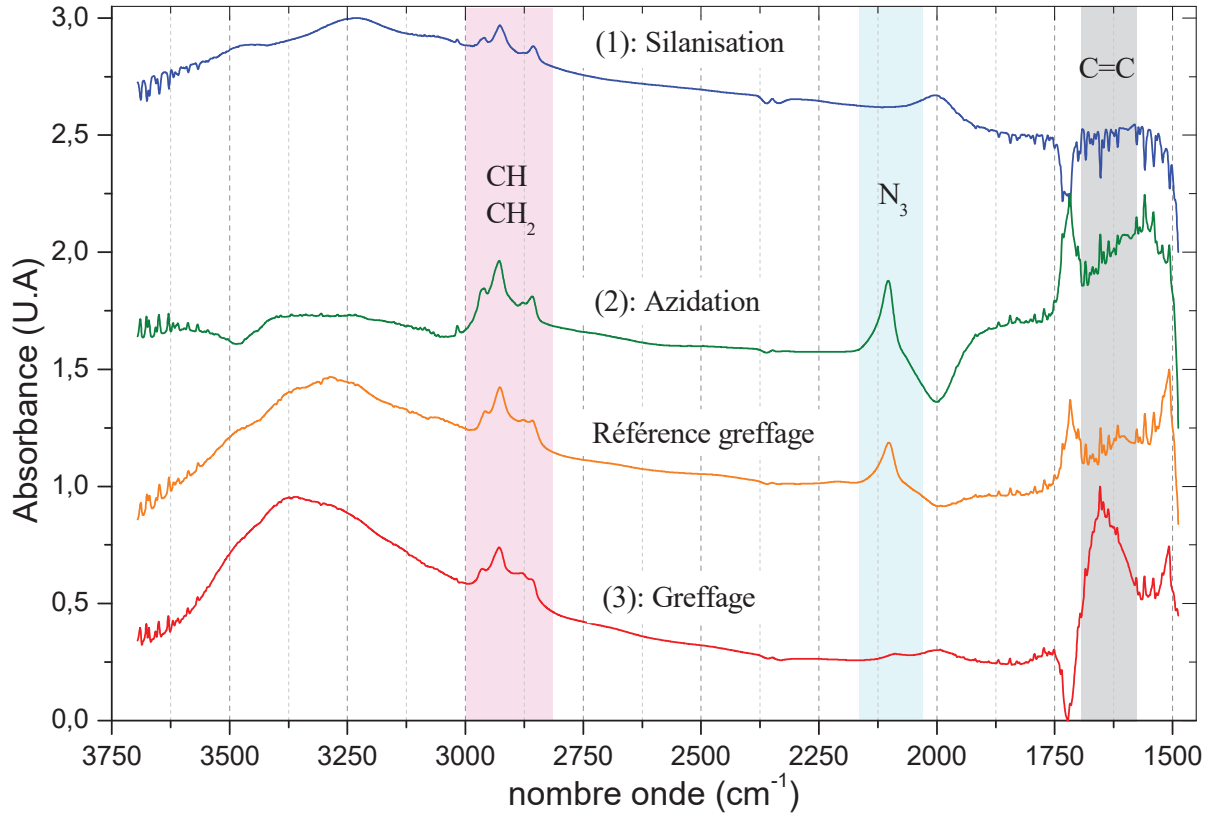



**Figure 19 : Spectres IR des différentes étapes de greffage sur les cristaux de silicium ((1) : silanisation, (2) : azidation et (3) : greffage des COS). Référence greffage : silanisation + azidation + greffage sans catalyseurs et sans rinçage.**

La morphologie de la surface après chaque étape de greffage a été caractérisée par AFM et la rugosité RMS (Root Mean Square) a été choisie pour évaluer les rugosités. Les images obtenues présentent des morphologies et des rugosités différentes après chaque étape de greffage (**Figure 20**). La surface modifiée par le silane apparaît très lisse avec une rugosité de 0,32 nm. Après azidation et greffage du COS, les rugosités deviennent plus grandes et valent 0,72 nm et 0,82 nm respectivement. La plus grande rugosité du greffage par rapport à la

silanisation et à l'azidation peut s'expliquer par la différence significative du degré de polymérisation des chaînes des COS (voir résultats MALDI-TOF, **Figure 6**). Ce changement des morphologies entre les différentes étapes constitue une indication de greffage des COS sur les surfaces de silicium.

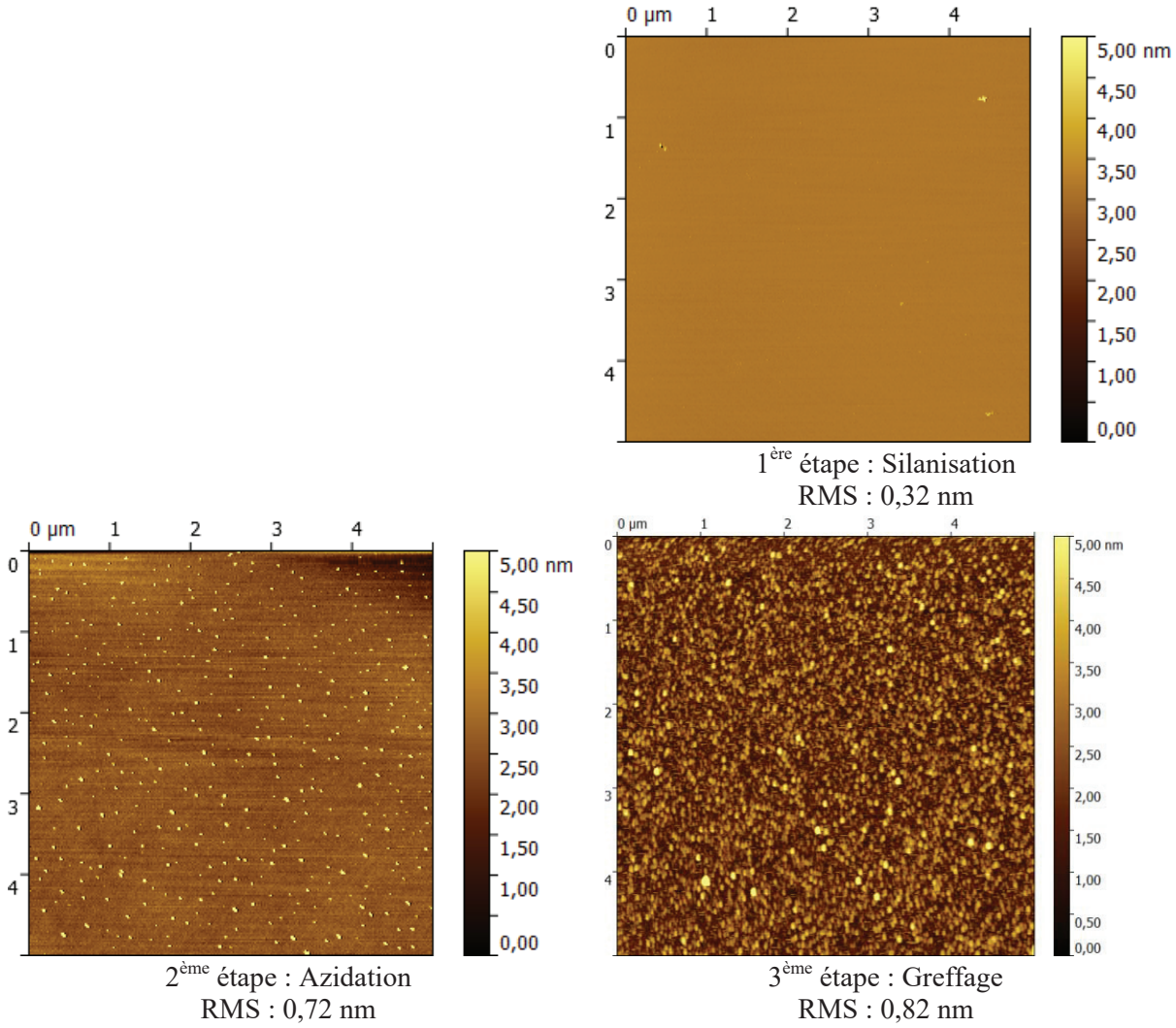



**Figure 20 : Images par AFM de la morphologie des surfaces après chaque étape de greffage.**

En ce qui concerne les résultats obtenus par spectrométrie de masse TOF-SIMS (**Figure 21 et Figure 22**), la modification de surface semble plus marquée sur les échantillons après le greffage des COS par rapport aux étapes de silanisation et d'azidation. En effet, la contribution azotée sur les spectres de masse en modes positif et négatif semble plus significative que pour les autres échantillons. Nous avons observé de nombreux fragments pouvant correspondre aux COS en modes positif et négatif dont potentiellement les pics à m/z = 409,18 (en mode négatif) et m/z = 528,14 (en mode positif) mais les structures chimiques restent à déterminer (**Figure 21**). Cependant, nous avons observé un effet du rinçage avec la nette diminution d'intensité du pic à m/z : 528,14 (**Figure 22**).

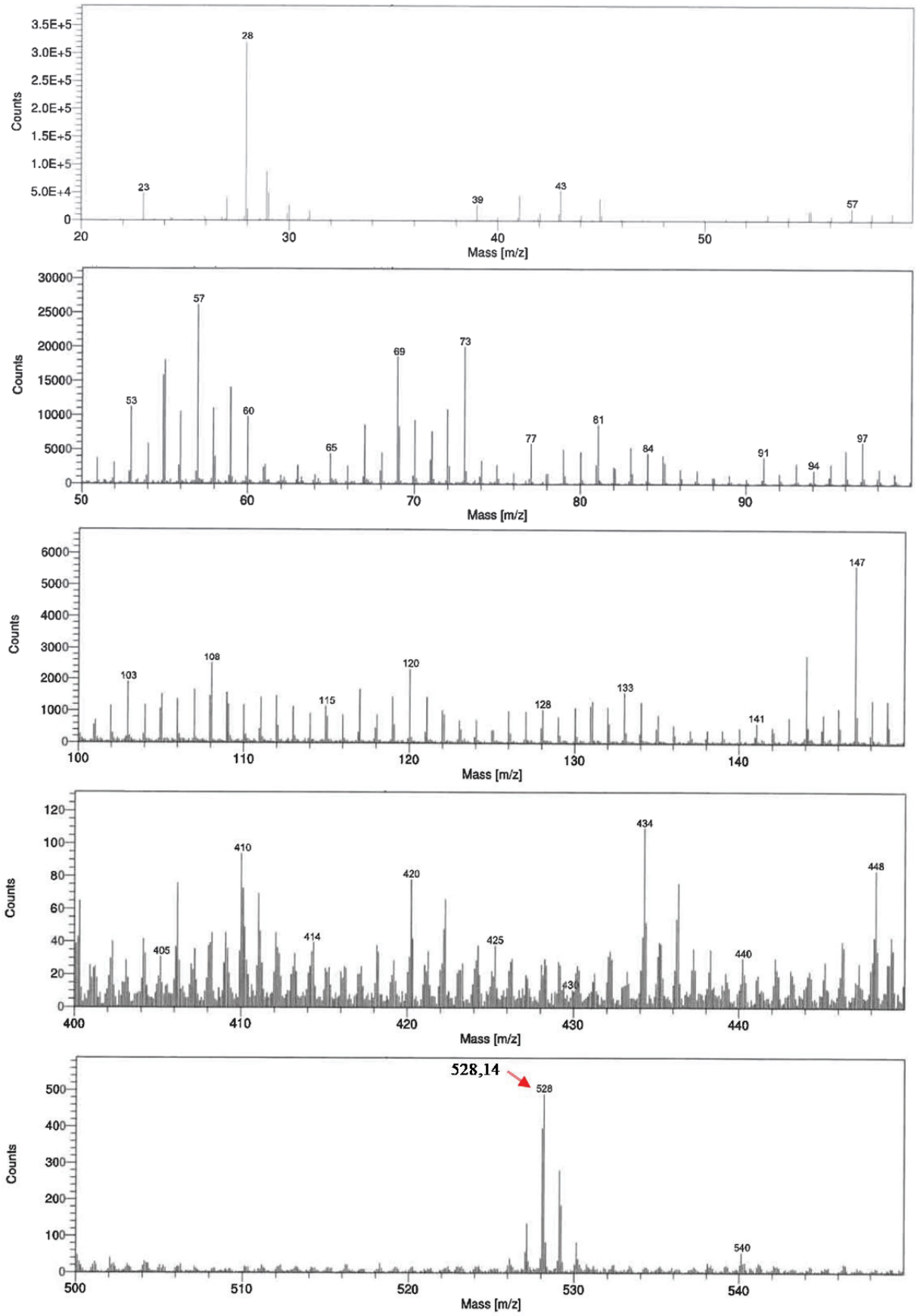



**Figure 21 : Spectres de masse TOF-SIMS en mode positif des échantillons de référence après greffage et sans rinçage des chitooligosaccharides sur les surfaces de silicium.**

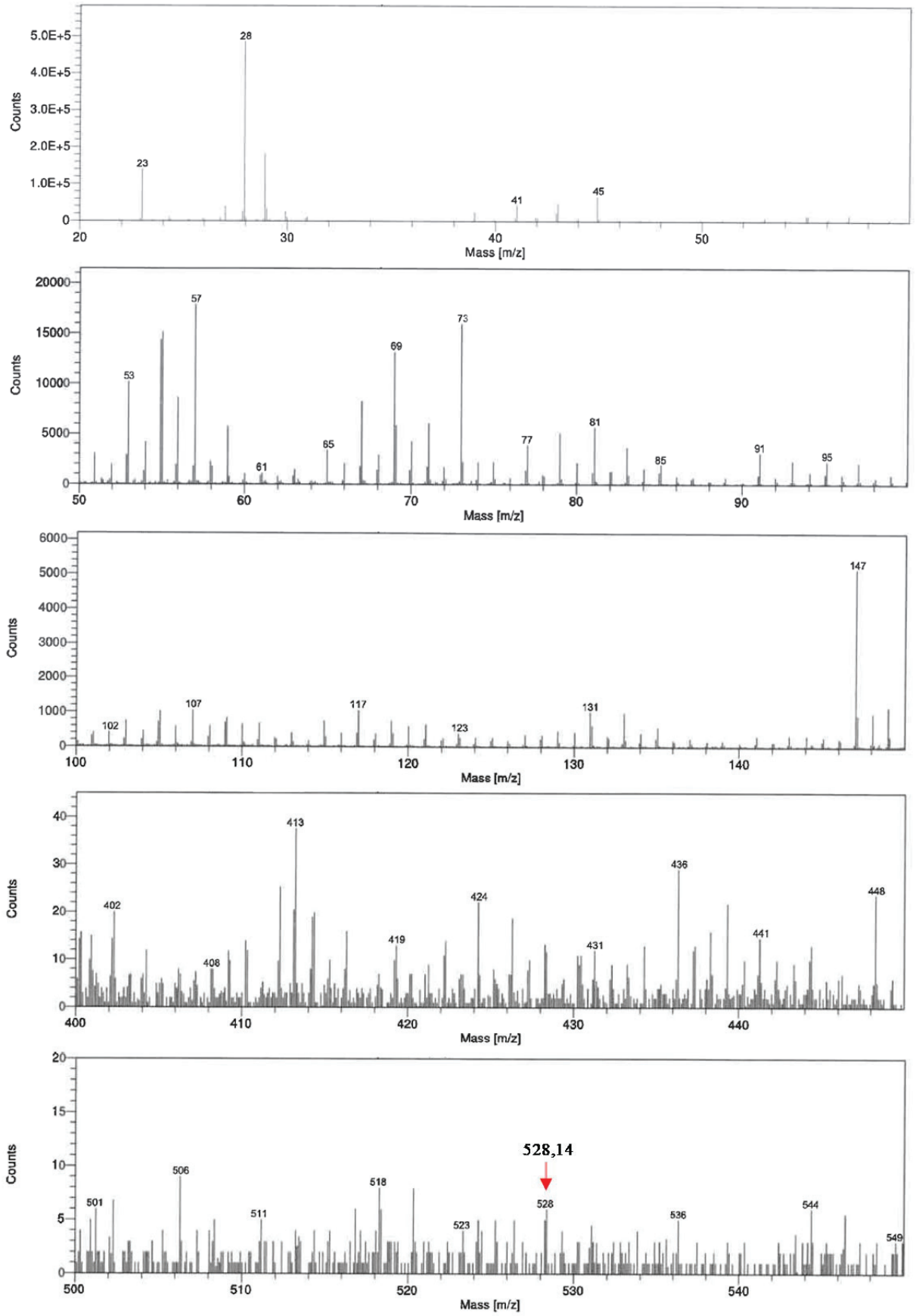



**Figure 22 : Spectres de masse TOF-SIMS en mode positif des surfaces de silicium après greffage des chitooligosaccharides sur les surfaces de silicium (Rinçage après chaque étape de greffage).**

## Conclusion

Dans ce chapitre, avant d'étudier le greffage par « grafting to » des COS sur les surfaces de silicium, nous avons considéré leur greffage en solution dans le but de trouver un protocole optimisé. Pour parvenir à cela, les dérivés propargyl de COS ont été greffés à un PEG commercial fonctionnalisé azoture. Ces différents greffages en solution ont été validés par spectroscopie IR et RMN et spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le greffage sur les surfaces est ainsi effectué à l'aide du même protocole qu'en solution. Cependant, le greffage sur les surfaces reste plus complexe que celui en solution et fait intervenir des étapes intermédiaires de greffage. D'abord, une première étape qui consiste à modifier la surface du silicium par le (3-chloropropyl)triméthoxysilane. Cette étape est suivie par la substitution du chlore du silane par la fonction azoture. Le greffage proprement dit du COS est enfin effectué en couplant l'alcyne du COS à la fonction azoture pour former le cycle 1,2,3-triazole.

Dans le but de confirmer le succès du greffage des COS sur les surfaces de silicium, des caractérisations par spectroscopie IR et spectrométrie de masse TOF-SIMS de la structure chimique de la surface ont été effectuées après chaque étape du greffage. Ces caractérisations sont complétées par des caractérisations par AFM, ellipsométrie et tensiométrie. De toutes les caractérisations effectuées sur les surfaces, nous avons observé après chaque étape du greffage des changements qui peuvent indiquer le greffage des COS mais certaines caractérisations nécessiteraient d'être poursuivies (notamment le ToF-SIMS) pour donner encore plus de force à cette conclusion.

## **Références** :


1. Kolb, H. C.; Finn, M.; Sharpless, K. B., Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001,** 40, (11), 2004-2021.
2. Lutz, J. F., 1, 3-Dipolar cycloadditions of azides and alkynes: a universal ligation tool in polymer and materials science. *Angewandte Chemie International Edition* **2007,** 46, (7), 1018-1025.
3. Opsteen, J. A.; van Hest, J. C., Modular synthesis of block copolymers via cycloaddition of terminal azide and alkyne functionalized polymers. *Chemical Communications* **2005**, (1), 57-59.
4. Wu, P.; Malkoch, M.; Hunt, J. N.; Vestberg, R.; Kaltgrad, E.; Finn, M.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Hawker, C. J., Multivalent, bifunctional dendrimers prepared by click chemistry. *Chemical communications* **2005**, (46), 5775-5777.
5. Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-catalyzed azide− alkyne cycloaddition. *Chemical reviews* **2008,** 108, (8), 2952-3015.
6. Huisgen, R., 1, 3-dipolar cycloadditions. Past and future. *Angewandte Chemie International Edition* **1963,** 2, (10), 565-598.
7. Wang, Z.-X.; Qin, H.-L., Regioselective synthesis of 1, 2, 3-triazole derivatives via 1, 3-dipolar cycloaddition reactions in water. *Chemical Communications* **2003**, (19), 2450-2451.
8. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase:[1, 2, 3]-triazoles by regiospecific copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of organic chemistry* **2002,** 67, (9), 3057-3064.
9. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie* **2002,** 114, (14), 2708-2711.
10. Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M., Mechanism of the Ligand-Free CuI-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angewandte Chemie* **2005,** 117, (15), 2250-2255.
11. Worrell, B.; Malik, J.; Fokin, V. V., Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu (I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science* **2013,** 340, (6131), 457-460.
12. Bao, H.; Li, L.; Leong, W. C.; Gan, L. H., Thermo-responsive association of chitosan-graft-poly (N-isopropylacrylamide) in aqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010,** 114, (32), 10666-10673.
13. Kulbokaite, R.; Ciuta, G.; Netopilik, M.; Makuska, R., N-PEG'ylation of chitosan via "click chemistry" reactions. *Reactive and Functional polymers* **2009,** 69, (10), 771-778.
14. Pahimanolis, N.; Vesterinen, A.-H.; Rich, J.; Seppala, J., Modification of dextran using click-chemistry approach in aqueous media. *Carbohydrate Polymers* **2010,** 82, (1), 78-82.
15. Saito, H.; Wu, X.; Harris, J. M.; Hoffman, A. S., Graft copolymers of poly (ethylene glycol)(PEG) and chitosan. *Macromolecular rapid communications* **1997,** 18, (7), 547-550.

16. Durmaz, Y. Y.; Sangermano, M.; Yagci, Y., Surface modification of UV-cured epoxy resins by click chemistry. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2010,** 48, (13), 2862-2868.
17. Liebert, T.; Hänsch, C.; Heinze, T., Click chemistry with polysaccharides. *Macromolecular rapid communications* **2006,** 27, (3), 208-213.
18. Sommer, W. J.; Weck, M., Facile functionalization of gold nanoparticles via microwave-assisted 1, 3 dipolar cycloaddition. *Langmuir* **2007,** 23, (24), 11991-11995.
19. Bhairamadgi, N. S.; Gangarapu, S.; Caipa Campos, M. A.; Paulusse, J. M.; van Rijn, C. J.; Zuilhof, H., Efficient functionalization of oxide-free silicon (111) surfaces: thiol–yne versus thiol–ene click chemistry. *Langmuir* **2013,** 29, (14), 4535-4542.
20. Kwang-hee, K. P., Acid-Base Equilibria and Related Properites of Chitosan. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **1983,** 4, (2), 68-72.
21. Gruškienė, R.; Čiuta, G.; Makuška, R., Grafting of poly (ethylene glycol) to chitosan at c (6) position of glucosamine units via "click chemistry" reactions. *chemija* **2009,** 20, (4), 241-249.
22. Lee, R. S.; Huang, Y. T., Synthesis and characterization of amphiphilic block–graft MPEG-b-(P$\alpha$N3CL-g-alkyne) degradable copolymers by ring-opening polymerization and click chemistry. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008,** 46, (13), 4320-4331.
23. Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Fréchet, J. M.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper (I)-catalyzed ligation of azides and alkynes. *Angewandte Chemie* **2004,** 116, (30), 4018-4022.
24. Lummerstorfer, T.; Hoffmann, H., Click chemistry on surfaces: 1, 3-dipolar cycloaddition reactions of azide-terminated monolayers on silica. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004,** 108, (13), 3963-3966.
25. Sudre, G. Tunable adhesion of hydrogels. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2011.
26. Meyerhofer, D., Characteristics of resist films produced by spinning. *Journal of Applied Physics* **1978,** 49, (7), 3993-3997.
27. Carim, A.; Dovek, M.; Quate, C.; Sinclair, R.; Vorst, C., High-resolution electron microscopy and scanning tunneling microscopy of native oxides on silicon. *Science* **1987,** 237, (4815), 630-633.
28. Plueddemann, E. P., Silane coupling agents. *Additives for plastics* **1978,** 1, 123-167.
29. Ahmed, A.; Bonner, C.; Desai, T. A., Bioadhesive microdevices for drug delivery: a feasibility study. *Biomedical Microdevices* **2001,** 3, (2), 89-96.
30. Arghir, I.; Knez, K.; Janssen, K.; Decrop, D.; Spasic, D.; Lammertyn, J., Surface Nanostructuring and Silanization for Improved Fiber Optic-SPR Biosensing. **2013**.
31. Aswal, D.; Lenfant, S.; Guerin, D.; Yakhmi, J.; Vuillaume, D., Self assembled monolayers on silicon for molecular electronics. *Analytica chimica acta* **2006,** 568, (1), 84-108.
32. Busse, S.; Käshammer, J.; Krämer, S.; Mittler, S., Gold and thiol surface functionalized integrated optical Mach–Zehnder interferometer for sensing purposes. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1999,** 60, (2), 148-154.

33. Candiani, A.; Cucinotta, A., Functionalized microstructured optical fibers for specific nucleic acid detection. In *Optofluidics, Sensors and Actuators in Microstructured Optical Fibers*, Elsevier: 2015; pp 229-246.
34. Pritchard, D. J.; Morgan, H.; Cooper, J. M., Micron-Scale Patterning of Biological Molecules. *Angewandte Chemie International Edition* **1995,** 34, (1), 91-93.
35. Sorribas, H.; Padeste, C.; Tiefenauer, L., Photolithographic generation of protein micropatterns for neuron culture applications. *Biomaterials* **2002,** 23, (3), 893-900.
36. Johansson, U.; Holmgren, A.; Forsling, W.; Frost, R., Adsorption of silane coupling agents onto kaolinite surfaces. *Clay Minerals* **1999,** 34, (2), 239-246.
37. Sutra, P.; Fajula, F.; Brunel, D.; Lentz, P.; Daelen, G.; Nagy, J. B., 29 Si and 13 C MAS-NMR characterization of surface modification of micelle-templated silicas during the grafting of organic moieties and end-capping. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999,** 158, (1), 21-27.
38. Arkles, B., Tailoring surfaces with silanes. *Chemtech* **1977,** 7, (12), 766-778.
39. Brunel, D.; Cauvel, A.; Di Renzo, F.; Fajula, F.; Fubini, B.; Onida, B.; Garrone, E., Preferential grafting of alkoxysilane coupling agents on the hydrophobic portion of the surface of micelle-templated silica. *New journal of chemistry* **2000,** 24, (10), 807-813.
40. Lee, L.-H., Wettability and conformation of reactive polysiloxanes. *Journal of colloid and interface science* **1968,** 27, (4), 751-760.
41. Tripp, C.; Hair, M., An infrared study of the reaction of octadecyltrichlorosilane with silica. *Langmuir* **1992,** 8, (4), 1120-1126.
42. Brzoska, J.; Azouz, I. B.; Rondelez, F., Silanization of solid substrates: a step toward reproducibility. *Langmuir* **1994,** 10, (11), 4367-4373.
43. Parikh, A. N.; Allara, D. L.; Azouz, I. B.; Rondelez, F., An intrinsic relationship between molecular structure in self-assembled n-alkylsiloxane monolayers and deposition temperature. *The Journal of Physical Chemistry* **1994,** 98, (31), 7577-7590.
44. Cao, P.; Xu, K.; Heath, J. R., Azidation of silicon (111) surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **2008,** 130, (45), 14910-14911.
45. Liu, C.; Wang, X.; Li, Z.; Cui, L.; Li, C., Silver-catalyzed decarboxylative radical azidation of aliphatic carboxylic acids in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* **2015,** 137, (31), 9820-9823.
46. Ollivier, C.; Renaud, P., Formation of Carbon− Nitrogen Bonds via a Novel Radical Azidation Process. *Journal of the American Chemical Society* **2000,** 122, (27), 6496-6497.
47. Ollivier, C.; Renaud, P., A Novel Approach for the Formation of Carbon− Nitrogen Bonds: Azidation of Alkyl Radicals with Sulfonyl Azides. *Journal of the American Chemical Society* **2001,** 123, (20), 4717-4727.
48. Panchaud, P.; Renaud, P., A convenient tin-free procedure for radical carboazidation and azidation. *The Journal of organic chemistry* **2004,** 69, (9), 3205-3207.
49. Devaraj, N. K.; Collman, J. P., Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions on Solid Surfaces: Applications and Future Directions. *Molecular Informatics* **2007,** 26, (11-12), 1253-1260.
50. Collman, J. P.; Devaraj, N. K.; Chidsey, C. E., "Clicking" functionality onto electrode surfaces. *Langmuir* **2004,** 20, (4), 1051-1053.

51. Nandivada, H.; Chen, H. Y.; Bondarenko, L.; Lahann, J., Reactive polymer coatings that "click". *Angewandte Chemie International Edition* **2006,** 45, (20), 3360-3363.
52. Rozkiewicz, D. I.; Jańczewski, D.; Verboom, W.; Ravoo, B. J.; Reinhoudt, D. N., "Click" chemistry by microcontact printing. *Angewandte Chemie International Edition* **2006,** 45, (32), 5292-5296.
53. Aswal, D. K.; Lenfant, S.; Guerin, D.; Yakhmi, J. V.; Vuillaume, D., A Tunnel Current in Self-Assembled Monolayers of 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane. *Small* **2005,** 1, (7), 725-729.
54. Gandhi, D. D.; Lane, M.; Zhou, Y.; Singh, A. P.; Nayak, S.; Tisch, U.; Eizenberg, M.; Ramanath, G., Annealing-induced interfacial toughening using a molecular nanolayer. *Nature* **2007,** 447, (7142), 299.
55. Vasilev, C.; Johnson, M. P.; Gonzales, E.; Wang, L.; Ruban, A. V.; Montano, G.; Cadby, A. J.; Hunter, C. N., Reversible switching between nonquenched and quenched states in nanoscale linear arrays of plant light-harvesting antenna complexes. *Langmuir* **2014,** 30, (28), 8481-8490.

# CONCLUSION GENERALE

Dans cette thèse, nous avons étudié de façon systématique les propriétés physicochimiques et structurales des films de chitosane élaborés par spin-coating. Ces propriétés, qui sont sensibles aux paramètres moléculaires et à la source du chitosane, aux méthodes d'élaboration, à certains traitements (recuit, neutralisation, vieillissement,…) sont dans la plupart des cas retrouvées de manière contradictoire dans la littérature. Pour s'affranchir des effets de la source et la méthode de réacétylation du chitosane, nous avons travaillé dans cette thèse avec deux lots de chitosane fortement désacétylés, l'un issu de la crevette et de masse molaire moyenne proche de 180 kg/mol et l'autre issu du calamar et de masse molaire de l'ordre de 600 kg/mol. Les degrés d'acétylation de ces deux lots ont été variés par réacétylation homogène.

Les propriétés physicochimiques (angles de contact, tension et polarité de surface) des films ont été étudiées en tenant compte de l'effet du vieillissement, du recuit, de la neutralisation, de la nature des contre-ions de l'acide utilisé afin de comprendre dans chacune de ces conditions l'effet des paramètres moléculaires des chitosanes utilisés. D'abord, les résultats obtenus dans toutes ces conditions d'étude ont révélé une dépendance temporelle des propriétés physicochimiques. En effet, les propriétés de mouillabilité varient en fonction du temps et commencent à devenir stables à partir de 24 h après la préparation des films. Le caractère hydrophile des films de chitosane augmente lorsque le DA augmente alors que les tensions et polarités de surface des films de chitosane varient très légèrement. L'un des résultats les plus importants de cette partie est la neutralisation des films de chitosane préparés avec la solution aqueuse d'acide acétique. En effet, la comparaison des propriétés physicochimiques des films neutralisés et non neutralisés a prouvé que les films de chitosane se neutralisent au cours du temps par évaporation de l'acide acétique. Une influence de la masse molaire du chitosane est également à souligner. A l'inverse de la tension de surface qui diminue, les angles de contact et la polarité des films de chitosane augmentent lorsque la masse molaire augmente. Selon la nature des contre-ions de l'acide utilisé lors de la solubilisation du chitosane et par conséquent la nature des sels formés entre le chitosane et les acides, nous avons observé des tendances différentes sur la variation des propriétés physicochimiques. L'utilisation de HCl conduit à la formation de sels de chlorure d'ammonium avec le chitosane. Ces sels étant très sensibles à l'eau, les films obtenus sont largement plus hydrophiles par rapport aux films formés avec AcOH qui sont neutralisés en 24 h environ. Le caractère hydrophile des films augmente très faiblement avec l'augmentation du DA. A l'instar des films obtenus avec AcOH, les tensions et polarités de surfaces sur les

films avec HCl varient très légèrement avec le DA. Cependant, elles restent plus élevées sur les films avec HCl. L'effet de la masse sur les paramètres physicochimiques des films formés avec HCl n'a été observé que sur la polarité. En effet, la polarité des films diminue avec l'augmentation de la masse molaire.

L'étude de la morphologie des films de chitosane a permis de voir que les films obtenus avec AcOH sont légèrement plus lisses que les films formés avec HCl. Néanmoins, les films obtenus avec ces deux acides présentent des rugosités moyennes inférieures à 2 nm et dépendent légèrement du DA, des épaisseurs et du recuit des films. La détermination de la structure chimique des films de chitosane a prouvé la neutralisation des films d'acétate de chitosane et la formation des sels de chlorure d'ammonium pour les films préparés avec HCl. La détermination du gonflement des films de chitosane par la réflectivité des neutrons révèle que celui-ci dépend fortement des paramètres moléculaires du chitosane et moins des épaisseurs des films et du pH environnant. Pour une même masse molaire de chitosane, le gonflement des films augmente avec l'augmentation du degré d'acétylation. Cette tendance est observée avec la masse molaire pour des DA proches. La variation du gonflement sous l'effet du pH et des épaisseurs des films est très faible. Le caractère abrupt des courbes de profil de concentration confirme la faible rugosité des films de chitosane à l'état sec puisqu'elle se retrouve à l'état gonflé. Une étude de la cristallinité des films de chitosane dans les différentes conditions (nature de l'acide, vieillissement, recuit, neutralisation,…) considérées au cours de cette thèse pourra permettre une interprétation plus objective de l'effet du taux de cristallinité sur les propriétés physicochimiques des films de chitosane.

L'étude de l'impact de l'humidité relative sur les propriétés physicochimiques des films de chitosane ainsi que l'évaluation de la quantité d'eau dans les films peuvent s'avérer très intéressantes pour maîtriser d'avantage les propriétés physicochimiques des films.

Plusieurs souches de bactéries ont été utilisées pour sonder la réponse biologique des films préparés par spin-caoting en solulibilisant le chitosane par une solution aqueuse d'acide acétique. Les réponses biologiques obtenues au cours de cette étude dépendent fortement des paramètres moléculaires des films de chitosane et de la souche de bactéries. D'abord, les souches de bactéries utilisées présentent, de manière générale, une adhésion et une prolifération suivant un métabolisme normal sur les films du chitosane 180 de DA=52,1 %. En dehors de ce DA, l'adhésion et la prolifération des différentes souches de bactéries se font de manière préférentielle. La souche de *K. pneumoniae* adhère et prolifère sur les films de

chitosane 600 de DA 34 % tandis que les bactéries *S. aureus* montrent une préférence pour le chitosane 180 de DA 1 %. Les tests de sensibilité aux antibiotiques des différentes souches de bactéries utilisées dans cette étude ont mené à des concentrations minimales inhibitrices (CMI) très similaires et parfois inférieures à celles obtenues par la méthode VITEK® de référence. De manière générale, ces résultats sur la réponse biologique des films de chitosane prouvent la possibilité de pouvoir moduler l'adhésion et la prolifération des bactéries en ajustant les paramètres moléculaires du chitosane. Des caractérisations biologiques de films d'autres types de polysaccharides ou de la gélose pourraient permettre une comparaison avec les réponses biologiques des films de chitosane et aider à mieux comprendre l'effet du chitosane sur l'adhésion et la prolifération des bactéries.

Parallèlement à l'adsorption physique du chitosane sur les surfaces par spin-coating, nous avons étudié le greffage chimique de chaînes de chito-oligosaccharide sur des substrats de silicium. Ce greffage a d'abord été validé en solution par couplage des COS dérivés propargyl avec des molécules modèles. Ce greffage en solution a permis la mise en place d'un protocole optimisé pour le greffage sur les surfaces. A l'opposé du greffage en solution qui se fait par couplage direct entre les molécules, le greffage sur les surfaces est effectué en trois étapes : la silanisation, l'azidation et le greffage des chito-oligosaccharides. Ces différentes étapes de greffage sur les substrats sont validées par diverses techniques de caractérisation. Il serait très intéressant de tester le greffage sur les surfaces avec des chito-oligosaccharides de taille de chaînes plus grande que celle des chito-oligosaccharides utilisés au cours cette thèse afin de pouvoir approfondir la caractérisation structurale des brosses par la réflectivité des neutrons. La réussite de ce greffage de chito-oligosaccharides sur des surfaces planes offre la possibilité d'utilisation des chito-oligosaccharides dans des applications biomédicales où l'adsorption physique présenterait des limites (zones à humidité élevée pouvant entraîner la délamination du film adsorbé par exemple).

Les caractérisations biologiques des surfaces de chitosane adsorbées ont révélé des utilisations potentielles pour des applications biomédicales. En effet, les surfaces de chitosane physisorbées pourraient être utilisées pour améliorer la surface des implants pour faciliter leur intégration et éventuellement pour le diagnostic rapide afin d'aider à lutter contre l'antibiorésistance. Une étude des interactions brosses de chito-oligosaccharides-bactéries pourrait être intéressante car pouvant mener à d'autres perspectives. Des tests sur la capacité des brosses de chito-oligosaccharides à piéger des nanoparticules et sur la cinétique de

libération de celles-ci dans un milieu proche des conditions physiologiques pour aider à limiter les inflammations liées à l'utilisation des implants.

L'analyse des propriétés d'interaction des films de chitosane avec différentes protéines en présence du milieu de culture des bactéries d'une part ainsi que l'étude du comportement des films (étirement, structure des chaînes) en contact avec ce milieu d'autre part, peuvent contribuer à la compréhension de certains résultats biologiques mais également d'apporter une réponse à la question de la stabilité des films de chitosane dans le milieu de culture.

# LEXIQUE DE QUELQUES TERMES BIOLOGIQUES

**Adhérence** : Force liant la surface d'une cellule à celle d'une autre cellule ou à une structure cellulaire. Elle résulte d'interactions entre des protéines d'adhérence de la membrane plasmique des deux cellules adjacentes, ou entre des protéines d'adhérence et un constituant de la matrice extracellulaire.

**Adhésines** : Substances protéiques, glucidiques, ou lipidiques de la surface des bactéries, favorisant leur adhérence aux membranes de la cellule hôte.

**Antibiorésistance** : Capacité des bactéries à travers des mécanismes biologiques d'acquérir une résistance à un ou plusieurs antibiotiques.

**Antibiotique** : Substance ayant la capacité de tuer les bactéries (effet bactéricide) ou d'inhiber leur multiplication (effet bactériostatique). Le mécanisme d'action des antibiotiques est très variable. Ils sont plus ou moins spécifiques de certaines familles bactériennes.

**Biocompatibilité** : Capacité des polymères (ou biomatériaux) à ne pas produire d'effets toxiques ou nuisibles sur les systèmes biologiques.

**Biodégradabilité** : Capacité des polymères (ou biomatériaux) à se décomposer en des substances plus simples sous l'effet des enzymes provenant des micro-organismes.

**Biofilm** : Assemblages ou amas de bactéries bien structurés, liés entre eux et à une surface par une matrice extracellulaire.

**Capsule bactérienne** : Enveloppe épaisse qui entoure la paroi ou la membrane externe de certaines bactéries et qui ne s'en détache pas facilement. Elle est essentiellement constituée de polysaccharides (souvent antigéniques). La présence d'une capsule augmente généralement le pouvoir pathogène d'une souche bactérienne.

**Chimiotaxie** : Déplacement d'une cellule ou d'un organisme unicellulaire en réponse au gradient de concentration d'une substance soluble qui diffuse à partir de cellules productrices.

**Conjugaison** : Transfert de matériel génétique d'une cellule à une autre ou fusion du génome de deux bactéries. Chez les bactéries à Gram négatif, transmission d'un plasmide d'une cellule à une autre, éventuellement accompagné d'une partie du génome bactérien. Le transfert se limite à l'ADN.

**Cytotoxique** : Qui présente un caractère toxique pour les cellules

**Fimbriae** : Filaments de 3 à 10 nm de diamètre et de 100 nm de longueur attachés à la membrane externe de certaines bactéries. Les fimbriae sont formées d'une protéine spécifique (fimbrilline) codée par le chromosome bactérien ou par un plasmide.

**Flagelle bactérien** : Structure filamenteuse constituant l'appareil locomoteur des bactéries. Le flagelle comprend un filament, un crochet et un corps basal. Le filament est un cylindre creux de 2 à 10 nm de diamètre, en forme d'hélice gauche étirée ; il est entièrement constitué de flagelline. Le crochet est une structure tubulaire recourbée à angle droit, un peu plus large que le filament, et reliant celui-ci au corps basal. Le corps basal est constitué d'un axe qui traverse la paroi de la bactérie et qui se termine par un anneau appliqué contre la membrane plasmique. La rotation de l'anneau par rapport à la membrane entraîne le crochet et provoque le mouvement du filament.

**Haptotaxie** : Déplacement d'une cellule sur une substance, orienté par le gradient par le gradient de concentration d'un ligand lié au substrat.

**Intégrines** : Superfamille de protéines transmembranaires établissant des liens entre le cytosquelette d'actine et des composants extracellulaires.

**Membrane plasmique** : Membrane séparant le cytosol du milieu extracellulaire. La membrane plasmique des bactéries peut avoir une composition chimique assez différente de celle des eucaryotes mais sa structure en double couche est fondamentalement la même. Elle comprend aussi de nombreux transporteurs dont certains sont affectés aux sécrétions.

**Métabolisme** : Caractères généraux des processus physicochimiques se déroulant dans un organisme vivant, concernant notamment ses sources d'énergie, de carbone et d'électrons.

**Osmolarité** : Concentration de l'ensemble des substances osmotiquement actives, exprimée en osmoles par kg de solvant.

**Paroi bactérienne** : Partie de l'enveloppe des procaryotes (à l'exception des mycoplasmes et des formes L), située à l'extérieur de la membrane plasmique et relativement rigide. La nature de la paroi est généralement identifiée par la coloration de GRAM.

**Perméase** : Protéine ou complexe protéique membranaire qui effectue un transport facilité spécifique de certaines molécules à travers la membrane.

**Phénotype** : Ensemble des caractères présentés par un individu ou par une cellule. Il est habituellement influencé par des facteurs exogènes (nutrition, illumination, température, etc.)

**Pilus** : (*pl.* pili) Filament de 8 nm de diamètre et de 1 à plusieurs µm de long, formant un étroit canal (2 nm), constitué d'une protéine spécifique (piline), porté par les bactéries $F^+$. Il est nécessaire à l'adhérence de la bactérie $F^+$ à la bactérie $F^-$ lors de la conjugaison et il constitue le canal par lequel l'ADN est transféré.

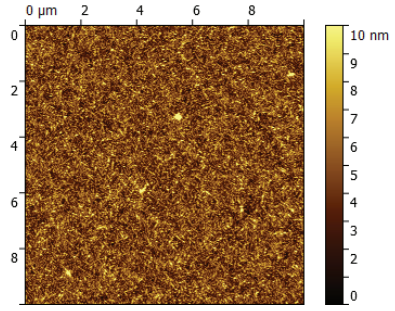
**Porines** : Protéines formant des canaux permettant la diffusion d'ions et de petites molécules. Ce sont des multimères de chaînes polypeptidiques conformées en feuillets β antiparallèles. Les feuillets s'enroulent en un tonnelet dont la surface externe, hydrophobe, s'insère dans une membrane et dont le centre, hydrophile, forme un canal transmembranaire.

# ANNEXES

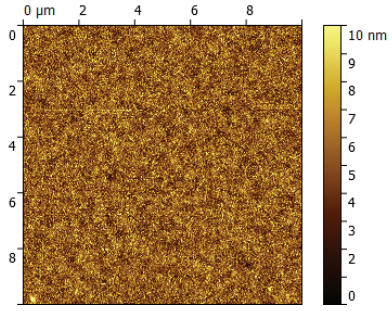
# ANNEXE A : MORPHOLOGIE DES FILMS DE CHITOSANE PAR AFM

# 1. Films élaborés avec la solution aqueuse d'acide chlorhydrique

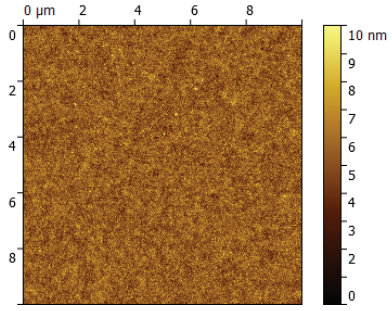
## ❖ Chitosane 600, concentration 0.5 % (m/m)



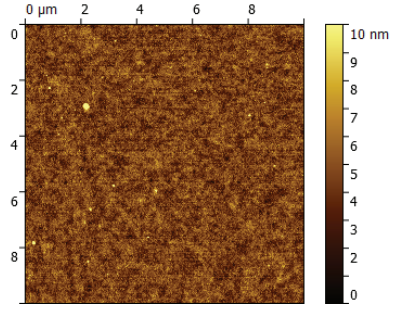

DA : 2,4 % ; Ep. : 85 nm
RMS : 1,67 nm



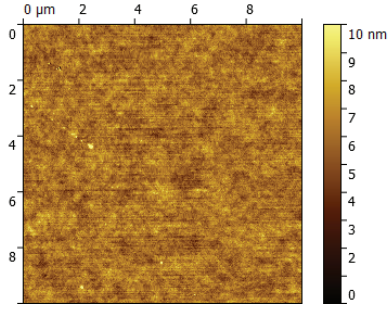

DA : 8 % ; Ep. : 77 nm
RMS : 1,57 nm



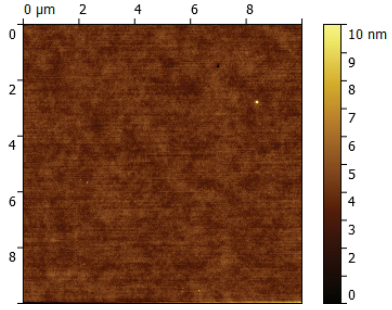

DA : 12,2 % ; Ep. : 70,5 nm
RMS : 0,93 nm



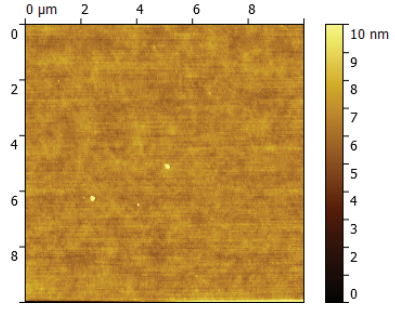

DA : 21,5 % ; Ep. : 48 nm
RMS : 1,11 nm




DA : 34 % ; Ep. : 55 nm
RMS : 0,81 nm

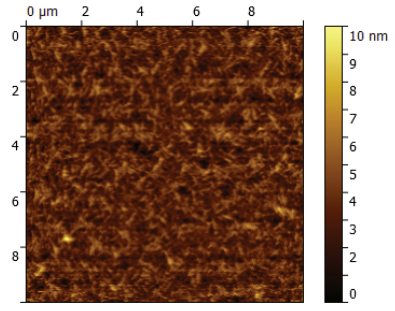



DA : 45,3 % ; Ep. : 56 nm
RMS : 0,45 nm

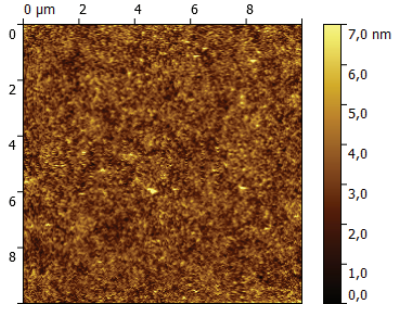



DA : 52,6 % ; Ep. : 44 nm
RMS : 0,59 nm

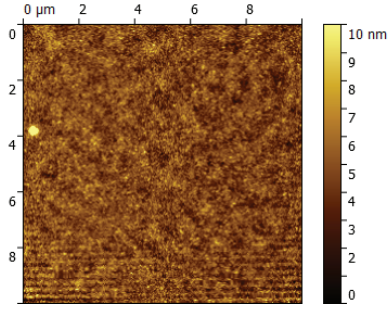
## ❖ Chitosane 600, concentration 1% (m/m)




DA : 2,4 % ; Ep. : 425 nm
RMS : 1,89 nm

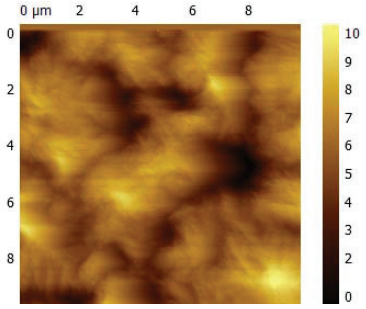



DA : 8 % ; Ep. : 488 nm
RMS : 1,51 nm

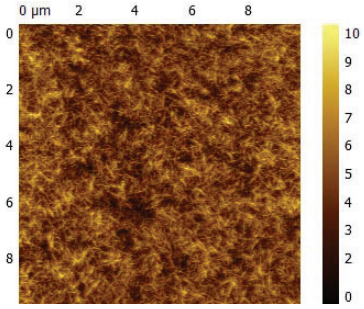



DA : 12,2 % ; Ep. : 459 nm
RMS : 1,06 nm

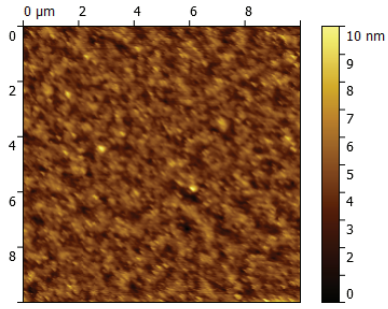
## ❖ Chitosane 180, concentration 2 % (m/m)



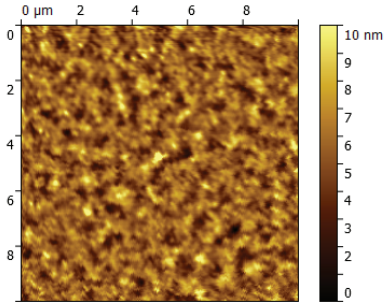

DA : 1 % ; Ep. : 267 nm
RMS : 1,45 nm



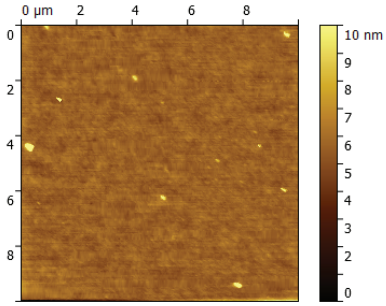

DA : 9 % ; Ep. : 340 nm
RMS : 1,45 nm



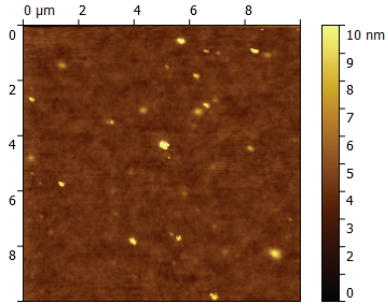

DA : 14,4 % ; Ep. : 286 nm
RMS : 0,97 nm




DA : 25,6 % ; Ep. : 325 nm
RMS : 1,37 nm

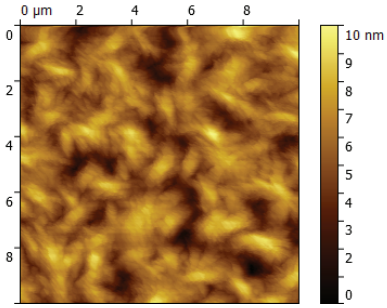



DA : 35,3 % ; Ep. : 288 nm
RMS : 0,49 nm

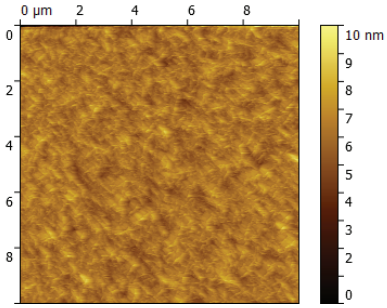



DA : 41,9 % ; Ep. : 295 nm
RMS : 0,51 nm

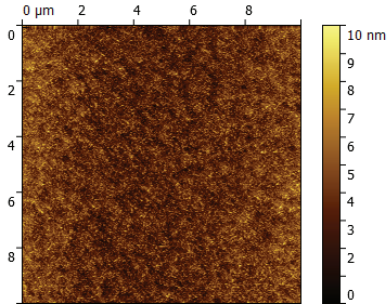
## ❖ Chitosane 180, concentration 1.42 % (m/m)



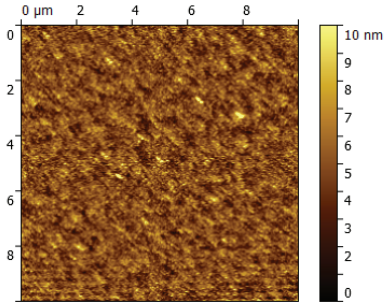

DA : 1 % ; Ep. :
RMS : 1,39 nm



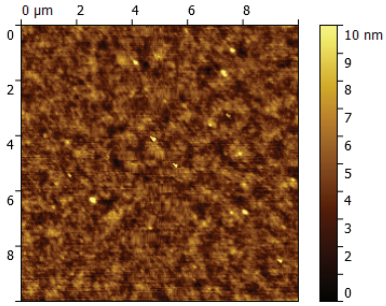

DA : 9 % ; Ep. : 214 nm
RMS : 0,6 nm



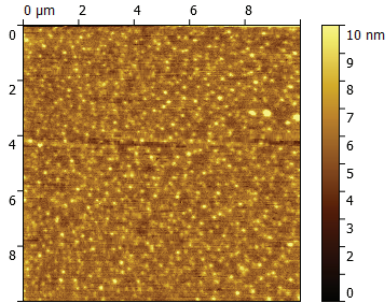

DA : 14.4 % ; Ep. : 191 nm
RMS : 1,14 nm




DA : 25,6 % ; Ep. : 193 nm
RMS : 1,14 nm

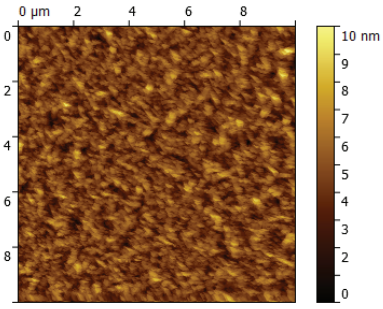



DA : 35,3 % ; Ep. : 184 nm
RMS : 1,10 nm

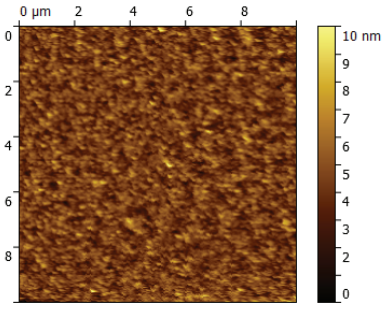



DA : 41,9 % ; Ep. : 191 nm
RMS : 0,97 nm

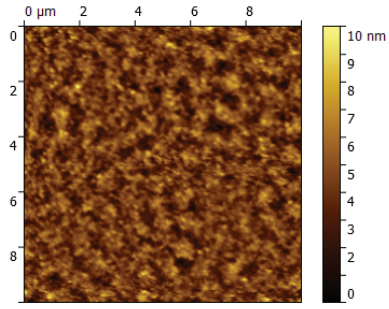
❖ Chitosane 180, concentration 1 % (m/m)



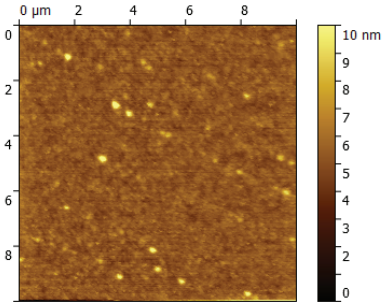

DA : 1 % ; Ep. : 80 nm
RMS : 1,10 nm




DA : 9 % ; Ep. : 83 nm
RMS : 0,99 nm



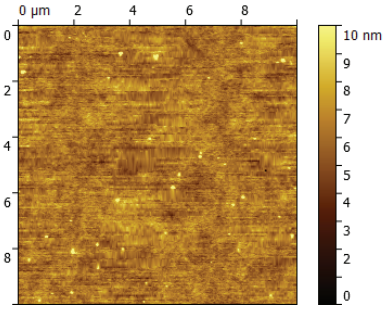

DA : 14,4 % ; Ep. : 81 nm
RMS : 1,16 nm



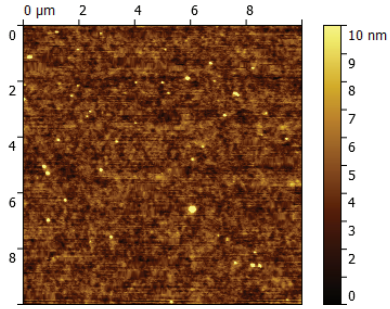

DA : 25,6 % ; Ep. : 74 nm
RMS : 0,59 nm

## 2. Films élaborés avec la solution aqueuse d'acide acétique

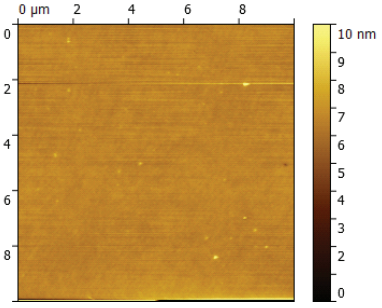
❖ Chitosane 600, concentration 0.67 % (m/m)



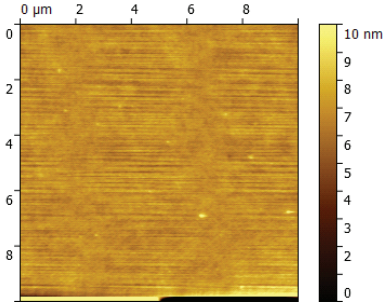

DA : 8 % ; Ep. : 93 nm
RMS : 0,83 nm



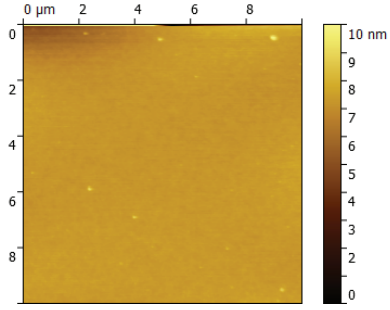

DA : 12,2 % ; Ep. : 99 nm
RMS : 1,26 nm




DA : 21,5 % ; Ep. : 87 nm
RMS : 0,46 nm

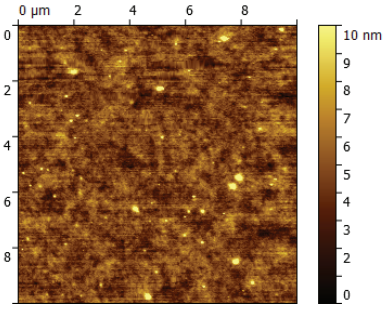



DA : 34 % ; Ep. : 95 nm
RMS : 0,39 nm

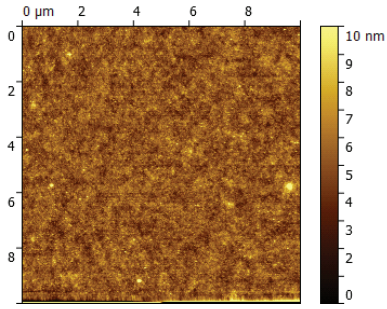



DA : 45,3 % ; Ep. : 94 nm
RMS : 0,42 nm

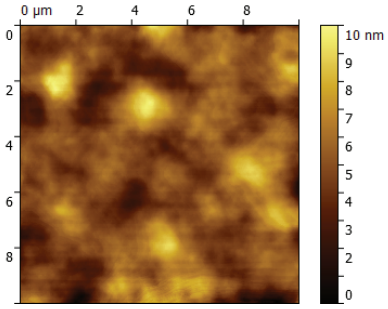
❖ Chitosane 600, concentration 1 % (m/m)



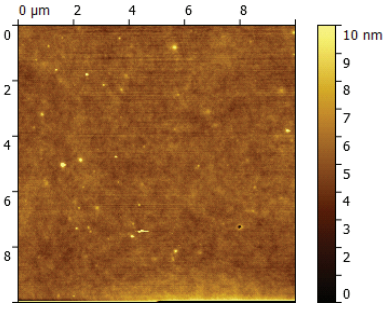

DA : 2,4 % ; Ep. : 434 nm
RMS : 1,35 nm




DA : 8 % ; Ep. : 487 nm
RMS : 1,29 nm

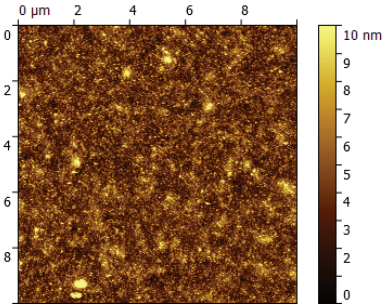



DA : 12,2 % ; Ep. : 486 nm
RMS : 1,65 nm

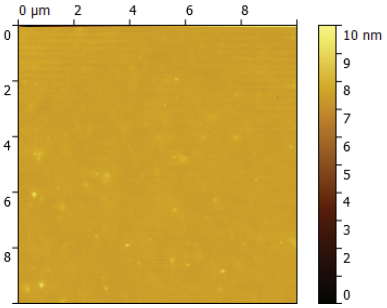



DA : 21,5 % ; Ep. : 481 nm
RMS : 1,18 nm

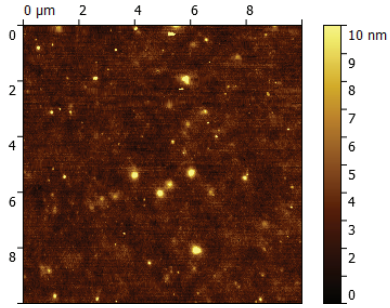
❖ Chitosane 180, concentration 2 % (m/m)



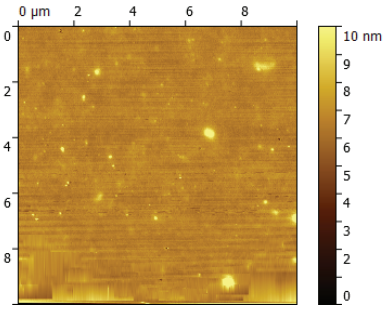

DA : 1 % ; Ep. : 288 nm
RMS : 1,33 nm



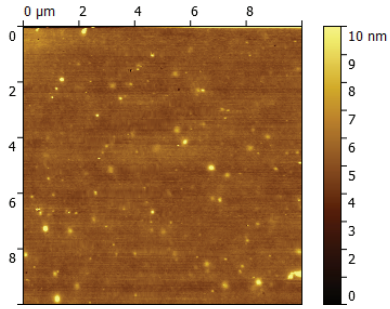

DA : 9 % ; Ep. : 254 nm
RMS : 0,2 nm




DA : 14,4 % ; Ep. : 332 nm
RMS : 1,05 nm

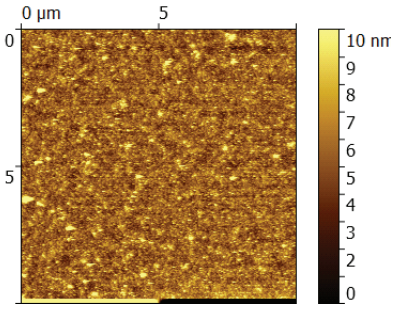



DA : 35,3 % ; Ep. : 267 nm
RMS : 0,6 nm

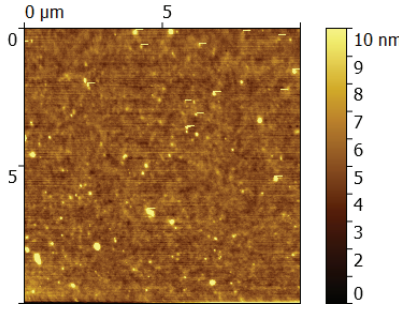



DA : 41,9 % ; Ep. : 293 nm
RMS : 0,62 nm

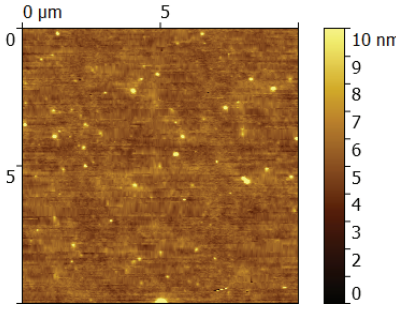
❖ Chitosane 180, concentration 1.42 % (m/m)



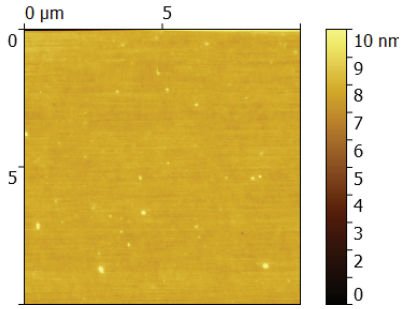

DA : 1 % ; Ep. : 145 nm
RMS : 1,27 nm



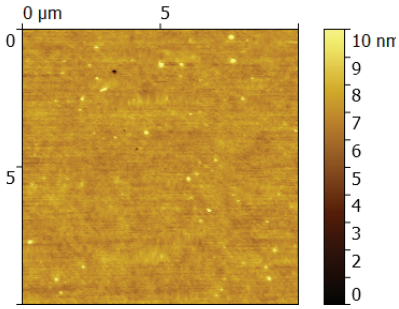

DA : 9 % ; Ep. : 146 nm
RMS : 1,19 nm




DA : 14,4 % ; Ep. : 131 nm
RMS : 0,78 nm

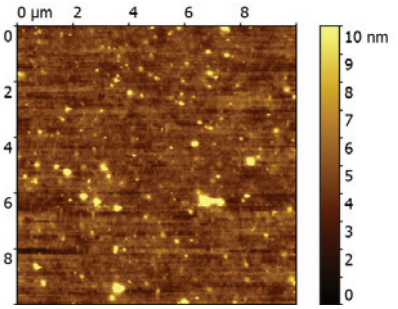



DA : 35,3 % ; Ep. : 139 nm
RMS : 0,33 nm

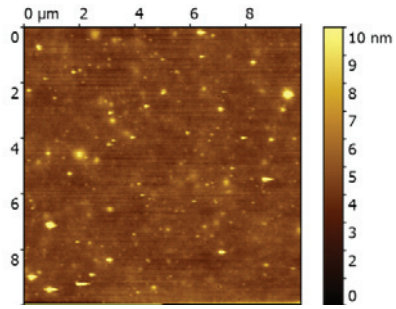



DA : 41,9 % ; Ep. : 145 nm
RMS : 0,40 nm

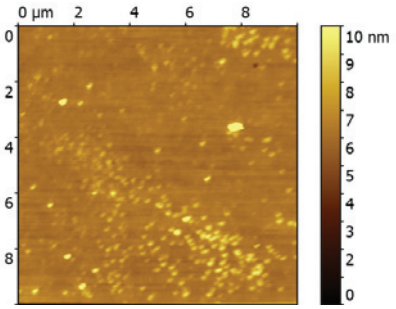
❖ Chitosane 180 DA 55 % AcOH (NR)



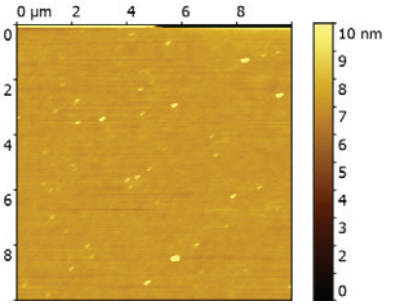

DA : 52,2 % ; Ep. : 225 nm
RMS : 1,8 nm



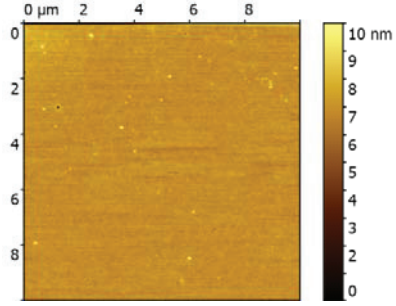

DA : 52,2 % ; Ep. : 185 nm
RMS : 1,08 nm




DA : 52,2 % ; Ep. : 85 nm
RMS : 0,88 nm

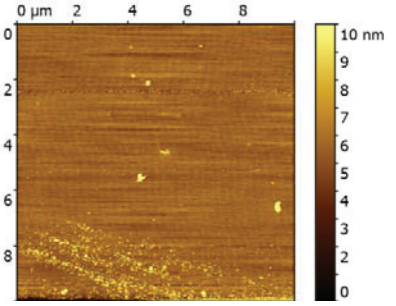



DA : 52,2 % ; Ep. : 45 nm
RMS : 0,75 nm

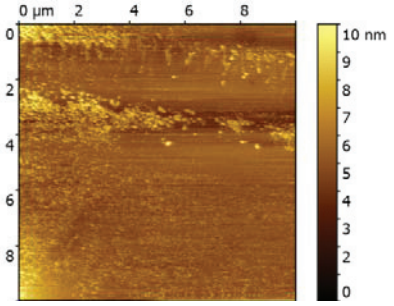



DA : 52,2 % ; Ep. : 26 nm
RMS : 0,64 nm

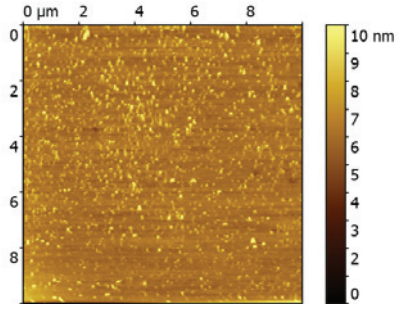
❖ Chitosane 180 DA 55 % AcOH (RA)



DA : 52,2 % ; Ep. : < 5 nm
RMS : 1,7 nm

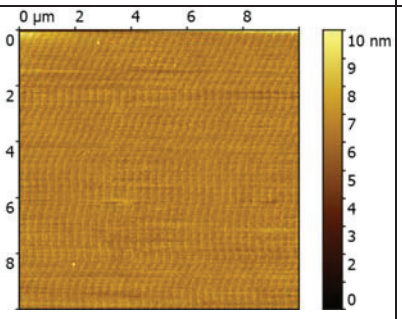
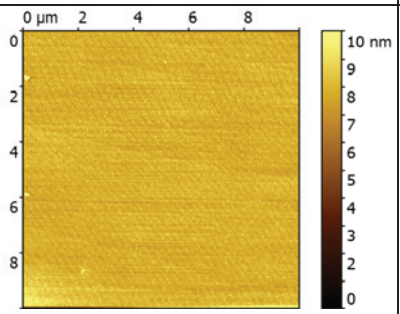
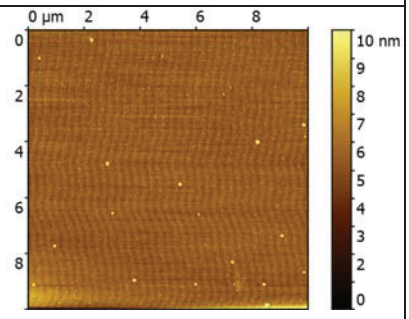
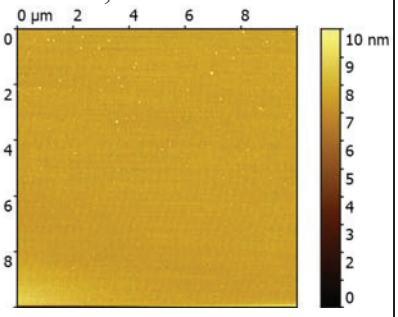
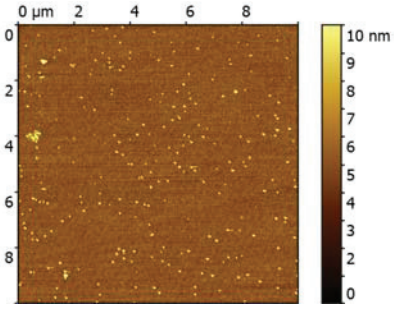
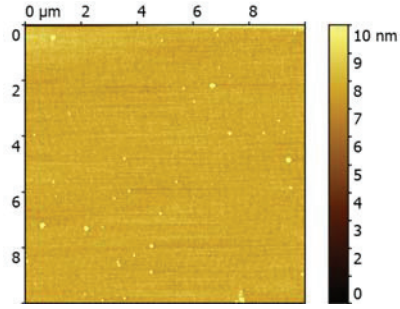
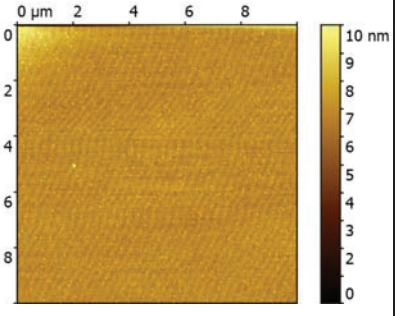
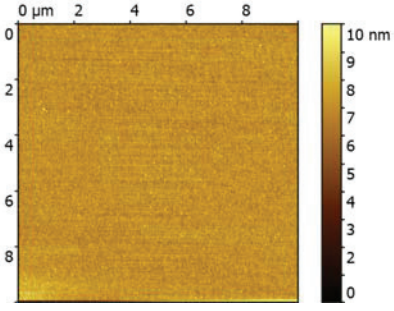
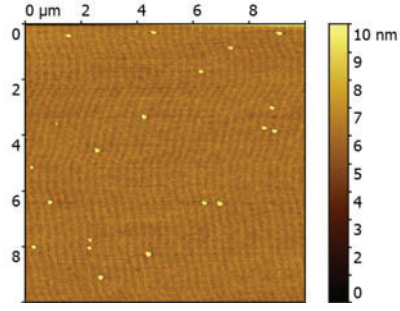


DA : 52,2 % ; Ep. : < 5 nm
RMS : 1,51 nm



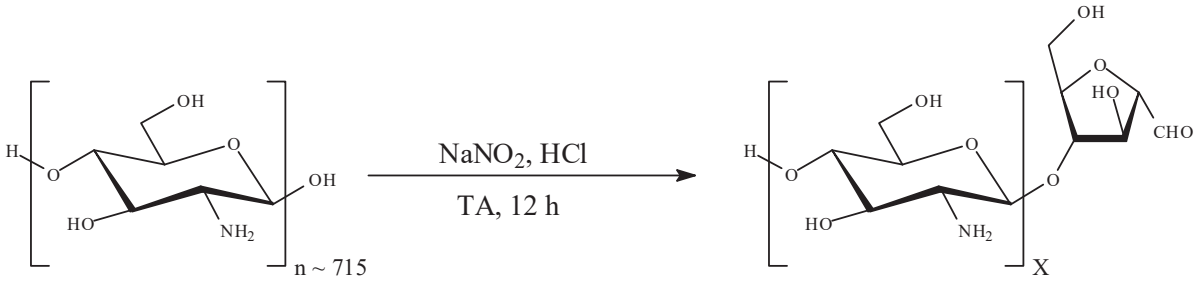
DA : 52,2 % ; Ep. : < 5 nm
RMS : 0,82 nm

❖ Chitosane 600 DA 55 %: effet recuit et neutralisation

| Non recuit | Recuit | Recuit + neutralisation |
|---|---|---|
|  Conc. : 0,05 % RMS : 0,63 nm |  Conc. : 0,05 % RMS : 0,98 nm |  Conc. : 0,05 % RMS : 0,86 nm |
|  Conc. : 0,1 % RMS : 0,38 nm |  Conc. : 0,1 % RMS : 1,07 nm |  Conc. : 0,1 % RMS : 0,72 nm |
|  Conc. : 0,2 % RMS : 0,58 nm |  Conc. : 0,2 % RMS : 0,61 nm |  Conc. : 0,2 % RMS : 0,92 nm |

# ANNEXE B : SYNTHESE DES CHITOOLIGOSACCHARIDES DERIVES PROPARGYL

# 1. Synthèse des COSamf X~16 et 27



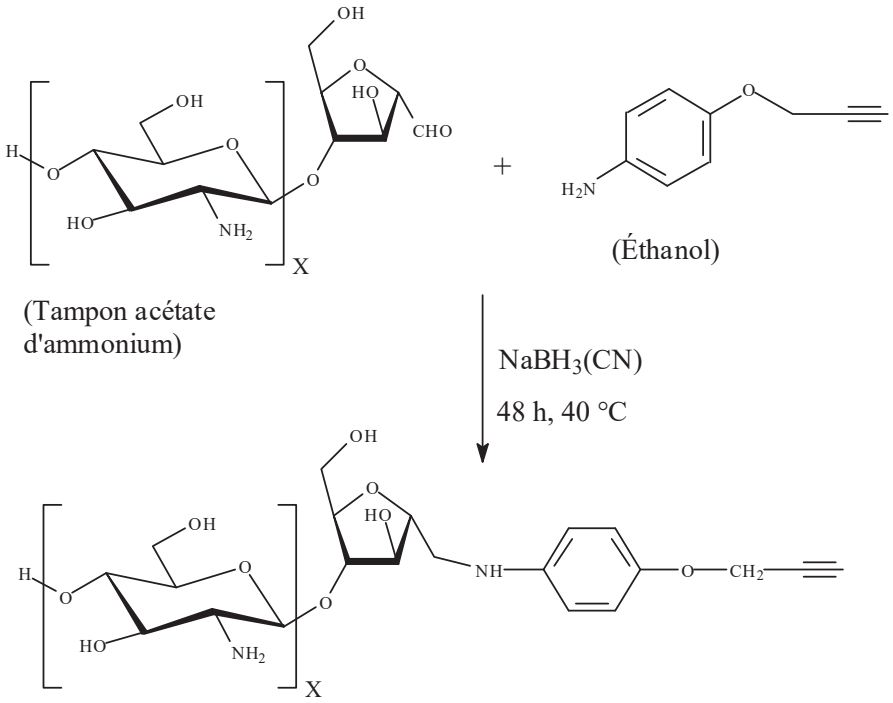

Chitosane (DA ~ 0 %) COSamf (X ~ 16 et 27)

Le chitosane (2,1 g, 13 mmol d'unités GlcN) est dissous dans de l'eau par ajout de 1,2 mL de HCl (37 % m/m). Une solution aqueuse de $NaNO_2$ (de rapport molaire GlcN/$NaNO_2$ = 4 et 10 respectivement pour les COSamf X~16 et 27) fraîchement préparée est ajoutée dans la solution de chitosane. Le mélange est laissé à température ambiante pendant 12 h. Pour COSamf X~16, la solution est neutralisée (en ajustant le pH du milieu à 8 par ajout d'hydroxyde d'ammonium (28 % m/m)) puis filtrée par des filtres en ester cellulosique (seuil de coupure 500 g/mol, Spectrum Labs). Après précipitation dans l'éthanol et séchage sous vide du produit, une poudre blanche (1,5 g, rendement massique 70 %) est obtenue. Pour COSamf X~27, le produit est précipité (ajustement du pH à 9 par ajout d'hydroxyde d'ammonium (28 % m/m)) puis lavé plusieurs fois par de l'eau distillée avant d'être lyophilisé. Le produit obtenu (1,6 g) a un rendement massique de 76 % et se présente sous l'aspect d'une poudre blanche.

**COSamf (X ~ 16)**: RMN 1H (D2O, 298 K, 500 MHz): δ (ppm) 5.10 (d, J 5.3 Hz, $H^1$ amf, 1H), 4.80-4.65 (m, $H^1$ GlcN, 16H), 4.45 (t, J 4.8 Hz, $H^3$ amf, 1H), 4.21 (t, J 4.9 Hz, $H^4$ amf,, 1H), 4.12 (m, $H^5$ amf, , 1H), 4.05-3.40 (m, $H^2$ et $H^6$ amf, $H^{3-6}$ GlcN, 66H), 3.10-2.90 (m, $H^2$ GlcN, 16H).

**COSamf (X ~ 27)**: RMN 1H (D2O, 298 K, 500 MHz): δ (ppm) 5.10 (d, J 5.3 Hz, $H^1$ amf, 1H), 4.80-4.65 (m, $H^1$ GlcN, 27H), 4.45 (t, J 4.8 Hz, $H^3$ amf, 1H), 4.21 (t, J 4.9 Hz, $H^4$ amf,, 1H), 4.12 (m, $H^5$ amf, , 1H), 4.05-3.40 (m, $H^2$ et $H^6$ amf, $H^{3-6}$ GlcN, 110H), 3.10-2.90 (m, $H^2$ GlcN, 27H).

## 2. Synthèse du 4-propargyloxyaniline-g-COSamf X ~ 16 et 27




Une masse de 1 g de COSamf est dissous dans 30 mL d'une solution aqueuse de tampon d'acétate d'ammonium (0,15 M, pH 5,5). Cette solution est mélangée avec une solution de 4-propargyloxyaniline (2 éq./unité amf dans 20 mL d'éthanol). Le mélange est mis sous agitation à température ambiante pendant 30 min. Du cyanoborohydrure de sodium (2 éq./unité amf) est rajouté dans le milieu réactionnel et le mélange est maintenu sous agitation pendant 2 jours à 40 °C. Pour X~16, la solution est neutralisée (par ajout d'hydroxyde d'ammonium (28 % m/m) à pH 9) puis filtrée avec des filtres en ester cellulosique (seuil de coupure 500 g/mol, Spectrum Labs). Le produit est récupéré par précipitation dans l'éthanol puis séchage sous vide. Le produit obtenu est de nature poudreuse avec un rendement massique de 87 % (0,87 g de produit). Pour X~27, le produit est précipité (ajustement du pH à 9 par ajout d'hydroxyde d'ammonium (28 % m/m)) puis lavé plusieurs fois par un mélange eau/éthanol (1/1, v/v) avant d'être lyophilisé. Le produit obtenu se présente sous forme de poudre (0,9 g) avec un rendement massique de 90 %.

***X ~ 16:*** RMN $^{1}$H ($D_2O$, 298 K, 500 MHz): δ (ppm) 7,50 (d, *J* 9,0 Hz, H-Ar, 2H), 7,20 (d, *J* 9,0 Hz, H-Ar, 2H), 4,90 (d, *J* 8,1 Hz, $H^1$ GlcN, 16H), 4,40-4,05 (m, $H^{2-5}$ amf, 4H,), 4,05–3,40 (m, $H^{3-6}$ GlcN, $H^6$ amf, $CH_2N$, 67H), 3,30-3,10 (m, $H^2$ GlcN, 16H), 2,95 (s, ≡CH, 1H).

***X ~ 27:*** RMN $^{1}H$ ($D_2O$, 298 K, 500 MHz): δ (ppm) 7,50 (d, *J* 9,0 Hz, H-Ar, 2H), 7,20 (d, *J* 9,0 Hz, H-Ar, 2H), 4,90 (d, *J* 8,1 Hz, $H^{1}$ GlcN, 27H), 4,40-4,05 (m, $H^{2-5}$ amf, 4H,), 4,05–3,40 (m, $H^{3-6}$ GlcN, $H^{6}$ amf, $CH_2N$, 111H), 3,30-3,10 (m, $H^{2}$ GlcN, 27H), 2,95 (s, ≡CH, 1H).

**Titre :** Préparation et caractérisations physicochimiques et biologiques de surfaces modifiées par du chitosane

**Résumé :** Les modifications de surface par du chitosane ont été effectuées dans cette thèse de deux façons : physisorption de chitosane de différents paramètres moléculaires (« spin coating » de solutions acides homogènes) et greffage de chaînes de chitooligosaccharides dérivées propargyl (« grafting to ») sur les surfaces de silicium. Le premier cas d'étude vise à apporter une compréhension sur le lien existant entre les propriétés physicochimiques des films et les paramètres moléculaires du chitosane et l'impact de ses propriétés physicochimiques et paramètres moléculaires sur les réponses biologiques. A cette fin, les propriétés de mouillabilité, morphologiques, structurales des films d'une part et d'autre part les réponses d'adhésion et de prolifération de bactéries sur les films de chitosane ont été caractérisées. Dans cette étude, nous avons également pris en compte l'effet du type d'acide utilisé lors de la préparation des solutions ainsi que le vieillissement des films sur leurs propriétés physicochimiques. A l'issue de cette étude, les tests biologiques, notamment l'adhésion et la prolifération de bactéries sur les films de chitosane, ont montré des résultats plutôt liés aux paramètres moléculaires des films qu'à leurs propriétés physicochimiques.

Le deuxième cas de modification de surface vise à fonctionnaliser chimiquement les surfaces de silicium par des chitooligosaccharides par la méthode « grafting to ». Cette modification a été réalisée en trois étapes : silanisation, azidation et greffage des chitooligosaccharides. Toutes ces étapes ont été validées par différentes caractérisations de la surface après chaque étape de greffage par ellipsométrie, tensiométrie, AFM, spectroscopie infrarouge et spectrométrie TOF-SIMS.

**Mots clefs :** Chitosane, films minces, modification de surface, adhésion et prolifération bactérienne.

**Title:** Preparation of model surfaces modified by chitosan: physicochemical characterizations and biological response.

**Abstract:** The surface modifications have been carried out in this thesis by two different routes: by physisorption of chitosan chains with different molecular parameters onto silicon surfaces (spin coating of homogeneous acidic solutions) and grafting of propargyl- terminated chito-oligosaccharides chains onto silicon surfaces (grafting to). The first study case was to understand the relationship between the physicochemical properties of chitosan films and the molecular parameters, and to find the impact of these physicochemical properties and molecular parameters on the biological responses. To this end, the physicochemical properties such as the wettability, morphology, chemical and physical structure of chitosan films on the one hand, and the bacteria adhesion and spreading on chitosan films on the other hand, have been characterized. In this study, we have also considered the effect of the type of acid used when solubilizing the chitosan on the films neutralization as well as the film ageing effects on the physicochemical properties. At the end of the study, the biological response of the chitosan films showed more sensitivity towards the chitosan molecular parameters than towards the physicochemical properties of the films.

The aim in the second case of surface modification was to functionalize the silicon surfaces with chito-oligosaccharides by the "grafting to" method. It was conducted in three steps: silanisation, azidation and grafting of chito-oligosaccharides. All these steps were validated one by one by carrying out various characterizations using ellipsometry, tensiometry, AFM, infrared spectroscopy and TOF-SIMS spectrometry.

**Key words:** Chitosan, thin films, surface modification, bacteria adhesion and proliferation.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : Ingénierie des Matériaux Polymères, UMR CNRS 5223, Université Claude Bernard de Lyon 1, Bâtiment Polytech'Lyon, 15 Boulevard André Latarjet, 69622 Villeurbanne Cedex France.