



HAL
open science

Surfaces polymères antibactériennes à base de polyionènes : synthèses et études aux interfaces en physico-chimie et biologie

Sarah Bernardi

► **To cite this version:**

Sarah Bernardi. Surfaces polymères antibactériennes à base de polyionènes : synthèses et études aux interfaces en physico-chimie et biologie. Polymères. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASF034 . tel-03245707

HAL Id: tel-03245707

<https://theses.hal.science/tel-03245707>

Submitted on 2 Jun 2021

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.

Surfaces polymères antibactériennes à
base de polyionènes : synthèses et
études aux interfaces en physico-
chimie et biologie

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°571 Sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, NIMBE, 91191, Gif-sur-Yvette,
France

Référent : Faculté des Sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 15/12/20, par

Sarah BERNARDI

Composition du Jury

Ruxandra GREF

Directeur de Recherche, Université Paris-Sud/CNRS (Institut des Sciences
Moléculaires d'Orsay)

Présidente

Laurent BILLON

Professeur, Université de Pau et des pays de l'Adour (Institut des Sciences
Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux)

Rapporteur &
Examinateur

Karine REHEL

Professeur, Université Bretagne Sud (Laboratoire de Biotechnologie et Chimie
Marines)

Rapporteur &
Examinatrice

Bénédicte LEPOITTEVIN

Maître de Conférences, HDR, Université de Caen-Normandie/ENSICAEN
(Laboratoire de Chimie Moléculaire et Thio-Organique)

Examinatrice

Geraldine CARROT

Chercheur CEA, HDR, CEA Saclay (Laboratoire Nanosciences et Innovation pour
les Matériaux, la Biomédecine et l'Énergie)

Directrice de thèse

Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE

Professeur, Université Paris-Saclay/AgroParisTech (Laboratoire SayFood)

Co-encadrante &
Examinatrice

Morgan GUILBAUD

Ingénieur de recherche, Université Paris-Saclay/AgroParisTech (Laboratoire
SayFood)

Invitée

Remerciements

Ce manuscrit de « quelques pages » marque l'achèvement de trois années, huit mois et vingt-neuf jours au sein de Laboratoire d'Innovation en Chimie des Surfaces et Nanosciences (LICSEN) du Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA). Mille trois cent soixante-quatre jours d'un périple éreintant, mais au combien enrichissant. Cette thèse fut l'occasion de multiples rencontres et je tiens à remercier les personnes qui ont croisées mon chemin tout au long de cette aventure.

En premier lieu, je remercie les membres de mon jury de thèse : Karine Réhel, Laurent Billon, Bénédicte Lepoittevin et Ruxandra Gref, pour leur évaluation attentive de mon manuscrit et pour les discussions intéressantes que nous avons eues lors de la soutenance. En particulier, je remercie Bénédicte Lepoittevin et Ruxandra Gref d'avoir fait le déplacement pour assister à la soutenance en présentiel, malgré la pandémie. Mes encadrantes et moi-même nous sommes sentis bien moins seules dans ce si grand amphithéâtre.

Je tiens ensuite à remercier ma directrice de thèse, Geraldine Carrot, pour m'avoir fait confiance sur ce projet de thèse et pour m'avoir offert la possibilité de me former sur des techniques aussi variées qu'intéressantes, allant de la biologie à la physique. Grâce à elle, le mot pluridisciplinaire a pris tout son sens sur cette thèse. Je la remercie également pour son suivi attentif, ses nombreuses relectures et son soutien tout au long de ma thèse.

Je remercie également mon encadrante, Marie-Noëlle Bellon-Fontaine, pour ses retours aussi constructifs que bienveillants, et ses discussions scientifiques toujours pleines de pédagogie. L'AgroParisTech de Massy perd une professeure exemplaire et je lui souhaite de profiter pleinement de sa retraite.

Je tiens à remercier toute les personnes qui ont collaboré sur ce projet de thèse et qui l'ont rendu possible.

Merci à Morgan Guilbaud et Margareth Renault pour tous ce qu'elles m'ont appris en microbiologie. Une novice en la matière, elles ont fait de moi « la plus microbiologiste des chimistes » qu'elles connaissent, selon leurs termes. Ces mots me vont droit au cœur et j'espère porter ce titre avec fierté. Merci également pour leur aide et la réalisation de nombreuses

manipulations ainsi que leur disponibilité même pour des manipulations de dernière minute, trois semaines avant la soutenance.

Un énorme merci à Nabila Debou pour son aide sur les greffages chimiques et avec qui ce fut un plaisir de partager une paillasse aussi propre et rangée pendant 3 ans. Merci énormément également à Fanny Hauquier, pour son aide sur l'impression et la formulation, ses conseils délivrés avec humour et sa bonne humeur, qui m'a aidé à dédramatiser les loupés.

Je remercie Alexis Chennevière pour son accueil au LLB et à Orphée (R.I.P.). Merci pour son aide lors des mesures neutrons/rayons X, mais également lors du traitement des résultats. Je le remercie pour tout le savoir qu'il m'a enseigné. J'ai pu toucher du bout des doigts la science fondamentale pure et dure grâce à lui. Je le redis ici, comme à ma soutenance, si demain on me donnait la possibilité d'étudier ce que je veux, je retournerai étudier les couches de polyélectrolytes greffées en neutrons tellement l'univers qu'il m'a fait découvrir m'a plu.

Merci aussi à Jocelyne Leroy pour toutes les analyses XPS et son aide pour leurs interprétations. Merci à Jean-Marie Herry et Gilles Gerlot d'avoir réalisé les mesures d'angle de contact et de potentiel zêta. Merci également à Nicolas Badier pour son accueil à Quimper lors des quelques jours d'essai sur la ligne pilote de Bolloré. Merci à également Céline Boutin de m'avoir permis d'utiliser son laboratoire de culture cellulaire et Merci à Serge Pin de m'avoir laissé utiliser le lecteur de densité optique du LIONS. Merci à Clémentine Colas de m'avoir l'aisser utilisé son plasma et de m'avoir formé sur l'appareil. Merci à Philippe Surugue pour tous les supports qu'il m'a fabriqué pour les synthèses en surface. Merci aussi à Céline Délobel pour son efficacité sur l'ensemble des tâches administratives auxquelles j'ai été confronté.

Je remercie également les stagiaires qui ont contribué sur mon projet de thèse : Quentin Fusier, Elia Guenoun, Irène Galimberti, Alex Buzenet et Alexandre Pistol. Merci pour votre investissement et votre motivation à suivre mon rythme dynamique.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont égayé mon quotidien au laboratoire et en dehors.

Je tiens à remercier tous les membres du LICSEN pour tous les bons moments passés à leurs côtés durant ces trois années, de la course de relais au traditionnel repas de Noël.

Merci à Vincent Derycke pour son accueil au LICSEN et pour sa disponibilité. Merci à Pascal Viel pour ses conseils d'entrepreneur averti (et merci d'avoir pris Valeriu en stage !). Merci à

Guy Deniau d'avoir partagé toutes ses aventures en terres inconnues le midi. Merci à Maud Fayos pour toutes ces petites discussions matinales pour se donner du courage avant d'aller bosser. Merci à Bruno Jusselme et Renaud Cornut pour les échanges scientifiques et sur le monde de la recherche. Merci à Cédric Zobrist pour les discussions culturelles et sportives intéressantes. Merci à Julie Machado pour sa bonne humeur et son rire communicatif, mais également pour sa maladresse qui a fait une concurrence sérieuse à la mienne en termes de verrerie brisée.

Je remercie également tous mes compatriotes doctorants pour les échanges enrichissants et les moments de détente le midi, sur le terrain de foot ou dans un bar. Je les remercie également pour toutes les discussions scientifiques constructives. Merci à Marine Le Goas pour tous ce qu'elle m'a appris en culture cellulaire, pour m'avoir initié au football mais surtout pour son soutien continu pendant et au-delà de la thèse. Merci à mes co-bureaux avec qui ce fut un vrai plaisir de partager la pièce 10 : Thomas Petenzi, le plus Breton des Ritals, mon frère d'arme qui soutient cet année et avec qui nous avons refait le monde académique plus d'une fois, Florian Lebon dont l'avis éclairé, tranchant et sans concession sur de multiples sujets me ravit toujours, Robin Durr qui par son calme et sa patiente infinie face à l'administration française a beaucoup inspiré la rageuse que je suis, et Nicolas Blanchard, un autre exemple inspirant de calme et de bonne humeur et pour qui j'ai rattrapé One Piece afin d'arrêter de me boucher les oreilles pour éviter les spoilers. Merci également à Aurélien Doublet et Alice Boudet, souvent de passage dans notre bureau pour des moments sympathiques.

Je remercie également toutes les autres personnes que j'ai pu côtoyer au CEA et en dehors lors de ces 3 années de thèse. Je remercie plus particulièrement mes coéquipières de foot et mes coaches. Merci pour tous ces bons moments sur le terrain (qu'il vente, pleuve ou neige) et autour d'un verre. Licorne un jour, Licorne toujours.

Enfin, je voudrais remercier mes amis et ma famille proche pour leur soutien avant, pendant et après cette thèse.

Merci à mes amis Eléonore, Etienne, Guillaume et Barbara pour leur soutien, les bons moments de décompression et leurs conseils précieux à l'approche de la soutenance.

Merci également aux membres de ma belle-famille pour leur soutien. Merci en particulier à mon beau-frère, Ion, qui m'a fait redécouvrir la richesse du patrimoine culturel Français, ce qui m'a permis de garder un équilibre mental pendant cette thèse.

Je remercie tous les membres de ma famille qui me soutiennent et qui croient en moi depuis le début. Merci à ma grand-mère, Marie, qui m'a hébergé lors de mes premières années d'étude à Rennes. Sans son aide au quotidien, j'aurais probablement fait 3 années de prépa au lieu de 2. Merci à mes sœurs, Marion et Lucie, pour tous ses moments inoubliables que nous passons ensemble. Merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel et leurs encouragements depuis toujours.

Mes ultimes remerciements iront à Valeriu :

Merci ne suffit pas à décrire la gratitude que je te porte pour tout le soutien que tu m'as apporté lors de ces trois années de thèse qui ont parfois été si difficile. Tu es sans conteste ma plus belle rencontre lors de cette aventure. *Te iubesc.*

Abréviations

ANR : Agence Nationale de la Recherche

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale d'Inhibition

DMABC : 4-(diméthylamino) benzoyl chloride

DMF : N, N-Diméthylformamide

DP_n : degré de polymérisation en nombre

E. coli : *Escherichia coli*

FT : Flore Totale

I_p : Indice de polydispersité

MADAME : Méthacrylate de diméthylaminoéthyle

MeOH : Méthanol

M_n : Masse molaire moyenne en nombre

M_w : Masse molaire moyenne en masse

PDOPA : Polydopamine

PDOPA SG : Polydopamine SurGreffé

PE : Polyéthylène

PI : Polyionènes

PMADAME : Polyméthacrylate de diméthylaminoéthyle

RMN ¹H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SEC-MALS : Chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angles

THF : Tétrahydrofurane

VC : bactéries Viables Cultivables adhérentes

XPS : Spectroscopie photoélectronique X

Table des matières

Chapitre I : Etat de l'art

A. La contamination bactérienne des surfaces	17
A.1 Les bactéries	17
A.2 De la bioadhésion au biofilm.....	19
A.3 Les problématiques liées à la biocontamination des surfaces	23
B. Les stratégies préventives pour maîtriser la biocontamination.....	26
B.1 Stratégie antiadhésive	27
B.2 Stratégie bioactive.....	29
C. Les polycations avec des ammoniums quaternaires	35
C.1 Mécanisme d'inhibition sur les bactéries	35
C.2 Une grande famille de polymères	36
C.3 Le cas particulier des polyionènes	39
C.4 Greffage de polyionènes en surface	44
D. Conclusions et perspectives : objectifs de la thèse	50
Bibliographie.....	52

Chapitre II : Polyionènes en solution

A. Présentation des polyionènes	67
A.1 La polymérisation par étapes.....	67
A.2 Les polyionènes	70
B. Synthèses et caractérisations des polyionènes.....	73
B.1 Synthèses	73
B.2 Détermination des masses molaires	77
B.3 Variation des paramètres de synthèse	81

C. Caractérisations biologiques des polyionènes	86
C.1 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	86
C.2 Cytotoxicité	92
D. Conclusions et perspectives : choix des polymères à greffer	97
Bibliographie.....	100

Chapitre III : Polyionènes greffés en surface : étude sur le verre et le silicium

A. Greffage des polyionènes sur le verre.....	107
A.1 Présentation des procédés formant la sous-couche réactive.....	107
A.2 Protocole de greffage des polyionènes sur le verre	112
A.3 Caractérisations du greffage	114
B. Caractérisations biologiques et physico-chimiques des surfaces.....	117
B.1 Essais d'adhésion.....	117
B.2 Essais de cytotoxicité	124
B.3 Caractérisations physico-chimiques	127
C. Etude en réflectivité des rayons X et des neutrons	133
C.1 Adaptation du procédé de greffage aux wafers de silicium	133
C.2 Etudes des couches à sec : réflectivité des rayons X	137
C.3 Etude des couches hydratées : réflectivité des neutrons	140
C.4 Bilan des analyses en réflectivité des rayons X et des neutrons.....	159
D. Conclusions et perspectives	160
Bibliographie.....	164

Chapitre IV : Polyionènes en surface : applications sur le polyéthylène

A. Greffage des polyionènes sur le polyéthylène.....	170
A.1 Chimie et caractérisations du greffage des PI sur le PE	170
A.2 Caractérisations biologiques des PE greffés PI	173
A.3 Comparaison entre les PE et les verres greffés PI	180
B. Impression jet d'encre sur le polyéthylène.....	182
B.1 Création et impression de l'encre	182
B.2 Caractérisations biologiques du PE avec l'encre PI 6-6 vinylique.....	189
C. Incorporation de polyionènes dans le polyéthylène	192
C.1 Protocole de fabrication des PE MM	192
C.2 Caractérisations biologiques des PE mélanges maîtres (MM)	195
C.3 Comparaison entre les PE greffés PI 6-6 et MM PI 6-6	199
D. Conclusions et perspectives	201
Bibliographie.....	204
Conclusion Générale.....	207
Annexes.....	215

Chapitre I : Etat de l'art

Table des matières

Introduction.....	15
A. La contamination bactérienne des surfaces	17
A.1 Les bactéries	17
A.2 De la bioadhésion au biofilm.....	19
A.2.1 Mécanisme de la biocontamination des surfaces.....	19
A.2.1.1 <i>Le transport</i>	20
A.2.1.2 <i>La bioadhésion</i>	20
A.2.1.3 <i>Le biofilm</i>	21
A.2.2 Quelques généralités sur le biofilm bactérien	21
A.3 Les problématiques liées à la biocontamination des surfaces	23
A.3.1 Les problématiques de santé publique	23
A.3.2 Les problématiques industrielles et environnementales	24
A.3.3 La difficile maîtrise de la biocontamination des surfaces.....	25
B. Les stratégies préventives pour maîtriser la biocontamination.....	26
B.1 Stratégie antiadhésive	27
B.1.1 Topographie.....	27
B.1.2 Hydrophobie et charge de surface	28
B.2 Stratégie bioactive.....	29
B.2.1 Stratégie « release killing »	30
B.2.1.1 <i>Les agents antimicrobiens</i>	30
B.2.1.2 <i>Le contrôle du relargage</i>	31
B.2.2 Stratégie « contact killing ».....	32
B.2.2.1 <i>Topographie nanométrique</i>	32

<i>B.2.2.2 Greffage chimique covalent</i>	33
C. Les polycations avec des ammoniums quaternaires	35
C.1 Mécanisme d'inhibition sur les bactéries	35
C.2 Une grande famille de polymères	36
C.2.1 Cycles aromatiques et hétérocycles	36
C.2.2 Acrylates et méthacrylates	37
C.2.3 Polysiloxanes.....	38
C.2.4 Polyoxazolines.....	38
C.3 Le cas particulier des polyionènes	39
C.3.1 Synthèse des polyionènes.....	39
C.3.2 Facteurs influençant l'efficacité antibactérienne des polyionènes	41
<i>C.3.2.1 Masses molaires</i>	41
<i>C.3.2.2 Contre-ions</i>	42
<i>C.3.2.3 Taille des segments hydrophobes</i>	43
C.4 Greffage de polyionènes en surface	44
C.4.1 « Grafting to »	45
C.4.2 « Grafting from »	46
C.4.3 « Grafting through »	47
D. Conclusions et perspectives : objectifs de la thèse	50
Bibliographie	52

Introduction

La maîtrise de la biocontamination des surfaces est un enjeu sanitaire majeur, particulièrement lorsqu'elle implique la lutte contre des micro-organismes pathogènes dans des secteurs socio-économiques clés tels que le médical ou l'agroalimentaire. Cette biocontamination résulte de la capacité des bactéries à se lier intimement à une surface pour y adhérer, c'est le phénomène de « bioadhésion ». Une fois adhérentes, les bactéries sont capables de s'organiser et de communiquer entre elles afin d'édifier une structure tridimensionnelle sur les surfaces appelée « biofilm ». Ce phénomène naturel, bien qu'inoffensif dans la grande majorité des cas, est à l'origine de nombreuses problématiques industrielles, comme l'obstruction de membranes de filtration, mais surtout de problèmes sanitaires majeurs, comme les intoxications alimentaires et les maladies infectieuses.

Employés intensivement tout au long du XX^{ème} siècle, les antibiotiques constituaient le meilleur traitement pour combattre les micro-organismes. Cette utilisation massive et préventive a malheureusement entraîné le développement de bactéries multi-résistantes devenues insensibles aux antibiotiques. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles stratégies pour combattre ces micro-organismes et limiter leurs propagations dans des secteurs sensibles. L'utilisation de polymères antibactériens synthétiques est particulièrement explorée de par leur stabilité chimique et thermique mais surtout de par les possibilités infinies de structures qu'offre aujourd'hui l'architecture macromoléculaire. En particulier, les polymères cationiques amphiphiles sont capables de provoquer la lyse des bactéries par un mécanisme qui n'induit pas de résistance de leur part. Ceci en fait donc des composés de choix pour une action antibactérienne pérenne sur le long terme. Les bactéries étant très difficiles à éliminer une fois « installées » sur des surfaces, il faut agir en amont de leur adhésion et privilégier des stratégies préventives. Les modifications chimiques des surfaces et notamment le greffage covalent de polymères, sont des stratégies bien adaptées pour fabriquer des surfaces sur-mesure avec les propriétés désirées.

Dans ce contexte de développement durable et de sécurité sanitaire, le projet ANR BRICAPAC, consortium de chercheurs et d'industriels, s'est concentré sur la réalisation de surfaces antibactériennes appliquées au domaine de l'emballage agroalimentaire. Ce projet regroupe deux laboratoires académiques avec des expertises en fonctionnalisation de surface et en microbiologie, le CEA et AgroParisTech-INRA, ainsi que deux acteurs industriels majeurs de l'emballage et du secteur agroalimentaire en France, BOLLORE Division Films Plastiques et

CHARAL. La préoccupation première de ce projet est de limiter la prolifération et l'effet des bactéries d'altération, voire pathogènes, dans les produits alimentaires. En parallèle, l'objectif secondaire est de conserver les bactéries d'intérêt technologique, dites positives (bactéries lactiques), qui contribuent à la bonne maturation du produit frais. L'emballage alimentaire antibactérien idéal serait donc capable de piéger et d'inhiber les bactéries indésirables au stade de l'adhésion, tout en préservant les bactéries positives. Ceci permettrait à la fois une meilleure protection vis-à-vis du consommateur et une meilleure conservation du produit, ce qui aurait pour conséquence une augmentation des dates limites de consommation. Il serait ainsi possible d'obtenir des retombées économiques et environnementales importantes grâce à la diminution du gaspillage alimentaire. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail de thèse, qui porte sur la création et l'étude de surfaces antibactériennes.

La première partie de cet état de l'art sera dédiée à la présentation du mécanisme de la contamination des surfaces par les bactéries et les problématiques qui y sont associées. Dans une deuxième partie, nous exposerons les diverses stratégies existantes pour maîtriser la biocontamination des surfaces. Les polymères cationiques avec des ammoniums quaternaires et en particulier, les polyionènes sont reconnus pour leurs propriétés antibactériennes. La troisième partie sera donc consacrée à cette classe de polymère et aux quelques méthodes décrites pour greffer, de façon covalente, de tels polymères sur des surfaces.

A. La contamination bactérienne des surfaces

En 1676, Antonie Van Leeuwenhoek observait pour la première fois des micro-organismes à la surface de ses dents,¹ qu'il appela « animalcules », grâce à un microscope de son invention. De part cette découverte, on l'associe souvent au début de la recherche en microbiologie. Presque deux siècles plus tard, en 1838, le microbiologiste Christian Gottfried Ehrenberg baptisera ces micro-organismes du nom de « bactérie », un dérivé du mot grec βακτηριον [bakterion] qui signifie « bâtonnet ».

A.1 Les bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes. En effet, elles possèdent une enveloppe cellulaire avec un cytoplasme et des organites mais le matériel génétique n'est pas contenu dans un noyau (Figure I-1, b), contrairement aux eucaryotes. Les bactéries représentent d'ailleurs la majorité des cellules procaryotes existantes et constituent la première forme de vie apparue sur Terre il y a 4 milliards d'années. Elles peuvent mesurer de 0,5 à 3 μm de long et sont de formes diverses : sphères (coques), bâtonnets (bacilles) ou encore spiralés (Figure I-1, a et c). Sur l'enveloppe extérieure des bactéries, certaines possèdent des *pili* ou des flagelles qui facilitent leurs déplacements et peuvent intervenir lors de l'adhésion à une surface.

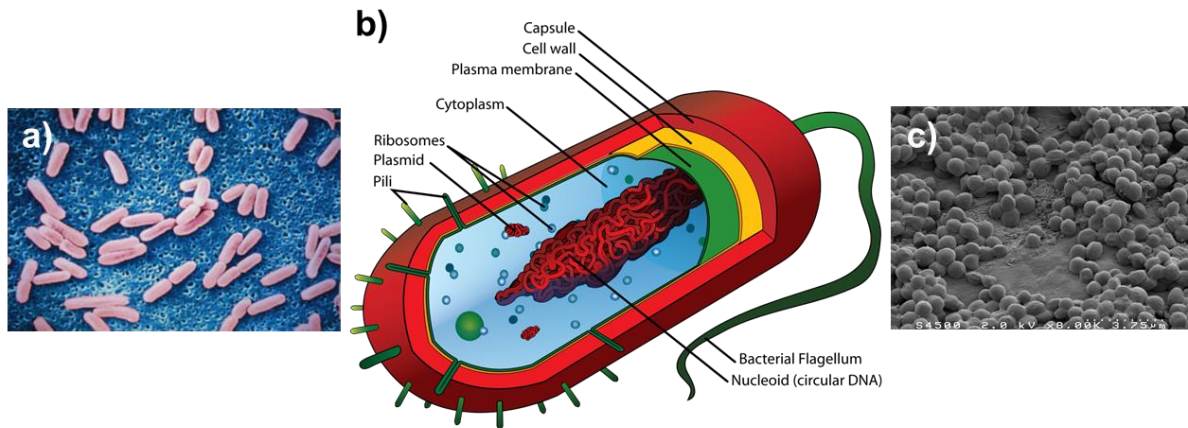


Figure I-1 : Structure générale d'une bactérie (b) et leurs différentes formes : bâtonnets (a), sphériques (c)
(Crédit image Mariana Ruiz Villareal, domaine public)

Les bactéries sont séparées en deux grandes classes suivant la structure de leur paroi cellulaire grâce au procédé de la coloration de Gram : Gram positif et Gram négatif. Ces deux types de paroi vont avoir une influence sur le comportement de la bactérie face à son environnement.² Les bactéries à Gram négatif possèdent quatre couches dans leur paroi cellulaire (membrane externe, un à deux peptidoglycanes, espace périplasmique et membrane plasmique). Ces

couches sont plus fines que celles des bactéries à Gram positif qui en possèdent trois (plusieurs peptidoglycane, espace périplasmique et membrane plasmique) (Figure I-2).



Figure I-2 : Schéma des parois d'une bactérie à Gram négatif et d'une bactérie à Gram positif

L'espace périplasmique est utilisé pour stocker des nutriments permettant à la bactérie de se développer. Le peptidoglycane maintient la forme de la bactérie en assurant une protection mécanique contre la pression osmotique. Des lipoprotéines sont présentes entre la membrane externe des bactéries à Gram négatif et la couche de peptidoglycane afin de maintenir le lien entre les deux couches. Les doubles couches lipidiques (Figure I-3) qui constituent les membranes plasmiques des bactéries à Gram positif et négatif ainsi que la membrane externe des bactéries à Gram négatif, sont composées de phospholipides, en particulier de phosphatidyléthanolamines (70% de sa composition). Ces phospholipides présentent un caractère amphiphile avec un pôle hydrophile vers l'extérieur de la couche et un pôle hydrophobe vers l'intérieur. Chez les cellules procaryotes, ce domaine hydrophile donne à la membrane plasmique une charge de surface négative à cause de la présence d'ions phosphates. Le contact entre la bactérie et la surface se faisant *via* la paroi, sa structure a donc une influence directe sur la biocontamination des surfaces.

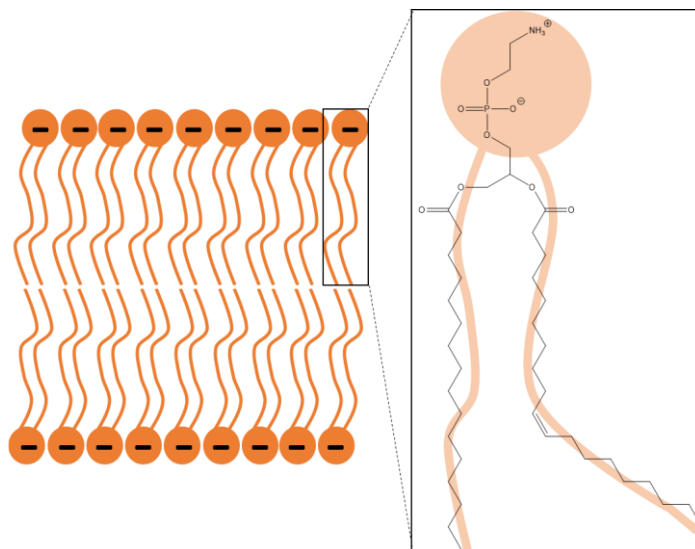


Figure I-3 : Schéma de la double couche lipidique et de la structure de la phosphatidyléthanolamine

Les bactéries interagissent avec d'autres organismes selon trois modèles : le mutualisme où la relation est bénéfique et profitable pour les deux organismes, comme dans le cas de la flore intestinale ; le commensalisme où la bactérie profite de l'environnement offert par l'hôte mais sans gêner celui-ci, comme dans le cas de la flore commensale (les bactéries présentes sur la peau) ; et enfin, le parasitisme où le développement des bactéries perturbe l'hôte, c'est le cas des maladies infectieuses.

A.2 De la bioadhésion au biofilm

Depuis la découverte d'Antonie Van Leeuwenhoek, les bactéries ont principalement été étudiées dans leur forme libre et planctonique, jusqu'à ce que les travaux d'Arthur Henrici,³ en 1933, et de Claude Zobell,⁴ en 1943, attirent l'attention sur l'existence d'interactions entre les micro-organismes et les surfaces. Il faudra cependant attendre 1987-88 pour que William Costerton⁵ mette en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces (végétales, animales, minérales ou de synthèse) et est constitué de populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, acides nucléiques, sucres et protéines : c'est ce que l'on appelle un « biofilm ». A partir des années 90, et après plus de trois siècles d'études des bactéries à l'état planctonique, le consensus est total dans la communauté scientifique, le mode de vie principal des bactéries est sessile (état adhérent sur une surface) et non planctonique.

A.2.1 Mécanisme de la biocontamination des surfaces

Dans un milieu liquide, les bactéries peuvent se présenter sous deux états : l'état planctonique, où la bactérie isolée se déplace librement, et l'état sessile, où les bactéries adhèrent, de façon isolée ou en communauté, sur une surface. La biocontamination des surfaces est le passage de la bactérie de l'état planctonique en solution à une structure bidimensionnelle puis tridimensionnelle sur la surface. Ce phénomène s'effectue en trois grandes étapes : le transport des bactéries sur la surface, la bioadhésion (2D) où les bactéries adhèrent sur la surface et la formation du biofilm (3D) où les bactéries se multiplient. La bioadhésion est constituée d'une adhésion réversible et d'une adhésion irréversible (Figure I-4, 1 et 2). Le biofilm se forme ensuite selon un mécanisme en trois étapes : la structuration, la maturation et la dispersion (Figure I-4, 3,4 et 5).⁶⁻⁸

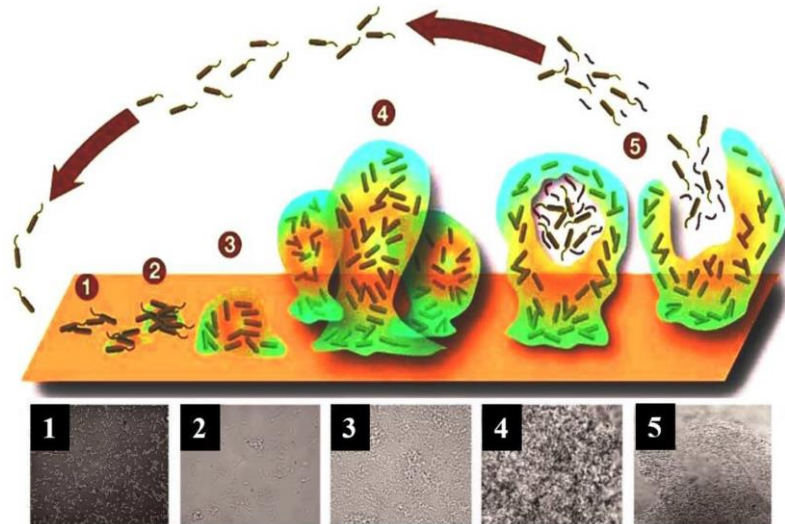


Figure I-4 : Mécanisme de la biocontamination d'une surface par *P. aeruginosa* accompagné par des observations au microscope optique : (1) adhésion réversible, (2) adhésion irréversible, (3) structuration, (4) maturation et (5) dispersion. Figure extraite des travaux de Verderosa et al.⁶

A.2.1.1 Le transport

Le transport de la bactérie sur le support s'effectue par des forces physiques (distance à la surface > 150 nm) comme la convection, la diffusion, la gravitation et le mouvement brownien⁹ mais aussi grâce à des appendices qui permettent à la bactérie de se mouvoir¹⁰ tels que des flagelles ou des *pili*. L'approche de la bactérie vers la surface est décrite par des forces réciproques qui dépendent de la distance.

A.2.1.2 La bioadhésion

Une fois sur la surface, les bactéries peuvent y adhérer, c'est le phénomène de bioadhésion. La bioadhésion correspond à une situation où la bactérie adhère intimement à une surface par des interactions physico-chimiques et cellulaires complexes.

L'adhésion réversible (Figure I-4, 1) est l'adhésion initiale qui s'effectue quand la bactérie est à quelques nanomètres de la surface. Le procédé de bioadhésion sur la surface débute par une première phase d'interactions physico-chimiques grâce aux propriétés intrinsèques de la bactérie dans son environnement telles que la charge électrique, le caractère hydrophile/hydrophobe, les forces d'attraction de van der Waals ou les propriétés acide/base de Lewis (liaisons hydrogènes).⁹ Dans la deuxième phase, les interactions moléculaires et cellulaires deviennent prédominantes. Celles-ci impliquent des interactions complexes entre la surface et des structures bactériennes de surface comme les *pili*, les capsules et les *fimbriae*.⁹ Ces interactions dépendent aussi des caractéristiques de la surface et des facteurs environnementaux comme la présence de protéines ou de substances biocides.⁹

L'adhésion irréversible (Figure I-4, 2) commence lorsque les bactéries produisent la matrice extracellulaire pour définitivement s'ancrer à la surface. La physiologie des bactéries devient alors le paramètre prédominant dans leurs interactions avec la surface. Le nombre de bactéries associées à la surface augmente de par leurs multiplications.

A.2.1.3 *Le biofilm*

Une fois qu'elles ont solidement adhéré sur la surface, les bactéries peuvent se multiplier et former un biofilm. La structuration du biofilm (Figure I-4, 3) s'effectue par la création de micro-colonies et l'expansion de la matrice extracellulaire. Les micro-colonies sont formées à la fois des bactéries initialement adhérentes qui se divisent, et des bactéries qui s'attachent au cours de la formation du biofilm.

La maturation du biofilm (Figure I-4, 4) entraîne la mise en place du mécanisme de communication entre les bactéries, appelé « quorum sensing »,¹¹ pour transformer les espaces entre les micro-colonies en canaux d'échanges des fluides nutritifs. Le biofilm et les micro-colonies se structurent en forme de piliers d'épaisseurs variables ou de champignons¹² au sein desquels les bactéries sont enveloppées dans la matrice extracellulaire.

La dispersion (Figure I-4, 5) est la dissémination d'une partie des micro-organismes du biofilm, qui retournent à l'état de bactéries planctoniques, afin d'aller coloniser de nouvelles surfaces. Cette étape peut être provoquée naturellement par les micro-organismes eux-mêmes¹² ou bien induite par un stress extérieur qui les poussent à chercher une nouvelle surface (manque de nutriments, surpopulation, destruction du biofilm). Le biofilm reste cependant le mode de vie privilégié des bactéries dans la nature alors que la phase de dispersion n'est qu'un passage permettant la dissémination vers des surfaces plus propices à leur développement.

A.2.2 Quelques généralités sur le biofilm bactérien

Le biofilm bactérien constitue un micro-consortium tridimensionnelle stable avec une matrice extracellulaire de composition variée en fonction des micro-organismes présents, de la température ou des nutriments disponibles.¹³ Il peut être constitué d'une ou plusieurs espèces et se former sur des surfaces naturelles ou artificielles.

La survie dans le biofilm des bactéries est assurée par la production d'une matrice extracellulaire composée jusqu'à 97% d'eau et de substances polymères extracellulaires produites par les micro-organismes eux-mêmes. Ces substances sont un mélange de polysaccharides (40 à 95%), de protéines (1 à 60%), d'acides nucléiques (1 à 10%) et de lipides

(1 à 40%).^{14,15} Les micro-organismes trouvent leurs sources nutritives dans la matrice extracellulaire de par la présence de composés carbonés, azotés et phosphorés.

La coexistence organisée entre les divers micro-organismes aux propriétés métaboliques différentes au sein du biofilm est possible par le mécanisme de communication de « quorum sensing »¹¹ qui leur permet d'échanger des informations sur le milieu environnant. Ainsi, l'apparition d'un stress pour l'une des espèces peut être signalée à l'ensemble des bactéries constituant le biofilm et prodiguer une meilleure défense face aux agressions externes. De plus, cette communication intra et inter-espèces permet l'organisation d'un réseau de canaux aqueux dans le biofilm afin d'acheminer l'oxygène, l'eau et les nutriments mais aussi de gérer l'évacuation des produits de dégradation.¹⁶

Malgré la présence du réseau de canaux, il existe au sein du biofilm des zones à teneur variable en oxygène et en nutriments que l'on peut identifier par des variations de pH. Les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments alors que celles proches des canaux ou de l'interface biofilm-liquide sont mieux oxygénées et alimentées en nutriments.¹⁷ Les biofilms les plus épais (jusqu'à 100 μm) s'organisent en fonction des types de métabolisme de chaque bactérie. Par exemple, les bactéries anaérobies se dirigent vers les couches plus profondes où l'oxygène est plus rare.¹⁸

Le biofilm ayant de nombreux effets positifs sur le développement des bactéries, il est le mode de vie privilégié de celles-ci et parfois même le mode de vie par défaut pour certaines espèces.¹⁹ La proximité des micro-organismes au sein des biofilms facilite la mise en place de symbiose entre les bactéries aux besoins métaboliques différents²⁰ et offre un meilleur accès aux nutriments.⁴ La formation du biofilm dépend de l'accessibilité en nutriments. Dans un milieu faible en nutriments, les bactéries restent sous la forme planctonique afin de chercher un environnement plus riche en nutriments pour y établir un biofilm.²¹

Le biofilm est donc caractérisé par une haute densité bactérienne, la production d'une matrice extracellulaire et sa croissance sur des surfaces. C'est un environnement structuré possédant une architecture complexe, très variable selon la nature des micro-organismes présents à l'intérieur et les conditions environnementales du milieu où il se forme. Les caractéristiques structurales et physico-chimiques du biofilm confèrent aux bactéries qui le composent des propriétés spécifiques de morphologie, de croissance, de communication et de résistance aux biocides, distinctes de celles des bactéries planctoniques.

A.3 Les problématiques liées à la biocontamination des surfaces

Dans la majorité des cas, la présence de bactéries sur des surfaces, en cellules adhérentes ou en biofilm, est inoffensive. Elles contribuent très largement au bon fonctionnement des écosystèmes en participant notamment au cycle du carbone et de l'eau. Elles sont essentielles à la dégradation de la matière organique, mais aussi au recyclage de l'azote, du soufre et de nombreux métaux. Cependant, dans certains cas minoritaires, elles peuvent avoir un impact négatif important sur des problématiques industrielles ou sur des problématiques de santé publique lorsqu'il s'agit de bactéries pathogènes.

A.3.1 Les problématiques de santé publique

Le rapport public du « National Institute of Health » des Etats-Unis (NIH) dévoile que la pose de dispositifs médicaux est à l'origine de 50% des infections microbiennes contractées en milieu hospitalier.²² Ces dispositifs constituent un excellent support pour l'adhésion des bactéries et le développement de biofilms.²³ A titre d'exemple, sur un dispositif à base de plastique, un biofilm de 1 µm peut se développer en seulement 24 h.²⁴ Ces cellules adhérentes ou ces biofilms engendrent de nombreux problèmes de santé dans diverses parties du corps comme des infections liées à la pose de cathéters²⁴ ou de prothèses. On estime que 5 à 10 % des prothèses implantées seront responsables d'infections dans les 10 ans qui suivent leurs poses.^{25,26} Ce taux est en hausse constante à cause du vieillissement de la population et de l'obésité. Ces deux facteurs altèrent la réponse immunitaire de l'organisme en cas d'infection.^{27,28} Dans le domaine cardio-vasculaire,²⁹ les prothèses à long terme comme les pacemakers et les valves cardiaques artificielles sont particulièrement vulnérables. L'origine de ces infections est due majoritairement à *Staphylococcus epidermidis* ou *Staphylococcus aureus*. Les bactéries peuvent engendrer un dysfonctionnement du dispositif implanté mais aussi diffuser dans d'autres organes du corps *via* le flux sanguin. Dans la majorité des cas, la seule solution efficace c'est le retrait du dispositif médical infecté.

Le rapport public du NIH stipule aussi que plus de 80% des infections microbiennes sont liées à la formation de biofilm.²² Les infections dues aux biofilms, contribuent de manière très importante aux infections nosocomiales. A titre d'exemple, *Pseudomonas aeruginosa* provoque des infections respiratoires.^{18,24} Au niveau de la cavité buccale, sur la plaque dentaire, *Streptococcus sobrinus* et *Streptococcus mutans* sont responsables de l'apparition de caries lorsque la flore buccodentaire est à pH acide.¹⁸ Dans le cadre agroalimentaire, de nombreuses bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et

Salmonella Typhimurium) sont ainsi à l'origine de divers problèmes dans le corps humain et peuvent engendrer des intoxications alimentaires.

A.3.2 Les problématiques industrielles et environnementales

Les bactéries sont la source de problèmes variés au niveau industriel. Dans l'industrie agroalimentaire, les bactéries d'altération telles que *Pseudomonas aeruginosa* vont dégrader l'odeur, la texture, le goût, et le visuel des aliments. En effet, malgré les bonnes pratiques d'hygiène mises en place dans ce domaine, les aliments sont toujours sujets à des contaminations naturelles lors des différentes étapes de transformation, en particulier pour les produits frais. Plusieurs espèces de *Bacillus* sont par exemple très fréquemment à l'origine de dégradation des produits laitiers. L'industrie laitière est aussi très touchée par la mammite bovine (40% des élevages) qui provoque une réaction inflammatoire sur les pis rendant impossible la récupération du lait. Ces infections provoquées par les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* et *Escherichia coli*, représentent chaque année de lourdes pertes économiques pour les éleveurs.³⁰

Les bactéries colonisent aussi régulièrement les systèmes d'injection d'eau et les tuyauteries. La bactérie *Legionella pneumophila* est connue pour coloniser les canalisations d'eau facilement. Dans un milieu pauvre en nutriments, elle développe une grande résistance au chlore, ce qui implique une exposition plus longue et plus concentrée à des biocides pour l'éliminer.³¹ Par exemple, dans l'industrie pétrolière, la présence de bactéries adhérentes ou de biofilms provoquent l'acidification du pétrole, ce qui le rend inutilisable. De même, la colonisation des systèmes d'eau est très répandue dans les cabinets dentaires. Une étude a montré que 25% des plateaux techniques, sur 35 systèmes évalués, étaient contaminés par des micro-colonies et des biofilms.³² La contamination des systèmes de ventilation et de distribution d'eau par les micro-organismes pathogènes contribue aussi à la prolifération de ces infections dans le milieu hospitalier ou agroalimentaire.³³ Les membranes de filtration, dans les systèmes d'épuration, sont également régulièrement obstruées par des bactéries, que celles-ci soient mortes ou vivantes.

La formation de biofilms sur les coques de navires, appelée « biofouling »,³⁴ conduit à une augmentation des forces de friction, une diminution de la vitesse de croisière et entraîne donc un surcoût énergétique. Les bactéries peuvent aussi contribuer aux problèmes de corrosion sur des surfaces métalliques.³⁴ Les bactéries anaérobies sont à l'origine de réactions chimiques corrosives, susceptibles d'endommager, d'obstruer et de contaminer durablement ces surfaces.

A.3.3 La difficile maîtrise de la biocontamination des surfaces

De manière générale, les agents antibactériens traditionnels comme les antibiotiques et les désinfectants se révèlent de moins en moins efficaces dans l'élimination des bactéries sur les surfaces de par l'émergence de souches résistantes. Cette meilleure résistance peut aussi être expliquée par la présence de la matrice extracellulaire, la physiologie des bactéries sur les surfaces et leur expansion perpétuelle.³⁵

La matrice extracellulaire protège les bactéries contre les agressions de l'environnement et les rend plus résistantes aux radiations ultraviolettes, au pH, à l'osmolarité, l'oxydation, mais aussi à la prédation, aux agents antimicrobiens et aux agents de la défense immunitaire.^{13,33} Sous forme de biofilms, certaines bactéries peuvent tolérer des concentrations en antimicrobiens 100 à 1000 fois supérieures à leurs homologues à l'état planctonique.³⁶ On suppose que la matrice agit comme une barrière de diffusion vis-à-vis des molécules toxiques. Les composés de la matrice se lient aux antimicrobiens, les empêchant ainsi de diffuser à l'intérieur et d'avoir une action en profondeur. La matrice extracellulaire fait aussi office de barrière au système immunitaire de l'hôte. Elle empêche la reconnaissance des antigènes bactériens par les anticorps.¹² Une fois le biofilm formé, il empêche, de par sa taille, le fonctionnement du processus de phagocytose. La communication par le mécanisme de « quorum sensing »³⁷ permet aux bactéries d'adopter un comportement de communauté, en réponse à la densité cellulaire, et donc une meilleure organisation vis-à-vis des agressions externes. Les bactéries ont la possibilité de se transférer des informations par échange direct d'ADN. Cet échange s'effectue par contact physique, *via* les *pili* de conjugaison. Le biofilm augmente ces probabilités de contact entre bactéries dans un environnement protégé et ainsi il facilite l'accès à l'acquisition de gènes de résistance aux antimicrobiens.^{38,39} Enfin, la difficulté de traitement réside aussi dans le fait d'une expansion perpétuelle des zones infectées par la multiplication des bactéries. Les bactéries vont coloniser de plus en plus de surface au cours de la phase de dispersion, tout en conservant les caractéristiques acquises au sein de leur précédent biofilm comme la résistance aux antimicrobiens.^{39,40}

Une fois qu'elles ont adhéré, les bactéries sont donc très difficiles à éliminer par des traitements et des procédés de désinfection classiques. Elles sont de plus en plus résistantes et tolérantes à de nombreux stress (dessiccation, carence en nutriments, exposition aux acides ou aux agents antibactériens). Pour lutter contre la contamination bactérienne des surfaces, une stratégie alternative consiste à traiter le problème en amont, au stade de la bioadhésion, et de privilégier

des traitements préventifs pour améliorer les traitements curatifs. Dans l'idéal, il faut créer des surfaces capables de tuer les bactéries ou tout du moins, d'empêcher ou de perturber cette étape de bioadhésion. Cette perturbation provoque une modification physiologique des bactéries en surface qui va aussi entraîner des modifications dans la structuration du biofilm et donc potentiellement faciliter leur élimination.

B. Les stratégies préventives pour maîtriser la biocontamination

Le domaine des surfaces antimicrobiennes a connu un essor rapide durant les dernières décennies et est devenu un des domaines les plus étudiés dans les biomatériaux. Cet intérêt croissant est notamment dû à l'incidence très importante des infections nosocomiales, résultat de l'explosion des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (Figure I-5). L'adhésion des bactéries sur une surface dépend de nombreux facteurs, les plus importants étant les propriétés physico-chimiques de la bactérie, de la surface et du milieu dans lequel s'effectue l'adhésion. Une des approches les plus efficaces pour limiter voire inhiber l'adhésion microbienne sur des surfaces est donc la modification chimique de surface. Cependant, il est important de noter que malgré une diminution notable de l'adhésion microbienne, aucune méthode actuellement ne peut empêcher complètement cette adhésion bactérienne et la formation de biofilm. Dans la littérature, il existe deux stratégies principales pour empêcher la biocontamination d'une surface : la stratégie antiadhésive qui consiste à empêcher la bactérie d'adhérer sur la surface et la stratégie bioactive qui consiste à tuer ou à inhiber la croissance de la bactérie par contact direct sur la surface ou à travers le relargage d'agents actifs depuis la surface.

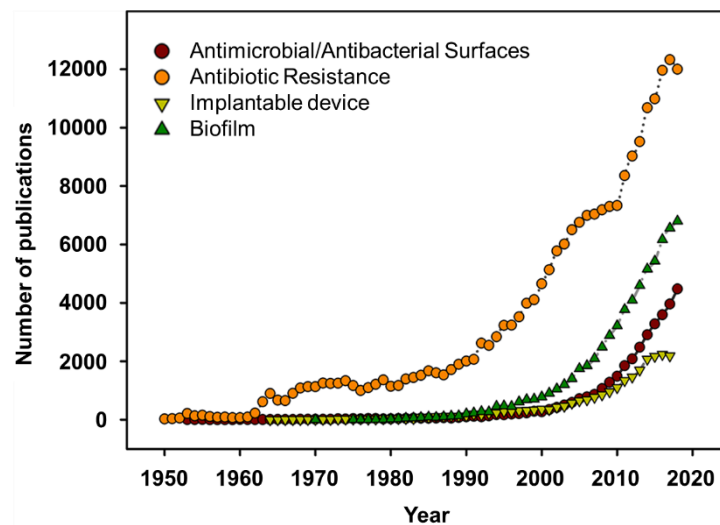


Figure I-5 : Evolution dans le temps du nombre de publications liées aux problématiques des infections microbiennes⁴¹

B.1 Stratégie antiadhésive

La stratégie antiadhésive permet de retarder ou d'empêcher l'adhésion des bactéries sur les surfaces et donc de perturber l'étape de bioadhésion. En revanche, elle ne provoque pas la mort des bactéries, ce qui limite son efficacité. Les propriétés physiques d'une surface peuvent jouer un rôle dans la limitation de l'adhésion bactérienne comme la topographie,⁴² l'hydrophobie ou la charge globale de surface (Figure I-6).^{9,43}

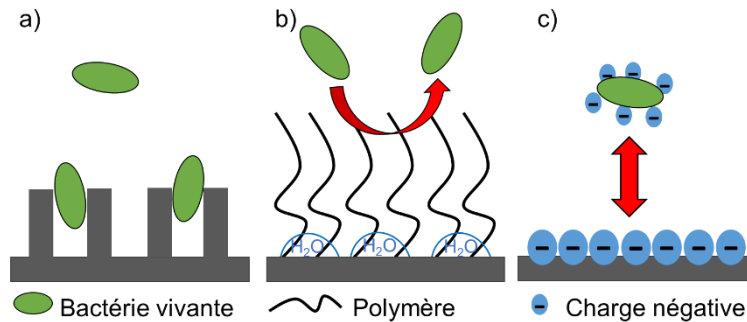


Figure I-6 : Schéma des stratégies antiadhésives : a) topographie, b) hydrophobie, c) charge de surface

B.1.1 Topographie

Des différences de colonisation sur des surfaces modifiées chimiquement de façon équivalente ont mis en lumière le fait que la topographie de surface a une influence sur les interactions entre bactéries et surfaces.⁴⁴ Depuis, la corrélation entre adhésion bactérienne et topographie est très étudiée.^{45,46} Moduler la topographie de surface, *via* par exemple des procédés de gravure laser, permet d'avoir une efficacité à long terme avec un faible impact écologique et environnemental. L'objectif est de développer des motifs bien définis sur les surfaces afin d'influencer l'adhésion et la formation du biofilm en l'absence d'agents antimicrobiens.⁴¹

Les surfaces à topographie ordonnée s'inspirent des surfaces animales et végétales comme la peau de requin⁴⁷ ou la feuille de lotus.⁴⁸ Dans la plupart des études, on a montré que des motifs de taille sub-micrométrique ou micrométrique peuvent minimiser l'adhésion des bactéries bien que la topographie n'a pas d'influence sur la viabilité des bactéries adhérentes.⁴² Diaz *et al.*⁴⁹ ont montré que *Pseudomonas fluorescens* forment des agrégats bien définis sur des surfaces d'or avec des grains de 50 à 100 nm de diamètre, orientés de façon aléatoire, mais pas sur des surfaces d'or ordonnées avec des stries de 1,3 μm de profondeur et de 120 nm de large. L'alignement forcé provoqué par les stries entrave les interactions entre bactéries et empêche la formation du biofilm.

On peut aussi influencer la mobilité bactérienne et la répartition sur les surfaces avec des motifs topographiques ajustés aux diamètres des bactéries. Yang *et al.*⁵⁰ ont réalisé des motifs en forme d'alvéoles (nid d'abeille) en variant la taille des pores. Ils ont constaté que pour des pores de 1 μm , donc un diamètre comparable à la taille d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, cette structure permettait l'isolement des bactéries, retardant ainsi la colonisation sur la surface et la formation du biofilm. A l'opposé, des motifs de 0,5 μm ne réussissaient pas à piéger les bactéries et des motifs de 3 à 10 μm avaient un effet d'inhibition graduellement moins efficace à mesure que l'on augmentait la taille des pores d'alvéole, les pores les plus grands favorisant la formation d'agrégats. Il est important de noter que ce type de surfaces ne fait que retarder la formation du biofilm par rapport à une surface plane pendant les premières heures. Les bactéries adhérentes s'accumulent sur ces motifs et le biofilm est formé au bout d'une période plus ou moins longue, typiquement 24 h.

B.1.2 Hydrophobie et charge de surface

Le greffage de molécules sur les surfaces est un moyen efficace pour générer des surfaces antiadhésives. Le design de surface hydrophile/hydrophobe avec des polymères est l'une des stratégies les plus courantes.⁵¹ En règle générale, les bactéries hydrophobes adhèrent plus facilement sur des surfaces hydrophobes et inversement, les bactéries hydrophiles adhèrent mieux sur des surfaces hydrophiles.⁹ Il y a cependant d'autres paramètres (appendices, liquide suspendant...) qui rentrent en compte lors de l'adhésion bactérienne sur des surfaces, et par conséquent, cette règle ne s'applique pas si facilement. Il est possible d'intervenir sur la charge de surface du substrat pour limiter l'adhésion bactérienne. En effet, dans un milieu liquide, cette propriété est liée au caractère hydrophile/hydrophobe de la surface. Une surface chargée en milieu hydraté aura tendance à attirer les molécules d'eau et donc à rendre la surface plus hydrophile. Ces deux propriétés de surface peuvent être dissociées mais sont souvent liées pour expliciter leurs mécanismes antiadhésifs.^{9,52}

Une étude a montré que les flagelles bactériens favorisent l'adhésion bactérienne à des surfaces hydrophobes.⁵³ En rendant une surface très hydrophile, on donc peut limiter l'adhésion bactérienne.⁵⁴ La majorité des revêtements antiadhésifs hydrophiles sont obtenus en greffant de façon covalente des brosses polymères, de type polyéthylène glycol,^{55,56} polyoxazoline⁵⁷ ou polyacrylamide.⁵⁸ Les bactéries s'approchent du film formé de brosses polymères attachées de façon covalente à la surface, ce qui provoque une compression des chaînes polymères engendrant une gêne stérique et une force de répulsion élastique. Cette barrière stérique empêche l'adhésion microbienne sur la surface modifiée. De plus, l'approche des bactéries

provoque le retrait de molécules d'eau dans les chaînes de polymère hydratées durant la compression, ce qui entraîne localement une pression osmotique instable. Cette variation de pression génère alors une force répulsive qui dépend de la densité de greffage et de la longueur des chaînes polymères.⁵⁹ A l'inverse, on peut aussi utiliser des revêtements hydrophobes pour limiter l'adhésion des bactéries. Les revêtements hydrophobes peuvent diminuer l'affinité des protéines de la membrane bactérienne pour la surface et ainsi limiter l'adhésion. Lepoittevin *et al.*⁶¹ ont ainsi montré que les adhésions de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* étaient nettement diminuées sur des surfaces fluorées.

Dans des conditions de faibles forces ioniques, certaines surfaces réalisées avec des polyélectrolytes possèdent des propriétés antiadhésives de par leur charge de surface comme des polymères à base d'héparine.⁶⁰ Les revêtements d'héparine confèrent une charge négative aux surfaces, ce qui résulte en une adhésion réduite des bactéries par répulsion électrostatique (la surface des bactéries étant généralement chargée négativement). Il faut cependant noter que l'héparine est aussi hydrophile et donc la présence de molécules d'eau contribue aux propriétés antiadhésives de l'héparine.

B.2 Stratégie bioactive

La stratégie antiadhésive, bien que largement étudiée et déjà employée dans certains domaines, peut se révéler moins efficace qu'une stratégie impliquant une action bactéricide pour limiter l'adhésion bactérienne. Parmi les stratégies bioactives, on distingue deux cas : la stratégie « release killing », qui consiste à relarguer des agents antimicrobiens qui vont tuer les bactéries au voisinage de la surface, et la stratégie « contact killing », qui fixe des agents antimicrobiens ou possède une topographie particulière sur la surface, qui va entraîner l'inhibition ou la mort des bactéries lorsque celles-ci entrent en contact direct avec la surface (Figure I-7).

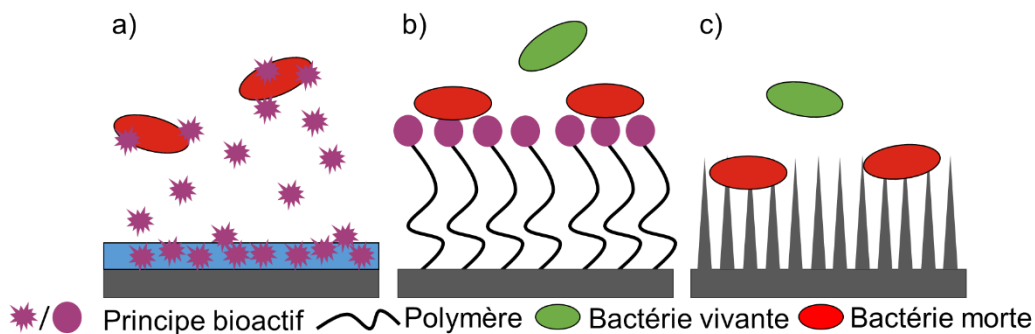


Figure I-7 : Schéma des stratégies bioactives : a) « release killing », b) « contact killing » avec agents antibactériens, c) « contact killing » par topographie

B.2.1 Stratégie « release killing »

Un revêtement « release killing » émet des principes actifs biocides divers. L'effet antibactérien est atteint par la diffusion de ces agents biocides selon leurs différents mécanismes d'action. Pour créer des surfaces « release killing », les principes bioactifs peuvent être introduits en masse (« bulk ») dans une matrice, adsorbés ou bien déposés sur la surface par pulvérisation (« spray ») ou immersion (« deep coating »). Ils sont incorporés dans de multiples matériaux tels que des matrices polymères,⁶² des couches de polyélectrolytes⁵² ou des hydrogels.⁶³ Ces revêtements ont l'avantage d'avoir une action localisée importante au voisinage de la surface libre du film où les molécules sont libérées, avec une action plus faible à mesure que l'on s'éloigne de la surface.

B.2.1.1 *Les agents antimicrobiens*

Des substances classiques et peu nocives comme des antibiotiques,⁶⁴ des huiles essentielles,^{65,66} ou des petites molécules organiques⁶⁷ peuvent être utilisées comme agents antibactériens. Le relargage de ces molécules peut cependant entraîner une toxicité, des problèmes environnementaux ou dans le cas d'un emballage de produits frais, une altération de la fraîcheur ou du goût lors de l'utilisation d'huiles essentielles par exemple. De plus, la présence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques rend leur utilisation peu adaptée. D'autre part, les molécules organiques résistent généralement très peu à des procédés industriels haute température (au-delà de 200°C) comme les procédés d'extrusion des films plastiques.

Les peptides antimicrobiens⁶⁸ sont également des composés antibactériens intéressants puisqu'ils possèdent un large spectre d'action contre les bactéries, les virus et certains parasites. Contrairement aux antibiotiques qui agissent sur certaines protéines présentes dans la membrane bactérienne, le mécanisme d'action proposé pour les peptides repose sur une perturbation de la membrane. Les peptides antimicrobiens avec une structure cationique amphiphile interagissent avec les membranes des bactéries chargées négativement. Cette interaction biophysique provoque une désorganisation et une déstabilisation de la membrane avec une fuite du cytoplasme entraînant la mort de la bactérie.⁶⁹ L'efficacité et le mécanisme varient selon la structure du peptide et la cible.⁷⁰ La grande diversité des mécanismes d'action des peptides antimicrobiens assure une faible probabilité que les bactéries développent des résistances vis-à-vis de ces composés. Pour l'instant, l'optimisation et l'usage clinique de ces peptides sont limités par un manque de compréhension de tous les mécanismes impliqués.⁷¹ De plus, les peptides peuvent être endommagés par les enzymes de l'hôte dans le cas d'implants ou altérés pour certains pH ou conditions osmotiques.⁷²

Des bactéricides très utilisés pour leur grande efficacité sont les composés inorganiques comme l'argent,⁷³ le cuivre,⁷⁴ l'oxyde de zinc⁷⁵ ou l'oxyde de titane.⁷⁶ Les composés à base d'argent affectent le système respiratoire des micro-organismes mais le mécanisme exact reste cependant encore incertain.⁷⁷ Les nanoparticules d'argent sont particulièrement efficaces⁷⁸ de par leur petite taille qui facilite la pénétration dans la bactérie. La grande surface spécifique des nanoparticules favorise aussi leurs interactions avec la surface cellulaire. Enfin, les ions Ag^+ libérés peuvent réagir avec des biomolécules de la membrane bactérienne contenant du phosphore et du soufre. Il est important de soulever les inquiétudes vis-à-vis de la toxicité des nanoparticules d'argent. Cette cytotoxicité a été justement reliée au relargage des ions Ag^+ qui peuvent conduire à un stress oxydatif pour les cellules.⁷⁹ Néanmoins, en considérant que la concentration minimum en argent pour avoir un effet cytotoxique sur les cellules est bien plus grande que la concentration nécessaire pour tuer des bactéries, leur utilisation reste envisageable. Cependant, le manque de recul sur la toxicité des nanoparticules en général⁸⁰ empêche pour l'instant la mise sur le marché de tels revêtements, notamment dans les domaines médical et agroalimentaire. De même, les nanotubes de carbone sont aussi étudiés pour leurs propriétés bioactives,⁸¹ mais leur possible toxicité impose un principe de précaution et des études plus poussées, avant de permettre leur utilisation dans des domaines grand public.

B.2.1.2 Le contrôle du relargage

Les agents antimicrobiens les plus efficaces sont également ceux qui peuvent induire une toxicité sur les cellules eucaryotes en fonction de la concentration. Suivant les domaines d'application visés, comme le médical ou l'alimentaire, les quantités relarguées peuvent devenir problématiques. De plus, ce type de revêtement possède une action antimicrobienne à court terme, puisque les agents antimicrobiens agissent, que les bactéries soient présentes ou non. Les chercheurs ont donc réfléchi à des moyens de contrôler ce relargage afin d'en limiter la toxicité mais aussi de conférer une action plus durable dans le temps à ces revêtements.

La libération de l'agent antimicrobien peut se faire de façon contrôlée en installant une barrière à l'intérieur du film qui entrainera une libération plus tardive. Par exemple, on peut utiliser des barrières d'argile,⁸² des supports de montmorillonite ou de SiO_2 ⁸³ pour ralentir la diffusion de l'argent. Le développement de la technologie plasma permet de créer des films polymères capables de libérer des composés actifs de manière régulée comme les ions Ag^+ .⁸⁴ Malgré les efforts faits dans ce sens, les quantités de molécules libérées restent difficilement contrôlables, entraînant des effets secondaires indésirables. Le groupe d'Abbott⁸⁵ a ainsi démontré que les

quantités libérées de chlorhexidine (antiseptique) par des surfaces « release killing » étaient proches de la limite cytotoxique du produit malgré le contrôle du relargage.

B.2.2 Stratégie « contact killing »

On peut contourner le problème principal de la stratégie « release killing », c'est-à-dire l'absence de maîtrise sur les espèces relarguées, avec des revêtements « contact killing ». La lyse de la bactérie est provoquée par son contact direct avec la surface à cause d'une topographie particulière ou du greffage sur la surface d'un agent antibactérien. Les modes d'actions sont très diverses selon les types de surfaces et/ou les principes actifs greffés.

B.2.2.1 Topographie nanométrique

L'amélioration des techniques d'observation à l'échelle nanométrique permet maintenant d'étudier en profondeur l'adhésion des bactéries sur des topographies faites de nano-motifs.⁸⁶ Des surfaces avec des pics ou piliers nanométriques, qui sont donc plus petits que la taille des bactéries, peuvent endommager les membranes et induire la mort des bactéries.

Le groupe d'Ivanova⁸⁷ a été le premier à expliquer ce phénomène en étudiant les propriétés antibactériennes des ailes de cigales. Ces ailes possèdent des nano-piliers réguliers (200 nm de haut, 100 nm de diamètre à la base, 60 nm de diamètre au sommet) avec des espaces quasi hexagonaux de 170 nm. Dans leurs travaux, les nano-piliers ont lysé les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* au contact en seulement 5 minutes. L'ajout d'un dépôt d'or sur la surface n'a pas changé ses propriétés antimicrobiennes, ce qui permet de supposer que son efficacité est due à ses propriétés physiques. Après des tests sur plusieurs types de bactéries, il en résulte que les surfaces fonctionnent bien sur les bactéries à Gram négatif mais n'ont aucun effet sur les bactéries à Gram positif. Le mécanisme d'action sur les bactéries à Gram négatif a été démontré sur la base de modèles biophysiques.⁸⁸ La paroi bactérienne (composée de peptidoglycanes) entre les nano-piliers se rompt par compression jusqu'à un point de rupture. Les forces de van der Waals et la gravité semblent aussi participer au mécanisme de rupture. La paroi plus rigide et plus épaisse des bactéries à Gram positif offre plus de résistance à ces nanostructures et contribue à les protéger.

Des propriétés analogues ont été observées sur les ailes des libellules.⁸⁹ Dans ce cas-ci, les nano-piliers sont de hauteur et de forme variable avec une distribution spatiale aléatoire. Ces structures peuvent entraîner la mort cellulaire des bactéries à Gram négatif et positif. Le mécanisme proposé pour ces nano-piliers est le suivant :⁹⁰ les nano-piliers interagissent avec les substances polymères extracellulaires sans pénétrer la membrane. La membrane externe et

la membrane cytoplasmique commencent à se séparer à cause de la force de cisaillement produite par l'immobilisation des micro-organismes quand ils essaient de migrer de la surface. Cela entraîne une rupture de la membrane et une fuite du contenu de la bactérie.

B.2.2.2 Greffage chimique covalent

La plupart des agents antimicrobiens présentés dans la stratégie « release killing » peuvent être immobilisés sur des surfaces avec un greffage chimique covalent. Cette opération permet dans la majorité des cas de conserver l'activité antimicrobienne tout en évitant le relargage des agents dans l'hôte ou l'environnement.

Les nanoparticules d'argent peuvent être immobilisées sur des surfaces. Des surfaces de titane avec des nanoparticules d'argent immobilisées par des citrates ont démontré une action antibactérienne.⁹¹ La perturbation de la membrane a été mise en évidence sur les bactéries à Gram négatif mais pas sur les bactéries à Gram positif. Les protéines portant des thiols et des phospholipides, qui possèdent une grande affinité pour l'argent et qui sont présentes sur les membranes des bactéries à Gram négatif, peuvent expliquer cet effet. De plus, les membranes des bactéries à Gram négatif sont moins rigides et peuvent être plus sensibles à l'action de l'argent.⁹² Cependant, lorsque les nanoparticules d'argent sont immobilisées sur des surfaces, le relargage de matériels extracellulaires gêne leur action et diminue leur efficacité à long terme.

Il est aussi possible de greffer sur des surfaces des antibiotiques tout en conservant leur effet antimicrobien.⁹³ De même, il est intéressant de greffer des peptides antimicrobiens puisqu'ils possèdent un large spectre d'action sur les bactéries, un risque limité de résistance et une faible cytotoxicité.⁹⁴ Toutefois, de nombreux paramètres sont à prendre en compte afin de conserver l'activité des peptides antimicrobiens une fois qu'ils sont greffés sur la surface. La conformation du peptide sur la surface peut être déterminante pour le maintien de son activité biologique. Haynie *et al.* ont démontré qu'une fois greffés sur la surface, seuls les peptides qui avaient conservé une conformation tridimensionnelle en hélice α possédaient une activité antimicrobienne.⁹⁵ De plus, il est souvent nécessaire d'ajouter un espaceur entre les peptides et la surface afin de maximiser leurs efficacités. Cet espaceur apporte la mobilité nécessaire aux peptides pour se positionner dans l'arrangement qui favorise l'interaction avec la membrane bactérienne.⁹⁶ Selon l'amplitude de mobilité accordé par l'espaceur, le mécanisme d'action des peptides peut être différent.⁹⁷

Dans ce contexte, les polymères antimicrobiens sont particulièrement intéressants car ils possèdent une plus grande flexibilité que les peptides même une fois greffés. Parmi eux, les polymères cationiques,⁹⁸ et en particulier ceux qui possèdent des groupements comme les sels

d'ammonium quaternaire, sont très utilisés pour réaliser des surfaces « contact killing ».⁹⁹⁻¹⁰¹ Les composés à base d'ammoniums quaternaires sont reconnus depuis longtemps comme de bons agents antimicrobiens.¹⁰² Ils sont capables de perturber les membranes cytoplasmiques des bactéries en leur faisant perdre leur organisation et leur intégrité, ce qui provoque la fuite du contenu et la lyse de la bactérie.^{103,104} La mobilité des polycations au sein du revêtement est un paramètre important pour conserver les propriétés antimicrobiennes sur la surface. Celles-ci peuvent être affectées par la masse molaire du polymère ou le pH du milieu environnant.¹⁰⁵ Les composés à base d'ammoniums quaternaires montrent aussi une cytotoxicité vis-à-vis des cellules eucaryotes qui est dépendante de la concentration. Pour les utiliser en tant qu'agents antimicrobiens, il faut donc trouver une concentration satisfaisante qui permet d'avoir un effet antibactérien sans effet cytotoxique.

La stratégie antiadhésive, bien que très répandue, n'est pas adaptée pour répondre à notre problématique. En effet, cette stratégie ne provoque pas la mort de la bactérie, celle-ci est donc libre d'aller coloniser une autre surface non protégée. Dans le cas d'un emballage alimentaire, qui est un système clos, l'effet antiadhésif va entraîner une adhésion des bactéries sur le produit alimentaire et le détériorer. La stratégie « release killing », de par sa nature, ne peut pas non plus être envisagée car le relargage des espèces antimicrobiennes peut induire une dégradation du produit alimentaire voire une toxicité pour le consommateur. Le choix se porte donc sur la mise en place d'une stratégie « contact killing » par le greffage covalent d'agents antimicrobiens. Les revêtements bioactifs avec des espèces greffées de façon covalente sont une approche efficace pour limiter la toxicité résiduelle, tout en apportant des propriétés antibactériennes sur des surfaces plastiques. En effet, les matériaux d'intérêt ici sont des films plastiques contenant majoritairement du polyéthylène (PE). Par conséquent, il n'est pas envisageable de provoquer la lyse des bactéries en jouant sur la topographie de surface.

Nous avons choisi de greffer des polymères bioactifs car ils possèdent une activité à long terme avec une forte stabilité chimique et une meilleure tenue en température par rapport aux petites molécules organiques. Contrairement aux nanoparticules d'argent, ils conservent toute leur efficacité une fois greffés sur les surfaces et leur utilisation dans des domaines grand public comme l'alimentaire sont envisageables. Enfin, leur efficacité antimicrobienne en surface n'est pas dépendante d'une conformation particulière comme cela peut être le cas pour les peptides antimicrobiens. De par leur nature, les chaînes polymères possèdent déjà la mobilité nécessaire pour une interaction efficace avec les membranes bactériennes.

C. Les polycations avec des ammoniums quaternaires

Parmi les divers polymères synthétiques exprimant une activité antibactérienne par nature, les polycations avec des ammoniums quaternaires sont les plus répandus. En effet, la membrane plasmique des bactéries est chargée négativement à cause de la présence de phosphatidyléthanolamine qui constitue 70% de sa composition. Les polymères antimicrobiens chargés positivement sont donc capables d'interagir efficacement avec la membrane bactérienne. Les ammoniums quaternaires sont souvent liés à des segments aliphatiques hydrophobes, ce qui confère un caractère amphiphile aux polycations. Cette balance amphiphile, avec des charges positives hydrophiles et des groupes aliphatiques hydrophobes, augmente la concentration en groupes biocides à proximité de la membrane bactérienne.

C.1 Mécanisme d'inhibition sur les bactéries

Le mécanisme d'action des molécules biocides cationiques sur des bactéries est décrit selon la séquence suivante : (1) adsorption sur la surface de la paroi bactérienne, (2) diffusion à travers la paroi bactérienne, (3) liaison avec la membrane cytoplasmique, (4) perturbation de la membrane cytoplasmique, (5) relargage du contenu du cytoplasme comme des ions K^+ et de l'ADN, ce qui provoque (6) la mort de la bactérie.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Il est généralement admis que le mécanisme d'action des polycations avec des ammoniums quaternaires (Figure I-8) peut être décrit de la même manière, puisque les mêmes événements physiologiques lors des étapes (1), (3) et (5) ont été observés pour des polycations biocides.¹⁰⁹⁻¹¹²

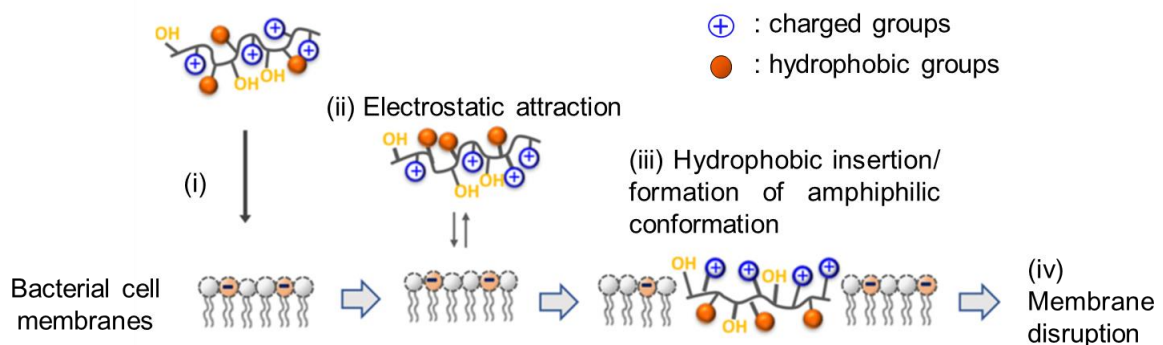


Figure I-8 : Mécanisme d'action antibactérienne des polycations avec des ammoniums quaternaires et des segments hydrophobes¹¹³

Les charges positives du polymère interagissent de façon destructive avec la membrane cellulaire et/ou la membrane cytoplasmique.¹¹² Elles sont attirées par la membrane des bactéries chargée négativement (Figure I-8, i), engendrant une interaction électrostatique entre les deux

entités (Figure I-8, ii). Après cette approche, la chaîne polymère s'associe à la membrane de la bactérie et les parties hydrophobes vont venir s'insérer à l'intérieur de celle-ci (Figure I-8, iii). Cette association va perturber l'équilibre de la membrane, provoquant sa déstabilisation et la fuite du contenu du cytoplasme, ce qui entraîne la lyse de la bactérie (Figure I-8, iv).

Les macromolécules peuvent interagir de façon plus efficace avec les bactéries à Gram positif.¹¹⁴ La couche externe de polyglycane est suffisamment peu compacte, ce qui facilite la pénétration profonde de la chaîne polymère à l'intérieur de la cellule et l'interaction avec la membrane cytoplasmique. A l'opposé, les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane supplémentaire, la membrane externe, avec une double couche de phospholipides qui protège plus efficacement la membrane cytoplasmique contre l'action des polymères biocides.

C.2 Une grande famille de polymères

Au sein des polycations amphiphiles, les polymères avec des ammoniums quaternaires sont les plus explorés.¹¹⁴ Ces ammoniums quaternaires peuvent être formés par une réaction post-synthèse sur le polymère et sont généralement présents en chaîne pendante. On peut aussi les synthétiser directement lors de la réaction de polymérisation du polymère, et ils se situent alors dans le squelette de la chaîne.

C.2.1 Cycles aromatiques et hétérocycles

La plupart des polymères cationiques amphiphiles avec des ammoniums quaternaires contiennent des cycles aromatiques ou des hétérocycles dans leurs structures. Il s'agit en général de dérivés de la poly(vinylpyridine)¹¹⁵ ou du polystyrène (PS).¹¹⁶ Ces dérivés sont composés de segments aliphatiques plus ou moins longs en chaînes pendantes pour apporter l'hydrophobie nécessaire à un pouvoir antibactérien efficace. La poly(4-vinylpyridine) (P4VP) possède une pyridine réactive qui peut être quaternisée en pyridinium et conférer des propriétés antibactériennes au polymère. Sambhy *et al.*¹¹⁷ ont décrit la préparation de deux séries de polymères cationiques amphiphiles basées sur des copolymères pyridinium-méthacrylate en faisant varier la position et la longueur d'un segment alkyle R (Figure I-9). Les copolymères ont été synthétisés par polymérisation radicalaire conventionnelle et possèdent des masses molaires similaires, comprises entre 27 000 et 33 000 g.mol⁻¹. L'activité antimicrobienne des polymères a été déterminée par une mesure de concentration minimale d'inhibition (CMI) sur une bactérie à Gram négatif *Escherichia coli* (*E. coli*) et une bactérie à Gram positif *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). La série B (Figure I-9) présente des CMI plus faibles sur les deux souches

étudiées pour l'ensemble des longueurs de segments synthétisées, indiquant que l'effet antibactérien est meilleur lorsque le segment hydrophobe est éloigné de la charge positive dans le cas de ces copolymères.

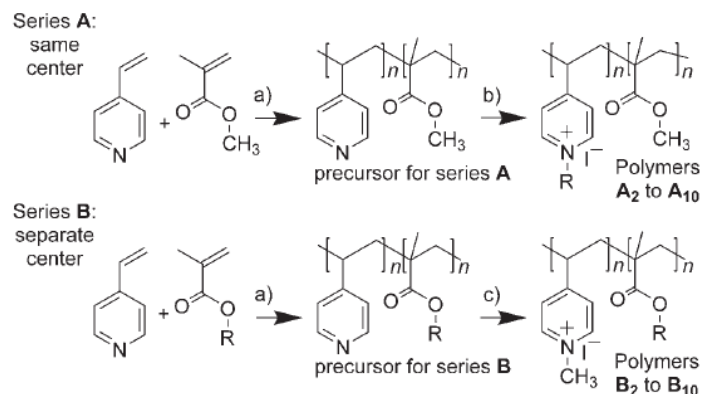


Figure I-9 : Copolymères pyridinium-méthacrylate ($R = \text{éthyle, propyle, butyle, hexyle, octyle, decyle}$) synthétisés par Sambhy *et al.*¹¹⁷

Les CMI les plus faibles pour la série B sont atteintes pour $R = \text{butyle}$ à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sur *E. coli*, et $R = \text{hexyle}$ à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sur *B. subtilis*. En dépit de leur efficacité biocide, les poly(vinylpyridine) présentent une faible biocompatibilité, ce qui limite leur utilisation dans des applications biomédicales. L'incorporation de parties plus hydrophiles dans le polymère par copolymérisation est une méthode pour améliorer à la fois la biocompatibilité et l'efficacité antimicrobienne.¹¹⁸

C.2.2 Acrylates et méthacrylates

Les dérivés de polymères acrylates et méthacrylates sont souvent utilisés en tant que polycations antimicrobiens. Une grande partie d'entre eux est synthétisée à partir de monomères méthacrylates commerciaux tel que le méthacrylate de 2-(diméthylamino) d'éthyle (DMAEMA). L'ammonium quaternaire est en général obtenu par une réaction de méthylation avec des halogénoalcanes. Une grande variété d'homopolymères et de copolymères peut être préparée à partir de ces composés en faisant varier le taux de charges positives et l'hydrophobie, afin d'optimiser les propriétés antimicrobiennes. Lu *et al.*¹¹⁹ ont synthétisé des dérivés du DMAEMA avec des groupes alkyles de longueurs différentes (Figure I-10).

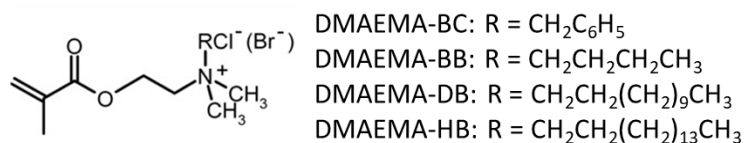


Figure I-10 : Monomères DMAEMA avec différents groupes alkyles synthétisés par Lu *et al.*¹¹⁴

Le DMAEMA-BC a été préparé avec le chlorométhyl benzène (BC), le DMAEMA-BB avec le 1-bromobutane (BB), le DMAEMA-DB avec le 1-bromododécane et le DMAEMA-HB avec le 1-bromohexadécane. Ils ont ensuite réalisé la polymérisation radicalaire conventionnelle des méthacrylates pour obtenir les polymères correspondants avec des chaînes alkyles de longueurs variables sur les ammoniums quaternaires. Le poly(DMAEMA-BC) et le poly(DMAEMA-BB) montrent les concentrations minimales bactéricides (CMB) les plus basses : 1,56 mg.mL⁻¹ à la fois sur *E. coli* (Gram négatif) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, Gram positif).

C.2.3 Polysiloxanes

Les polysiloxanes portant des ammoniums quaternaires sont particulièrement intéressants en tant que polymères antimicrobiens. La grande flexibilité de la chaîne polymère rend le contact plus facile entre les groupes quaternaires et le micro-organisme. Des polysiloxanes avec des sels d'ammoniums quaternaires en groupes pendants (Figure I-11) ont été synthétisés par Fortuniak *et al.*¹²⁰

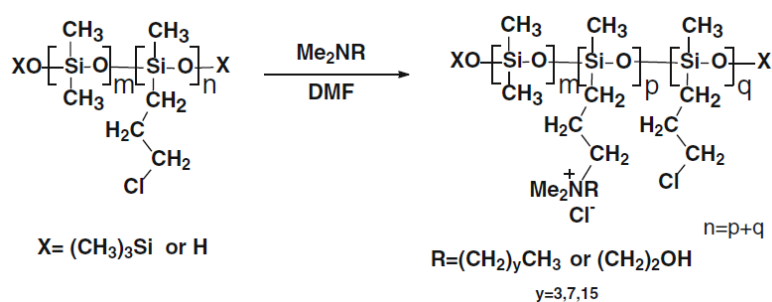


Figure I-11 : Polysiloxanes avec des ammoniums quaternaires en groupes pendants synthétisés par Fortuniak *et al.*¹²⁰

Leur activité antimicrobienne a été évaluée en solution en mesurant des CMI sur deux bactéries à Gram positif et trois bactéries à Gram négatif. Les polysiloxanes avec des sels d'ammoniums quaternaires montrent une activité antibactérienne contre toutes les souches. A titre d'exemple, ils ont montré des CMI de 1,25 à 5 µg.ml⁻¹ sur *S. aureus* et des CMI de 5 à 20 µg.mL⁻¹ sur *E. coli*.

C.2.4 Polyoxazolines

Les polyoxazolines sont des pseudo-peptides qui peuvent être synthétisés à partir d'une polymérisation par ouverture de cycle.¹²¹ Les propriétés de ces polymères peuvent être modulées en contrôlant simplement les fonctionnalités en bout de chaînes, pendant les phases d'amorçage et de terminaison, ou en variant le groupe pendent du monomère. Ici, les groupes portant l'activité biocide sont situés en bout de chaîne du polymère (appelé groupe satellite) et non en groupe pendent comme dans la plupart des exemples précédents. Waschinski *et al.*¹²²

ont synthétisé plusieurs polyoxazolines fonctionnalisés par des sels d'ammonium quaternaire (Figure I-12) avec des masses molaires comprises entre 2 200 et 12 800 g.mol⁻¹.

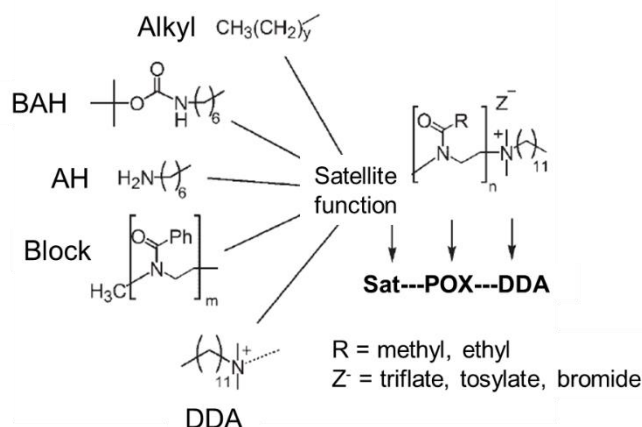


Figure I-12 : Polyoxazolines avec différents groupes en bouts de chaînes synthétisés par Waschinski et al.¹²²

Cette étude montre que les groupes satellites ont une influence sur l'action antimicrobienne du polymère. L'activité antibactérienne de ces polymères a été évaluée sur *S. aureus* (Gram positif) et *E. coli* (Gram négatif). Le meilleur effet antibactérien a été obtenu pour des groupes satellites constitués de chaînes aliphatiques de 4 à 10 carbones. Les CMI sont de 6 µmol.L⁻¹ et 56 µmol.L⁻¹ sur *S. aureus* et *E. coli* respectivement, pour le polyoxazoline avec une chaîne aliphatique de 10 carbones comme groupe satellite.

C.3 Le cas particulier des polyionènes

La plupart des polycations antimicrobiens décrits précédemment présentent des ammoniums quaternaires en groupes pendants. Au contraire, les polyionènes (PI) sont des polyélectrolytes avec des ammoniums quaternaires situés dans le squelette de la chaîne polymère. Ces sont des polycations hydrophiles qui possèdent des segments hydrophobes.

C.3.1 Synthèse des polyionènes

En 1972, Rembaum et Noguchi ont effectué la synthèse des PI *via* une réaction de polyaddition, la réaction de Menshutkin, entre une bi/tri amine et un dihalogène (Figure I-13).¹²³

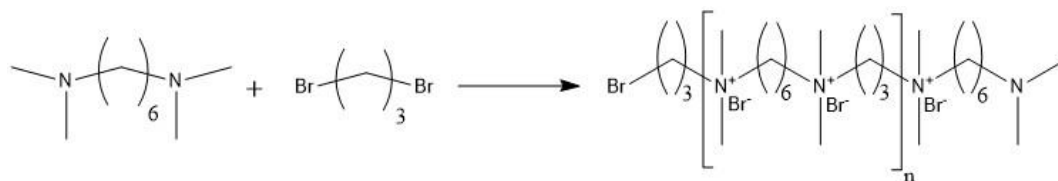


Figure I-13 : Structure d'un des PI synthétisé par Rembaum et Noguchi.¹²³

Cette synthèse, de par le choix des monomères, permet de moduler aisément la balance amphiphile entre les segments hydrophobes et les charges positives de ces polycations hydrophiles. A leurs connaissances, ces polycations possédaient la plus grande densité de charge sur le squelette d'un polymère jamais recensée pour l'époque. Rembaum a aussi mis en évidence les propriétés antibactériennes et cytotoxiques de ces PI en mettant en avant les toxicités plus élevées des PI possédant des segments hydrophobes inter-ammoniums quaternaires longs.¹²⁴ La relation entre structure et propriétés biologiques de ces polymères continue d'être étudiée jusqu'à très récemment par de nombreuses équipes.¹²⁵⁻¹²⁹

Un exemple intéressant est l'étude menée par Liu *et al.*¹³⁰ qui démontre la capacité des PI à ne pas induire de mécanisme de résistance par les bactéries. Ils ont synthétisé des PI en faisant varier la nature du segment inter-ammonium quaternaire avec des ponts éthers et des cycles aromatiques ainsi que la proportion de ces segments au sein du polymère (Figure I-14). Les masses molaires de ces polymères sont comprises entre 1 900 et 7 900 g.mol⁻¹.

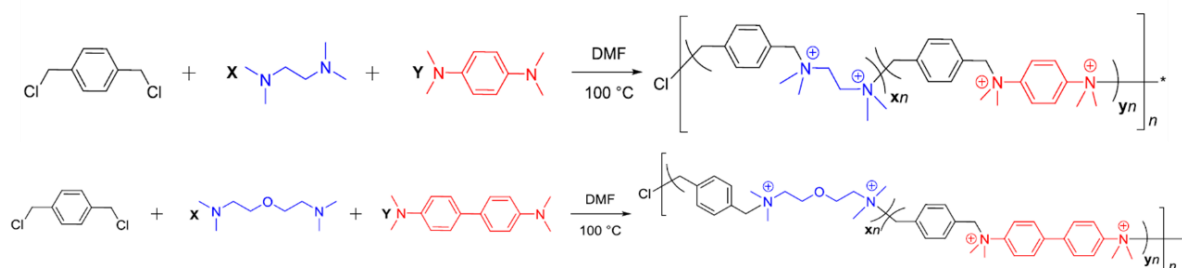


Figure I-14 : Polyionènes synthétisés par Liu *et al.*¹³⁰

L'activité antimicrobienne a été mesurée par des CMI sur deux bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*) et une bactérie à Gram positif (*S. aureus*). Les polymères synthétisés ont présenté au mieux des CMI comprises entre 1,95 et 7,8 µg.mL⁻¹ sur l'ensemble des souches, choisies pour leur résistance aux antibiotiques. Afin de démontrer l'absence de résistance, la souche *E. coli* a été exposée successivement à la CMI ou à des doses non létales, équivalentes à 1/8^{ème} de la CMI du polymère, et ceci à 10 reprises. L'expérience a été effectuée avec un antibiotique courant, la ciprofloxacine, et le polyionène 1 (Figure I-15).

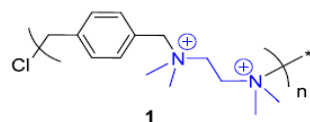


Figure I-15 : Polyionène 1 synthétisé par Liu *et al.*¹³⁰

E. coli a montré rapidement une résistance à la ciprofloxacine et il a été nécessaire de doubler la valeur de la CMI à partir du quatrième passage et de la quadrupler à partir du septième

passage, pour inhiber la même souche. A l'opposé, le polyionène 1 n'a démontré aucune résistance de la part d'*E. coli* et la valeur de CMI a été suffisante pour inhiber la souche lors des 10 passages. Par ailleurs, le polyionène 1 montre une bonne biocompatibilité vis-à-vis de la peau de souris.

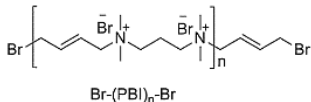
C.3.2 Facteurs influençant l'efficacité antibactérienne des polyionènes

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'activité antibactérienne des PI, les trois principaux étant la masse molaire, la nature du contre-ion et la taille des segments hydrophobes.¹³¹ Ces paramètres vont être détaillés au travers de plusieurs exemples sur des PI de structures variées issus de la littérature.

C.3.2.1 Masses molaires

Dans les exemples précédents, nous avons pris soin de mentionner les masses molaires des polymères utilisés. En effet, la masse molaire est un facteur qui peut avoir une influence sur l'efficacité antibactérienne. Strassburg *et al.*¹³² ont synthétisé des polyionènes avec des segments aliphatiques contenant des doubles liaisons et ont étudié l'influence de la masse molaire sur la CMI de diverses souches bactériennes. Les résultats et la structure du polymère sont récapitulés dans le Tableau I-1. Les masses molaires (M_n) et les degrés de polymérisation (n) ont été déterminés par RMN ¹H.

Tableau I-1 : CMI sur diverses souches bactériennes des $(PBI)_n$ synthétisés par Strassburg *et al.*¹³²

M_n (g.mol ⁻¹)  Br-(PBI) _n -Br	CMI (μg.mL ⁻¹)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>
598 (n=1,1)	5000	5000	5000
1234 (n=3,0)	5000	630	78
2279 (n=6,0)	2500	78	78
2959 (n=8,0)	630	78	78
3571 (n=9,8)	630	78	78
3666 (n=10,0)	630	78	78
4933 (n=13,7)	630	78	78

La valeur de la CMI diminue avec l'augmentation de la masse molaire sur les trois souches bactériennes testées. Ceci implique que plus la masse molaire est grande, plus les PI ont un pouvoir bactériostatique important sur la gamme de concentration évaluée. Ces résultats correspondent à la tendance souvent observée dans la littérature pour les polymères antibactériens de faibles masses molaires ($M_n < 5.10^4$ g.mol⁻¹).¹³¹ En revanche, pour des polymères antibactériens avec des M_n supérieures à environ 1.10^5 g.mol⁻¹, on constate souvent

que l'efficacité antibactérienne diminue avec l'augmentation de la masse molaire. Cette influence sur l'activité antibactérienne peut s'expliquer par la capacité du polymère à franchir les membranes cellulaires. Plus la masse molaire du polymère est élevée, moins celui-ci est perméable pour pénétrer la membrane. La perméabilité du polymère dépend aussi du type de membrane de la bactérie. Il est plus facile d'atteindre la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif que celle des bactéries à Gram négatif car elles possèdent en plus une membrane externe.

Pour autant, dans les résultats de cette étude, les CMI se stabilisent pour les plus grandes M_n de la gamme. Les valeurs de CMI élevées pour les petites M_n ($< 1000 \text{ g.mol}^{-1}$) sont probablement dues au fait que les polymères possèdent seulement 1 à 6 unités de répétition et sont plus proches d'un oligomère que d'un polymère. La faible densité de charge et le peu de segments hydrophobes sur le polymère en interaction avec la membrane bactérienne ne seraient pas suffisants pour la déstabiliser. On peut donc supposer qu'au-dessus d'une valeur seuil de M_n , la masse molaire n'a pas d'influence sur la CMI des PI synthétisés par Strassburg *et al* sur leur gamme d'étude.

La dépendance en masse molaire est relativement peu significative sur des gammes rapprochées, il est donc nécessaire de comparer des polymères dans des gammes de masses molaires larges afin de tirer des conclusions sur l'influence de ce paramètre. Cependant, si on souhaite évaluer l'influence d'un autre paramètre de structure du PI sur l'activité antibactérienne, il faudra s'assurer de comparer des polymères de masses molaires équivalentes.

C.3.2.2 Contre-ions

L'influence du contre-ion dans l'activité antibactérienne des PI a également été étudiée. Le groupe de Mattheis *et al.*¹³³ a montré que le contre-ion pouvait avoir un impact sur l'effet antibactérien. Ils ont synthétisé des PI contenant des ammoniums quaternaires et des ponts éthers et ont remplacé les contre-ions bromes par des contre-ions hydroxydes ou phosphates. Le changement du contre-ion brome par un phosphate sur le PI n'a pas eu d'influence sur les CMI d'*E. coli*. En revanche, le changement par le contre-ion hydroxyde a eu pour effet d'augmenter les CMI et donc de diminuer l'activité antibactérienne du PI par rapport au même PI avec un contre-ion brome. Une étude similaire menée sur *E. coli* par Chen *et al.*¹³⁴ avec des ammoniums quaternaires en chaîne pendante d'un dendrimère a montré que l'efficacité antibactérienne était meilleure avec des contre-ions bromes plutôt que chlores. Si le polycation et le contre-ion possèdent une interaction électrostatique forte, la densité de charge effective sera plus faible. Il en résulte que le polycation sera moins absorbé par la charge négative des

membranes bactériennes car l'interaction électrostatique entre les deux entités sera diminuée.¹³⁵ L'influence du contre-ion semble donc encore assez difficile à cerner et est probablement dépendante à la fois des souches testées, des contre-ions choisis et des structures des polycations. Il en ressort cependant que si le polycation possède une interaction électrostatique forte avec son contre-ion, alors cela peut nuire à son efficacité antibactérienne sur certaines souches.

C.3.2.3 Taille des segments hydrophobes

Il a été démontré que le ratio charge positive/hydrophobie est un élément clé pour moduler le pouvoir antibactérien d'un polycation en solution.¹³⁶ Par conséquent, jouer sur la longueur des segments hydrophobes, à proximité ou entre les charges positives, au sein du PI permet de moduler ce ratio pour trouver le meilleur effet antibactérien. Mattheis *et al.*¹³³ ont synthétisé un ensemble de PI avec des ponts éthers (hydrophiles) et des segments alkyles (hydrophobes) dans l'unité de répétition. Ils ont fait varier la longueur des groupes alkyles en chaîne pendante (R) sur les ammoniums quaternaires ainsi que la longueur du segment hydrophobe à l'intérieur du squelette (R') pour en étudier l'influence sur l'activité antibactérienne (Figure I-16). Les masses molaires de ces polymères sont comprises entre 1 000 et 1 800 g.mol⁻¹.

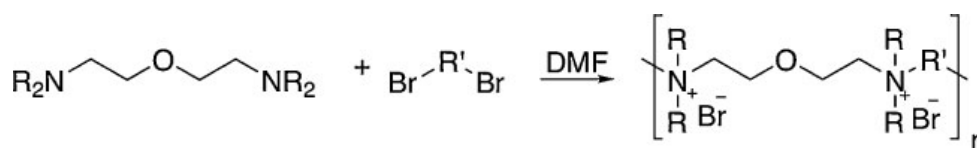


Figure I-16 : Polyionènes synthétisés par Mattheis *et al.*¹³³, R = méthyle, butyle, hexyle, octyle et R' = éthyle, butyle, pentyle, hexyle, décyle, dodécyle

Les CMI ont été évaluées sur *E. coli* (Gram négatif). Les composés avec R = méthyle et R' = butyle, pentyle, hexyle et décyle présentent les CMI les plus faibles, avec des valeurs comprises entre 6,25 et 8,75 µg.mL⁻¹, suggérant qu'un groupe alkyle court en chaîne pendante sur l'ammonium quaternaire et un segment alkyle inter-charge long est la meilleure combinaison pour un pouvoir antibactérien efficace sur ces PI. Narita *et al.*¹³⁷ sont parvenus à la même conclusion en étudiant l'influence de la longueur des segments inter-ammoniums quaternaires, sur des PI similaires à ceux présentés en Figure I-13 (avec des segments aliphatiques), sur la perturbation des membranes des levures.

Les polyionènes sont les polymères cationiques qui ont été choisis lors de ce projet du fait de leurs propriétés antibactériennes puissantes et modulables. D'une part, il est aisé d'obtenir une forte densité de charge tout en maintenant un contrôle très précis sur le ratio charges

positives/segments hydrophobes puisque les ammoniums quaternaires sont formés lors de la polyaddition des monomères. Ceci n'est pas le cas lors d'une post-fonctionnalisation sur des chaînes pendantes. D'autre part, la position des ammoniums quaternaires au sein du squelette leur confère une meilleure stabilité chimique par rapport à des ammoniums quaternaires en chaîne pendante. Enfin, l'absence de résistance des bactéries et la faible cytotoxicité en font des atouts supplémentaires pour l'application visée.¹³⁰ La stratégie et le polymère antimicrobien ayant été choisis, il faut maintenant évaluer les possibilités de greffage covalent des polyionènes sur des surfaces, principal challenge de cette thèse.

C.4 Greffage de polyionènes en surface

Les polyionènes ont déjà été solubilisés dans l'eau pour former des gels¹³⁸ ou incorporés dans diverses matrices polymères comme le PE¹³⁹ ou des matrices inorganiques comme des argiles colloïdales.¹⁴⁰ Ils ont aussi été utilisés pour créer des films qui servent de membranes de séparation pour des gaz^{141,142} ou étirés pour former des élastomères¹⁴³ mais très rarement greffés de façon covalente sur des surfaces.

Trois méthodes de greffage covalent de polymères sur des surfaces sont couramment employées : la technique « grafting to », la technique « grafting from » et la technique « grafting through ». La méthode « grafting to » utilise des polymères fonctionnalisés en bout de chaîne afin de former des liaisons covalentes avec des sites réactifs sur le substrat (Figure I-17, a). La méthode « grafting from », développée plus récemment, consiste à amorcer la polymérisation des monomères (M) directement à partir de la surface en utilisant une monocouche d'amorceur (A), auto-assemblée ou greffée chimiquement, préalablement attachée à la surface (Figure I-17, b). Enfin, la méthode « grafting through » consiste à réaliser une polymérisation en solution avec la présence d'une surface qui possède des groupes fonctionnels (F) pouvant réagir lors de la polymérisation (Figure I-17, c).

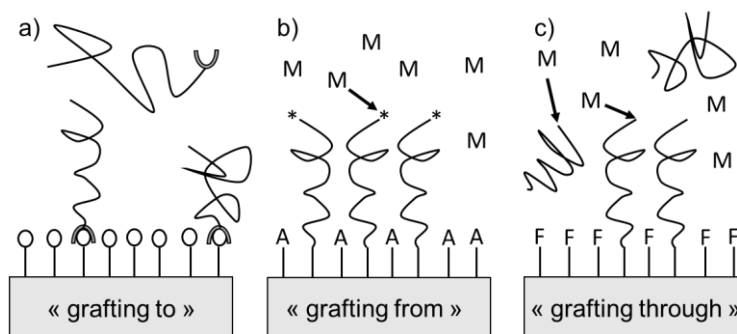


Figure I-17 : Schéma des méthodes a) « grafting to », b) « grafting from » et c) « grafting through »

C.4.1 « Grafting to »

La technique « grafting to », appliquée à des composés de haute masse molaire, est dérivée de la méthode consistant à former des monocouches auto-assemblées (Self-Assembled Monolayers, SAM). Le polymère est d'abord synthétisé en solution. Ce polymère, à greffer sur la surface, possède souvent une fonction réactive en bout de chaîne, obtenue soit *via* le mécanisme de sa polymérisation, soit par une réaction de post-fonctionnalisation une fois le polymère synthétisé. L'utilisation de fonctions chlorosilanes ou alcoxysilanes est favorisée pour le greffage sur des substrats de verre ou de silicium alors qu'on privilégiera des groupes thiols ou disulfures pour des substrats d'or.

A notre connaissance, un seul exemple de greffage de PI par « grafting to » a été recensé, et seulement très récemment. En 2019, Dezfoolnezhad *et al.*¹⁴⁴ ont greffé des chaînes de PI sur des nanoparticules de fer fonctionnalisées avec des fonctions amines, en ajoutant les deux éléments dans un mélange DMF/MeOH. La présence du PI en surface a été confirmée par des analyses MEB-EDX (Microscopie Electronique à Balayage avec spectroscopie de rayons X à Dispersion d'Energie). En revanche, il n'y a pas eu d'études plus poussées qui auraient permis de déterminer la densité de greffage sur les nanoparticules. L'article se concentrait sur l'évaluation des performances de ces nanoparticules en tant que catalyseurs.

Bien que facile à mettre en œuvre, la technique « grafting to » présente plusieurs limitations importantes. D'une part, seuls des polymères sans fonctions réactives, de type poly(styrène) ou poly(vinyl pyridine), peuvent être attachés sur des surfaces, car la grande réactivité des groupes d'ancrage empêche la coexistence de plusieurs fonctions sur la chaîne polymère. Par exemple, des fonctions chlorosilanes ne peuvent coexister avec des fonctions amines, hydroxyles et acides sans réagir aussi avec elles. D'autre part, la densité de greffage atteignable est limitée aussi bien thermodynamiquement que cinétiquement.^{145,146} Au début, la surface est majoritairement inoccupée et les chaînes polymères peuvent facilement diffuser et réagir avec la surface. Quand la surface devient plus encombrée, la cinétique de diffusion des polymères devient très lente et la densité de greffage n'augmente plus. Il en résulte que le recouvrement maximal de la surface par le polymère est limité par le volume exclu de l'enroulement de la chaîne polymère. Les systèmes obtenus par « grafting to » ont donc une faible densité de greffage. Il faut cependant noter que l'utilisation récente des réactions de chimie « click » a permis d'améliorer la densité de greffage obtenues par « grafting to » sans toutefois pouvoir s'affranchir de la limitation de cinétique de diffusion.^{147,148} Enfin, cette méthode est employée principalement pour le greffage de polymères neutres. En effet, la forte répulsion électrostatique

inter-chaînes entre les charges positives des polycations vient s'ajouter aux limitations précédemment évoquées, et empêche la construction de couches denses. De ce fait, cette méthode ne semble pas adaptée pour le greffage des PI. Un revêtement antibactérien avec une faible surface de recouvrement n'est pas envisageable car cela limiterait son efficacité au contact des bactéries.

C.4.2 « Grafting from »

Afin de pallier aux limitations du « grafting to », la stratégie « grafting from » a été développée. Elle consiste à amorcer la polymérisation directement à partir de la surface en immobilisant sur celle-ci des amorceurs. Ainsi, seuls les monomères doivent diffuser jusqu'à la surface, ce qui résout le problème de barrière de diffusion observé lors du cas du « grafting to » et permet d'obtenir des densités de greffage beaucoup plus importantes.

Plusieurs polymérisations classiques ont été utilisées avec l'approche « grafting from » pour greffer des polymères de façon covalente tels que la polymérisation carbocationique,¹⁴⁹ la polymérisation anionique,¹⁵⁰ la polymérisation par ouverture de cycle (Ring-Opening Polymerization, ROP),¹⁵¹ la polymérisation par ouverture de cycle par métathèse (Ring-Opening Metathesis Polymerization, ROMP)¹⁵² ou encore les polymérisations radicalaires contrôlées.¹⁵³ L'avantage de la polymérisation radicalaire contrôlée est d'offrir un contrôle de la polymérisation avec des conditions moins drastiques que les polymérisations ioniques. Par rapport à cela, elle reste une technique de choix pour la stratégie « grafting from ».

La polymérisation radicalaire contrôlée repose sur l'existence d'un équilibre d'activation et de désactivation entre des espèces inactives incapables de se propager et des espèces actives. Cette technique peut mener à des chaînes étirées avec une faible polydispersité et des densités de greffage importantes. Ejaz *et al.*¹⁵⁴ ont été parmi les premiers à utiliser la polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atomes (Atom Transfert Radical Polymerization, ATRP) en « grafting from » pour synthétiser une brosse dense de chaînes de poly(méthacrylate de méthyle) de faible polydispersité sur un substrat de silicium. L'ATRP initié par les surfaces est aussi largement employé pour le greffage de polymères sur des nanoparticules.^{155,156} Parvole *et al.*¹⁵⁷ ont utilisé la polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes (Nitroxyde Mediated Polymerization, NMP) pour former des brosses de poly(acrylate) sur des particules de silice. Baum et Brittain¹⁵⁸ réalisent la polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (Reversible Addition-Fragmentation Transfert radical polymerization, RAFT) de brosses de poly(styrène) (PS), de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) et de poly(N,N-diméthylacrylamide) (PDMA) sur des substrats de silicium. La nature

vivante des brosses de PDMA et de PS est vérifiée par un réamorçage de la polymérisation pour former des copolymères à blocs de type P(S-*b*-DMA) et P(DMA-*b*-MMA). Ils ont également procédé au dégreffage des chaînes formées sur le gel de silice. Après analyse, ils ont observé que les longueurs de chaîne et les indices de polydispersité sont comparables entre les chaînes greffées et les chaînes formées en solution.

La densité de greffage obtenue par la technique « grafting from » est de loin la plus importante et est possible grâce à la conformation brosse imposée par les amorceurs sur la surface, lors de la croissance des chaînes. Des densités de greffage plus faibles peuvent être obtenues en utilisant des monocouches mixtes d'amorceurs et de molécules non amorçantes, ce qui dilue la densité de la couche d'amorceur. Grâce aux polymérisations radicalaires contrôlées, il est également possible d'avoir un excellent contrôle sur la nature, la longueur et la densité des chaînes de polymères greffées sur la surface. Ces méthodes « grafting from » possèdent cependant quelques limitations. Elles requièrent souvent des étapes difficiles pour immobiliser les amorceurs sur les surfaces ainsi que des mises en œuvre de polymérisation plus complexes (atmosphère inerte, absence d'eau ou d'oxygène). Enfin, ce procédé étant limité aux polymérisations en chaîne, il n'est pas applicable aux polyionènes qui sont obtenus par polyaddition.

C.4.3 « Grafting through »

Afin de greffer les PI sur une surface, il faut utiliser une méthode intermédiaire : le « grafting through ». La polymérisation par étape est effectuée en solution avec la présence d'une surface qui comporte des groupes pouvant réagir lors de la polyaddition des PI. Cette méthode permet la réalisation de synthèse en « one-pot », en combinant à la fois la polymérisation du polymère et son immobilisation sur la surface. Ce procédé permet d'atteindre des densités de greffage plus importante qu'en « grafting to », dans le cas où la couche polymère greffée croît de manière homogène lors de la polymérisation. Cette méthode a été beaucoup étudiée dans le cas des polymérisations en chaîne avec la polymérisation radicalaire conventionnelle¹⁵⁹⁻¹⁶¹ ou contrôlée.¹⁶²⁻¹⁶⁵ On va s'intéresser au cas plus rare de la littérature où cette méthode a été utilisée pour des polymérisations par étapes, qu'il s'agisse de polyaddition ou de polycondensation.

L'équipe de Carter a étudié la polycondensation catalysée par du nickel (0), de brosse de polydihexylfluorène sur des wafers de silicium.¹⁶⁶ D'après les auteurs, ce fut le premier exemple de polymérisation par étapes catalysée par des métaux sur des surfaces dans la littérature. Les auteurs n'avaient pas recensé d'autres exemples de polycondensation en surface

pour le greffage covalent de polymère à l'exception de la synthèse séquentielle, unité par unité, de biomacromolécules sur des surfaces.¹⁶⁷ La polycondensation du 2,7-dibromo-9,9-di-n-hexylfluorène a été conduite sur une matrice avec des fonctions 4-bromophényles qui participent lors de la polymérisation (Figure I-18). Elles servent de fonctions réactives pour amorcer la croissance des chaînes sur la surface.

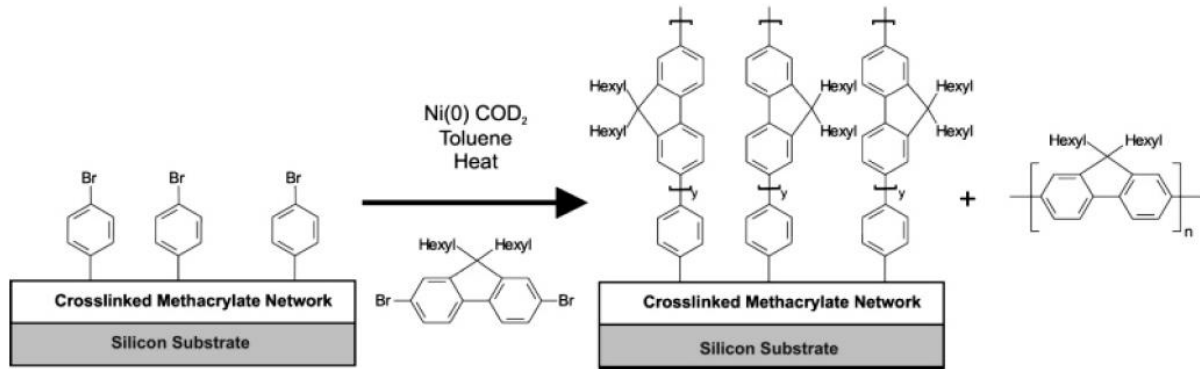


Figure I-18 : Schéma du procédé de greffage employé par l'équipe de Carter¹⁶⁶

De par la nature de la polymérisation par étapes et de la polycondensation, les chaînes polymères se forment aussi en solution lors du procédé de greffage. La croissance des chaînes en surface se fait probablement par condensation des monomères sur des chaînes en croissance greffées mais aussi par le greffage de macromolécules issues de la polymérisation en solution sur des fonctions réactives de la surface. Les chaînes formées en solution ont des masses molaires comprises entre 30 000 et 70 000 g.mol⁻¹ avec des indices de polydispersité autour de 2. Ces valeurs correspondent à des résultats attendus lors d'une polycondensation. La majorité de la polymérisation s'est produite en solution, mais suffisamment de réactions en surface ont eu lieu pour attester du greffage des chaînes. Puisque la majorité de la réaction s'est produite en solution, on ne peut pas assimiler les masses molaires des chaînes en solution à celles des chaînes greffées, comme on peut le faire dans le cas des polymérisations radicalaires contrôlées amorcées par les surfaces en « grafting from ».¹⁶⁸ L'épaisseur du film polymère formé est d'environ 6 nm mais il est impossible de connaître précisément la longueur des chaînes car ils n'ont pas pu les dégreffer pour les analyser. En théorie, si la chaîne est tendue et orthogonale, l'unité de répétition mesure environ 10,3 Å. En conséquence, il y aurait 6 unités de répétition dans la chaîne greffée. Cette approximation est cependant sous-évaluée, en réalité, les chaînes ne sont probablement pas tendues et droites dans le film.

Khire *et al.*¹⁶⁹ ont étudié le cas de la polymérisation par étapes d'une polyaddition en surface. Ils ont effectué la réaction d'addition de dithiols et diacrylates *via* un procédé « grafting through » sur des nanoparticules possédant des fonctions acrylates. La surface des

nanoparticules de silice a d'abord été recouverte d'une fonction amine par l'ajout de N-méthyle aminopropyle triméthoxysilane. La fonction sécable par exposition aux U.V. (« photocleavage ») a ensuite été introduite avec l'acide éthyle 4-(4-(1-hydroxyéthyle)-2-méthoxy-5-nitrophénoxy) butanoïque sur lequel une fonction acrylate a été rajoutée (Figure I-19). Les nanoparticules modifiées ont enfin été mises en présence de dithiols et de diacrylates pour réaliser la polyaddition en surface et en solution. Le ratio dithiols : diacrylates a été varié lors des essais de polyaddition.

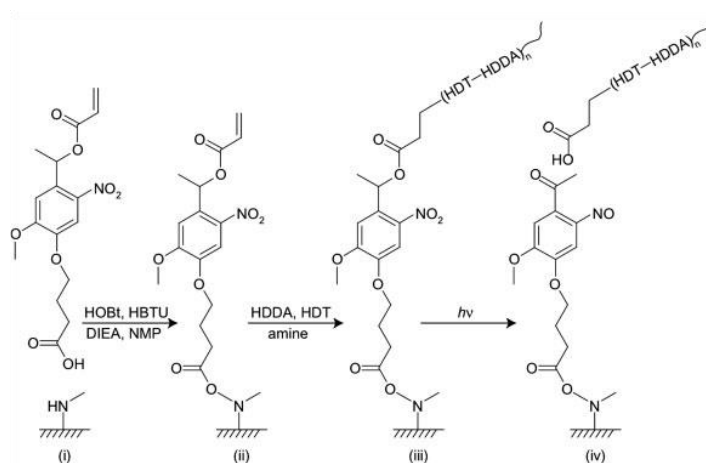


Figure I-19 : Schéma du procédé de greffage employé par Khire et al.¹⁶⁹

Les nanoparticules sont exposées aux U.V. après polymérisation pour détacher les chaînes greffées en surface. Ainsi, les masses molaires des chaînes dégreffées ont pu être comparées à celles des chaînes formées en solution grâce à des analyses par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Dans les deux cas, les M_n et les M_w étaient comparables, dans la limite de l'erreur expérimentale. Le ratio stœchiométrique a donné les masses molaires les plus grandes, comme cela pouvait être attendu dans le cas d'une polymérisation par étapes. En faisant varier le ratio thiol:acrylate de 0,8:1 à 1:1, la M_n est passée de 2 000 à 5 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et la M_w est passée de 4 000 à 10 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. En revanche, la densité de greffage sur les nanoparticules est restée constante quel que soit le ratio employé. Il est donc probable, comme dans le cas des polymérisations en chaîne, que les masses molaires des chaînes greffées et des chaînes formées en solution soient similaires. Ainsi, l'étude des chaînes en solution peut apporter l'information de la masse molaire des chaînes greffées quand il n'est pas possible de dégreffer celles-ci.

D. Conclusions et perspectives : objectifs de la thèse

La contamination bactérienne des surfaces est donc une problématique majeure dans des domaines comme le médical ou l'agroalimentaire. La physiologie particulière des bactéries en surface et le développement de souches multi-résistantes leur offrent une protection optimale face aux agents antimicrobiens et diminuent leur efficacité. Afin d'agir en amont de la formation du biofilm, lors de l'étape de bioadhésion, la création de surfaces bioactives « contact killing » constitue selon nous, la meilleure stratégie pour éliminer les bactéries tout en maintenant une toxicité minimale vis-à-vis des consommateurs. Les polyionènes (PI) possèdent des propriétés antimicrobiennes à la fois puissantes et modulables grâce à la possibilité de modifier le ratio charge/hydrophobie de façon contrôlée. L'objectif de cette thèse est donc de créer des surfaces antibactériennes en greffant des PI sur des matériaux d'intérêt dans le domaine agroalimentaire, et d'en étudier les propriétés biologiques en faisant un lien avec leur structure.

Le deuxième chapitre se concentre sur la synthèse et la caractérisation en solution des PI. Des gammes « aliphatiques » et « éthers » ont été obtenues en faisant varier le ratio charge/hydrophobie, la masse molaire et la nature des segments. L'impact de ces propriétés physico-chimiques sur les propriétés biologiques a été étudié afin de trouver le meilleur compromis entre efficacité antibactérienne et moindre cytotoxicité.

Le troisième chapitre de ce manuscrit est consacré au greffage de façon covalente des PI choisis grâce à une méthode innovante combinant le revêtement de polydopamine et le procédé « Graftfast ». Cette méthode sera développée plus amplement au début ce chapitre. La combinaison de ces deux procédés a permis de greffer une sous-couche réactive, possédant des fonctions diéthylamines sur lesquelles on réalise la polyaddition en surface des PI *via* la méthode « grafting through ». Les PI ont ainsi été greffés sur des surfaces de verre et des wafers de silicium. Les propriétés biologiques (pouvoir antibactérien et cytotoxicité) et physico-chimiques (énergies de surface et zêtamétrie) de ces surfaces ont été évaluées. Les chaînes greffées en surface ont également été étudiées par réflectivité des rayons X et des neutrons, pour déterminer l'épaisseur des couches et tenter d'établir un lien entre la conformation des polymères et leur mécanisme d'action sur les bactéries.

Le quatrième chapitre rassemble les trois procédés développés lors de cette thèse afin de fonctionnaliser de façon covalente des surfaces de polyéthylène avec des PI. Ce matériau est en effet le principal composant des films alimentaires. Dans un premier temps, les PI ont été

greffés sur le polyéthylène avec un procédé analogue à celui sur le verre. Puis, ils ont également été incorporés dans une encre et réticulés sous U.V. après un dépôt par impression. Enfin, ils ont été incorporés en masse par extrusion. Pour chacun de ces procédés, nous avons évalué la possibilité de leurs applications dans le domaine agroalimentaire en caractérisant leurs propriétés antibactériennes et cytotoxiques.

Bibliographie

- (1) Porter, J. R. Antony van Leeuwenhoek: Tercentenary of His Discovery of Bacteria. *BACTERIOL. REV.* **1976**, *40*, 10.
- (2) Young, K. D. The Selective Value of Bacterial Shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2006**, *70* (3), 660–703. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-06>.
- (3) Henrici, A. T. Studies of Freshwater Bacteria. A Direct Microscopic Technique. *Journal of Bacteriology* **1933**, *25* (3), 277–287.
- (4) Zobell, C. E. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity¹. *Journal of Bacteriology* **1943**, *46* (1), 39–56. <https://doi.org/10.1128/JB.46.1.39-56.1943>.
- (5) Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P. Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. *Nat Rev Microbiol* **2004**, *2* (2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.
- (6) Verderosa, A. D.; Totsika, M.; Fairfull-Smith, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 824. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>.
- (7) Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, *56* (1), 187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>.
- (8) Schachter, B. Slimy Business—the Biotechnology of Biofilms. *Nat Biotechnol* **2003**, *21* (4), 361–365. <https://doi.org/10.1038/nbt0403-361>.
- (9) An, Y. H.; Friedman, R. J. Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterial Surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, *43* (3), 338-348. [10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199823\)43:3<338::AID-JBM16>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199823)43:3<338::AID-JBM16>3.0.CO;2-B).
- (10) Yang, J.; Bos, R.; Belder, G. F.; Engel, J.; Busscher, H. J. Deposition of Oral Bacteria and Polystyrene Particles to Quartz and Dental Enamel in a Parallel Plate and Stagnation Point Flow Chamber. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *220* (2), 410–418. <https://doi.org/10.1006/jcis.1999.6539>.
- (11) Dickschat, J. S. Quorum Sensing and Bacterial Biofilms. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (3), 343. <https://doi.org/10.1039/b804469b>.
- (12) Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **1999**, *284* (5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>.
- (13) Flemming, H.-C.; Wingender, J. The Biofilm Matrix. *Nat Rev Microbiol* **2010**, *8* (9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- (14) 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. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0326>.
- (15) Sutherland, I. The Biofilm Matrix – an Immobilized but Dynamic Microbial Environment. *Trends in Microbiology* **2001**, *9* (5), 222–227. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1).
- (16) Lawrence, J. R.; Korber, D. R.; Hoyle, B. D.; Costerton, J. W.; Caldwell, D. E. Optical Sectioning of Microbial Biofilms. *Journal of Bacteriology* **1991**, *173* (20), 6558–6567. <https://doi.org/10.1128/JB.173.20.6558-6567.1991>.
- (17) Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; DeBeer, D.; Caldwell, D.; Korber, D.; James, G. Biofilms, the Customized Microniche. *Journal of Bacteriology* **1994**, *176* (8), 2137–2142. <https://doi.org/10.1128/JB.176.8.2137-2142.1994>.
- (18) Rabin, N.; Zheng, Y.; Opoku-Temeng, C.; Du, Y.; Bonsu, E.; Sintim, H. O. Biofilm Formation Mechanisms and Targets for Developing Antibiofilm Agents. *Future Medicinal Chemistry* **2015**, *7* (4), 493–512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>.

- (19) Jefferson, K. K. What Drives Bacteria to Produce a Biofilm? *FEMS Microbiology Letters* **2004**, 236 (2), 163–173. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x>.
- (20) Shapiro, J. A. THINKING ABOUT BACTERIAL POPULATIONS AS MULTICELLULAR ORGANISMS. *Annu. Rev. Microbiol.* **1998**, 52 (1), 81–104. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.81>.
- (21) Stanley, N. R.; Lazazzera, B. A. Environmental Signals and Regulatory Pathways That Influence Biofilm Formation: Signalling in Biofilm Formation. *Molecular Microbiology* **2004**, 52 (4), 917–924. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04036.x>.
- (22) Davies, D. Understanding Biofilm Resistance to Antibacterial Agents. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2 (2), 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>.
- (23) Schierholz, J. M.; Beuth, J. Implant Infections: A Haven for Opportunistic Bacteria. *Journal of Hospital Infection* **2001**, 49 (2), 87–93. <https://doi.org/10.1053/jhin.2001.1052>.
- (24) Guggenbichler, J. P.; Assadian, O.; Boeswald, M.; Kramer, A. Incidence and Clinical Implication of Nosocomial Infections Associated with Implantable Biomaterials – Catheters, Ventilator-Associated Pneumonia, Urinary Tract Infections. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* **2011**, 6 (1), 1-19.
- (25) Gbejuade, H. O.; Lovering, A. M.; Webb, J. C. The Role of Microbial Biofilms in Prosthetic Joint Infections: A Review. *Acta Orthopaedica* **2015**, 86 (2), 147–158. <https://doi.org/10.3109/17453674.2014.966290>.
- (26) Sampedro, M. F.; Patel, R. Infections Associated with Long-Term Prosthetic Devices. *Infectious Disease Clinics of North America* **2007**, 21 (3), 785–819. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.07.001>.
- (27) Kapadia, B. H.; Berg, R. A.; Daley, J. A.; Fritz, J.; Bhave, A.; Mont, M. A. Periprosthetic Joint Infection. *The Lancet* **2016**, 387 (10016), 386–394. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61798-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61798-0).
- (28) Meckenstock, R.; Therby, A. Modifications de l'immunité dans l'obésité : impact sur le risque infectieux. *La Revue de Médecine Interne* **2015**, 36 (11), 760–768. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2015.07.013>.
- (29) Tarakji, K. G.; Ellis, C. R.; Defaye, P.; Kennergren, C. Cardiac Implantable Electronic Device Infection in Patients at Risk. *Arrhythmia & Electrophysiology Review* **2016**, 5 (1), 65. <https://doi.org/10.15420/aer.2015.27.2>.
- (30) Giaouris, E.; Simões, M.; Dubois-Brissonnet, F. The Role of Biofilms in the Development and Dissemination of Microbial Resistance within the Food Industry. *Foods* **2020**, 9 (6), 816. <https://doi.org/10.3390/foods9060816>.
- (31) Kuchta, J. M.; States, S. J.; McGlaughlin, J. E.; Overmeyer, J. H.; Wadowsky, R. M.; McNamara, A. M.; Wolford, R. S.; Yee, R. B. Enhanced Chlorine Resistance of Tap Water-Adapted *Legionella Pneumophila* as Compared with Agar Medium-Passaged Strains. *Applied and Environmental Microbiology* **1985**, 50 (1), 21–26. <https://doi.org/10.1128/AEM.50.1.21-26.1985>.
- (32) Barbeau, J.; ten Bokum, L.; Gauthier, C.; Prevost, A. P. Cross Contamination Potential of Saliva Ejectors Used in Dentistry. *J. Hosp. Infect.* **1998**, 40, 303–311.
- (33) Donlan, R. M.; Costerton, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *CMR* **2002**, 15 (2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>.
- (34) Coetser, S. E.; Cloete, T. E. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems. *Critical Reviews in Microbiology* **2005**, 31 (4), 213–232. <https://doi.org/10.1080/10408410500304074>.

- (35) Foley, I.; Gilbert, P. Antibiotic Resistance of Biofilms. *Biofouling* **1996**, *10* (4), 331–346. <https://doi.org/10.1080/08927019609386290>.
- (36) Ceri, H.; Olson, M. E.; Stremick, C.; Read, R. R.; Morck, D.; Buret, A. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* **1999**, *37* (6), 1771–1776. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999>.
- (37) Ahmer, B. M. M. Cell-to-Cell Signalling in Escherichia Coli and Salmonella Enterica: Quorum Sensing in E. Coli and Salmonella. *Molecular Microbiology* **2004**, *52* (4), 933–945. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04054.x>.
- (38) Ghigo, J.-M. Natural Conjugative Plasmids Induce Bacterial Biofilm Development. *Nature* **2001**, *412*, 442–445.
- (39) Donaghy, J. A.; Jagadeesan, B.; Goodburn, K.; Grunwald, L.; Jensen, O. N.; Jespers, A.; Kanagachandran, K.; Lafforgue, H.; Seefelder, W.; Quentin, M.-C. Relationship of Sanitizers, Disinfectants, and Cleaning Agents with Antimicrobial Resistance. *Journal of Food Protection* **2019**, *82* (5), 889–902. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-373>.
- (40) French, G. L. Bactericidal Agents in the Treatment of MRSA Infections--the Potential Role of Daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2006**, *58* (6), 1107–1117. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl393>.
- (41) Ghilini, F.; Pissinis, D. E.; Miñán, A.; Schilardi, P. L.; Diaz, C. How Functionalized Surfaces Can Inhibit Bacterial Adhesion and Viability. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5* (10), 4920–4936. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00849>.
- (42) Hasan, J.; Chatterjee, K. Recent Advances in Engineering Topography Mediated Antibacterial Surfaces. *Nanoscale* **2015**, *7* (38), 15568–15575. <https://doi.org/10.1039/C5NR04156B>.
- (43) van Loosdrecht, M. C. M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A. J. B. Electrophoretic Mobility and Hydrophobicity as a Measure to Predict the Initial Steps of Bacterial Adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* **1987**, *53* (8), 1898–1901.
- (44) Crawford, R. J.; Webb, H. K.; Truong, V. K.; Hasan, J.; Ivanova, E. P. Surface Topographical Factors Influencing Bacterial Attachment. *Advances in Colloid and Interface Science* **2012**, *179–182*, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.06.015>.
- (45) Perera-Costa, D.; Bruque, J. M.; González-Martín, M. L.; Gómez-García, A. C.; Vellido-Rodríguez, V. Studying the Influence of Surface Topography on Bacterial Adhesion Using Spatially Organized Microtopographic Surface Patterns. *Langmuir* **2014**, *30* (16), 4633–4641. <https://doi.org/10.1021/la5001057>.
- (46) Lorenzetti, M.; Dogša, I.; Stošicki, T.; Stopar, D.; Kalin, M.; Kobe, S.; Novak, S. The Influence of Surface Modification on Bacterial Adhesion to Titanium-Based Substrates. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (3), 1644–1651. <https://doi.org/10.1021/am507148n>.
- (47) Chung, K. K.; Schumacher, J. F.; Sampson, E. M.; Burne, R. A.; Antonelli, P. J.; Brennan, A. B. Impact of Engineered Surface Microtopography on Biofilm Formation of *Staphylococcus Aureus*. *Biointerphases* **2007**, *2* (2), 89–94. <https://doi.org/10.1116/1.2751405>.
- (48) Solga, A.; Cerman, Z.; Striffler, B. F.; Spaeth, M.; Barthlott, W. The Dream of Staying Clean: Lotus and Biomimetic Surfaces. *Bioinspir. Biomim.* **2007**, *2* (4), S126–S134. <https://doi.org/10.1088/1748-3182/2/4/S02>.
- (49) Díaz, C.; Schilardi, P. L.; Salvarezza, R. C.; Fernández Lorenzo de Mele, M. Nano/Microscale Order Affects the Early Stages of Biofilm Formation on Metal Surfaces. *Langmuir* **2007**, *23* (22), 11206–11210. <https://doi.org/10.1021/la700650q>.

- (50) Yang, M.; Ding, Y.; Ge, X.; Leng, Y. Control of Bacterial Adhesion and Growth on Honeycomb-like Patterned Surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *135*, 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.010>.
- (51) Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. A Review of the Biomaterials Technologies for Infection-Resistant Surfaces. *Biomaterials* **2013**, *34* (34), 8533–8554. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.089>.
- (52) Séon, L.; Lavallo, P.; Schaaf, P.; Boulmedais, F. Polyelectrolyte Multilayers: A Versatile Tool for Preparing Antimicrobial Coatings. *Langmuir* **2015**, *31* (47), 12856–12872. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02768>.
- (53) Bruzard, J.; Tarrade, J.; Coudreuse, A.; Canette, A.; Herry, J.-M.; Taffin de Givenchy, E.; Darmanin, T.; Guittard, F.; Guilbaud, M.; Bellon-Fontaine, M.-N. Flagella but Not Type IV Pili Are Involved in the Initial Adhesion of *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1 to Hydrophobic or Superhydrophobic Surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *131*, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.036>.
- (54) Faille, C.; Jullien, C.; Fontaine, F.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Slomianny, C.; Benezech, T. Adhesion of *Bacillus* Spores and *Escherichia Coli* Cells to Inert Surfaces: Role of Surface Hydrophobicity. *Can. J. Microbiol.* **2002**, *48* (8), 728–738. <https://doi.org/10.1139/w02-063>.
- (55) Dong, B.; Jiang, H.; Manolache, S.; Wong, A. C. L.; Denes, F. S. Plasma-Mediated Grafting of Poly(Ethylene Glycol) on Polyamide and Polyester Surfaces and Evaluation of Antifouling Ability of Modified Substrates. *Langmuir* **2007**, *23* (13), 7306–7313. <https://doi.org/10.1021/la0633280>.
- (56) Ekblad, T.; Bergström, G.; Ederth, T.; Conlan, S. L.; Mutton, R.; Clare, A. S.; Wang, S.; Liu, Y.; Zhao, Q.; D'Souza, F.; Donnelly, G. T.; Willemsen, P. R.; Pettitt, M. E.; Callow, M. E.; Callow, J. A.; Liedberg, B. Poly(Ethylene Glycol)-Containing Hydrogel Surfaces for Antifouling Applications in Marine and Freshwater Environments. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (10), 2775–2783. <https://doi.org/10.1021/bm800547m>.
- (57) Konradi, R.; Acikgoz, C.; Textor, M. Polyoxazolines for Nonfouling Surface Coatings - A Direct Comparison to the Gold Standard PEG. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33* (19), 1663–1676. <https://doi.org/10.1002/marc.201200422>.
- (58) Fundeanu, I.; van der Mei, H. C.; Schouten, A. J.; Busscher, H. J. Polyacrylamide Brush Coatings Preventing Microbial Adhesion to Silicone Rubber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008**, *64* (2), 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.02.005>.
- (59) Banerjee, I.; Pangule, R. C.; Kane, R. S. Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (6), 690–718. <https://doi.org/10.1002/adma.201001215>.
- (60) Fu, J.; Ji, J.; Yuan, W.; Shen, J. Construction of Anti-Adhesive and Antibacterial Multilayer Films via Layer-by-Layer Assembly of Heparin and Chitosan. *Biomaterials* **2005**, *26* (33), 6684–6692. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.034>.
- (61) Lepoittevin, B.; Bedel, S.; Dragoé, D.; Bruzard, J.; Barthés-Labrousse, M.-G.; Mazerat, S.; Herry, J.-M.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Roger, P. Antibacterial Surfaces Obtained through Dopamine and Fluorination Functionalizations. *Progress in Organic Coatings* **2015**, *82*, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.01.007>.
- (62) Reesha, K. V.; Panda, S. K.; Bindu, J.; Varghese, T. O. Development and Characterization of an LDPE/Chitosan Composite Antimicrobial Film for Chilled Fish Storage. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, *79*, 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.016>.
- (63) Fullenkamp, D. E.; Rivera, J. G.; Gong, Y.; Lau, K. H. A.; He, L.; Varshney, R.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Silver-Releasing Antibacterial Hydrogels.

- Biomaterials* **2012**, *33* (15), 3783–3791. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.027>.
- (64) Zhuk, I.; Jariwala, F.; Attygalle, A. B.; Wu, Y.; Libera, M. R.; Sukhishvili, S. A. Self-Defensive Layer-by-Layer Films with Bacteria-Triggered Antibiotic Release. *ACS Nano* **2014**, *8* (8), 7733–7745. <https://doi.org/10.1021/nn500674g>.
- (65) Del Nobile, M. A.; Conte, A.; Buonocore, G. G.; Incoronato, A. L.; Massaro, A.; Panza, O. Active Packaging by Extrusion Processing of Recyclable and Biodegradable Polymers. *Journal of Food Engineering* **2009**, *93* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.022>.
- (66) Nostro, A.; Scaffaro, R.; D'Arrigo, M.; Botta, L.; Filocamo, A.; Marino, A.; Bisignano, G. Study on Carvacrol and Cinnamaldehyde Polymeric Films: Mechanical Properties, Release Kinetics and Antibacterial and Antibiofilm Activities. *Appl Microbiol Biotechnol* **2012**, *96* (4), 1029–1038. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4091-3>.
- (67) Guerra, N. P.; Araujo, A. B.; Barrera, A. M.; Agrasar, A. T.; Macías, C. L.; Carballo, J.; Pastrana, L. Antimicrobial Activity of Nisin Adsorbed to Surfaces Commonly Used in the Food Industry. *Journal of Food Protection* **2005**, *68* (5), 1012–1019. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.1012>.
- (68) Raman, N.; Marchillo, K.; Lee, M.-R.; Rodríguez López, A. de L.; Andes, D. R.; Palecek, S. P.; Lynn, D. M. Intraluminal Release of an Antifungal β -Peptide Enhances the Antifungal and Anti-Biofilm Activities of Multilayer-Coated Catheters in a Rat Model of Venous Catheter Infection. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2* (1), 112–121. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00427>.
- (69) Powers, J.-P. S.; Hancock, R. E. . The Relationship between Peptide Structure and Antibacterial Activity. *Peptides* **2003**, *24* (11), 1681–1691. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023>.
- (70) Nguyen, L. T.; Haney, E. F.; Vogel, H. J. The Expanding Scope of Antimicrobial Peptide Structures and Their Modes of Action. *Trends in Biotechnology* **2011**, *29* (9), 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>.
- (71) Sahl, H.-G.; Pag, U.; Bonness, S.; Wagner, S.; Antcheva, N.; Tossi, A. Mammalian Defensins: Structures and Mechanism of Antibiotic Activity. *Journal of Leukocyte Biology* **2005**, *77* (4), 466–475. <https://doi.org/10.1189/jlb.0804452>.
- (72) Brogden, N. K.; Brogden, K. A. Will New Generations of Modified Antimicrobial Peptides Improve Their Potential as Pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents* **2011**, *38*, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.05.004>.
- (73) Silver, S.; Phung, L. T.; Silver, G. Silver as Biocides in Burn and Wound Dressings and Bacterial Resistance to Silver Compounds. *J IND MICROBIOL BIOTECHNOL* **2006**, *33* (7), 627–634. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0139-7>.
- (74) Palza, H. Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *IJMS* **2015**, *16* (1), 2099–2116. <https://doi.org/10.3390/ijms16012099>.
- (75) Carvalho, P.; Sampaio, P.; Azevedo, S.; Vaz, C.; Espinós, J. P.; Teixeira, V.; Carneiro, J. O. Influence of Thickness and Coatings Morphology in the Antimicrobial Performance of Zinc Oxide Coatings. *Applied Surface Science* **2014**, *307*, 548–557. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.04.072>.
- (76) Arroyo, J. M.; Olmos, D.; Orgaz, B.; Puga, C. H.; San José, C.; González-Benito, J. Effect of the Presence of Titania Nanoparticles in the Development of *Pseudomonas Fluorescens* Biofilms on LDPE. *RSC Adv.* **2014**, *4* (93), 51451–51458. <https://doi.org/10.1039/C4RA09642H>.
- (77) Reidy, B.; Haase, A.; Luch, A.; Dawson, K.; Lynch, I. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current

- Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials* **2013**, 6 (6), 2295–2350. <https://doi.org/10.3390/ma6062295>.
- (78) Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramírez, J. T.; Yacaman, M. J. The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, 16 (10), 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>.
- (79) de Lima, R.; Seabra, A. B.; Durán, N. Silver Nanoparticles: A Brief Review of Cytotoxicity and Genotoxicity of Chemically and Biogenically Synthesized Nanoparticles: Genotoxicity of Silver Nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* **2012**, 32 (11), 867–879. <https://doi.org/10.1002/jat.2780>.
- (80) Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* **2008**, 4 (1), 26–49. <https://doi.org/10.1002/sml.200700595>.
- (81) Kang, S.; Pinault, M.; Pfefferle, L. D.; Elimelech, M. Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Strong Antimicrobial Activity. *Langmuir* **2007**, 23 (17), 8670–8673. <https://doi.org/10.1021/la701067r>.
- (82) Min, J.; Braatz, R. D.; Hammond, P. T. Tunable Staged Release of Therapeutics from Layer-by-Layer Coatings with Clay Interlayer Barrier. *Biomaterials* **2014**, 35 (8), 2507–2517. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.009>.
- (83) Becaro, A. A.; Puti, F. C.; Correa, D. S.; Paris, E. C.; Marconcini, J. M.; Ferreira, M. D. Polyethylene Films Containing Silver Nanoparticles for Applications in Food Packaging: Characterization of Physico-Chemical and Anti-Microbial Properties. *J. nanosci nanotechnol* **2015**, 15 (3), 2148–2156. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9721>.
- (84) Vasilev, K.; Sah, V.; Anselme, K.; Ndi, C.; Mateescu, M.; Dollmann, B.; Martinek, P.; Ys, H.; Ploux, L.; Griesser, H. J. Tunable Antibacterial Coatings That Support Mammalian Cell Growth. *Nano Lett.* **2010**, 10 (1), 202–207. <https://doi.org/10.1021/nl903274q>.
- (85) Agarwal, A.; Nelson, T. B.; Kierski, P. R.; Schurr, M. J.; Murphy, C. J.; Czuprynski, C. J.; McAnulty, J. F.; Abbott, N. L. Polymeric Multilayers That Localize the Release of Chlorhexidine from Biologic Wound Dressings. *Biomaterials* **2012**, 33 (28), 6783–6792. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.068>.
- (86) Hsu, L. C.; Fang, J.; Borca-Tasciuc, D. A.; Worobo, R. W.; Moraru, C. I. Effect of Micro- and Nanoscale Topography on the Adhesion of Bacterial Cells to Solid Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, 79 (8), 2703–2712. <https://doi.org/10.1128/AEM.03436-12>.
- (87) Ivanova, E. P.; Hasan, J.; Webb, H. K.; Truong, V. K.; Watson, G. S.; Watson, J. A.; Baulin, V. A.; Pogodin, S.; Wang, J. Y.; Tobin, M. J.; Löbbe, C.; Crawford, R. J. Natural Bactericidal Surfaces: Mechanical Rupture of *Pseudomonas Aeruginosa* Cells by Cicada Wings. *Small* **2012**, 8 (16), 2489–2494. <https://doi.org/10.1002/sml.201200528>.
- (88) Pogodin, S.; Hasan, J.; Baulin, V. A.; Webb, H. K.; Truong, V. K.; Phong Nguyen, T. H.; Boshkovikj, V.; Fluke, C. J.; Watson, G. S.; Watson, J. A.; Crawford, R. J.; Ivanova, E. P. Biophysical Model of Bacterial Cell Interactions with Nanopatterned Cicada Wing Surfaces. *Biophysical Journal* **2013**, 104 (4), 835–840. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.12.046>.
- (89) Bhadra, C. M.; Khanh Truong, V.; Pham, V. T. H.; Al Kobaisi, M.; Seniutinas, G.; Wang, J. Y.; Juodkakis, S.; Crawford, R. J.; Ivanova, E. P. Antibacterial Titanium Nano-Patterned Arrays Inspired by Dragonfly Wings. *Sci Rep* **2015**, 5 (1), 16817. <https://doi.org/10.1038/srep16817>.
- (90) Bandara, C. D.; Singh, S.; Afara, I. O.; Wolff, A.; Tesfamichael, T.; Ostrikov, K.; Oloyede, A. Bactericidal Effects of Natural Nanotopography of Dragonfly Wing on

- Escherichia Coli*. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9 (8), 6746–6760. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b13666>.
- (91) Flores, C. Y.; Miñán, A. G.; Grillo, C. A.; Salvarezza, R. C.; Vericat, C.; Schilardi, P. L. Citrate-Capped Silver Nanoparticles Showing Good Bactericidal Effect against Both Planktonic and Sessile Bacteria and a Low Cytotoxicity to Osteoblastic Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5 (8), 3149–3159. <https://doi.org/10.1021/am400044e>.
- (92) Taglietti, A.; Diaz Fernandez, Y. A.; Amato, E.; Cucca, L.; Dacarro, G.; Grisoli, P.; Necchi, V.; Pallavicini, P.; Pasotti, L.; Patrini, M. Antibacterial Activity of Glutathione-Coated Silver Nanoparticles against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Langmuir* **2012**, 28 (21), 8140–8148. <https://doi.org/10.1021/la3003838>.
- (93) Aumsuwan, N.; Heinhorst, S.; Urban, M. W. Antibacterial Surfaces on Expanded Polytetrafluoroethylene; Penicillin Attachment. *Biomacromolecules* **2007**, 8 (2), 713–718. <https://doi.org/10.1021/bm061050k>.
- (94) Costa, F.; Carvalho, I. F.; Montelaro, R. C.; Gomes, P.; Martins, M. C. L. Covalent Immobilization of Antimicrobial Peptides (AMPs) onto Biomaterial Surfaces. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7 (4), 1431–1440. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.005>.
- (95) Haynie, S. L.; Crum, G. A.; Doele, B. A. Antimicrobial Activities of Amphiphilic Peptides Covalently Bonded to a Water-Insoluble Resin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, 39 (2), 301–307. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.2.301>.
- (96) Gabriel, M.; Nazmi, K.; Veerman, E. C.; Nieuw Amerongen, A. V.; Zentner, A. Preparation of LL-37-Grafted Titanium Surfaces with Bactericidal Activity. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17 (2), 548–550. <https://doi.org/10.1021/bc050091v>.
- (97) Lozeau, L. D.; Alexander, T. E.; Camesano, T. A. Proposed Mechanisms of Tethered Antimicrobial Peptide Chrysopsin-1 as a Function of Tether Length Using QCM-D. *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119 (41), 13142–13151. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b06883>.
- (98) McDonnell, G.; Russell, A. D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *CLIN. MICROBIOL. REV.* **1999**, 12, 33.
- (99) Asri, L. A. T. W.; Crismaru, M.; Roest, S.; Chen, Y.; Ivashenko, O.; Rudolf, P.; Tiller, J. C.; van der Mei, H. C.; Loontjens, T. J. A.; Busscher, H. J. A Shape-Adaptive, Antibacterial-Coating of Immobilized Quaternary-Ammonium Compounds Tethered on Hyperbranched Polyurea and Its Mechanism of Action. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 24 (3), 346–355. <https://doi.org/10.1002/adfm.201301686>.
- (100) Tiller, J. C.; Lee, S. B.; Lewis, K.; Klibanov, A. M. Polymer Surfaces Derivatized with Poly(Vinyl-N-Hexylpyridinium) Kill Airborne and Waterborne Bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 79 (4), 465–471. <https://doi.org/10.1002/bit.10299>.
- (101) Hegstad, K.; Langsrud, S.; Lunestad, B. T.; Scheie, A. A.; Sunde, M.; Yazdankhah, S. P. Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health? *Microbial Drug Resistance* **2010**, 16 (2), 91–104. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0120>.
- (102) Hugo, W. B.; Frier, M. Mode of Action of the Antibacterial Compound Dequalinium Acetate. *Applied Microbiology* **1969**, 17 (1), 118–127. <https://doi.org/10.1128/AEM.17.1.118-127.1969>.
- (103) Denyer, S. P. Mechanisms of Action of Antibacterial Biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation* **1995**, 36 (3–4), 227–245. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(96\)00015-7](https://doi.org/10.1016/0964-8305(96)00015-7).
- (104) Salton, M. R. J. Lytic Agents, Cell Permeability, and Monolayer Penetrability. *The Journal of General Physiology* **1968**, 52 (1), 227–252. <https://doi.org/10.1085/jgp.52.1.227>.

- (105) Lichter, J. A.; Rubner, M. F. Polyelectrolyte Multilayers with Intrinsic Antimicrobial Functionality: The Importance of Mobile Polycations. *Langmuir* **2009**, *25* (13), 7686–7694. <https://doi.org/10.1021/la900349c>.
- (106) Kanazawa, A.; Ikeda, T.; Endo, T. Polymeric Phosphonium Salts as a Novel Class of Cationic Biocides. II. Effects of Counter Anion and Molecular Weight on Antibacterial Activity of Polymeric Phosphonium Salts. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **1993**, *31* (6), 1441–1447. <https://doi.org/10.1002/pola.1993.080310611>.
- (107) Hugo, W. B.; Longworth, A. R. Some Aspects of the Mode of Action of Chlorhexidine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1964**, *16* (10), 655–662. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1964.tb07384.x>.
- (108) Hugo, W. B.; Longworth, A. R. The Effect of Chlorhexidine on the Electrophoretic Mobility, Cytoplasmic Constituents, Dehydrogenase Activity and Cell Walls of Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1966**, *18* (9), 569–578. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1966.tb07935.x>.
- (109) Kanazawa, A.; Ikeda, T.; Endo, T. Novel Polycationic Biocides: Synthesis and Antibacterial Activity of Polymeric Phosphonium Salts. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **1993**, *31* (2), 335–343. <https://doi.org/10.1002/pola.1993.080310205>.
- (110) Ikeda, T.; Yamaguchi, H.; Tazuke, S. New Polymeric Biocides: Synthesis and Antibacterial Activities of Polycations with Pendant Biguanide Groups. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1984**, *26* (2), 139–144. <https://doi.org/10.1128/AAC.26.2.139>.
- (111) Ikeda, T.; Tazuke, S.; Suzuki, Y. Biologically active polycations, 4a) Synthesis and antimicrobial activity of poly(trialkylvinylbenzylammonium chloride)s. *Makromol. Chem.* **1984**, *185* (5), 869–876. <https://doi.org/10.1002/macp.1984.021850503>.
- (112) Kenawy, E.-R.; Abdel-Hay, F. I.; El-Shanshoury, A. E.-R. R.; El-Newehy, M. H. Biologically Active Polymers. V. Synthesis and Antimicrobial Activity of Modified Poly(Glycidyl Methacrylate-Co-2-Hydroxyethyl Methacrylate) Derivatives with Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2002**, *40* (14), 2384–2393. <https://doi.org/10.1002/pola.10325>.
- (113) Mortazavian, H.; Foster, L. L.; Bhat, R.; Patel, S.; Kuroda, K. Decoupling the Functional Roles of Cationic and Hydrophobic Groups in the Antimicrobial and Hemolytic Activities of Methacrylate Random Copolymers. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (11), 4370–4378. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01256>.
- (114) Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Polymeric Materials with Antimicrobial Activity. *Progress in Polymer Science* **2012**, *37* (2), 281–339. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005>.
- (115) Tiller, J. C.; Liao, C.-J.; Lewis, K.; Klivanov, A. M. Designing Surfaces That Kill Bacteria on Contact. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (11), 5981–5985. <https://doi.org/10.1073/pnas.111143098>.
- (116) Jiang, S.; Wang, L.; Yu, H.; Chen, Y.; Shi, Q. Study on Antibacterial Behavior of Insoluble Quaternary Ammonium. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *99* (5), 2389–2394. <https://doi.org/10.1002/app.22810>.
- (117) Sambhy, V.; Peterson, B. R.; Sen, A. Antibacterial and Hemolytic Activities of Pyridinium Polymers as a Function of the Spatial Relationship between the Positive Charge and the Pendant Alkyl Tail. *Angew. Chem.* **2008**, *120* (7), 1270–1274. <https://doi.org/10.1002/ange.200702287>.
- (118) Sellenet, P. H.; Allison, B.; Applegate, B. M.; Youngblood, J. P. Synergistic Activity of Hydrophilic Modification in Antibiotic Polymers. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (1), 19–23. <https://doi.org/10.1021/bm0605513>.

- (119) Lu, G.; Wu, D.; Fu, R. Studies on the Synthesis and Antibacterial Activities of Polymeric Quaternary Ammonium Salts from Dimethylaminoethyl Methacrylate. *Reactive and Functional Polymers* **2007**, *67* (4), 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2007.01.008>.
- (120) Fortuniak, W.; Mizerska, U.; Chojnowski, J.; Basinska, T.; Slomkowski, S.; Chehimi, M. M.; Konopacka, A.; Turecka, K.; Werel, W. Polysiloxanes With Quaternary Ammonium Salt Biocidal Functions and Their Behavior When Incorporated Into a Silicone Elastomer Network. *J Inorg Organomet Polym* **2011**, *21* (3), 576–589. <https://doi.org/10.1007/s10904-011-9485-7>.
- (121) Hoogenboom, R. Poly(2-Oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (43), 7978–7994. <https://doi.org/10.1002/anie.200901607>.
- (122) Waschinski, C. J.; Herdes, V.; Schueler, F.; Tiller, J. C. Influence of Satellite Groups on Telechelic Antimicrobial Functions of Polyoxazolines. *Macromol. Biosci.* **2005**, *5* (2), 149–156. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400169>.
- (123) Rembaum, A.; Noguchi, H. Reactions of N, N, N', N'-Tetramethyl- α , ω -Diaminoalkanes with α , ω -Dihaloalkanes. II. Xy Reactions. *Macromolecules* **1972**, *5* (3), 261–269.
- (124) Rembaum, A.; Senyei, A. E.; Rajaraman, R. Interaction of Living Cells with Polyionenes and Polyionene-Coated Surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **1977**, *11* (1), 101–110.
- (125) Cakmak, I.; Ulukanli, Z.; Tuzcu, M.; Karabuga, S.; Genctav, K. Synthesis and Characterization of Novel Antimicrobial Cationic Polyelectrolytes. *European Polymer Journal* **2004**, *40* (10), 2373–2379. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.06.004>.
- (126) Xu, X.; Xiao, H.; Ziaee, Z.; Wang, H.; Guan, Y.; Zheng, A. Novel Comb-like Ionenenes with Aliphatic Side Chains: Synthesis and Antimicrobial Properties. *Journal of Materials Science* **2013**, *48* (3), 1162–1171. <https://doi.org/10.1007/s10853-012-6854-8>.
- (127) Lou, W.; Venkataraman, S.; Zhong, G.; Ding, B.; Tan, J. P. K.; Xu, L.; Fan, W.; Yang, Y. Y. Antimicrobial Polymers as Therapeutics for Treatment of Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Lung Infection. *Acta Biomaterialia* **2018**, *78*, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.038>.
- (128) Krumm, C.; Trump, S.; Benski, L.; Wilken, J.; Oberhaus, F.; Köller, M.; Tiller, J. C. Fast-Acting Antibacterial, Self-Deactivating Polyionene Esters. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (19), 21201–21209. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b19313>.
- (129) Kopiasz, R. J.; Tomaszewski, W.; Kuźmińska, A.; Chreptowicz, K.; Mierzejewska, J.; Ciach, T.; Jańczewski, D. Hydrophilic Quaternary Ammonium Ionenenes—Is There an Influence of Backbone Flexibility and Topology on Antibacterial Properties? *Macromol. Biosci.* **2020**, 2000063. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000063>.
- (130) Liu, S.; Ono, R. J.; Wu, H.; Teo, J. Y.; Liang, Z. C.; Xu, K.; Zhang, M.; Zhong, G.; Tan, J. P. K.; Ng, M.; Yang, C.; Chan, J.; Ji, Z.; Bao, C.; Kumar, K.; Gao, S.; Lee, A.; Fevre, M.; Dong, H.; Ying, J. Y.; Li, L.; Fan, W.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. Highly Potent Antimicrobial Polyionenes with Rapid Killing Kinetics, Skin Biocompatibility and in Vivo Bactericidal Activity. *Biomaterials* **2017**, *127*, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.027>.
- (131) Kenawy, E.-R.; Worley, S. D.; Broughton, R. The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (5), 1359–1384. <https://doi.org/10.1021/bm061150q>.
- (132) Strassburg, A.; Kracke, F.; Wenners, J.; Jemeljanova, A.; Kuepper, J.; Petersen, H.; Tiller, J. C. Nontoxic, Hydrophilic Cationic Polymers—Identified as Class of

- Antimicrobial Polymers. *Macromolecular Bioscience* **2015**, *15* (12), 1710–1723. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500207>.
- (133) Mattheis, C.; Zheng, M.; Agarwal, S. Closing One of the Last Gaps in Polyionene Compositions: Alkyloxyethylammonium Ionenes as Fast-Acting Biocides. *Macromolecular Bioscience* **2012**, *12* (3), 341–349. <https://doi.org/10.1002/mabi.201100316>.
- (134) Chen, C. Z.; Beck-Tan, N. C.; Dhurjati, P.; van Dyk, T. K.; LaRossa, R. A.; Cooper, S. L. Quaternary Ammonium Functionalized Poly(Propylene Imine) Dendrimers as Effective Antimicrobials: Structure–Activity Studies. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (3), 473–480. <https://doi.org/10.1021/bm0055495>.
- (135) Katchalsky, A. Polyelectrolytes and Their Biological Interactions. *Biophysical Journal* **1964**, *4* (1), 9–41. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(64\)86924-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(64)86924-1).
- (136) Kügler, R.; Bouloussa, O.; Rondelez, F. Evidence of a Charge-Density Threshold for Optimum Efficiency of Biocidal Cationic Surfaces. *Microbiology* **2005**, *151* (5), 1341–1348. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27526-0>.
- (137) Narita, T.; Ohtakeyama, R.; Nishino, M.; Gong, J. P.; Osada, Y. Effects of Charge Density and Hydrophobicity of Ionene Polymer on Cell Binding and Viability. *Colloid & Polymer Science* **2000**, *278* (9), 884–887.
- (138) Häring, M.; Grijalvo, S.; Haldar, D.; Saldías, C.; Díaz, D. D. Polymer Topology-Controlled Self-Healing Properties of Polyelectrolyte Hydrogels Based on DABCO-Containing Aromatic Ionenes. *European Polymer Journal* **2019**, *115*, 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.03.044>.
- (139) Zheng, A.; Xu, X.; Xiao, H.; Guan, Y.; Li, S.; Wei, D. Preparation of Antistatic and Antimicrobial Polyethylene by Incorporating of Comb-like Ionenes. *Journal of Materials Science* **2012**, *47* (20), 7201–7209. <https://doi.org/10.1007/s10853-012-6666-x>.
- (140) Mansur, C. R. E.; Oliveira, R. S.; Akeda, V.; Queirós, Y. G. C.; Spinelli, L. S.; Lucas, E. F. Nanocomposites Based on Ionene-Bentonite Used to Treat Oily Water. *Journal of Applied Polymer Science* **2012**, *123* (1), 218–226. <https://doi.org/10.1002/app.34477>.
- (141) O’Harra, K. E.; Kammakakam, I.; Devriese, E. M.; Noll, D. M.; Bara, J. E.; Jackson, E. M. Synthesis and Performance of 6FDA-Based Polyimide-Ionenes and Composites with Ionic Liquids as Gas Separation Membranes. *Membranes* **2019**, *9* (7), 79. <https://doi.org/10.3390/membranes9070079>.
- (142) O’Harra, K. E.; Kammakakam, I.; Noll, D. M.; Turflinger, E. M.; Dennis, G. P.; Jackson, E. M.; Bara, J. E. Synthesis and Performance of Aromatic Polyamide Ionenes as Gas Separation Membranes. *Membranes* **2020**, *10* (3), 51. <https://doi.org/10.3390/membranes10030051>.
- (143) Demarteau, J.; O’Harra, K. E.; Bara, J. E.; Sardon, H. Valorization of Plastic Wastes for the Synthesis of Imidazolium-Based Self-Supported Elastomeric Ionenes. *ChemSusChem* **2020**, *13* (12), 3122–3126. <https://doi.org/10.1002/cssc.202000505>.
- (144) Dezfoolnezhad, E.; Ghodrati, K.; Badri, R. Polyionene/Br₃ Grafted on Magnetic Nanoparticles as an Efficient and Eco-Friendly Catalyst for the Metal Free Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-Ones/Thiones. *Silicon* **2019**, *11* (3), 1593–1609. <https://doi.org/10.1007/s12633-018-9977-y>.
- (145) Penn, L. S.; Huang, H.; Quirk, R. P.; Cheong, T. H. Kinetics of Polymer Brush Formation With and Without Segmental Adsorption. In *Polymer Brushes*; Advincula, R. C., Brittain, W. J., Caster, K. C., Rühle, J., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, 2005; pp 317–328. <https://doi.org/10.1002/3527603824.ch16>.

- (146) Kopf, A.; Baschnagel, J.; Wittmer, J.; Binder, K. On the Adsorption Process in Polymer Brushes: A Monte Carlo Study. *Macromolecules* **1996**, *29* (5), 1433–1441. <https://doi.org/10.1021/ma951083k>.
- (147) Drockenmuller, E.; Colinet, I.; Damiron, D.; Gal, F.; Perez, H.; Carrot, G. Efficient Approaches for the Surface Modification of Platinum Nanoparticles via Click Chemistry. *Macromolecules* **2010**, *43* (22), 9371–9375. <https://doi.org/10.1021/ma102188d>.
- (148) Ostaci, R.-V.; Damiron, D.; Al Akhrass, S.; Grohens, Y.; Drockenmuller, E. Poly(Ethylene Glycol) Brushes Grafted to Silicon Substrates by Click Chemistry: Influence of PEG Chain Length, Concentration in the Grafting Solution and Reaction Time. *Polym. Chem.* **2011**, *2* (2), 348–354. <https://doi.org/10.1039/C0PY00251H>.
- (149) Zhao, B.; Brittain, W. J. Synthesis of Tethered Polystyrene-Block-Poly(Methyl Methacrylate) Monolayer on a Silicate Substrate by Sequential Carbocationic Polymerization and Atom Transfer Radical Polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (14), 3557–3558. <https://doi.org/10.1021/ja984428y>.
- (150) Zhou, Q.; Fan, X.; Xia, C.; Mays, J.; Advincula, R. Living Anionic Surface Initiated Polymerization (SIP) of Styrene from Clay Surfaces. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (8), 2465–2467. <https://doi.org/10.1021/cm0101780>.
- (151) Wieringa, R. H.; Siesling, E. A.; Geurts, P. F. M.; Werkman, P. J.; Vorenkamp, E. J.; Erb, V.; Stamm, M.; Schouten, A. J. Surface Grafting of Poly(L-Glutamates). 1. Synthesis and Characterization. *Langmuir* **2001**, *17* (21), 6477–6484. <https://doi.org/10.1021/la001769s>.
- (152) Juang, A.; Scherman, O. A.; Grubbs, R. H.; Lewis, N. S. Formation of Covalently Attached Polymer Overlayers on Si(111) Surfaces Using Ring-Opening Metathesis Polymerization Methods. *Langmuir* **2001**, *17* (5), 1321–1323. <https://doi.org/10.1021/la0012945>.
- (153) Qiu, J.; Charleux, B.; Matyjaszewski, K. Controlled/Living Radical Polymerization in Aqueous Media: Homogeneous and Heterogeneous Systems. *Progress in Polymer Science* **2001**, *26* (10), 2083–2134. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00033-8).
- (154) Ejaz, M.; Yamamoto, S.; Ohno, K.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. Controlled Graft Polymerization of Methyl Methacrylate on Silicon Substrate by the Combined Use of the Langmuir–Blodgett and Atom Transfer Radical Polymerization Techniques. *Macromolecules* **1998**, *31* (17), 5934–5936. <https://doi.org/10.1021/ma980240n>.
- (155) Carrot, G.; Diamanti, S.; Manuszak, M.; Charleux, B.; Vairon, J.-P. Atom Transfer Radical Polymerization of n-Butyl Acrylate from Silica Nanoparticles. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2001**, *39* (24), 4294–4301. <https://doi.org/10.1002/pola.10085>.
- (156) El Harrak, A.; Carrot, G.; Oberdisse, J.; Eychenne-Baron, C.; Boué, F. Surface–Atom Transfer Radical Polymerization from Silica Nanoparticles with Controlled Colloidal Stability. *Macromolecules* **2004**, *37* (17), 6376–6384. <https://doi.org/10.1021/ma035959w>.
- (157) Parvole, J.; Billon, L.; Montfort, J. Formation of Polyacrylate Brushes on Silica Surfaces. *Polym. Int.* **2002**, *51* (10), 1111–1116. <https://doi.org/10.1002/pi.1045>.
- (158) Baum, M.; Brittain, W. J. Synthesis of Polymer Brushes on Silicate Substrates via Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Technique. *Macromolecules* **2002**, *35* (3), 610–615. <https://doi.org/10.1021/ma0112467>.
- (159) Bialk, M.; Prucker, O.; Rühle, J. Grafting of Polymers to Solid Surfaces by Using Immobilized Methacrylates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2002**, *198–200*, 543–549. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)00958-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00958-X).

- (160) Prucker, O.; R  he, J. Synthesis of Poly(Styrene) Monolayers Attached to High Surface Area Silica Gels through Self-Assembled Monolayers of Azo Initiators. *Macromolecules* **1998**, *31* (3), 592–601. <https://doi.org/10.1021/ma970660x>.
- (161) Prucker, O.; R  he, J. Mechanism of Radical Chain Polymerizations Initiated by Azo Compounds Covalently Bound to the Surface of Spherical Particles. *Macromolecules* **1998**, *31* (3), 602–613. <https://doi.org/10.1021/ma970661p>.
- (162) Zhao, B.; Brittain, W. . Polymer Brushes: Surface-Immobilized Macromolecules. *Progress in Polymer Science* **2000**, *25* (5), 677–710. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00012-5).
- (163) Advincula, R. Polymer Brushes by Anionic and Cationic Surface-Initiated Polymerization (SIP). In *Surface-Initiated Polymerization I*; Jordan, R., Ed.; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, 2006; Vol. 197, pp 107–136. https://doi.org/10.1007/12_066.
- (164) Marutani, E.; Yamamoto, S.; Ninjbadgar, T.; Tsujii, Y.; Fukuda, T.; Takano, M. Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization of Methyl Methacrylate on Magnetite Nanoparticles. *Polymer* **2004**, *45* (7), 2231–2235. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.02.005>.
- (165) Nguyen, D. H.; Vana, P. Silica-Immobilized Cumyl Dithiobenzoate as Mediating Agent in Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization. *Polym. Adv. Technol.* **2006**, *17* (9–10), 625–633. <https://doi.org/10.1002/pat.826>.
- (166) Beinhoff, M.; Appapillai, A. T.; Underwood, L. D.; Frommer, J. E.; Carter, K. R. Patterned Polyfluorene Surfaces by Functionalization of Nanoimprinted Polymeric Features. *Langmuir* **2006**, *22* (6), 2411–2414. <https://doi.org/10.1021/la051878c>.
- (167) Gait, M. J.; Sheppard, R. C. Rapid Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides: A New Solid-Phase Method. *Nucl Acids Res* **1977**, *4* (4), 1135–1158. <https://doi.org/10.1093/nar/4.4.1135>.
- (168) Boyes, S. G.; Brittain, W. J.; Weng, X.; Cheng, S. Z. D. Synthesis, Characterization, and Properties of ABA Type Triblock Copolymer Brushes of Styrene and Methyl Acrylate Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2002**, *35* (13), 4960–4967. <https://doi.org/10.1021/ma020109m>.
- (169) Khire, V. S.; Kloxin, A. M.; Couch, C. L.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. Synthesis, Characterization and Cleavage of Linear Polymers Attached to Silica Nanoparticles Formed Using Thiol-Acrylate Conjugate Addition Reactions. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2008**, *46* (20), 6896–6906. <https://doi.org/10.1002/pola.22999>.

Chapitre II: Polyionènes en solution

Tables des matières

A. Présentation des polyionènes	67
A.1 La polymérisation par étapes.....	67
A.2 Les polyionènes	70
B. Synthèses et caractérisations des polyionènes.....	73
B.1 Synthèses	73
B.1.1 Gamme aliphatique	73
B.1.2 Gamme éther	75
B.2 Détermination des masses molaires	77
B.2.1 Calcul du M_n par RMN 1H	77
B.2.2 Evaluation du M_n par chromatographie d'exclusion stérique avec détecteur de diffusion de lumière multi-angles (SEC-MALS)	78
B.3 Variation des paramètres de synthèse	81
B.3.1 Temps de polymérisation	82
B.3.2 Concentration des monomères	84
C. Caractérisations biologiques des polyionènes	86
C.1 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	86
C.1.1 Principe	86
C.1.2 Variation de la masse molaire	87
C.1.3 Variation de la longueur du segment aliphatique	88
C.1.4 Variation de la nature du segment	89
C.2 Cytotoxicité	92
C.2.1 Principe	92
C.2.2 Variation de la masse molaire	93

C.2.3	Variation de la longueur du segment aliphatique	94
C.2.4	Variation de la nature du segment	95
D.	Conclusions et perspectives : choix des polymères à greffer	97
	Bibliographie.....	100

Les polyionènes sont les polymères bactériostatiques choisis pour réaliser des surfaces antibactériennes. Avant de chercher à greffer ces polymères en surface, nous allons les étudier en solution afin de déterminer leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. Ainsi, ce premier chapitre est consacré à l'étude en solution des polyionènes. L'objectif est de mettre en lumière les paramètres structuraux permettant de moduler à la fois l'efficacité antibactérienne et la cytotoxicité. Une première partie introductive sera consacrée à une présentation spécifique des polyionènes après des rappels théoriques sur la polymérisation par étapes. Les synthèses de deux gammes de polyionènes et leurs caractérisations structurales seront détaillées dans la partie suivante. Enfin, la dernière partie sera dédiée aux propriétés biologiques de ces polymères.

A. Présentation des polyionènes

Les polyionènes sont synthétisés par polyaddition (réaction de Menshutkin) lors d'une polymérisation par étapes. Il convient de rappeler les principes généraux de cette polymérisation avant d'aborder, dans une deuxième partie, une présentation spécifique des polyionènes.

A.1 La polymérisation par étapes

La polymérisation par étapes est un mécanisme de polymérisation qui procède par des étapes indépendantes. Dès le début de la polymérisation, les monomères réagissent très rapidement entre eux pour former des dimères puis des trimères et des oligomères plus longs, jusqu'à former des polymères. La majorité des polymérisations par étapes sont des polycondensations où chaque étape est une réaction qui se fait avec l'élimination de petites molécules (H_2 , H_2O , HCl ou NH_3). Un exemple de polycondensation est la synthèse des polyamides par condensation entre des diamines et des diacides carboxyliques avec une perte d'eau. Cependant, une partie des polymérisations par étapes sont des polyadditions où chaque étape se fait sans aucune élimination de sous-produits. Par exemple, les polyuréthanes sont issus de la polymérisation de diols sur des diisocyanates.

Les monomères difonctionnels A et B doivent avoir une fonctionnalité supérieure ou égale à deux pour que la polymérisation se produise. Il peut s'agir soit de monomères hétérotéléchéliques, avec deux fonctions différentes sur le même monomère, soit de monomères

téléchéliques, avec une fonction différente sur chaque monomère (Figure II-1). Les monomères hétérotéléchéliques donnent des polymères statistiques tandis que les monomères téléchéliques mènent à des polymères alternés. On peut aussi réaliser la polymérisation par étapes avec un seul monomère hétérotéléchélique.

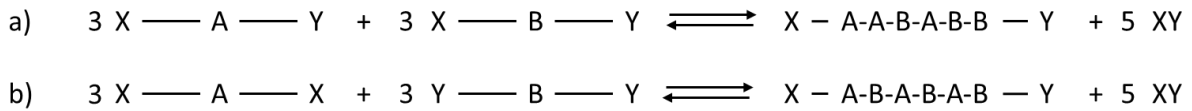


Figure II-1 : a) Monomères hétérotéléchéliques formant un polymère statistique et b) Monomères téléchéliques formant un polymère alterné

Lors d'une polymérisation par étapes, la masse molaire et la conversion augmentent de manière continue dans le temps. En revanche, les réactions sont équilibrées et non totales ce qui implique souvent l'obtention de faible degré de polymérisation en nombre (DP_n). Tous les monomères étant consommés dans les premiers temps de la polymérisation, la stœchiométrie est le facteur prépondérant pour obtenir la meilleure conversion possible. Les masses molaires moyennes en nombre (M_n) obtenues restent généralement faibles ($5\,000 < M_n < 40\,000 \text{ g.mol}^{-1}$) car les monomères disparaissent rapidement avant la formation de chaînes polymères de masses suffisamment élevées. Une fois les monomères consommés, la probabilité de rencontres entre les chaînes est faible et donc la masse molaire des polymères n'augmente plus. Dans le cas d'une polycondensation, on peut éliminer le sous-produit pour déplacer l'équilibre et ainsi augmenter les valeurs des masses molaires.

La relation de Carothers¹ définit et prédit le DP_n en fonction du degré d'avancement (p), aussi appelé conversion, à l'instant t pour un monomère de type X-A-Y. La conversion est définie comme le rapport du nombre de monomères ayant réagi sur le nombre de monomères de départ :

$$p = \frac{2(N_0 - N_t)}{2N_0} \Leftrightarrow N_t = N_0(1 - p) \quad (1)$$

Avec N_0 qui représente le nombre de molécules de monomère à $t=0$ et N_t qui représente le nombre de molécule de monomère à t .

Ainsi, le DP_n est le rapport entre le nombre de molécules de monomère à $t=0$ et le nombre de molécules de monomère à t :

$$DP_n = \frac{N_0}{N_t} = \frac{1}{1 - p} \quad (2)$$

Le cas des monomères portant les fonctions antagonistes X et Y est particulier. A tout moment, chaque chaîne de polymère est terminée par les deux fonctions X et Y, cela peut donc entraîner une potentielle formation de cycles. Leur proportion est généralement négligeable car la probabilité de rencontre entre les fonctions X et Y d'une même chaîne reste faible. Elle l'est d'autant plus que la chaîne est longue. Cependant, si X et Y ne sont séparés que par un petit nombre d'atomes de carbone, la cyclisation devient plus probable. Ainsi, la fonction alcool et la fonction acide carboxylique doivent être séparés par plus de cinq carbones dans le monomère pour que la polymérisation linéaire des polycarbonates soit favorisée par rapport à la cyclisation intramoléculaire (Figure II-2).

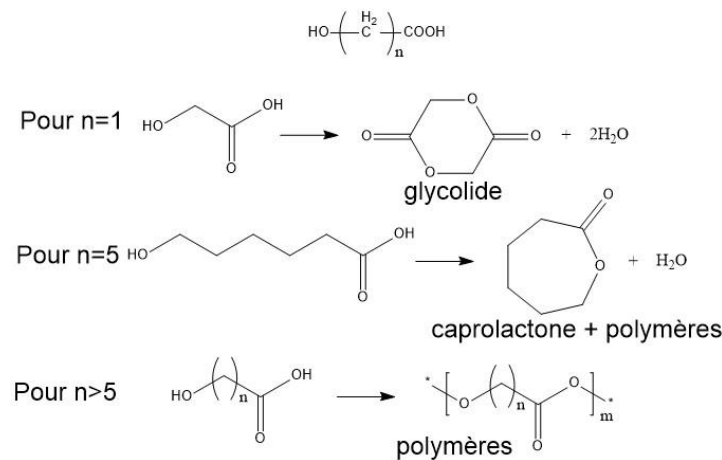


Figure II-2 : Formation de cycles ou de polycarbonates linéaires en fonction du monomère utilisé

Dans le cas où il y a deux monomères A et B difonctionnels téléchéliques, on distingue deux situations : les mélanges stœchiométriques et non stœchiométriques. On ne raisonne plus alors en terme de molécule de monomère mais en nombre de fonction qui peuvent réagir. Le DP_n est défini par l'équation suivante :

$$DP_n = \frac{1 + r}{1 + r - 2pr} \text{ avec } r = \frac{N_X^0}{N_Y^0} \quad (3)$$

Avec N_X^0 le nombre de fonction du type X à $t=0$ et N_Y^0 le nombre de fonction du type Y à $t=0$. Dans le cas d'un mélange stœchiométrique, $r = 1$ donc l'équation (3) se simplifie et on retombe sur l'équation (2). Le degré d'avancement dicte le DP_n final de la polymérisation dans une réaction stœchiométrique. Si l'avancement p vaut 0,95, alors le DP_n est égale à 20.

Si le mélange n'est pas stœchiométrique, avec un des deux monomères en excès, on peut seulement simplifier l'équation (3) en fin de polymérisation car p tend vers 1. On obtient alors l'expression suivante du DP_n :

$$DP_n = \frac{1+r}{1-r} \text{ avec } r = \frac{N_X^0}{N_Y^0} \quad (4)$$

Le rapport r de départ impose le DP_n final dans le cas d'une réaction non stœchiométrique. Dès que r s'éloigne de 1, le DP_n diminue fortement et les masses molaires obtenues sont très faibles.

A.2 Les polyionènes

En 1968, Rembaum *et al.* ont adopté le nom de « ionene » en anglais pour désigner des polymères contenant des groupes ioniques dérivés de monomères contenant des amines.² Les premiers polyionènes (PI) ont cependant été synthétisés en 1933 par Gibbs *et al.* à partir d'halogène de diméthylamino-*n*-alkyle (Figure II-3), un monomère hétérotéléchélique.³ Cette polymérisation donne en général une variété de cycle en plus du polymère linéaire.

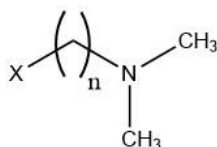


Figure II-3 : Structure des halogènes de diméthylamino-*n*-alkyle, $X = F, Cl, Br, I$

Les PI sont désormais plutôt synthétisés en utilisant la réaction de Menshutkin^{4,5} entre deux monomères bifonctionnels téléchéliques, le N, N, N, N-tétraméthyl-1,*x*-diaminoalcane et le 1,*y* dihalogénoalcane (Figure II-4). La nomenclature de ces PI est souvent associée au nombre de groupes méthylènes présents dans les monomères, où x représente le nombre de CH_2 dans la diamine et y le nombre de CH_2 dans le dihalogène (généralement dibrome). Par exemple, le PI 6-9 est formé à partir du N, N, N, N-tétraméthyl-1,6-diaminohexane et du 1,9 dibromononane. C'est cette nomenclature que nous adoptons tout au long du manuscrit pour désigner les différents polymères étudiés.

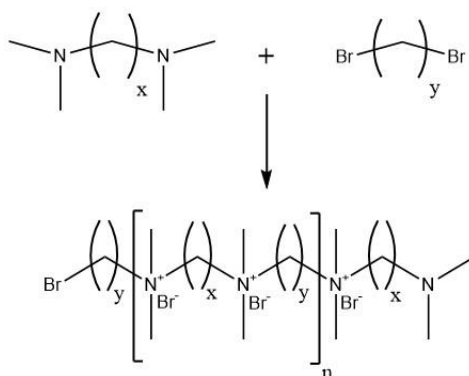


Figure II-4 : Synthèse d'un PI x - y

Les PI possèdent des ammoniums quaternaires répartis le long de la chaîne principale et non en chaîne pendante.² Ces polymères ont reçu beaucoup d'attention car leur synthèse permet de contrôler la densité de charge sur la chaîne ce qui n'est pas le cas des polyélectrolytes classiques qui présentent une distribution aléatoire des groupes ioniques.⁶ Les propriétés des polyélectrolytes étant très dépendantes de leur structure, il est difficile de modéliser leur comportement quand la position des charges sur le polymère est aléatoire. En cela, les PI sont uniques puisqu'ils présentent des sites ioniques situés de façon régulière le long de la macromolécule dans une unité de répétition définie précisément. Le choix judicieux des monomères, qui sont généralement commercialisés ou synthétisés facilement, permet d'avoir accès à une grande variété de polymères à la densité de charge bien définie.

La réaction de Menshutkin s'effectue selon un mécanisme de SN2 entre un dihalogène linéaire et une diamine tertiaire nucléophile (Figure II-5). Ce mécanisme est très sensible à l'encombrement stérique et il est défavorisé par la présence de substituants en alpha ou beta du centre réactif. Le groupe partant lors de la polymérisation des PI est important non seulement pour la réactivité des monomères mais aussi dans l'étude des liens entre structures et propriétés des polymères formés (cf Chapitre I.C.3.2.2 Influence du contre-ion).

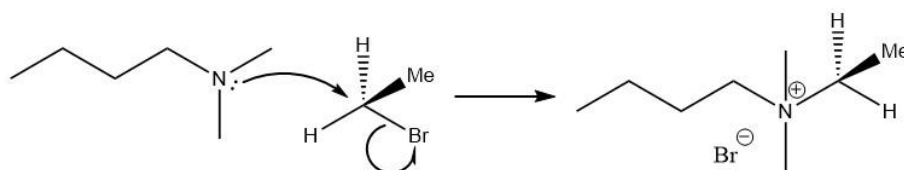


Figure II-5 : Mécanisme générale d'une SN2

Les diamines tertiaires avec des groupes méthyles sont privilégiées car ils n'induisent pas d'effet stérique nuisible et assurent un comportement nucléophile efficace. On utilise des dihalogènes primaires pour obtenir une plus grande réactivité lors de la SN2. Le dibrome est l'halogène le plus utilisé car l'anion bromure est un bon nucléophile, la liaison C-X étant plutôt faible énergétiquement.⁷ D'autres groupes halogènes ont été étudiés mais les dichlores sont plus lents à réagir et les diiodes, si disponibles commercialement, sont plus chers que les dibromes.

Le mécanisme de SN2 implique que la réaction chimique suit théoriquement une cinétique d'ordre 2. Une réaction du second ordre suit la loi cinétique suivante :⁷

$$v = k[RX][Nu:] \quad (5)$$

Avec v la vitesse de réaction en mol.L⁻¹.s⁻¹, k le coefficient de vitesse, $[RX]$ la concentration en dihalogène en mol.L⁻¹ et $[Nu:]$ la concentration en nucléophile en mol.L⁻¹.

Dans une polymérisation par étapes, les réactivités des monomères et des bouts de chaîne des polymères sont équivalentes, ce qui conduit à des considérations cinétiques simples.⁸ La cinétique d'ordre 2 a été démontrée sur les synthèses du PI 6-12 et du PI 12-12 grâce à des suivis de spectroscopie IR *in situ*.^{9,10} Williams *et al.* ont suivi l'évolution des bandes IR présentes dans la région 940-800 cm⁻¹, la région des élongations de liaison C-N⁺.¹¹ A partir de l'augmentation d'intensité de la bande à 903 cm⁻¹, ils ont obtenu des cinétiques du second ordre, ce qui est consistant avec les résultats de Rembaum *et al.*² Dans de très rares cas, avec des solutions très concentrées en monomères, Rembaum a aussi démontré que la cinétique de polymérisation des PI pouvait être d'ordre 1.²

Cependant, Wang, Meyer et Wegner ont démontré par spectroscopie RMN ¹³C *in situ* que les polymérisations sont parfois plus complexes que des cinétiques d'ordre 2 ou 1 pour des PI x-y avec x et y = 3, 4 ou 6.¹² Ils ont détecté les quatre types de réactions attendus lors d'une polymérisation par étapes : 1) les monomères dihalogènes réagissent avec les monomères diamines tertiaires, 2) les monomères dihalogènes réagissent avec les bouts de chaîne amines tertiaires du polymère, 3) les monomères diamines tertiaires réagissent avec les bouts de chaîne halogènes du polymère, 4) les bouts de chaîne amines tertiaires réagissent avec les bouts de chaîne halogènes. En plus de cela, ils ont aussi mis en évidence la présence de réactions d'élimination d'Hofmann et de cyclisations intramoléculaires. Rembaum et Noguchi avaient déjà mis en évidence la cyclisation des PI (pour x = 1 et y = 2/4/5/6, x = 2 et y = 1/2/3 et x = 3 et y = 2) mais pas les réactions d'éliminations.⁵ A partir des analyses des spectres RMN, ils ont déduit que les PI avec des segments inter-ammoniums quaternaires courts (x et y = 3, 4 ou 6) montrent une grande variété dans la distribution des masses molaires dans des conditions spécifiques de réaction. La polymérisation des PI n'est donc pas toujours une réaction cinétique du second ordre ou du premier ordre.

Les polyionènes étudiés dans ce projet ont été synthétisés par la réaction de Menshutkin entre deux monomères téléchéliques. La structure de la chaîne entre les fonctions réactives des monomères a été variée afin d'obtenir deux gammes de PI : la gamme aliphatique et la gamme éther. Les détails des synthèses de ces deux gammes sont présentés dans la partie suivante.

B. Synthèses et caractérisations des polyionènes

L'objectif est de réaliser deux gammes de polyionènes (PI) avec des propriétés différentes en jouant sur la taille des polymères et leurs structures chimiques. Les synthèses des deux gammes vont être décrites dans un premier temps. Puis, on détaillera la détermination des masses molaires par deux techniques, la RMN du proton et la chromatographie d'exclusion stérique. Enfin, la variation des paramètres de synthèse et leurs influences sur la masse molaire seront étudiées.

B.1 Synthèses

B.1.1 Gamme aliphatique

Les PI aliphatiques constituent la première gamme de polymères étudiés. Ils sont obtenus à partir de monomères dont les fonctions réactives sont séparées par une chaîne aliphatique de longueur variable. La synthèse est réalisée dans un ballon tricol avec un réfrigérant et mis sous argon. La réaction est effectuée entre 16 et 18 heures, à 65°C, sous agitation magnétique. Une fois le produit obtenu, on précipite le polymère dans l'acétone (les monomères de départ y sont solubles) et on le filtre sur Büchner avant de le sécher sous vide. L'ensemble des monomères nécessaires pour réaliser les différents PI est récapitulé dans le Tableau II-1. La gamme des PI aliphatiques est constituée de quatre polymères : le PI 3-3, le PI 6-6, le PI 6-9 et le PI 6-12. Un détail de chacune des synthèses est fourni en Annexe A (p. 217).

Tableau II-1 : Polyionènes de la gamme aliphatique et monomères correspondant

Polyionènes	Monomères Diamine	Monomères Dibrome
3-3	N,N,N',N'-tétraméthyl-1,3-diaminopropane	1,3 dibromopropane
6-6	N,N,N',N'-tétraméthyl-1,6-diaminohexane	1,6 dibromohexane
6-9	N,N,N',N'-tétraméthyl-1,6-diaminohexane	1,9 dibromononane
6-12	N,N,N',N'-tétraméthyl-1,6-diaminohexane	1,12 dibromododécane

À la fin de la synthèse, on peut recenser trois types de PI différents en fonction de la combinaison des bouts de chaîne diméthylamine (N) et brome (Br) à chaque extrémité. Dans le cas d'une polymérisation par étapes en proportion stœchiométrique, ces trois polymères sont répartis selon les lois de probabilité : N-N 25%, Br-Br 25% et N-Br 50% (Figure II-6). Il faudra tenir compte de la nature des bouts de chaîne pour réaliser des fonctionnalisations post-synthèses.

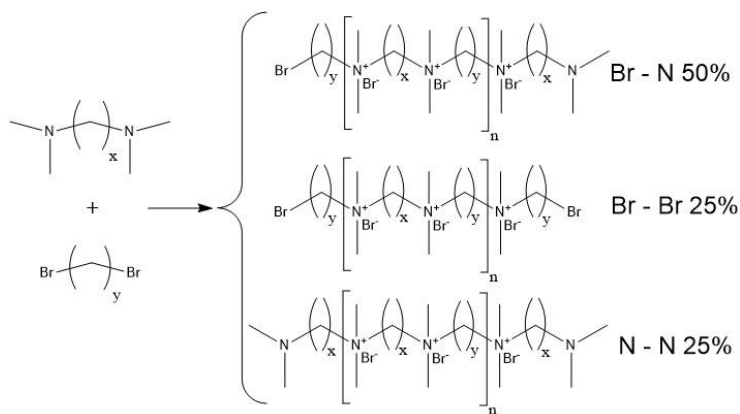


Figure II-6 : Structures et proportions des différents bouts de chaîne pour un PI x - y

À la suite de la purification, la structure du polymère est identifiée par RMN ^1H . L'intégration des pics et leurs déplacements chimiques permettent de les attribuer aux protons correspondant sur le PI 6-6 (Figure II-7). Le pic 1 à 2,99 ppm correspond aux douze protons sur les méthyles des ammoniums quaternaires. Les pics 2, 3 et 4 respectivement à 3,21-3,26, 1,72 et 1,37 ppm regroupent les protons de la chaîne aliphatique inter-ammoniums quaternaires. De plus, les pics des bouts de chaîne sont suffisamment intenses pour les attribuer. Le pic 5 à 2,81 ppm correspond aux six protons du bout de chaîne diméthylamine et le triplet du pic 6 à 3,52-3,55 ppm aux deux protons situés juste à côté du brome pour le bout de chaîne bromé. Les spectres RMN ^1H des autres PI aliphatiques sont fournis dans l'Annexe B (p. 245).

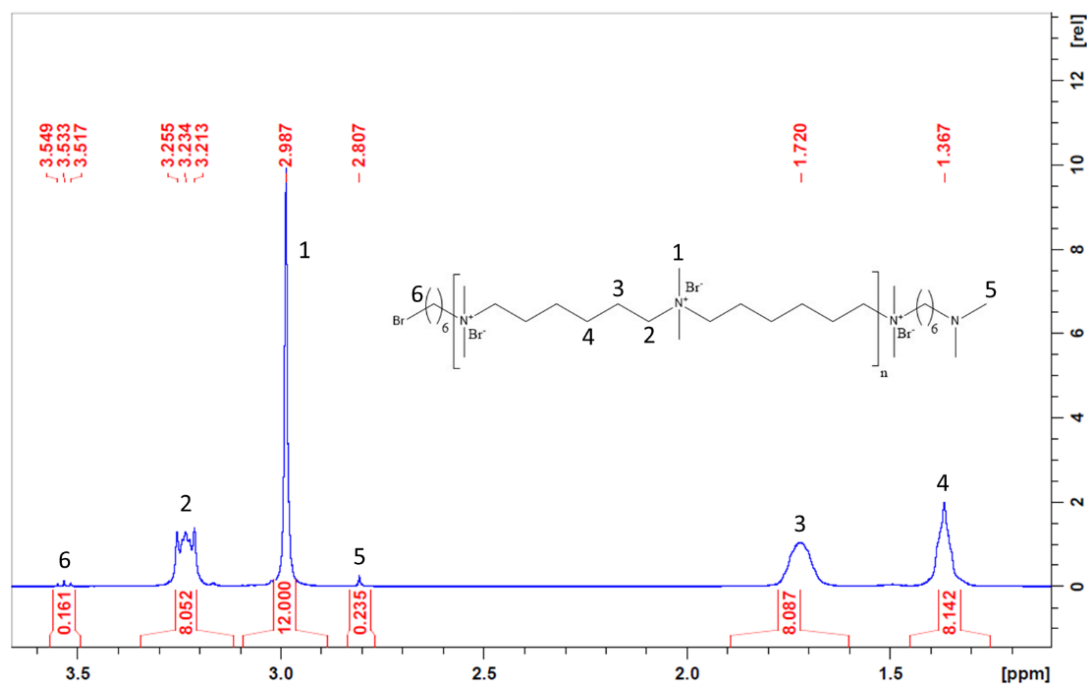


Figure II-7 : Spectre RMN ^1H du PI 6-6

B.1.2 Gamme éther

Les PI éthers constituent la deuxième gamme de polymères étudiés. Ils ont été synthétisés pour la première fois en 1975 par T. Tsuitsui, R. Tanaka et T. Tanaka.¹³ En vue d'une application dans l'alimentaire, la biocompatibilité des PI est souhaitable. De ce fait, ils doivent idéalement être peu cytotoxiques et posséder une grande sélectivité pour les bactéries. Ce critère est souvent évalué en comparant l'activité bactériostatique du polymère à son activité hémolytique. Pour cela, on évalue la concentration hémolytique 50 (CH₅₀), qui correspond à la concentration en polymère provoquant l'hémolyse de 50% des globules rouges. Plusieurs études ont montré la meilleure sélectivité des PI pour les bactéries (CH₅₀ élevés par rapport à la CMI) et une cytotoxicité plus faible lorsque ceux-ci possèdent des segments diminuant l'hydrophobie du polymère.¹⁴⁻¹⁷ L'ajout de ponts éthers sur les PI devrait donc diminuer l'hydrophobie et ainsi réduire leurs toxicités envers les cellules mammaliennes par rapport aux PI aliphatiques. Ces PI sont obtenus à partir d'un monomère dibromoalcane et d'un monomère diméthylaminoéthyle éther (Figure II-8). L'unité de répétition du polymère est constitué d'un segment aliphatique hydrophobe de longueur variable et d'un segment avec un pont éther de longueur fixe.

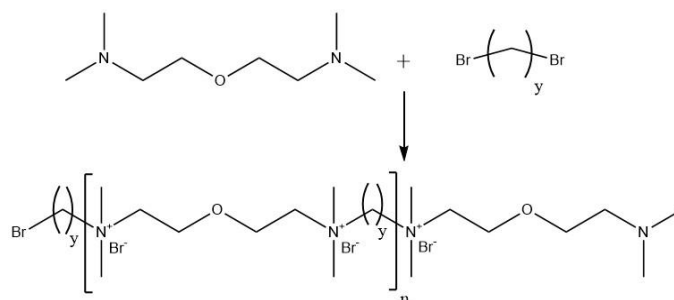


Figure II-8 : Structure générale des PI avec un seul pont éther dans l'unité de répétition

Un autre type de polymère avec deux ponts éthers dans l'unité de répétition est obtenu en remplaçant le monomère dibromoalcane par le 2-chloroéthyle éther (Figure II-9).

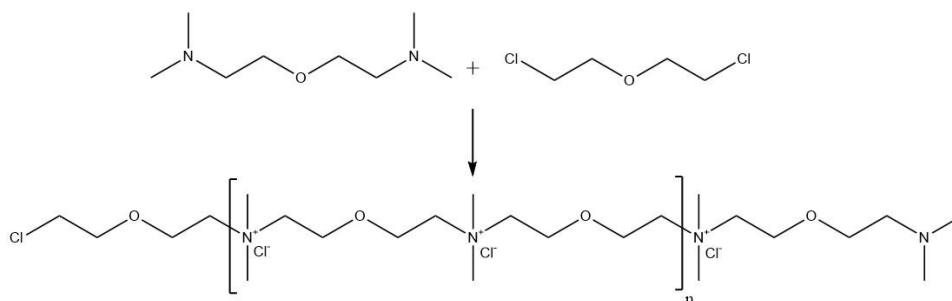


Figure II-9 : Structure du PI avec deux ponts éthers dans l'unité de répétition

Les PI éthers sont synthétisés dans un ballon tricol avec un réfrigérant et mis sous argon. La réaction est effectuée entre 16 et 18 heures, à 65°C, sous agitation magnétique. Une fois le

produit obtenu, on précipite le polymère dans l'acétone ou le THF et on le filtre sur Büchner avant de le sécher sous vide. La nomenclature de ces PI éthers est résumée dans le Tableau II-2. La gamme des PI éthers est constituée de quatre polymères avec un segment aliphatique et un segment éther : le PI éther 5-3, PI éther 5-6, PI éther 5-9 et le PI éther 5-12. Elle possède aussi un polymère avec deux segments éthers : le PI éther 5-éther 5. Les détails de chaque synthèse sont fournis en Annexe A (p. 217).

Tableau II-2 : Polyionènes de la gamme éther et monomères correspondant

Polyionènes	Monomères Diamine	Monomères Dibrome
et5-3	Bis[2-(N,N-diméthylamino)éthyl] éther	1,3 dibromopropane
et5-6	Bis[2-(N,N-diméthylamino)éthyl] éther	1,6 dibromohexane
et5-9	Bis[2-(N,N-diméthylamino)éthyl] éther	1,9 dibromononane
et5-12	Bis[2-(N,N-diméthylamino)éthyl] éther	1,12 dibromododécane
et5-et5	Bis[2-(N,N-diméthylamino)éthyl] éther	2-Chloroéthyl éther

La synthèse de ces PI éthers s'est effectuée facilement en utilisant les mêmes conditions que les PI aliphatiques. Cependant, la purification par précipitation pour les polymères avec des segments hydrophobes longs a nécessité d'être répétée au moins deux fois afin de s'affranchir de la présence des monomères (vérifié par RMN ^1H).

L'intégration des pics et leurs déplacements permettent d'attribuer les protons correspondants pour le PI et5-6 (Figure II-10) en RMN ^1H .

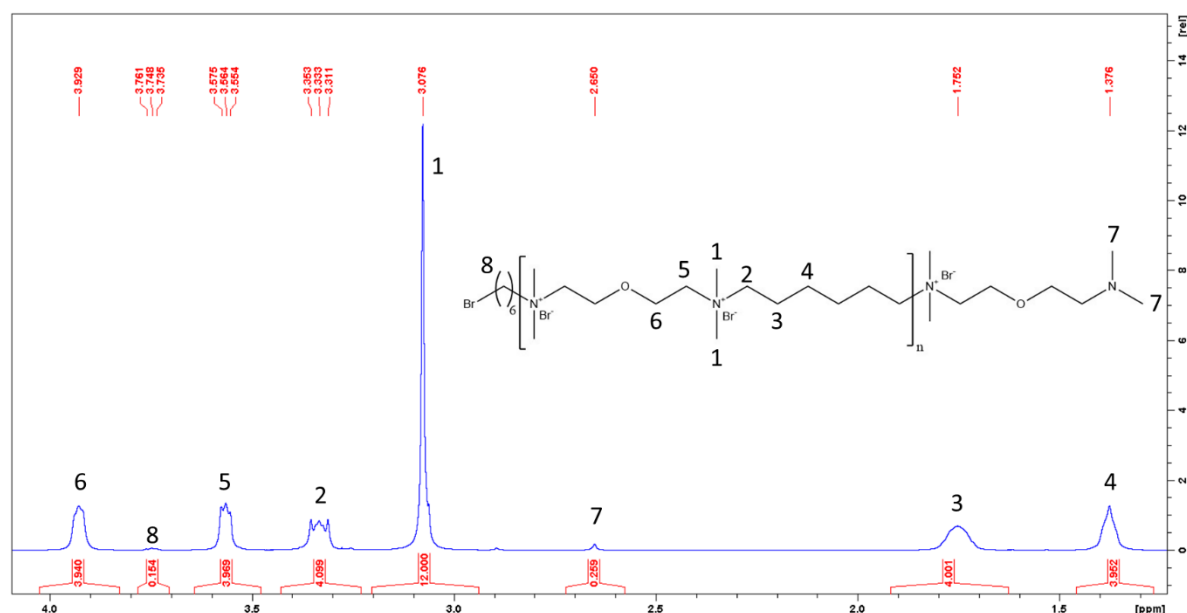


Figure II-10 : Spectre RMN ^1H du PI et5-6

Le pic 1 à 3,08 ppm correspond aux douze protons sur les méthyles des ammoniums quaternaires. Les pics 2, 3 et 4 respectivement à 3,31-3,35, 1,75 et 1,38 ppm regroupent les

protons de la chaîne aliphatique inter-ammoniums quaternaires. Les pics 5 et 6 à 3,55-3,58 et 3,93 ppm respectivement correspondent aux protons autour du pont éther. Le pic 7 à 2,65 ppm représente les six protons du bout de chaîne diméthylamine et le triplet du pic 8 à 3,74-3,76 ppm, les deux protons situés juste à côté du brome pour le bout de chaîne bromé. Les spectres RMN ^1H des autres PI éthers sont fournis en Annexe B (p. 245).

B.2 Détermination des masses molaires

B.2.1 Calcul du M_n par RMN ^1H

Nous pouvons calculer la masse molaire moyenne en nombre (M_n) des PI par RMN ^1H . Statistiquement, en conditions stœchiométriques, les bouts de chaîne bromés sont aussi nombreux que les bouts de chaîne aminés. On peut donc relier l'intégration de chaque pic à son nombre de protons correspondants. Le ratio donné par l'équation (6) donne accès au nombre de motifs (DP_n) présents dans une chaîne de PI.

$$DP_n = \frac{(\int \text{pic principal } (\text{CH}_3 - \text{N}^+)) / \text{nb de H correspondant}}{(\int \text{pic bout de chaîne}) / \text{nb de H correspondant}} \quad (6)$$

Le pic des méthyles des ammoniums quaternaires est bien défini et intense. Il est donc choisi comme pic principal de l'unité de répétition. Le DP_n permet de remonter au M_n en le multipliant par la masse molaire du motif de l'unité de répétition ($M_{\text{unité}}$).

$$M_n = DP_n \times M_{\text{unité}} \quad (7)$$

Les M_n calculées par cette méthode pour des synthèses stœchiométriques identiques de PI aliphatiques (0,9 M de concentration en monomères, temps de réaction entre 16 et 17 heures) ont été récapitulées dans le Tableau II-3. Si pour certaines synthèses on obtient des M_n équivalents par l'intégration des deux pics des bouts de chaîne, ce n'est pas toujours le cas. Il y a un problème de précision lié à la faible intensité des pics des bouts de chaînes. La RMN ^1H n'est donc pas la méthode la plus fiable. De plus, lorsqu'on s'éloigne de l'état stœchiométrique (erreur expérimentale), on ne connaît plus statistiquement la proportion des bouts de chaîne bromés par rapport aux bouts de chaîne diméthylamines. Il est donc difficile de calculer avec précision la M_n par cette méthode.

Tableau II-3 : M_n en g.mol^{-1} calculées par RMN ^1H pour des synthèses stœchiométriques de PI aliphatiques

Nom	Temps de réaction	DP_n		M_n (g.mol^{-1})	
		$(\text{CH}_3)_2\text{-N}$	$\text{CH}_2\text{-Br}$	$(\text{CH}_3)_2\text{-N}$	$\text{CH}_2\text{-Br}$
PI 3-3 S1	16h30	17,1	16,7	5 700	5 500
PI 3-3 S2	16h	28,6	25,0	9 500	8 300
PI 3-3 S3	16h15	30,0	22,2	10 000	7 400
PI 6-6 S1	16h30	27,3	10,0	11 300	4 200
PI 6-6 S2	16h15	26,1	15,4	10 850	6 400
PI 6-6 S3	16h	25,0	12,5	10 400	5 200
PI 6-9 S1	17h	18,2	18,2	8 300	8 300
PI 6-9 S2	17h	27,3	22,2	12 500	10 200
PI 6-9S 3	16h	24,0	22,2	11 000	10 200
PI 6-12 S1	16h	30,0	28,6	15 000	14 300
PI 6-12 S2	16h30	30,0	25,0	15 000	12 500
PI 6-12 S3	17h	37,5	28,6	18 750	14 300

Les M_n déterminées par RMN ^1H ont aussi été calculées pour des synthèses stœchiométriques de PI éthers (0,9 M de concentration en monomères, temps de réaction entre 16 et 18 heures). Elles ont été récapitulées dans le Tableau II-4. Les masses molaires évaluées sont du même ordre de grandeur que les synthèses précédentes. La même imprécision que dans le cas des PI aliphatiques est obtenue. Nous avons donc cherché à évaluer les masses molaires par une autre méthode : la chromatographie d'exclusion stérique qui permet également d'accéder à l'indice de polydispersité.

Tableau II-4 : M_n en g.mol^{-1} calculées par RMN ^1H pour des synthèses stœchiométriques de PI éther

Nom	Temps de réaction	DP_n		M_n (g.mol^{-1})	
		$(\text{CH}_3)_2\text{-N}$	$\text{CH}_2\text{-Br}$	$(\text{CH}_3)_2\text{-N}$	$\text{CH}_2\text{-Br}$
PI et5-3	17h	28,6	14,7	10 300	5 300
PI et5-6	16h45	23,7	11,2	9 600	4 500
PI et5-9	17h30	22,6	11,2	10 100	5 000
PI et5-12	18h	9,4	6,7	4 600	3 300
PI et5-et5	17h	29,6	18,0	8 900	5 400

B.2.2 Evaluation du M_n par chromatographie d'exclusion stérique avec détecteur de diffusion de lumière multi-angles (SEC-MALS)

Une méthode appropriée pour évaluer la masse molaire des polymères est la chromatographie d'exclusion stérique (Steric Exclusion Chromatography = SEC). Il est important d'évaluer les masses molaires sur des chaînes dissociées afin de la déterminer avec le plus de précision possible. Cependant, il est difficile d'éliminer les interactions inter-chaînes entre les

polyélectrolytes qui forment souvent des agrégats en solution. On peut remédier à ce problème en utilisant une phase d'élution avec des sels lors des mesures afin d'écranter les interactions électrostatiques. D'autres facteurs, non liés aux exclusions de tailles, peuvent influencer la détermination des masses molaires comme les interactions des contre-ions ou les interactions hydrophobes dans la phase stationnaire de la colonne chromatographique.¹⁸ Pour pallier à ces facteurs, les masses molaires peuvent être efficacement évaluées avec une chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de lumière multi-angles (Multi Angle Light Scattering = MALS). Cette méthode permet de déterminer les masses molaires absolues des polymères, à partir du rayon de giration en solution, mais aussi l'indice de polydispersité. La relation entre l'intensité mesurée et la masse molaire est définie par l'équation (8) :

$$I(\theta) \propto c \times M_w \times \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \quad (8)$$

Avec $I(\theta)$ l'intensité de la lumière diffusée, c la concentration massique du polymère en solution, M_w la masse molaire moyenne en masse du polymère et dn/dc son incrément d'indice de réfraction dans un solvant donné. La technique de la SEC-MALS est décrite en Annexe A (p. 217). Au préalable des mesures, les incréments d'indice de réfraction (dn/dc) de chaque polymère ont été déterminés et sont également fournis en Annexe A (p. 217).

Le groupe de Long a réalisé une étude pour déterminer la phase aqueuse d'élution appropriée pour des analyses SEC-MALS sur le PI 6-12 et le PI 12-12.¹⁹ La phase mobile qui fonctionne le mieux pour séparer les chaînes de PI est un mélange 23/23/54% en volume de méthanol, d'acide acétique et d'eau déionisée contenant 0,54 M d'acétate de sodium à pH 4. Les analyses DLS (Dynamic Light Scattering) réalisées par l'équipe ont confirmé l'absence d'agrégats ioniques pour les deux PI, ce qui assure la faisabilité de la séparation chromatographique dans ce mélange. Cette phase d'élution est celle utilisée pour toutes les analyses présentées dans ce manuscrit. La détermination des masses molaires par SEC-MALS (méthode la plus fiable à notre disposition) sera donc privilégiée pour l'ensemble des masses molaires données dans la suite de ce manuscrit.

Le Tableau II-5 regroupe les masses molaires moyennes en nombre (M_n) et les indices de polydispersité (I_p) évalués par SEC-MALS des synthèses stœchiométriques des PI aliphatiques présentés précédemment (concentration en monomères de 0,9 M, temps de réaction entre 16 et 18 heures). Ces résultats ont été mis en regard des valeurs de M_n calculées par RMN ¹H.

Tableau II-5 : M_n en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ calculées par RMN ^1H et SEC-MALS pour des synthèses stœchiométriques de PI aliphatiques

Nom	M_n ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) RMN ^1H		M_n ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) SEC-MALS	I_p (M_w/M_n) SEC-MALS
	$(\text{CH}_3)_2\text{-N}$	$\text{CH}_2\text{-Br}$		
PI 3-3 S1	5 700	5 500	2 450 ($\pm 16\%$)	2,5 ($\pm 16\%$)
PI 3-3 S2	9 500	8 300	2 800 ($\pm 17\%$)	3,0 ($\pm 17\%$)
PI 3-3 S3	10 000	7 400	3 900 ($\pm 22\%$)	3,0 ($\pm 22\%$)
PI 6-6 S1	11 300	4 200	7 350 ($\pm 11\%$)	1,4 ($\pm 12\%$)
PI 6-6 S2	10 850	6 400	7 200 ($\pm 15\%$)	1,6 ($\pm 15\%$)
PI 6-6 S3	10 850	5 200	6 100 ($\pm 11\%$)	1,8 ($\pm 11\%$)
PI 6-9 S1	8 300	8 300	5 300 ($\pm 6\%$)	1,7 ($\pm 6\%$)
PI 6-9 S2	12 500	10 200	8 550 ($\pm 11\%$)	1,7 ($\pm 11\%$)
PI 6-9 S3	11 000	10 200	7 700 ($\pm 7\%$)	1,7 ($\pm 7\%$)
PI 6-12 S1	15 000	14 300	9 000 ($\pm 11\%$)	1,8 ($\pm 11\%$)
PI 6-12 S2	15 000	12 500	8 600 ($\pm 4\%$)	1,6 ($\pm 5\%$)
PI 6-12 S3	18 750	14 300	9 200 ($\pm 7\%$)	1,6 ($\pm 7\%$)

Pour des synthèses en conditions expérimentales identiques, on retrouve globalement des M_n similaires par analyses SEC-MALS, attestant ainsi de la reproductibilité des réactions. L'ensemble des polymères synthétisés ont cependant des M_n assez faibles, tous inférieur à $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ce qui est courant pour une polymérisation par étapes. Les I_p obtenus sont aussi caractéristiques de ce type de polymérisation avec des valeurs comprises entre 1,4 et 3,0. Les masses molaires déterminées par SEC-MALS sont globalement plus petites que celles calculées à partir des spectres RMN ^1H , à quelques exceptions près où les valeurs sont comprises entre les deux M_n calculées par RMN ^1H selon les bouts de chaîne. L'écart observé entre les deux méthodes de détermination des masses molaires peut s'expliquer d'une part par l' I_p qui n'est pas reflété par une analyse RMN ^1H . D'autres part, l'incertitude sur les mesures de M_n par SEC-MALS est plus importante pour les faibles M_n comme c'est le cas ici (environ $\pm 10\text{-}20\%$).

Les synthèses de PI 3-3 donnent des M_n plus faibles par rapport aux synthèses des autres PI, avec des segments inter-ammoniums quaternaires plus longs. Les I_p du PI 3-3 sont aussi plus élevés que les autres PI (2,5-3,0 contre 1,4-1,8). Meyer *et al.*¹² avaient démontré que pour x et $y < 6$, la polymérisation des PI x - y est plus complexe et ne suit pas une cinétique du second ordre. Cette complexité se traduit par une grande diversité des M_n lors de la synthèse et notamment la formation de cycles, d'où les I_p très élevés. La grande répulsion électrostatique inter-chaîne, dû à la densité de charge importante sur le polymère, diminuerait la probabilité de rencontre entre les monomères et de ce fait la masse molaire.

Le Tableau II-6 regroupe les M_n et les I_p évalués par SEC-MALS des synthèses stœchiométriques des PI éthers présentées précédemment (concentration en monomères de 0,9 M, temps de réaction entre 16 et 18 heures). Ces résultats ont été mis en regard des valeurs de M_n évaluées par RMN ^1H .

Tableau II-6 : M_n en g.mol^{-1} calculées par RMN ^1H et SEC-MALS pour des synthèses stœchiométriques de PI éthers

Nom	Temps de réaction	M_n (g.mol^{-1}) RMN ^1H		M_n (g.mol^{-1}) SEC-MALS	I_p (M_w/M_n) SEC-MALS
		(CH_3) ₂ -N	CH ₂ -Br		
PI et5-3	17h	10 300	5 300	2 400 ($\pm 28\%$)	4,9 ($\pm 28\%$)
PI et5-6	16h45	9 600	4 500	8 900 ($\pm 13\%$)	2,0 ($\pm 13\%$)
PI et5-9	17h30	10 100	5 000	7 700 ($\pm 15\%$)	2,2 ($\pm 15\%$)
PI et5-12	18h	4 600	3 300	5 900 ($\pm 11\%$)	1,8 ($\pm 11\%$)
PI et5-et5	17h	8 900	5 400	6 000 ($\pm 23\%$)	2,5 ($\pm 23\%$)

L'ensemble des polymères synthétisés ont des M_n assez faibles, inférieurs à $9\,000\text{ g.mol}^{-1}$, comme attendu pour une polymérisation par étapes. Les I_p obtenus sont caractéristiques de ce type de polymérisation avec de valeurs comprises entre 1,8 et 2,5, à l'exception du PI et5-3 (I_p de 4,9 avec une grande incertitude). La masse molaire déterminée par SEC-MALS pour le PI et5-3 est également beaucoup plus petite que celle calculée *via* les spectres RMN ^1H . Pour les autres PI, les valeurs déterminées par SEC-MALS sont supérieures aux valeurs calculées par RMN ^1H .

La même tendance que sur la gamme aliphatique est observée. La synthèse du PI et5-3 conduit à une M_n plus faible et un I_p plus élevé par rapport aux synthèses des autres PI éthers. En faisant l'analogie avec le PI 3-3, on peut supposer que le PI et5-3 induit une polymérisation plus complexe que les autres avec probablement la formation de cycle et une grande répulsion électrostatique inter-chaînes qui expliquerait les résultats de M_n et I_p .

B.3 Variation des paramètres de synthèse

La SEC-MALS nous permet d'évaluer avec précision la M_n et l' I_p des PI synthétisés. Nous avons fait varier différents paramètres de synthèses afin d'évaluer leurs influences sur les masses molaires des polymères obtenus. Un bon contrôle des masses molaires nous permettra par la suite de préparer des PI sur mesure en fonction des applications visées.

B.3.1 Temps de polymérisation

Dans une polymérisation par étapes, la masse molaire augmente de façon continue dans le temps avec l'augmentation de la conversion ($DP_n = 1/(1-p)$). L'évolution de la masse molaire a été suivie par des prélèvements lors de la polymérisation d'un PI 3-3 et d'un PI 6-6. Les synthèses ont été effectuées en proportion stœchiométrique avec des concentrations en monomères de départ de 1,2 M. Les prélèvements sont précipités dans l'acétone, filtrés sur Büchner puis séchés sous cloche à vide. Les masses molaires moyennes en nombre (M_n) et en masse (M_w) des prélèvements ont ensuite été déterminées par des analyses SEC-MALS.

Les résultats du suivi pour le PI 3-3 montrent que la M_n et la M_w augmentent dans le temps jusqu'à atteindre un plateau où les masses molaires n'évoluent plus (Figure II-11, a). Les monomères étant consommés très rapidement en début de polymérisation, la masse molaire n'évolue plus en fin de polymérisation car la probabilité de rencontre entre les bouts de chaîne est très faible. La courbe se stabilise donc au bout d'un certain temps et les masses molaires atteignent une valeur plateau. Une étude similaire a été menée par Layman *et al.* sur la synthèse du PI 6-12 (Figure II-11, b).¹⁹ Ils constatent qu'au bout de 24 h, la masse molaire du PI 6-12 n'évolue plus, puisqu'ils retrouvent la même masse molaire qu'à 48 h.

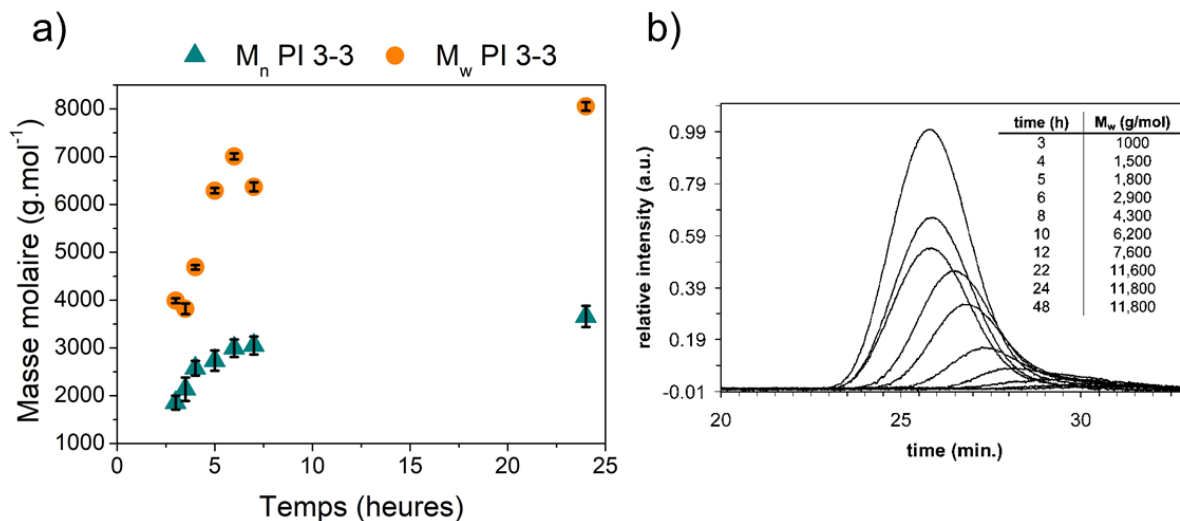


Figure II-11 : a) Evolution de la M_n et de la M_w en fonction du temps sur la synthèse du PI 3-3 et b) évolution de la M_w en fonction du temps avec les chromatogrammes de SEC-MALS sur la synthèse du PI 6-12 faite par Layman *et al.*¹⁹

La polymérisation du PI 6-6 suit théoriquement une cinétique d'ordre 2, par conséquent il est possible d'exprimer le DP_n en fonction du temps selon une relation linéaire du type $y = ax + b$. Dans le cas d'une réaction stœchiométrique, il est possible d'exprimer la vitesse cinétique selon l'équation suivante :

$$v = k[RX][Nu:] = k[M]^2 \quad (9)$$

Avec v la vitesse de réaction en $\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$, k le coefficient de vitesse, $[RX]$ la concentration en dihalogène en mol.L^{-1} et $[Nu:]$ la concentration en nucléophile en mol.L^{-1} .

La vitesse v s'exprime également en fonction de la disparition de l'un des monomères :

$$v = -\frac{d[M]}{dt} = k[M]^2 \Leftrightarrow -\frac{d[M]}{[M]^2} = kdt \quad (10)$$

En intégrant entre t et $t = 0$, on obtient l'équation suivante :

$$\int_{[M]_0}^{[M]} \frac{1}{[M]} = \int_0^t kt \quad \text{soit} \quad \frac{1}{[M]} - \frac{1}{[M]_0} = kt \quad (11)$$

Avec $[M]$ la concentration de M à t et $[M]_0$ la concentration de M à $t = 0$.

Or le DP_n à un instant t s'exprime aussi en fonction de la concentration en monomère M :

$$DP_n = \frac{[M]_0}{[M]} \quad (12)$$

Il est ensuite possible de réarranger l'équation (12) pour faire apparaître le DP_n , ainsi on obtient l'équation suivante :

$$\frac{[M]_0}{[M]} - 1 = [M]_0 kt \Leftrightarrow DP_n = [M]_0 kt + 1 \quad (13)$$

Le DP_n est proportionnelle à la M_n , donc on devrait théoriquement observer aussi une droite sur la première partie de la courbe $M_n(t)$ sur la polymérisation du PI 6-6. Une régression linéaire a été réalisé sur les résultats du suivi de la masse molaire lors de la polymérisation du PI 6-6 (Figure II-12). La courbe théorique obtenue a un coefficient R^2 égale à 0,838 donc les données expérimentales ne sont pas tout à fait une droite. Cette différence avec la théorie peut s'expliquer par la présence d'une erreur expérimentale si la polymérisation n'est pas parfaitement stœchiométrique. L'incertitude sur les valeurs déterminées par SEC-MALS est aussi relativement importante ce qui peut aussi induire un écart à la théorie.

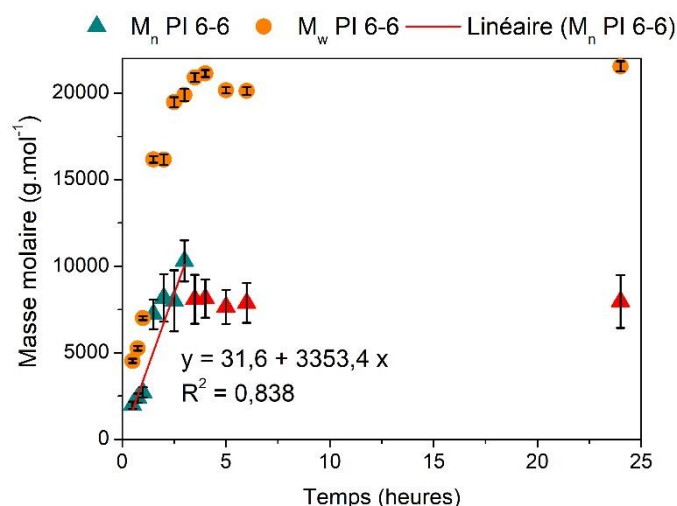


Figure II-12 : Evolution de la M_n et de la M_w en fonction du temps sur la synthèse du PI 6-6 avec régression linéaire sur la première partie des données expérimentales de $M_n(t)$

B.3.2 Concentration des monomères

La concentration en monomère est aussi un facteur qui permet d'avoir une influence sur la masse molaire. D'après les études, explicitées précédemment, des équipes de Meyer¹² et Long¹⁹ nous savons que la polymérisation du PI 6-6 suit une cinétique d'ordre 2. Ainsi la vitesse de réaction, dans le cas stœchiométrique, est égale à $v = k[M]^2$, avec k le coefficient de vitesse et $[M]$ la concentration d'un des monomères à un temps t . Pour des temps de réaction équivalents, la polymérisation est plus rapide avec des concentrations en monomères à $t = 0$ importantes. Les masses molaires finales obtenues lors de l'arrêt de la réaction sont elles aussi plus importantes.

Plusieurs synthèses stœchiométriques à diverses concentrations en monomères ont ainsi été réalisées. Les masses molaires obtenues sur les synthèses de PI 6-6 entre 0,5 et 1,5 M en monomères sont regroupées dans le Tableau II-7. La masse molaire pour la réaction à 0,9 M se situe dans la gamme des masses molaires déterminées pour les synthèses S1, S2 et S3 de la partie B.2.2 avec la même concentration en monomère.

Tableau II-7 : M_n en $g.mol^{-1}$ des synthèses stœchiométriques de PI 6-6 à différentes concentrations en monomères

PI 6-6 Concentration monomères ($mol.L^{-1}$)	Temps de réaction	M_n ($g.mol^{-1}$)	I_p (M_w/M_n)
0,5	18h	4 450 ($\pm 1\%$)	2,7 ($\pm 1\%$)
0,7	18h	5 300 ($\pm 19\%$)	1,8 ($\pm 20\%$)
0,9	18h	8 100 ($\pm 14\%$)	1,5 ($\pm 14\%$)
1,2	18h	12 250 ($\pm 11\%$)	1,5 ($\pm 12\%$)
1,5	18h	4 200 ($\pm 19\%$)	1,4 ($\pm 21\%$)

L'augmentation de la concentration en monomères jusqu'à 1,2 M permet une augmentation continue de la masse molaire tout en diminuant l'indice de polydispersité. On constate cependant que pour une concentration en monomères de 1,5 M, la masse molaire chute de nouveau. Un phénomène de prise en masse a été constaté lors de l'arrêt de la synthèse. La prise en masse a fait chuter les probabilités de rencontre entre les espèces et la masse molaire n'a plus augmenté. Ces résultats sont cohérents avec les masses molaires mesurées par SEC-MALS par l'équipe de Long sur les synthèses de PI 6-12 et de PI 12-12.¹⁹ Dans leurs cas, ils ont fait varier la proportion en masse des monomères de 20 à 50% du mélange final. Après calculs, on déduit qu'ils ont testé les concentrations 0,7 ; 1,2 et 6,5 M pour le PI 12-12 et 1,1 et 5,1 M pour le PI 6-12. Ils ont obtenu des M_n de 20 600 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le PI 12-12 à 1,2 M et de 10 700 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le PI 6-12 à 1,1 M. La même tendance a été observée, à savoir que la masse molaire finale augmente lorsque la concentration en monomères de départ augmente pour des temps de réaction équivalents. Il n'a pas été constaté de prise en masse dans leur cas mais les synthèses ont été réalisées pour des quantités plus faibles (3 mL de solvant sur leur étude contre 60 mL sur notre étude). Ils ont pu déterminer des M_n de 30 700 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le PI 12-12 à 6,5 M et 30 500 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le PI 6-12 à 5,1 M.

Un point quelque peu étonnant dans notre étude est le faible I_p obtenu pour certaines synthèses de PI 6-6 à haute concentration en monomères (1,4-1,5). Il est possible qu'une partie des masses molaires a été perdue lors du procédé de purification. La précipitation dans l'acétone peut éventuellement permettre la solubilisation des polymères de faibles masses molaires puisque les monomères sont solubles dedans. Ce fractionnement aurait donc conduit à des distributions de masses molaires plus resserrées lors de l'analyse SEC-MALS. L'équipe de Long a été confronté au même résultat avec des I_p plus faibles encore (1,2-1,4) pour les synthèses du PI 6-12 et du PI 12-12. Après avoir éliminé la possibilité de fractionnement lors de la purification ou l'exclusion d'échantillons lors du passage dans la colonne de chromatographie, ils ont avancé deux hypothèses. La première est que le faible I_p serait dû à une réactivité différente des monomères vis-à-vis des chaînes de polymères.²⁰ En effet, Nanda et Jain ont mis en évidence que des I_p inférieurs à 2 peuvent être observés lors d'une polymérisation par étapes quand la réactivité décroît avec l'augmentation de la masse molaire.²¹ Il est probable que l'addition d'un monomère neutre sur une espèce chargée se produise à des cinétiques différentes qu'entre deux espèces chargées. La deuxième hypothèse avancée est que la phase mobile utilisée lors des analyses SEC-MALS ne sépare pas parfaitement les polyélectrolytes. Cette séparation imparfaite peut alors entraîner une surestimation du M_n et donc par extension une sous-

évaluation de l' I_p .^{18,22} Après injection à plusieurs reprises du même échantillon de PI 12-12, ils ont constaté que les chromatogrammes d'indice de réfraction ne revenaient pas parfaitement à la ligne de base. Ceci laisse présager qu'il y a eu de l'adsorption du polymère sur la colonne. Ce phénomène n'a pas été observé lors de nos analyses SEC-MALS sur les PI 3-3, 6-6, 6-9 et 6-12. L'adsorption des PI sur la colonne dans cette phase d'élution se produirait alors seulement pour les polymères avec les segments hydrophobes les plus longs comme le PI 12-12.

Les deux gammes de PI, aliphatiques et éthers, ont été synthétisés en faisant varier la longueur des segments hydrophobes des unités de répétition. Le temps de polymérisation et la concentration en monomère sont des paramètres importants qui vont nous permettre de faire aussi varier la masse molaire des polymères synthétisés. Il faut désormais faire le lien entre ces variations de structures et les propriétés biologiques des PI. C'est ce qui va faire l'objet de la partie suivante.

C. Caractérisations biologiques des polyionènes

Les PI synthétisés ont ensuite été caractérisés par des tests biologiques. L'objectif est de démontrer leurs pouvoirs bactériostatiques en solution, c'est-à-dire mettre en évidence leurs capacités à inhiber la croissance bactérienne et notamment celles des germes indésirables. L'application envisagée pour ces PI étant dans un domaine alimentaire, nous avons évalué leur toxicité vis-à-vis de cellules mammaliennes. Il est à noter que les polymères qui ont servi aux tests de cytotoxicité sont les mêmes que ceux qui ont servi à l'évaluation des propriétés bactériostatiques.

C.1 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

C.1.1 Principe

Pour caractériser l'activité bactériostatique d'un PI, on détermine la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est la plus petite concentration pour laquelle la croissance bactérienne est inhibée. Le suivi de croissance des bactéries s'effectue à l'aide d'un appareil, appelé Bioscreen®. Celui-ci permet de réaliser rapidement des cinétiques de croissance bactérienne et de suivre cette croissance, en temps réel de façon automatique, par des mesures de densité optique. Le principe de fonctionnement est basé sur la turbidité d'une solution bactérienne qui

s'accroît quand la croissance bactérienne augmente au cours du temps, la densité optique de cette solution évoluant corrélativement. Des études antérieures ont démontré qu'il existait une relation linéaire de pente positive entre la densité optique et la masse bactérienne dans les puits de culture.²³⁻²⁶ Cette relation n'est cependant valable que pour certaines gammes de concentrations bactériennes, typiquement de 10^5 à 10^9 bactéries par millilitre.

Les CMI sont déterminées pour l'ensemble des polymères des deux gammes présentées précédemment. Elles sont évaluées sur les concentrations en polymères dans l'eau déionisée suivante : 0,5 ; 1 ; 2 ; 3,75 ; 7,5 ; 15 ; 25 ; 50 et 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les souches utilisées pour ces essais sont deux bactéries pathogènes modèles, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, Gram +) et *Escherichia coli* (*E. coli*, Gram -), et une souche d'intérêt technologiques, *Lactococcus lactis* 505 (*L. lactis*, Gram +). Chaque condition de concentration est réalisée en deux exemplaires et le test a été répété au moins deux fois sur chaque souche. Les détails expérimentaux du procédé sont fournis en Annexe A (p. 217).

C.1.2 Variation de la masse molaire

Dans un premier temps, la CMI est déterminée sur un PI 6-12 à différentes masses molaires afin de vérifier l'influence de ce paramètre. Les résultats sur *S. aureus* sont rassemblés dans le Tableau II-8. Ces mesures permettent d'attester de l'effet bactériostatique des PI puisqu'il y a bien une inhibition des croissances des souches bactériennes. Il faut noter qu'avec l'évaluation de la CMI on ne peut conclure que sur le pouvoir bactériostatique des polymères et non le pouvoir bactéricide. Pour cela, il faudrait récupérer le contenu des puits après le suivi de croissance et vérifier si les souches sont capables de se multiplier de nouveau après l'exposition aux PI. Cependant, les résultats de la littérature permettent d'attester du pouvoir bactéricide des PI qui a été démontré sur des structures similaires.^{15,16,27}

Tableau II-8 : CMI du PI 6-12 à différentes masses molaires sur *S. aureus*

PI 6-12 Mn (g.mol^{-1})	Ip (M_w/M_n)	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) <i>S. aureus</i>
2 800 ($\pm 5\%$)	1,4 ($\pm 6\%$)	2
6 000 ($\pm 9\%$)	1,7 ($\pm 9\%$)	7,5
9 000 ($\pm 11\%$)	1,8 ($\pm 11\%$)	7,5
12 900 ($\pm 17\%$)	2,2 ($\pm 17\%$)	15

Les résultats sur *S. aureus* démontrent effectivement que, dans la gamme étudiée, la masse molaire a une influence sur les valeurs de CMI. Les valeurs de CMI augmentent avec l'augmentation de la masse molaire donc les PI 6-12 avec des faibles masses molaires

présentent un meilleur pouvoir bactériostatique. Les PI de faibles masse molaires, et donc avec des chaînes plus courtes, doivent pénétrer plus facilement la couche de peptidoglycane sur la paroi de *S. aureus* (Gram +) pour ensuite perturber la membrane cytoplasmique.²⁸ La variation est cependant peu significative de 6 000 à 12 900 g.mol⁻¹ car la différence n'est que d'une seule dilution sur la gamme étudiée.

C.1.3 Variation de la longueur du segment aliphatique

L'ensemble de la gamme des PI aliphatiques a ensuite été testé sur *L. lactis*, *S. aureus* et *E. coli*. Les résultats des CMI sont récapitulés dans le Tableau II-9. Les PI montrent une efficacité aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Ceci est la conséquence de leur mode d'action qui consiste à perturber la paroi bactérienne pour en provoquer la lyse.

Tableau II-9 : CMI des PI aliphatiques sur *L. lactis*, *S. aureus* et *E. coli*

Polymères	Mn (g.mol ⁻¹)	Ip (M _w /M _n)	CMI (µg.mL ⁻¹)		
			<i>L. lactis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
PI 3-3	3 600 (±18%)	2,8 (±18%)	>75	15	50
	3 000 (±16%)	1,9 (±16%)	-	-	7,5
PI 6-6	6 800 (±11%)	2,2 (±11%)	75	7,5	-
	11 300 (11%)	1,9 (11%)	-	>50	-
PI 6-9	5 300 (±6%)	1,7 (±6%)	15	7,5	3,75
PI 6-12	2 800 (±5%)	1,4 (±6%)	1	2	1
	12 900 (±17%)	2,2 (±17%)	-	15	-

Leur action sur *S. aureus* et *E. coli* est comparable alors qu'elle paraît moins importante sur *L. lactis* puisqu'il est nécessaire d'utiliser des concentrations plus élevées en PI pour l'inhiber. Les PI synthétisés seraient donc plus efficaces dans notre étude sur les souches pathogènes modèles comme *S. aureus* ou *E. coli*. En l'état, le nombre de souches testées ne permet pas de conclure avec certitude sur l'efficacité en fonction du type de bactérie ou de paroi. Une étude sur une plus grande variété de bactéries est impérative pour appuyer cette tendance. Une telle étude a été effectuée sur 10 souches sauvages fournies par CHARAL dans le cadre du projet ANR BRICAPAC. Les résultats de cette étude sont fournis en Annexe C (p. 251). Cette étude a confirmé que l'efficacité des PI est effectivement souche-dépendante (activité bactériostatique ou bactéricide et CMI souches-dépendantes) et inhibe majoritairement des souches pathogènes et d'altération. A titre d'exemple, le PI 6-6 à 15 µg.mL⁻¹ inhibe la croissance de 2 souches pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) et de 2 souches d'altérations

(*Pseudomonas sp.*, *Brochotrix*) mais n'a pas d'influence sur les croissances des 4 souches lactiques testées.

La longueur du segment aliphatique présent dans l'unité de répétition du PI a également une influence sur la CMI. Elle diminue lorsque la longueur du segment aliphatique augmente. Ainsi les PI avec des segments aliphatiques longs présentent un meilleur pouvoir bactériostatique. Cette tendance a pu être observée sur les trois souches présentées ici et les dix souches du projet ANR BRICAPAC (Annexe C, p. 251). La meilleure efficacité du PI 6-12 est en partie dû à sa faible masse molaire, mais quand le compare au PI 3-3, qui est de masse molaire équivalente, il y a bien un écart important entre les valeurs de CMI de ces deux polymères sur les trois souches évaluées. La CMI a aussi été évalué sur *S. aureus* pour des PI 6-6 et PI 6-12 à 11 300 et 12 900 g.mol⁻¹ respectivement. Le PI 6-6 présente une CMI > 50 µg.mL⁻¹ alors que le PI 6-12 a une CMI de 15 µg.mL⁻¹. La meilleure efficacité du PI 6-12 est donc majoritairement dûe à la présence de segment aliphatique long dans l'unité de répétition.

Dans la littérature, il est admis que la balance charge/hydrophobie des polycations impacte l'efficacité du pouvoir antibactérien. Plusieurs études de la littérature sur des PI similaires sont parvenues à la même conclusion.^{16,29} En effet, la surface externe des bactéries à Gram positif et négatif est généralement chargée négativement, il n'est donc pas surprenant que des polycations présentent une grande affinité de liaison avec les parois bactériennes. Cependant, la présence de charges positives associées à des segments hydrophobes semble améliorer cette interaction avec la surface bactérienne et entraîne une meilleure pénétration du polymère dans la membrane cytoplasmique.^{30,31} Cette pénétration peut être suffisante pour provoquer une perte de fluidité de la membrane et ainsi perturber la croissance bactérienne. Une publication récente a même suggéré que la balance amphiphile est un paramètre plus important que la densité de charge pour améliorer l'efficacité antibactérienne.³²

C.1.4 Variation de la nature du segment

L'ajout de ponts éthers dans la deuxième gamme de PI a pour objectif de diminuer la cytotoxicité des polymères. Cependant, en ajoutant ces ponts éthers, on modifie aussi la balance charge/hydrophobie du PI et donc potentiellement son pouvoir bactériostatique. Les valeurs de CMI sur *S. aureus* de la gamme éther sont récapitulées dans le Tableau II-10 et sont mises en regard de leurs équivalents avec des masses molaires similaires sur la gamme aliphatique.

Tableau II-10 : CMI des PI aliphatiques et éthers sur *S. aureus*

Polymères	Mn (g.mol ⁻¹)	Ip (Mw/Mn)	CMI (µg.mL ⁻¹)	Polymères	Mn (g.mol ⁻¹)	CMI (µg.mL ⁻¹)
PI et5-3	2 400 (±28%)	4,9 (±28%)	15	PI 3-3	3 600 (±18%)	15
PI et5-6	8 900 (±13%)	2,0 (±13%)	15	PI 6-6	6 800 (±11%)	7,5
PI et5-9	7 700 (±15%)	2,2 (±15%)	>50	PI 6-9	5 300 (±6%)	7,5
PI et5-12	5 900 (±11%)	1,8 (±11%)	15	PI 6-12	6000 (±9%)	7,5
PI et5-et5	6 000 (±23%)	2,5 (±23%)	15			

Les PI éthers sont bactériostatiques mais on ne retrouve pas la même tendance que sur la gamme aliphatique, à savoir la diminution de la CMI lorsqu'on augmente la longueur du segment aliphatique. L'ajout du pont éther entraîne l'augmentation de la valeur de la CMI par rapport à leurs homologues aliphatiques de masses molaires équivalentes. Seul le PI et5-3 présente la même CMI que le PI 3-3 sur *S. aureus*. Cependant, le pont éther du PI et5-3 contient plus de carbone dans l'unité de répétition que le PI 3-3. Par conséquent ces deux polymères sont moins comparables entre eux que le PI et5-6 et le PI 6-6 par exemple. Le PI et5-9 est celui qui montre la plus grande augmentation de CMI sur *S. aureus* par rapport à son pendant aliphatique. Cette combinaison particulière de ponts éthers et de neuf carbones dans le segment aliphatique engendre probablement une balance charge/hydrophobie qui n'est pas favorable à une efficacité antibactérienne du PI.

Mattheis et *al.* ont synthétisé les mêmes PI éthers en faisant varier la longueur du groupe pendant R sur l'ammonium quaternaire et du segment aliphatique R' inter-ammoniums quaternaires (Figure II-13).¹⁶ On s'intéresse au cas particulier des PI éthers avec R = méthyle (similaire à la structure de nos PI éthers) et avec R' qui varie d'éthyle à décyle.

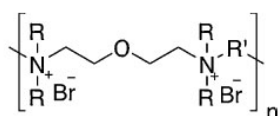


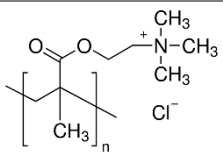
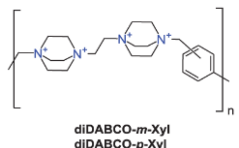
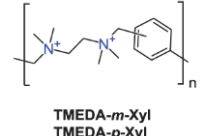
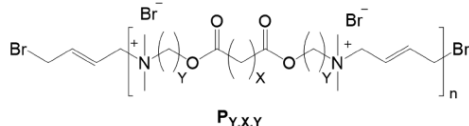
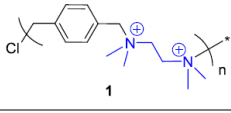
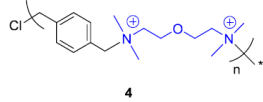
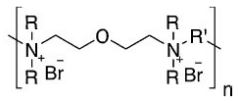
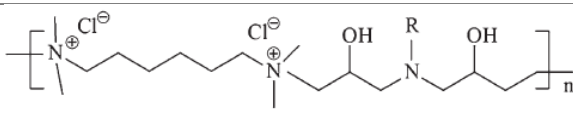
Figure II-13 : PI éthers synthétisés par Mattheis et *al.*,¹⁶ R = méthyle, butyle, hexyle, octyle et R' = éthyle, butyle, pentyle, hexyle, décyle, dodécyle

Les CMI sur *E. coli* sont du même ordre de grandeur que celle que nous avons évaluées sur *S. aureus*. En revanche, la CMI pour R' = éthyle est très élevée (>500 µg.mL⁻¹) avant de chuter drastiquement et de se stabiliser (de 6,25 à 8,75 µg.mL⁻¹ pour R' = butyle à décyle). Il y a donc bien une tendance sur la gamme des PI éthers d'une diminution de la CMI avec l'augmentation de la longueur du segment aliphatique inter-ammoniums quaternaires. Cette tendance n'est cependant pas visible sur notre gamme d'étude. Il faut noter que pour les groupes pendants R =

butyle, hexyle ou octyle, on n'observe plus cette tendance quand R' varie sur la gamme étudiée par Mattheis *et al.* Pour ces PI, les CMI sont plus élevées que pour les PI avec R = méthyle. Il est donc préférable d'avoir des groupes pendants peu encombrants sur l'ammonium quaternaire pour avoir une bonne efficacité antibactérienne sur ces PI.

Les CMI obtenues pour les PI aliphatiques et éthers sur *S. aureus* et *E. coli* ont été comparées au polyméthacrylate de diméthylaminoéthyle quaternisé (PMADAMEQ), un polymère cationique utilisé comme agent antibactérien (Tableau II-11).³³

Tableau II-11 : Résultats de CMI sur *S. aureus* et *E. coli* pour des PI issus de la littérature

Référence	Structure générale des polymères	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Dans cette étude	 <p>PMADAMEQ</p>	>200	/
Kopiasz <i>et al.</i> ³⁴	 <p>diDABCO-<i>m</i>-Xyl diDABCO-<i>p</i>-Xyl</p>	m : 4 p : 4	m : 16 p : 8
	 <p>TMEDA-<i>m</i>-Xyl TMEDA-<i>p</i>-Xyl</p>	m : 4 p : 8	m : 8 p : 8
Krumm <i>et al.</i> ²⁹	 <p>$P_{Y,X,Y}$ X = 2, 4, 8 et Y = 2, 3</p>	5 à 40	20 à 80
Liu <i>et al.</i> ¹⁵	 <p>1</p>	3,9	7,8
	 <p>4</p>	3,9	3,9
Mattheis <i>et al.</i> ¹⁶	 <p>R = méthyle R' = butyle, pentyle, hexyle, décyle, dodécyle</p>	/	6,25 à 15
Xu <i>et al.</i> ³⁵	 <p>R = éthyle, butyle, hexyle, octyle, dodécyle</p>	/	7,8 à 62,5

Le PMADAMEQ donne des CMI supérieures à $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sur *S. aureus*. Les PI sont donc nettement plus efficaces que ce polymère. Le PMADAMEQ possède cependant des charges positives en groupes pendants. Il est plus pertinent de comparer nos PI à des polymères cationiques avec des charges dans le squelette du polymère. Nous avons donc recensé des PI similaires dans la littérature (Tableau II-11). Les PI aliphatiques et éthers sont d'une efficacité équivalente ou meilleure que plusieurs exemples de PI issus de la littérature. Les manipulations étant faites dans des conditions variées avec des souches d'origines différentes, on ne peut cependant pas conclure avec certitude sur l'efficacité des polymères les uns par rapport aux autres.

C.2 Cytotoxicité

C.2.1 Principe

Pour caractériser la cytotoxicité des polymères, on réalise un test standardisé, appelé test MTT, qui permet de quantifier la viabilité cellulaire par des mesures de densité optique. Le test est réalisé suivant la norme NF EN ISO 10993-5 qui concerne les méthodes d'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* des dispositifs médicaux. Ce test est nommé d'après le nom du composé chimique utilisé, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium (MTT). Ce sel de tétrazolium peut être réduit en cristaux de formazan violets par l'enzyme succinate déshydrogénase mitochondriale (Figure II-14). La quantité de cristaux formés est ainsi proportionnelle au nombre de cellules vivantes et métaboliquement actives. La mesure de l'absorbance après dissolution des cristaux permet de quantifier la viabilité cellulaire.

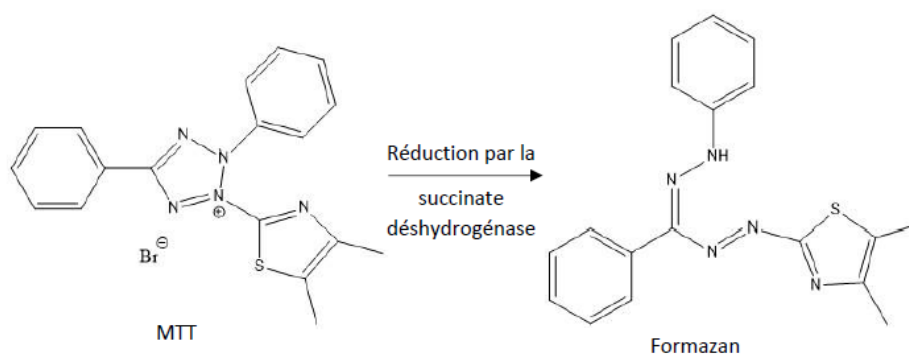


Figure II-14 : Réaction de réduction du MTT en formazan

L'évaluation de la toxicité est effectuée sur la lignée cellulaire L929 (fibroblastes murins sains) pendant 48 h d'exposition aux PI. Chaque condition a été réalisée en six exemplaires et sur deux gammes de concentration en polymère de 1 à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et de 1 à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Seule les

résultats de la gamme de 1 à 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sont présentés dans cette section mais les résultats sur la deuxième gamme sont disponibles en Annexe D (p. 252). Selon la norme NF EN ISO 10993-5, on considère que la concentration en PI est toxique si la viabilité cellulaire est inférieure à 70%. Les détails expérimentaux des essais sont fournis en Annexe A (p. 217). Certains résultats ont été analysés par des tests statistiques basés sur des modèles linéaires (test de Student). La significativité d'un test est appréciée par la mesure statistique nommée p-valeur. Elle représente la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle si elle est vraie (dans notre cas, l'hypothèse qu'il n'y a pas de différence observée entre deux conditions). Plus la valeur de la p-valeur est faible, plus le test de Student est statistiquement significatif. En pratique, on la compare au seuil de 0,05. Si la p-valeur calculée par le test de Student est inférieure à 0,05 alors on considère qu'il y a une différence significative entre les deux conditions avec un intervalle de confiance de 95%.

C.2.2 Variation de la masse molaire

Des PI 6-6 et des PI et5-9 à différentes masses molaires ont été synthétisés et leurs cytotoxicités ont été évaluées. Les résultats sont regroupés sur la Figure II-15. Les PI 6-6 à 6 800 et 11 300 g.mol^{-1} sont cytotoxiques à partir de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les PI et5-9 3 900 et 7 700 g.mol^{-1} sont cytotoxiques à partir de 7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

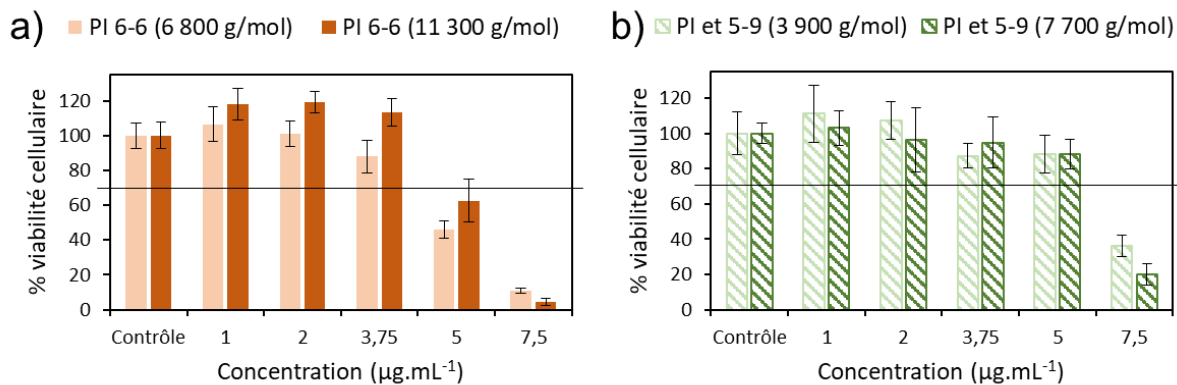


Figure II-15 : Résultats de cytotoxicité sur L929 (n = 6) pour des PI 6-6 (a) et PI et5-9 (b) à différentes M_n

Les résultats sont assez proches aux premiers abords et la masse molaire ne semble pas avoir un effet sur la cytotoxicité dans la gamme observée. Dans le cas des PI et5-9, il n'y a aucune différence significative sur toutes les concentrations de 1 à 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (p-valeur > 0,05 dans tous les cas). Sur les PI 6-6, il n'y a pas de différence significative sur la concentration 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (p-valeur > 0,05) mais l'écart sur les concentrations 2 à 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ est lui significatifs dans les trois cas (p-valeur < 0,05 dans les trois cas). Une masse molaire plus faible impliquerait donc une cytotoxicité plus importante. Pour autant, les deux PI 6-6 sont tous les deux considérés comme non-cytotoxiques à 3,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et cytotoxiques à 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, l'influence de la masse

moléculaire reste donc relativement faible. Plusieurs répétitions sont nécessaires pour affiner l'étude. En l'état, on considère que la masse molaire a une influence négligeable sur la cytotoxicité des PI étudiés, dans la gamme des masses molaires observées.

C.2.3 Variation de la longueur du segment aliphatique

Les résultats des tests de cytotoxicité pour les PI aliphatiques sont résumés sur la Figure II-16. Les PI sont cytotoxiques dès $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Des études de cytotoxicité ont déjà été menées sur les PI aliphatiques. Rembaum avait démontré la cytotoxicité des PI 3-3 et PI 6-10 sur des cellules humaines dès 1968.¹⁴ Plus récemment, Narita *et al.*^{17,36} ont mené deux études pour mettre en évidence les paramètres influençant la cytotoxicité de ces PI aliphatiques. D'après leurs résultats, la cytotoxicité se produit pour des densités de charges élevées sur le PI seulement si ce PI présente une grande hydrophobie. Les PI avec des segments aliphatiques courts se lient plus facilement à la membrane cellulaire mais ne la perturbent pas alors que les PI avec des segments aliphatiques longs, donc plus hydrophobes, détruisent efficacement la membrane cellulaire, même si moins de polymères sont adsorbés sur celle-ci.

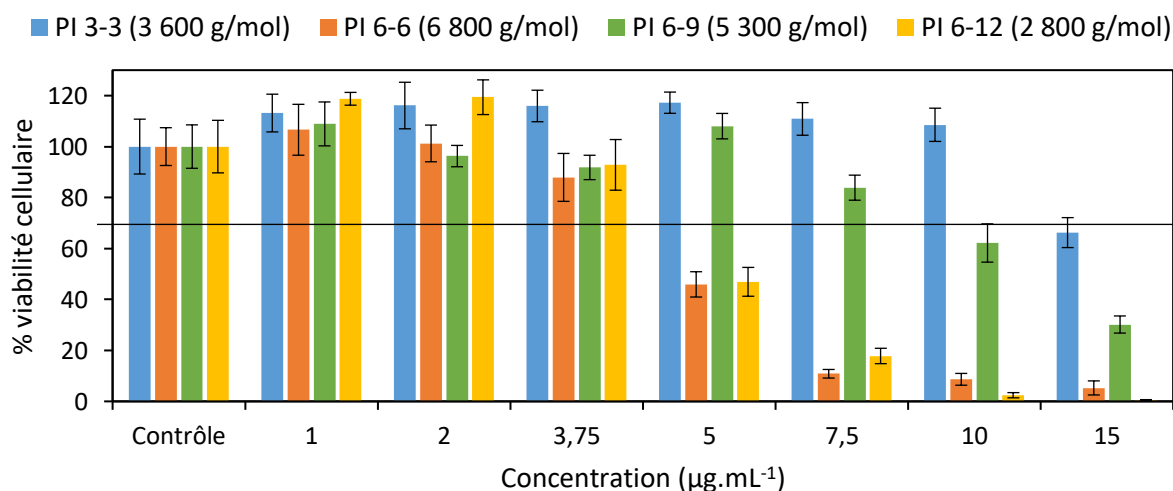


Figure II-16 : Résultats de cytotoxicité sur L929 ($n = 6$) pour les PI aliphatiques

Les résultats que nous obtenons sont en accord avec les conclusions de Narita *et al.*^{17,36} Le PI 3-3 est moins cytotoxique que le PI 6-12. La tendance est cependant moins marquée que sur les résultats de CMI. En effet, le PI 6-9 est plus cytotoxique que le PI 3-3 mais moins cytotoxique que le PI 6-6.

Lorsque l'on met en regard les concentrations de cytotoxicité avec les CMI (Tableau II-12), il apparaît évident qu'il est difficile de trouver une concentration où les PI sont à la fois bactériostatiques et non cytotoxiques.

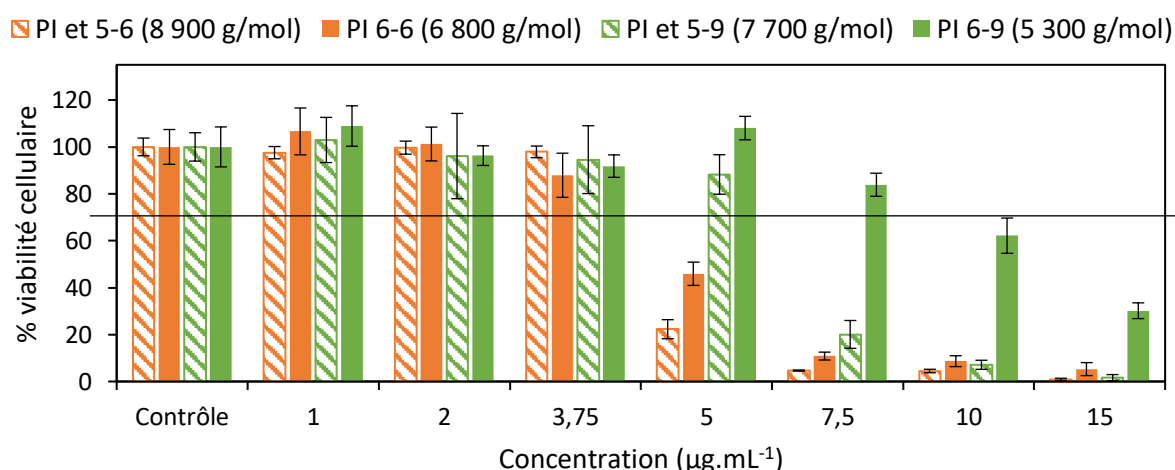
Tableau II-12 : Résultats des CMI et des concentrations de cytotoxicité sur les PI aliphatiques

Polymère	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			Cytotoxicité ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
	<i>L. lactis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	L929
PI 3-3	>75	15	50	15
PI 6-6	75	7,5	-	5
PI 6-9	15	7,5	3,75	10
PI 6-12	1	2	1	5

Il n'est pas possible d'y parvenir dans le cas du PI 3-3 et du PI 6-6, en revanche un compromis est possible dans le cas des PI 6-9 et PI 6-12. A $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, le PI 6-12 inhibe la croissance de toutes les souches sans être cytotoxique. Un cas plus intéressant est celui du PI 6-9. A $7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, le PI 6-9 inhibe la croissance de *S. aureus* et *E. coli* sans entraver celle de *L. lactis* et sans cytotoxicité. Cette particularité peut être exploitée dans le cas où l'on souhaite inhiber sélectivement certaines souches pathogènes au sein d'un mélange, par rapport à des souches dites positives (lactiques).

C.2.4 Variation de la nature du segment

L'objectif en remplaçant un segment aliphatique par un pont éther est de faire diminuer la cytotoxicité des PI. Les résultats de cytotoxicité des PI éthers sont représentés sur les Figure II-17 et Figure II-18. L'effet désiré n'a pas été obtenu sur une partie de la gamme (Figure II-17) puisque la cytotoxicité du PI et5-6 est de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ comme le PI 6-6, et celle du PI et5-9 est de $7,5$ contre $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le PI 6-9. Une diminution de viabilité a été constatée pour le PI 6-9 à $7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ mais elle n'est pas assez importante pour être qualifiée de cytotoxique.


 Figure II-17 : Résultats de cytotoxicité sur L929 ($n = 6$) pour les PI et5-6, et5-9, 6-6 et 6-9

En revanche, l'ajout des ponts éthers a permis de diminuer la cytotoxicité des deux cas extrêmes de la gamme (Figure II-18). Le PI et5-3 est cytotoxique à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (vérifié sur une gamme

plus large de concentration, cf Annexe D, p.252) contre $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le PI 3-3 et le PI et5-12 est cytotoxique à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contre $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le PI 6-12. On considère le PI et5-12 cytotoxique à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, et non à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, car la barre d'erreur passe en dessous du seuil de 70% de viabilité cellulaire. Comme la gamme aliphatique, il est difficile d'avoir sur la gamme éther des concentrations où ces polymères sont à la fois bactériostatiques sur les souches étudiées et non cytotoxiques. Cette situation est possible seulement pour le PI et5-3.

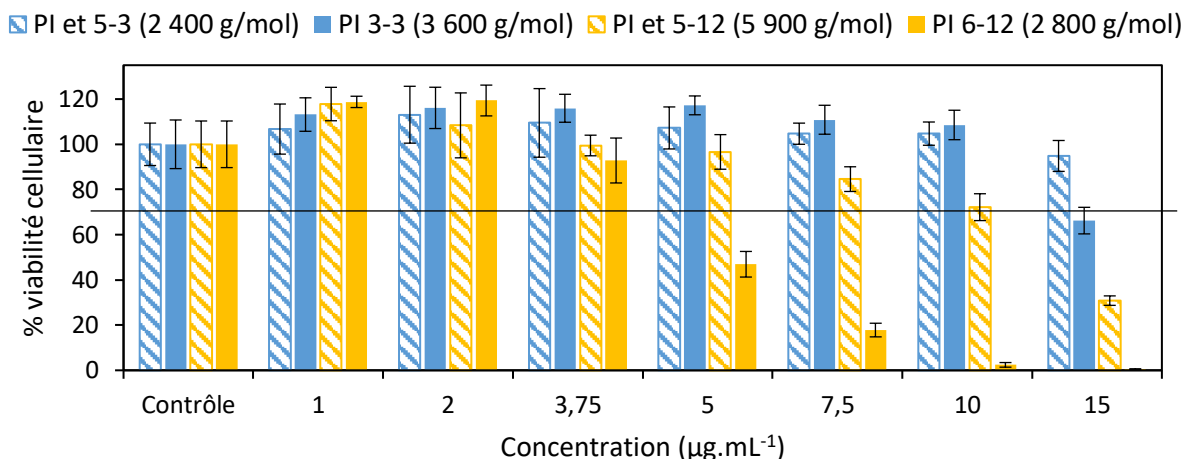


Figure II-18 : Résultats de cytotoxicité sur L929 ($n = 6$) pour les PI et5-3, et5-12, 3-3 et 6-12

Il est intéressant de se pencher sur le cas particulier des PI 6-6, PI et5-6 et PI et5-et5 pour conclure sur l'intérêt de l'ajout des ponts éthers sur la cytotoxicité des polymères (Figure II-19). Ces trois PI possèdent des structures proches en terme de nombre de carbone avec une variation de 0, 1 ou 2 ponts éthers dans l'unité de répétition du squelette.

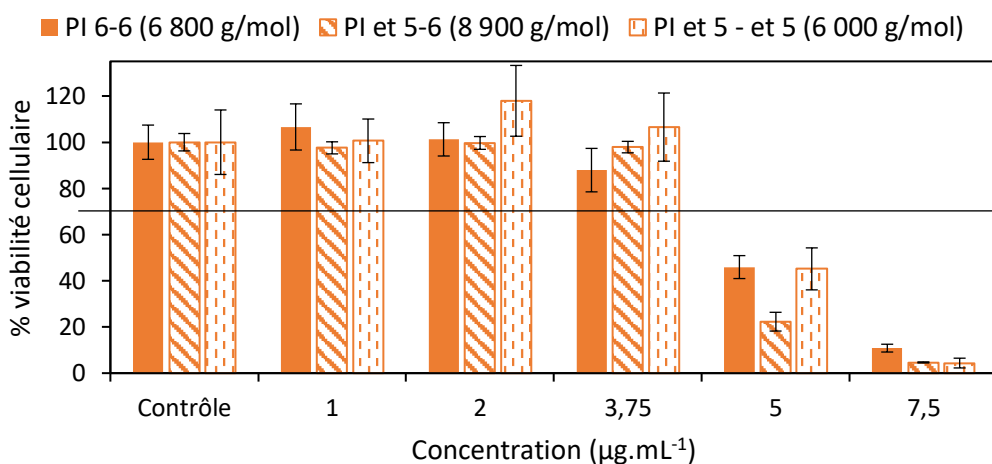


Figure II-19 : Résultats de cytotoxicité sur L929 ($n = 6$) pour PI 6-6, PI et5-6 et PI et5-et5

L'ajout des ponts éthers a diminué l'efficacité antibactérienne du PI et5-6 et du PI et5-et5 en doublant la CMI par rapport au PI 6-6. A première vue, la cytotoxicité est identique entre les trois PI avec une viabilité cellulaire inférieure à 70% pour la concentration 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Cependant, à la concentration inférieure de 3,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, le PI et5-et5 avec 2 ponts éthers serait moins cytotoxique que les deux autres. Afin de confirmer cette tendance, nous avons effectué un test statistique de Student entre les résultats des concentrations à 1, 2 et 3,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Il n'y a aucune différence significative entre les PI à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, le test montre une différence significative entre le PI et5-et5 et les deux autres PI (p-valeur < 0,05 pour les deux). Il n'a pas été constaté de différence significative entre le PI 6-6 et le PI et5-6 à cette concentration. Enfin, à 3,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, le test démontre une différence significative entre le PI 6-6 et les deux autres PI (p-valeur < 0,05 pour les deux) mais aucune différence n'est notable entre le PI et5-6 et le PI et5-et5. Au vu des résultats du test statistique, l'exemple du PI et5-3 et du PI et5-12, et en accord avec les résultats de la littérature,¹⁵⁻¹⁷ on peut conclure que l'ajout de ponts éthers fait effectivement diminuer la cytotoxicité. Cette diminution se fait cependant au détriment de l'efficacité antibactérienne.

D. Conclusions et perspectives : choix des polymères à greffer

Ce premier chapitre a permis de synthétiser deux gammes de PI. La RMN ^1H et la SEC-MALS ont permis de déterminer leurs structures et leurs masses molaires de façon fiable. Les paramètres de synthèse ont été variés afin de pouvoir maîtriser au mieux les structures des polymères désirés en fonction des applications visées. Ainsi il sera possible de jouer sur le temps de polymérisation et la concentration en monomère pour obtenir des PI de masses molaires variables.

Ce chapitre a aussi permis de comparer les deux gammes en termes de propriété bactériostatique et de cytotoxicité (Tableau II-13).

Tableau II-13 : Résultats de CMI sur *S. aureus* et de cytotoxicité sur L929 pour les PI aliphatiques et éthers

Polymère	CMI <i>S. aureus</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Cytotoxicité L929 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Polymère	CMI <i>S. aureus</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Cytotoxicité L929 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
PI 3-3	15	15	PI et5-3	15	25
PI 6-6	7,5	5	PI et5-6	15	5
PI 6-9	7,5	10	PI et5-9	>50	7,5
PI 6-12	2	5	PI et5-12	15	10
			PI et5-et5	15	5

Il a été démontré, au travers de nos résultats et de la littérature, que le pouvoir bactériostatique des PI est d'autant plus important que le segment aliphatique inter-ammoniums quaternaires est long. La gamme aliphatique est donc celle qui offre le plus de possibilité en terme de contrôle du pouvoir bactériostatique en fonction de la structure du polymère. La gamme éther est moins cytotoxique que la gamme aliphatique, mais cela s'obtient au détriment de l'efficacité antibactérienne. Il est possible de moduler la structure des PI pour obtenir des polymères à la fois non cytotoxiques et bactériostatiques sur des concentrations d'intérêt (PI 6-9, PI 6-12 et PI et5-3). En accord avec la littérature, nous avons constaté que la cytotoxicité de ces polymères cationiques est d'autant plus importante que le segment hydrophobe est grand. De plus, l'ajout de pont éther a effectivement permis de faire diminuer la cytotoxicité des PI en les rendant plus hydrophiles.

Plusieurs perspectives de synthèse sont envisageables pour la poursuite de cette étude en solution. Il est possible de varier d'avantage la structure des PI en réalisant des segments hydrophobes plus longs afin de vérifier s'il n'existe pas un seuil au-delà duquel l'activité bactériostatique des PI n'augmente plus avec la longueur du segment hydrophobe. Les monomères n'étant pas disponibles commercialement, il faudrait les synthétiser pour accéder par exemple à la polymérisation du PI 9-9 ou du PI 12-12 (Figure II-20).

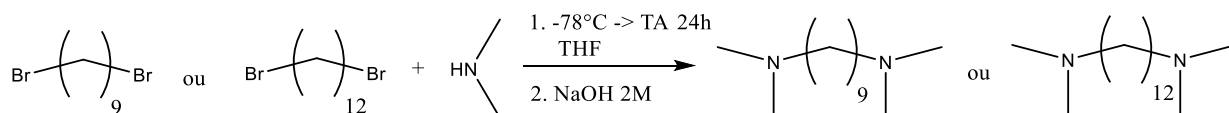


Figure II-20 : Synthèse des monomères *N,N,N',N'*-Tétraméthyl-1,9-nonanediamine et *N,N,N',N'*-Tétraméthyl-1,12-dodécanediamine

Une autre variation intéressante de la structure des PI pourrait être la possibilité de les biodégrader pour contrôler l'activité bactériostatique dans le temps. Krumm *et al.* ont synthétisé des PI avec des groupes esters afin de provoquer leurs dégradations dans les milieux aqueux par hydrolyse (Figure II-21).²⁹ L'étude menée par le groupe a montré le pouvoir bactéricide de ces polymères avec des cinétiques de lyse cellulaire de quelques minutes. Ils ont ensuite hydrolysé ces polymères à différents degrés afin de les dégrader, et ont de nouveau évalué l'action biocide dans le temps. Ainsi, ils ont pu mettre en évidence que les versions hydrolysées, donc de plus petites masses molaires, sont beaucoup moins bactéricides. Ces PI esters sont donc capables d'avoir une action biocide très rapide puis de se dégrader dans l'environnement en s'inactivant. De plus, en fonction de leur nature chimique et des conditions de dégradation, les PI esters peuvent rester actifs de 20 minutes à 1 semaine. Il est donc possible en fonction des applications de moduler le temps d'activité biocide de ces polymères.

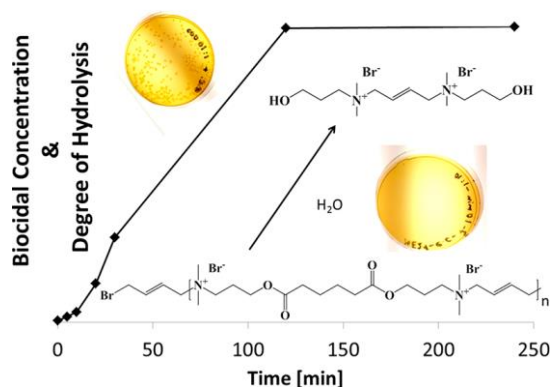


Figure II-21 : Concentration biocide et degré d'hydrolyse des PI esters en fonction du temps. Image issue de l'article de Krumm et al.²⁹

Bien que les PI soient des polymères antibactériens efficaces en solution, la perspective d'application la plus intéressante est, selon nous, de réussir à les greffer en surface. La création de surfaces antibactériennes capables de limiter la prolifération bactérienne sans relargage d'espèces nocives dans l'environnement seraient un véritable atout dans de nombreuses applications alimentaires et médicales (emballages alimentaires, systèmes de purification ou environnement hospitalier). Un greffage antibactérien robuste et une absence de relargage peuvent être obtenus en greffant de façon covalente des polymères antibactériens sur de surfaces. Plusieurs stratégies ont été développées dans la littérature pour réaliser des revêtement antibactériens « contact killing » à base de polycations.³⁷⁻⁴⁰ A notre connaissance, le greffage covalent de PI sur des surfaces n'a jamais été reporté dans la littérature. La synthèse d'hydrogels à base de PI réticulé⁴¹ pourrait être utilisé pour des modifications de surfaces mais nous ne l'avons pas considéré comme un greffage covalent sur une surface. Nous avons donc développé une méthode de greffage covalent des PI basée sur la formation d'une sous-couche réactive combinant revêtement de polydopamine et chimie de surface des sels de diazonium. Cette sous-couche possède des fonctions réactives diméthylamines sur lesquelles on vient effectuer la polyaddition en surface des PI *via* la méthode « grafting through ». Ce procédé de greffage a notamment fait l'objet d'un brevet en 2018 (Brevet FR2019052921 déposé le 04/12/18).

Le chapitre suivant est donc consacré au greffage covalent des PI sur des surface modèles, le verre et le wafer de silicium. Nous choisissons de greffer seulement la gamme aliphatique des PI car ils possèdent de meilleures propriétés bactériostatiques, par rapport aux PI éthers, et la possibilité de moduler cette efficacité en fonction de leur structure. Afin de s'assurer du greffage covalent des PI, de l'absence de relargage et de la conservation du pouvoir antibactérien en surface, les matériaux créés ont été analysés par des caractérisations approfondies en physico-chimie et en biologie.

Bibliographie

- (1) Carothers, W. H. Polymerization. *Chemical Reviews* **1931**, 8 (3), 353–426. <https://doi.org/10.1021/cr60031a001>.
- (2) Rembaum, A.; Baumgartner, W.; Eisenberg, A. Aliphatic Ionenes. *J. Polym. Sci. B Polym. Lett.* **1968**, 6 (3), 159–171. <https://doi.org/10.1002/pol.1968.110060302>.
- (3) Gibbs, C. F.; Littman, E. R.; Marvel, C. S. Quaternary Ammonium Salts from Halogenated Alkyl Dimethylamines. II. The Polymerization of Gamma-Halogenopropyl dimethylamines. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, 55, 753–757.
- (4) Abboud, J. L. M.; Notario, R.; Bertran, J.; Sola, M. One Century of Physical Organic Chemistry: The Menshutkin Reaction. *Prog. Phys. Org. Chem.* **1993**, 19, 1–182.
- (5) Rembaum, A.; Noguchi, H. Reactions of N, N, N', N'-Tetramethyl- α , ω -Diaminoalkanes with α , ω -Dihaloalkanes. II. Xy Reactions. *Macromolecules* **1972**, 5 (3), 261–269.
- (6) Mauritz, K. A. Morphological Theories. In *Ionomers: synthesis, structure, properties and applications*; Tant, M. R., Mauritz, K. A., Wilkes, G. L., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, **1997**; 95–157. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1461-2_3.
- (7) Williams, S. R.; Long, T. E. Recent Advances in the Synthesis and Structure–Property Relationships of Ammonium Ionenes. *Progress in Polymer Science* **2009**, 34 (8), 762–782. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.004>.
- (8) Flory, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*; Cornell University Press, Ithaca, New York, **1953**.
- (9) Borgerding, E. M. SYNTHESIS, MOLECULAR WEIGHT CHARACTERIZATION AND STRUCTURE- PROPERTY RELATIONSHIPS OF AMMONIUM IONENES. *MS thesis, Virginia Tech, Blacksburg, VA*; **2007**, 109.
- (10) Williams, S. R.; Barta, Z.; Ramirez, S. M.; Long, T. E. Synthesis of 12,12-Ammonium Ionenes with Functionality for Chain Extension and Cross-Linking via UV Irradiation. *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, 210 (7), 555–564. <https://doi.org/10.1002/macp.200800522>.
- (11) Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E. AMINES, C=N, AND N=O COMPOUNDS. In *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*; Elsevier, **1990**; 339–354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091740-5.50014-4>.
- (12) Wang, J.; Meyer, W. H.; Wegner, G. On the Polymerization of N,N,N,N-Tetramethyl- α , ω -Alkanediamines with Dibromoalkanes—an in-Situ NMR Study. *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, 195 (5), 1777–1795. <https://doi.org/10.1002/macp.1994.021950527>.
- (13) Tsutsui, T.; Tanaka, R.; Tanaka, T. Dynamic Mechanical Properties of Some Novel Ionene Polymers. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **1975**, 13 (11), 2091–2102. <https://doi.org/10.1002/pol.1975.180131103>.
- (14) Rembaum, A.; Senyei, A. E.; Rajaraman, R. Interaction of Living Cells with Polyionenes and Polyionene-Coated Surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **1977**, 11 (1), 101–110.
- (15) Liu, S.; Ono, R. J.; Wu, H.; Teo, J. Y.; Liang, Z. C.; Xu, K.; Zhang, M.; Zhong, G.; Tan, J. P. K.; Ng, M.; Yang, C.; Chan, J.; Ji, Z.; Bao, C.; Kumar, K.; Gao, S.; Lee, A.; Fevre, M.; Dong, H.; Ying, J. Y.; Li, L.; Fan, W.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. Highly Potent Antimicrobial Polyionenes with Rapid Killing Kinetics, Skin Biocompatibility and in Vivo Bactericidal Activity. *Biomaterials* **2017**, 127, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.027>.
- (16) Mattheis, C.; Zheng, M.; Agarwal, S. Closing One of the Last Gaps in Polyionene Compositions: Alkyloxyethylammonium Ionenes as Fast-Acting Biocides.

- Macromolecular Bioscience* **2012**, *12* (3), 341–349. <https://doi.org/10.1002/mabi.201100316>.
- (17) Narita, T.; Ohtakeyama, R.; Matsukata, M.; Gong, J. P.; Osada, Y. Kinetic Study of Cell Disruption by Ionic Polymers with Varied Charge Density. *Colloid and Polymer Science* **2001**, *279* (2), 178–183.
- (18) Wu, C. *Handbook of Size Exclusion Chromatography*; International Specialty Products, Wayne, New Jersey, **1995**.
- (19) Layman, J. M.; Borgerding, E. M.; Williams, S. R.; Heath, W. H.; Long, T. E. Synthesis and Characterization of Aliphatic Ammonium Ionenenes: Aqueous Size Exclusion Chromatography for Absolute Molecular Weight Characterization. *Macromolecules* **2008**, *41* (13), 4635–4641. <https://doi.org/10.1021/ma800549j>.
- (20) Gupta, S. K.; Kumar, A.; Bhargava, A. Molecular Weight Distribution and Moments for Condensation Polymerization of Monomers Having Reactivity Different from Their Homologues. *Polymer* **1979**, *20* (3), 305–310. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(79\)90091-0](https://doi.org/10.1016/0032-3861(79)90091-0).
- (21) Nanda, V. S.; Jain, S. C. Effect of Variation of the Bimolecular Rate Constant with Chain Length on the Statistical Character of Condensation Polymers. *The Journal of Chemical Physics* **1968**, *49* (3), 1318–1320. <https://doi.org/10.1063/1.1670226>.
- (22) Balke, S. T.; Mourey, T. H. Local Polydispersity Detection in Size Exclusion Chromatography: Method Assessment. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *81* (2), 370–383. <https://doi.org/10.1002/app.1448>.
- (23) Perrin, J.-F. Mesure de Biomasse et Mesures d'atténuation (Densité Optique, Optical Density, OD, Opacimétrie) Avec Un Spectrophotomètre Visible Ou UV-Visible Classique. http://www.perrin33.com/genie_ferment/tech/mesurebiomasse-trouble_2.php
- (24) Niemelä, S. I. Uncertainty of Quantitative Determinations Derived by Cultivation of Microorganisms, Mikes Publication, Advisory Commission for Metrology, Chemistry Section, Expert Group for Microbiology, Helsinki, Finland, **2003**.
- (25) Lin, H.-L.; Lin, C.-C.; Lin, Y.-J.; Lin, H.-C.; Shih, C.-M.; Chen, C.-R.; Huang, R.-N.; Kuo, T.-C. Revisiting with a Relative-Density Calibration Approach the Determination of Growth Rates of Microorganisms by Use of Optical Density Data from Liquid Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76* (5), 1683–1685. <https://doi.org/10.1128/AEM.00824-09>.
- (26) Stevenson, K.; McVey, A. F.; Clark, I. B. N.; Swain, P. S.; Pilizota, T. General Calibration of Microbial Growth in Microplate Readers. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 38828. <https://doi.org/10.1038/srep38828>.
- (27) Strassburg, A.; Kracke, F.; Wenners, J.; Jemeljanova, A.; Kuepper, J.; Petersen, H.; Tiller, J. C. Nontoxic, Hydrophilic Cationic Polymers-Identified as Class of Antimicrobial Polymers: Nontoxic, Hydrophilic Cationic Polymers.... *Macromol. Biosci.* **2015**, *15* (12), 1710–1723. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500207>.
- (28) Kenawy, E.-R.; Abdel-Hay, F. I.; El-Shanshoury, A. E.-R. R.; El-Newehy, M. H. Biologically Active Polymers. V. Synthesis and Antimicrobial Activity of Modified Poly(Glycidyl Methacrylate-Co-2-Hydroxyethyl Methacrylate) Derivatives with Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2002**, *40* (14), 2384–2393. <https://doi.org/10.1002/pola.10325>.
- (29) Krumm, C.; Trump, S.; Benski, L.; Wilken, J.; Oberhaus, F.; Köller, M.; Tiller, J. C. Fast-Acting Antibacterial, Self-Deactivating Polyionene Esters. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (19), 21201–21209. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b19313>.
- (30) Kuroda, K.; DeGrado, W. F. Amphiphilic Polymethacrylate Derivatives as Antimicrobial Agents. *JACS* **2005**, *127*, 4128–4129. <https://doi.org/10.1021/ja044205>

- (31) Dhende, V. P.; Samanta, S.; Jones, D. M.; Hardin, I. R.; Locklin, J. One-Step Photochemical Synthesis of Permanent, Nonleaching, Ultrathin Antimicrobial Coatings for Textiles and Plastics. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3* (8), 2830–2837. <https://doi.org/10.1021/am200324f>.
- (32) Palermo, E. F.; Lienkamp, K.; Gillies, E. R.; Ragona, P. J. Antibacterial Activity of Polymers: Discussions on the Nature of Amphiphilic Balance. *Angew. Chem.* **2019**, *131* (12), 3728–3731. <https://doi.org/10.1002/ange.201813810>.
- (33) Murata, H.; Koepsel, R. R.; Matyjaszewski, K.; Russell, A. J. Permanent, Non-Leaching Antibacterial Surfaces - 2: How High Density Cationic Surfaces Kill Bacterial Cells. *Biomaterials* **2007**, *28* (32), 4870–4879. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.012>.
- (34) Kopiasz, R. J.; Tomaszewski, W.; Kuźmińska, A.; Chreptowicz, K.; Mierzejewska, J.; Ciach, T.; Jańczewski, D. Hydrophilic Quaternary Ammonium Ionenes—Is There an Influence of Backbone Flexibility and Topology on Antibacterial Properties? *Macromol. Biosci.* **2020**, 2000063. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000063>.
- (35) Xu, X.; Xiao, H.; Ziaee, Z.; Wang, H.; Guan, Y.; Zheng, A. Novel Comb-like Ionenes with Aliphatic Side Chains: Synthesis and Antimicrobial Properties. *Journal of Materials Science* **2013**, *48* (3), 1162–1171. <https://doi.org/10.1007/s10853-012-6854-8>.
- (36) Narita, T.; Ohtakeyama, R.; Nishino, M.; Gong, J. P.; Osada, Y. Effects of Charge Density and Hydrophobicity of Ionene Polymer on Cell Binding and Viability. *Colloid & Polymer Science* **2000**, *278* (9), 884–887.
- (37) Waschinski, C. J.; Zimmermann, J.; Salz, U.; Hutzler, R.; Sadowski, G.; Tiller, J. C. Design of Contact-Active Antimicrobial Acrylate-Based Materials Using Biocidal Macromers. *Adv. Mater.* **2008**, *20* (1), 104–108. <https://doi.org/10.1002/adma.200701095>.
- (38) Shi, Z.; Neoh, K. .; Kang, E. . Antibacterial Activity of Polymeric Substrate with Surface Grafted Viologen Moieties. *Biomaterials* **2005**, *26* (5), 501–508. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.060>.
- (39) Xu, W. Z.; Gao, G.; Kadla, J. F. Synthesis of Antibacterial Cellulose Materials Using a “Clickable” Quaternary Ammonium Compound. *Cellulose* **2013**, *20* (3), 1187–1199. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9914-6>.
- (40) Lin, J.; Qiu, S.; Lewis, K.; Klibanov, A. M. Bactericidal Properties of Flat Surfaces and Nanoparticles Derivatized with Alkylated Polyethylenimines. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18* (5), 1082–1086. <https://doi.org/10.1021/bp025597w>.
- (41) Strassburg, A.; Petranowitsch, J.; Paetzold, F.; Krumm, C.; Peter, E.; Meuris, M.; Köller, M.; Tiller, J. C. Cross-Linking of a Hydrophilic, Antimicrobial Polycation toward a Fast-Swelling, Antimicrobial Superabsorber and Interpenetrating Hydrogel Networks with Long Lasting Antimicrobial Properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (42), 36573–36582. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b10049>.

Chapitre III Polyionènes greffés en surface : étude sur le verre et le silicium

Tables des matières

A. Greffage des polyionènes sur le verre.....	107
A.1 Présentation des procédés formant la sous-couche réactive.....	107
A.1.1 Revêtement de polydopamine	107
A.1.2 Procédé « Graffast »	109
A.1.2.1 Origine.....	109
A.1.2.2 Présentation du procédé.....	109
A.1.2.3 Avantages.....	111
A.1.2.4 Mécanisme.....	111
A.2 Protocole de greffage des polyionènes sur le verre	112
A.3 Caractérisations du greffage.....	114
A.3.1 X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)	114
A.3.2 Mesures d'angle de contact.....	116
B. Caractérisations biologiques et physico-chimiques des surfaces.....	117
B.1 Essais d'adhésion.....	117
B.1.1 Principe des essais	117
B.1.2 Observation de la flore totale	118
B.1.3 Dénombrement des bactéries viables cultivables adhérentes.....	119
B.1.4 Evaluation du relargage	122
B.2 Essais de cytotoxicité.....	124
B.2.1 Tests de cytotoxicité au contact des matériaux	125
B.2.1.1 Principe	125

<i>B.2.1.2 Résultats</i>	125
B.2.2 Tests de cytotoxicité sur des extraits de matériaux	126
<i>B.2.2.1 Principe</i>	126
<i>B.2.2.2 Résultats</i>	126
B.3 Caractérisations physico-chimiques	127
B.3.1 Potentiel zêta	128
B.3.2 Energies de surface et d'hydratation.....	130
C. Etude en réflectivité des rayons X et des neutrons	133
C.1 Adaptation du procédé de greffage aux wafers de silicium	133
C.1.1 Stratégie de greffage	134
C.1.2 Protocole de greffage des polyionènes sur les wafers de silicium	135
C.1.3 Caractérisation du greffage par XPS	135
C.2 Etudes des couches à sec : réflectivité des rayons X	137
C.2.1 Sous-couche PDOPA SG	137
C.2.2 Couche PI 6-9.....	138
C.3 Etude des couches hydratées : réflectivité des neutrons	140
C.3.1 Modèle des ajustements	140
C.3.2 Gonflement des couches dans le D ₂ O.....	140
<i>C.3.2.1 Sous-couche PDOPA SG.....</i>	<i>140</i>
<i>C.3.2.2 Couche PI 3-3.....</i>	<i>142</i>
C.3.3 Reproductibilité des lots dans le D ₂ O	143
<i>C.3.3.1 Sous-couche PDOPA SG.....</i>	<i>143</i>
<i>C.3.3.2 Couches PI 6-9.....</i>	<i>144</i>
C.3.4 Comparaisons des polyionènes aliphatiques du lot 1 dans le D ₂ O.....	146
C.3.5 Variation de la concentration en monomère	148
C.3.6 Variation du solvant deutéré	149
<i>C.3.6.1 Sous-couche PDOPA SG.....</i>	<i>150</i>

C.3.6.2	<i>Couche PI 6-9</i>	150
C.3.7	Variation du pH dans le D ₂ O.....	152
C.3.7.1	<i>Sous-couche PDOPA SG</i>	153
C.3.7.2	<i>Couche PI 6-9</i>	154
C.3.8	Variation de la force ionique par ajout de sel dans le D ₂ O.....	155
C.3.8.1	<i>Sous-couche PDOPA SG</i>	155
C.3.8.2	<i>Couche PI 6-9</i>	156
C.4	Bilan des analyses en réflectivité des rayons X et des neutrons.....	159
D.	Conclusions et perspectives	160
	Bibliographie	164

La méthode de greffage des polyionènes (PI) sur les surfaces a d'abord été expérimentée sur le verre, un matériau modèle peu réactif à l'instar du polyéthylène (PE), le matériau d'intérêt pour l'application dans l'agroalimentaire. Les greffages ont été réalisés sur des lames de verre rectangulaires de 14 mm de largeur pour 25 mm de longueur, avec 1 mm d'épaisseur. Ce chapitre est consacré à la réalisation et l'étude des surfaces de verre et de wafers de silicium greffées de PI. La première partie est dédiée au protocole de greffage sur le verre, en détaillant notamment les techniques de greffage originales développées pour la sous-couche polymère. La deuxième partie présente les caractérisations microbiologiques, pour évaluer la capacité des verres greffés PI à perturber la biocontamination des surfaces, et physico-chimiques, pour analyser les propriétés de surface de ces matériaux modifiés. Enfin, la dernière partie est consacrée à une étude en réflectivité des rayons X et des neutrons afin de tenter d'établir un lien entre la conformation des chaînes PI en surface et leur capacité à perturber l'adhésion microbienne. Cette étude a nécessité une adaptation du procédé de greffage sur les wafers de silicium, qui sera détaillée au début de cette troisième partie.

A. Greffage des polyionènes sur le verre

Afin de greffer les PI sur une surface, la méthode développée ici consiste à réaliser une polymérisation par étape en solution avec la présence d'une surface qui comporte des groupes pouvant réagir lors de la polyaddition des PI. Les méthodes évoquées dans le Chapitre I s'adaptent mal à la fonctionnalisation de surfaces peu réactives comme le verre ou le PE. Des développements récents ont cependant mis en lumière deux techniques qui permettent de fonctionnaliser des surfaces variées avec un large choix de groupes chimiques à greffer en surface pour servir de plateforme à des polymérisations subséquentes. Ces deux techniques sont les revêtements à base de polydopamine et le procédé « Graftfast ». Le procédé global de greffage sur le verre sera exposé par la suite.

A.1 Présentation des procédés formant la sous-couche réactive

A.1.1 Revêtement de polydopamine

La polymérisation de la dopamine (4-(2-aminoéthyl)benzène-1,2-diol) est un procédé découvert il y a un peu plus de 10 ans et qui permet de synthétiser des films polymères adhérents

sur tout type de surface par simple immersion dans une solution à pression et température ambiante (Figure III-1).

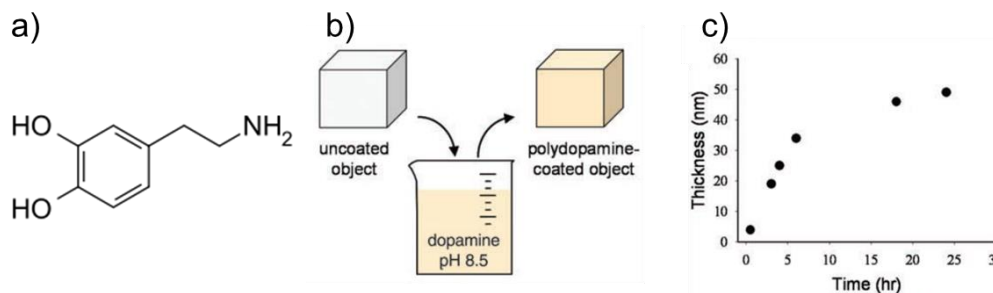


Figure III-1 : a) Structure de la dopamine, b) Schéma du procédé pour créer un revêtement de polydopamine, c) Evolution de l'épaisseur du film de polydopamine en fonction du temps. Figures extraites des travaux de Messersmith et al.¹

Cette méthode a été découverte par Messersmith¹ et depuis cette molécule a inspiré de nombreux chercheurs pour créer des revêtements fonctionnels.²⁻⁴ Les revêtements de polydopamine peuvent être utilisés tels quels mais ils sont plus intéressants comme primaire d'adhésion puisqu'ils conduisent à la formation d'un revêtement très adhérent même sur des matériaux inertes. Cette sous-couche réactive peut être ensuite fonctionnalisée pour modifier les propriétés de surface des matériaux ou greffer une nouvelle couche par-dessus.

Le revêtement de polydopamine peut être obtenu sur des métaux nobles, des surfaces natives d'oxyde, des semi-conducteurs, des céramiques ou encore des polymères.^{1,5} Cette méthode, inspirée des propriétés d'adhésion des moules sur les surfaces marines,¹ repose sur la formation spontanée d'une couche hautement adhésive sur les substrats. Cette couche ou ce film fin est formé par simple immersion du substrat dans une solution tampon basique de dopamine, les conditions d'oxydation favorisant des temps de réaction plus courts.⁶ En effet, la dopamine est une molécule contenant à la fois des fonctions alkylamines et cathécols qui imitent la structure des protéines sécrétées par les filaments de Byssus des moules pour adhérer aux rochers.

La polydopamine n'est pas un polymère formé de liaisons covalentes mais un agrégat supramoléculaire de monomères liés par des interactions de transfert de charges, de π -stacking et de liaisons hydrogènes.⁷ Le mécanisme de l'homopolymérisation de la dopamine n'est pas encore complètement clair, on suppose que cette homopolymérisation implique l'oxydation du catéchol en quinone et est suivi de la polymérisation (Figure III-2, a) d'une manière similaire à celle de la complexation des benzènediols avec des hydroquinones, pour former un polymère supramoléculaire (Figure III-2, b).^{1,7}

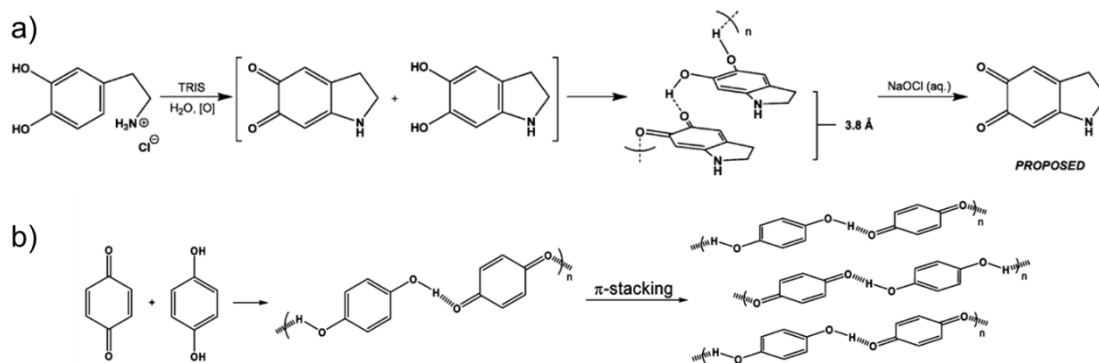


Figure III-2 : a) Mécanisme de polymérisation et structure de la polydopamine proposés par Dreyer et al.⁷ et b) mécanisme de complexation des benzènediols et des hydroquinones

Cette méthode a démontré son efficacité pour réaliser des motifs sur des surfaces⁸ mais aussi pour constituer une surface réactive très intéressante en vue de traitements secondaires pour varier les fonctionnalisations de surface et étendre le champ des applications possibles. En particulier, le greffage de couches polymères sur une telle surface a pu être achevé en utilisant des polymères avec des fonctions thiols, amines ou chlorures d'acyle, conduisant par exemple à la création de surfaces antiadhésives⁹ ou bioactives¹⁰ pour des revêtements antibactériens.

A.1.2 Procédé « Graftfast »

A.1.2.1 Origine

Les procédés d'électrogreffage cathodique de monomères vinyliques produisent un film de polymères covalent sur n'importe quelle surface conductrice ou semi-conductrice à partir d'une solution anhydre de monomères vinyliques. Afin d'outrepasser les limitations de ce procédé, qui sont celles inhérentes aux mécanismes de polymérisation anionique (conditions inertes, anhydres), un procédé d'électrogreffage à partir de la réduction de sels de diazonium a été mis au point.¹¹⁻¹⁴ Cependant, ce procédé reste un procédé électrochimique et est donc limité en terme de substrats greffables. Pour ouvrir de nouvelles voies de greffage sur d'autres types de surface, de conductrices à isolantes, une méthode employant un agent réducteur en solution a été développée dans notre laboratoire afin d'activer le sel de diazonium. Ce procédé d'ancrage à base de sels de diazonium permet le greffage chimique de couche aryle mais surtout la modification de tout type de surface par des polymères.

A.1.2.2 Présentation du procédé

Ce nouveau procédé est baptisé « Graftfast ».¹⁵ Il permet de réaliser une polymérisation radicalaire en surface basée sur la réduction des sels de diazonium qui peuvent générer des radicaux afin d'amorcer la polymérisation d'un monomère vinylique. Comme illustré sur le schéma (Figure III-3), un procédé « Graftfast » typique consiste à faire réagir : un sel de

diazonium, un agent réducteur, un monomère vinylique, un substrat et éventuellement un solvant. Les films obtenus sont en général des poly(méthacrylates) mais on peut appliquer ce procédé à tous les polymères qui peuvent être synthétisés par polymérisation radicalaire. Les films de polymères sont greffés en une seule étape à température ambiante et dans l'eau. On peut ainsi créer une sous-couche de poly(diméthylamino méthacrylate) qui apporte les fonctions diméthylamines réactives nécessaires pour réaliser ensuite la polyaddition en surface des PI.

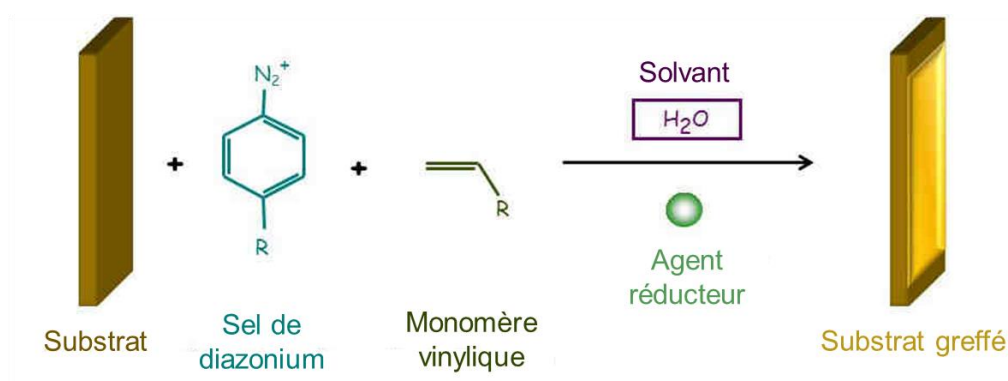


Figure III-3 : Schéma du procédé « Graftfast » issu de la thèse d'Alice Mesnage¹⁶

Un composé diazo est un composé aliphatique, aromatique ou hétérocyclique avec un groupe N_2 lié à un carbone. En 1858, Peter Griess découvrit le composé aromatique diazonium $RN_2^+X^-$.¹⁷ Les sels de diazonium aromatiques sont des acides de Lewis et non des acides de Brønsted comme les sels de diazonium aliphatiques.¹⁷ Le diazonium N_2^+ est l'entité connue la plus attractrice d'électrons. Par conséquent, les sels de diazonium prennent part à une grande variété de réactions^{18,19} en particulier les additions nucléophiles (sur les β -azotes du diazonium), les substitutions nucléophiles et les couplages azo.

Quelques sels de diazonium aromatiques substitués en para sont disponibles commercialement comme le 4 bromo, nitro ou méthoxy benzènediazonium tétrafluoroborate (BF_4^- est connu pour stabiliser les sels de diazonium¹⁷). On peut cependant le synthétiser en solution par une réaction de diazotation et l'isoler (Figure III-4). La méthode la plus connue consiste à faire réagir du nitrite de sodium sur une amine en milieu acide à $0^\circ C$.¹⁷ Ainsi on peut réaliser une réaction « one pot » en synthétisant le sel de diazonium *in situ* dans le milieu réactif du procédé qui va consommer par la suite le sel de diazonium formé.^{20,21}

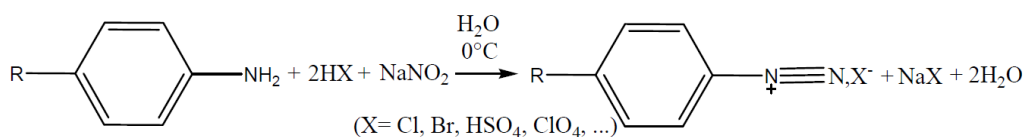


Figure III-4 : Réaction de diazotation par le nitrite de sodium sur une amine aryle

Le L-acide ascorbique (Figure III-5), aussi appelé vitamine C, est l'agent réducteur employé dans ce procédé. C'est un diacide faible, ce qui permet d'explorer des conditions expérimentales larges car il limite peu les pH utilisables pour la réduction. Il a déjà été utilisé comme réducteur dans la réaction de Sandmeyer²² ou la réduction d'ions métalliques en solution,²³ en particulier dans le cas de l'or²⁴ ou de l'argent²⁵ pour la formation de nano-objets.

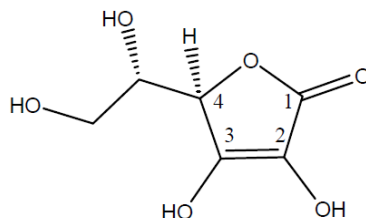


Figure III-5 : Structure du L-acide ascorbique

A.1.2.3 Avantages

Le procédé « Graftfast » est applicable à une large gamme de matériaux.¹⁵ Il a été largement appliqué sur des conducteurs et des semi-conducteurs métalliques comme le nickel, le zinc, le platine, l'inox, le titane, l'or, les fibres de carbone et l'aluminium mais aussi des matériaux isolants comme le PTFE, les plastiques, la cellulose ou le coton. Les premières études du procédé « Graftfast » faites par Mevellec et *al.*¹⁵ ont montré que l'intensité en IR d'une bande caractéristique du polymère greffé augmente avec le temps de réaction, établissant ainsi une corrélation entre l'intensité de la bande IR et l'épaisseur du film. L'un des objectifs des modifications de surfaces est de pouvoir maîtriser et ajuster les propriétés de surface des matériaux aux applications visées. Ainsi, avec le procédé « Graftfast », on peut transformer des surfaces hydrophobes en surfaces hydrophiles et inversement. Par exemple, une surface de PTFE a été rendu hydrophile en y greffant du poly(acide acrylique).¹⁵

A.1.2.4 Mécanisme

La thèse d'Alice Mesnage a été consacrée à l'étude du procédé « Graftfast » et l'élucidation de son mécanisme dans la formation de films de polymère covalent sur des surfaces (Figure III-6).¹⁶ Le sel de diazonium aryle est utilisé comme un primaire d'adhésion. Le réducteur est une espèce qui amorce la polymérisation en formant des radicaux libres à partir des sels de diazonium aryle par réaction d'oxydo-réduction. Dans les conditions de greffage, les radicaux permettent au sel de diazonium de se greffer en surface et de former une couche de polyphénylène. Dans le même temps, le sel de diazonium amorce la polymérisation radicalaire du monomère vinylique, présent en solution. Les chaînes polymères en croissance se greffent ensuite sur les groupes aromatiques.

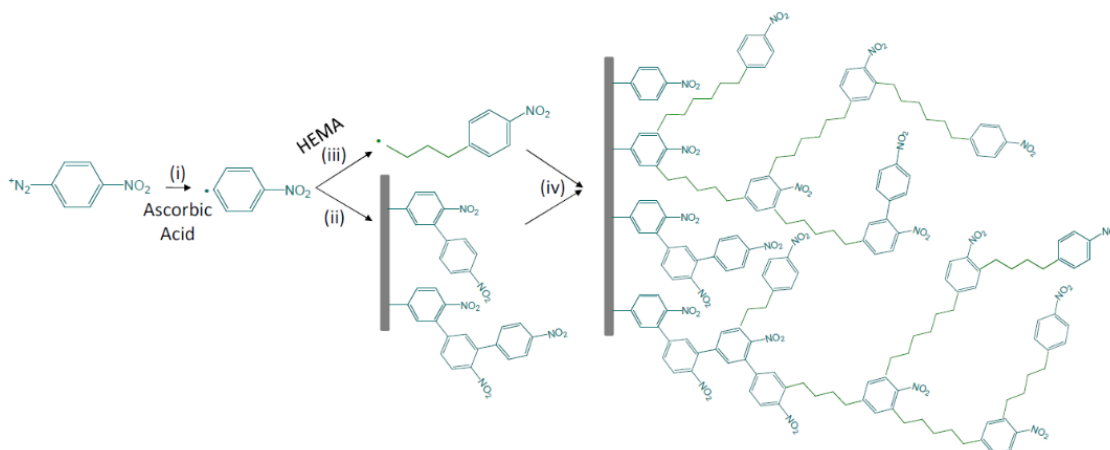


Figure III-6 : Mécanisme du procédé Graftfast avec le monomère méthacrylate d'hydroxyéthyle (HEMA), figure extraite de la thèse d'Alice Mesnage¹⁶

Le sel de diazonium est consommé par une réaction de dédiazotation qui se traduit par la perte d'un diazote. Dans ce procédé d'ancrage, le transfert d'électrons à l'origine de la réduction du sel de diazonium est obtenu par une réaction chimique d'oxydo-réduction. En conséquence, il suit les mêmes règles que n'importe quelle réaction redox. Tous les agents réducteurs avec un potentiel standard d'oxydation plus bas que le potentiel de réduction du sel de diazonium sont considérés comme des espèces adaptées pour effectuer une réaction de dédiazotation. La réduction des sels de diazonium en radical aryle en phase homogène est une réaction bien connue qui a notamment été faite avec l'iode et le H_3PO_2 .¹⁷ Comme précisé précédemment, dans notre étude, c'est l'acide ascorbique qui sert de réducteur pour la réaction de dédiazotation.

A.2 Protocole de greffage des polyionènes sur le verre

Le greffage des PI sur les lames de verre s'effectue en trois étapes principales résumées sur la Figure III-7. Le greffage de la polydopamine et la polymérisation « Graftfast » du méthacrylate de diméthylaminoéthyle (MADAME) permettent d'obtenir à la surface des fonctions réactives diméthylamines afin de réaliser dans une troisième étape, la polyaddition en surface des PI. Un protocole détaillé du procédé de greffage sur le verre est fourni en Annexe A (p. 217) mais les grandes étapes vont être récapitulées dans cette sous-section.

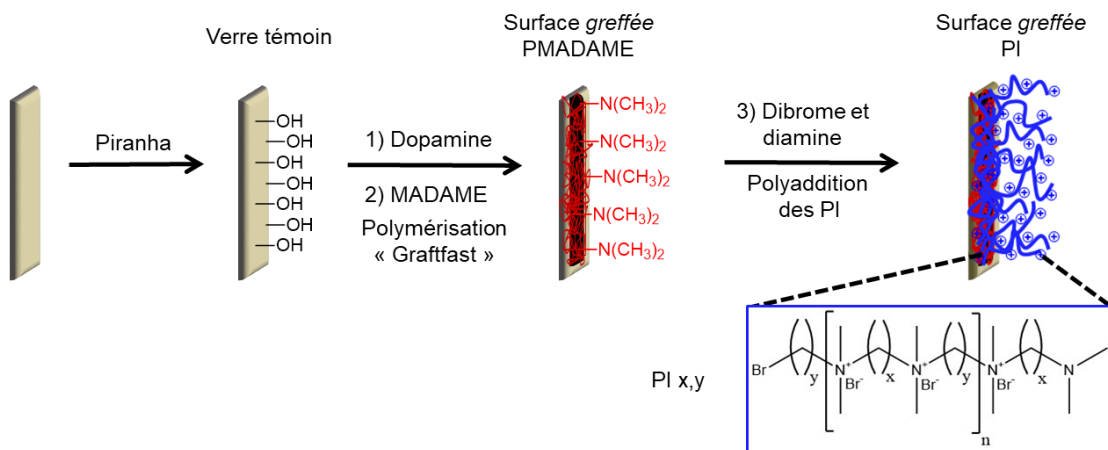


Figure III-7 : Schéma du procédé de greffage des PI sur le verre

Dans un premier temps, les lames de verre sont plongées dans une solution piranha (H₂O₂/H₂SO₄ ; 1:3). Cette solution possède une double fonction : le nettoyage intensif des lames de verres pour retirer toute trace d'éléments organiques et la création de fonctions hydroxyles à la surface. Une fois les lames nettoyées abondamment à l'eau déionisée, elles sont immergées dans un bain de dopamine à 1 mg.mL⁻¹. Afin d'amorcer la polymérisation de la dopamine, on ajoute au mélange aqueux une solution concentrée de NaOH pour déprotoner les diols. La solution est également mise sous agitation pour apporter de l'oxygène et favoriser l'oxydation de la dopamine.⁷ Afin de former une couche dense sur une surface peu réactive comme le verre, les lames de verre sont laissées dans la dopamine pendant 48 h. La dopamine va se chimiosorber sur la lame de verre et nous permettre d'avoir des fonctions chimiques sur lesquelles greffer les sous-couches polymères.^{1,10}

La polymérisation en surface par « Graftfast » du MADAME en polyméthacrylate de diméthylaminoéthyle (PMADAME, Figure III-8) s'effectue par l'ajout successif, sous agitation, de différentes solutions.

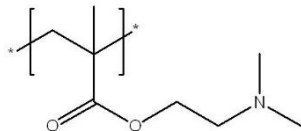


Figure III-8 : Structure du polyméthacrylate de diméthylaminoéthyle (PMADAME)

Une solution de 4-nitroaniline est mise en présence de nitrite de sodium en condition acide dans l'eau, afin de former en solution le sel de diazonium. Une fois le sel formé, on ajoute dans la solution le monomère vinylique que l'on souhaite greffer en surface, ici le MADAME. Afin de réduire le sel de diazonium par une réaction de dédiazotation, pour amorcer la polymérisation en surface du MADAME, une solution aqueuse d'acide ascorbique est ajoutée au mélange. Les

lames de verre sont immergées dans la solution de greffage pendant 1 h avant d'être nettoyées en prévision de la prochaine étape. La couche de polydopamine (PDOPA) formée précédemment constitue une couche organique dense et couvrante qui va servir d'ancrage pour la polymérisation « Graftfast » du MADAME. Des essais ont été fait en réalisant directement la polymérisation « Graftfast » sur le verre mais la faible réactivité de cette surface donnait des couches peu couvrantes. La combinaison de la sous-couche PDOPA et de la polymérisation « Graftfast » du MADAME permet d'obtenir beaucoup de fonctions diméthylamines afin de faciliter la réaction de polyaddition des PI en surface.

Dans la dernière étape, les lames de verre avec la sous-couche PMADAME sont mises en présence des monomères diamines et dibromes pour former en surface les PI 3-3, PI 6-6, PI 6-9 et PI 6-12. Les monomères nécessaires pour former chacun des PI sont les mêmes que ceux pour la polymérisation en solution (Chapitre II-B). Les monomères sont ajoutés en proportions stœchiométriques à une concentration de 0,9 M dans le méthanol. La réaction est effectuée sous agitation, à 65 °C, pendant environ 16 à 18 h. A la fin de la réaction, les lames de verre sont rincées et séchées afin d'être caractérisées par des analyses physico-chimiques et biologiques. Les solutions de greffage sont récupérées et précipitées selon le même protocole que la polymérisation en solution (protocole fourni en Annexe A, p.217) afin d'effectuer l'analyse des masses molaires par SEC-MALS.

A.3 Caractérisations du greffage

A.3.1 X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

Pour vérifier que le greffage des polyionènes a bien été effectué sur les lames de verre, on réalise une analyse XPS à chaque étape de greffage du procédé. Cette technique de caractérisation permet de connaître la composition chimique à la surface d'un matériau. Une présentation de la technique est fournie en Annexe A (p.217). Les analyses XPS démontrent que des couches organiques ont bien été greffées sur le verre avec la présence des pics caractéristiques du carbone et de l'azote sur le spectre global (Figure III-9, a). D'autre part, les pics caractéristiques du verre sont présents sur le spectre (silice, sodium, calcium), ce qui laisse supposer que les couches organiques greffées ont une épaisseur totale inférieure à 15 nm, la profondeur d'analyse de l'appareil utilisé.

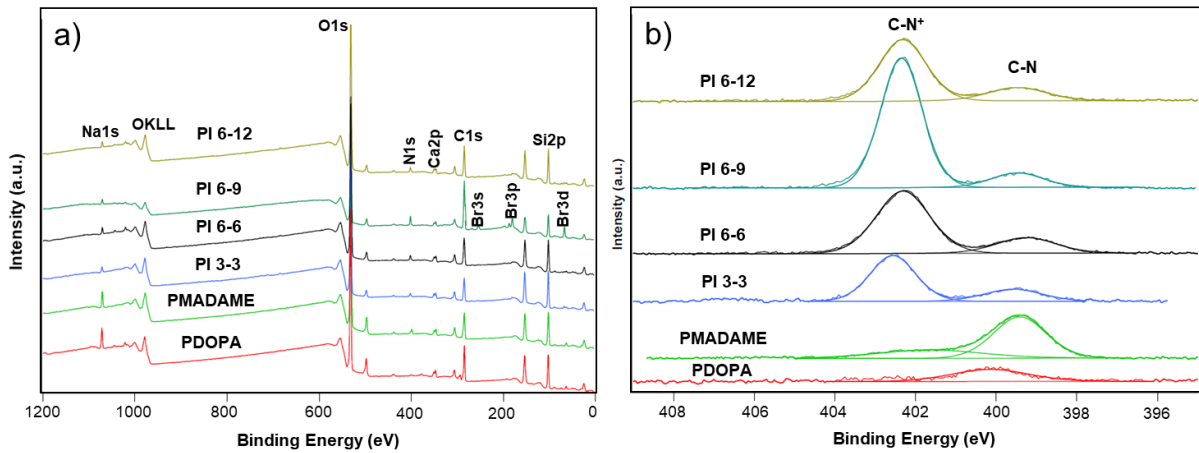


Figure III-9 : a) Spectres globaux XPS des surfaces de verre greffées PDOPA, PMADAME, PI 3-3, PI 6-6, PI 6-9 et PI 6-12 et b) spectres à haute résolution du pic N 1s sur ces mêmes surfaces

Sur le spectre N 1s à haute résolution (Figure III-9, b), la contribution de l'azote pour les verres greffés PI se divise en deux contributions à 399 eV et 402 eV. Le pic à 402 eV est caractéristique de la présence de contributions C-N⁺ à la surface du matériau, ce qui est une signature dans ce cas de la présence du PI. Le pic à 399 eV est quant à lui caractéristique des liaisons C-N issus des diméthylamines (terminales du PI et non fonctionnalisées du PMADAME). Ce pic est majoritaire sur les spectres à haute résolution du N 1s pour les sous-couches PMADAME et PDODA. La faible contribution C-N⁺ à 402 eV visible sur le spectre haute résolution du verre greffé PMADAME peut être due à une protonation des groupes pendants diméthylamines puisque ce greffage s'effectue dans des conditions acides.

L'analyse montre aussi la présence d'une contribution des contre-ions bromes sur le spectre global du verre greffé PI 6-9 (Figure III-9, a). L'intensité de la contribution azote caractéristique des C-N⁺ à 402 eV est plus grande que sur les trois autres spectres des verres greffés PI. La contribution brome est donc seulement visible dans le cas où la couche PI est très épaisse et/ou plus couvrante (si la densité de greffage est plus importante). La quantification des % atomiques à partir des spectres globaux et des spectres à haute résolution N 1s permet de calculer le ratio entre les contributions C-N⁺ et Br⁻ (Tableau III-1, Tableau III-2).

Tableau III-1 : Compositions chimiques des verres greffés PI (% atomique) déterminées sur les spectres globaux

Couche	Si 2p	C 1s	O 1s	N 1s	Br 3d
PDOPA	53,0 %	17,6 %	29,0 %	0,4 %	-
PMADAME	26,7 %	22,4%	48,4 %	2,5 %	-
PI 3-3	30,4 %	19,2 %	49,3 %	1,1 %	-
PI 6-6	27,0 %	23,0 %	47,5 %	2,5 %	-
PI 6-9	20,6 %	41,0 %	31,0 %	4,2 %	3,3 %
PI 6-12	27,0 %	24,0 %	47,2 %	1,8 %	-

Tableau III-2 : Contributions du pic N 1s des verres greffés PI (% atomique) déterminées sur les spectres à haute résolution

Couche	C-N (399 eV)	C-N ⁺ (402 eV)
PDOPA	100 %	-
PMADAME	70,9 %	29,1 %
PI 3-3	25,0 %	75,0 %
PI 6-6	21,4 %	78,6 %
PI 6-9	12,0 %	88,0 %
PI 6-12	20,9 %	79,1 %

Le calcul donne un ratio de 1,1, ce qui est cohérent avec la structure du polymère. Ces éléments viennent donc confirmer la présence du PI sur le verre et la réussite du greffage covalent.

A.3.2 Mesures d'angle de contact

L'évolution de l'état de surface entre chaque étape peut être suivie grâce à des mesures d'angle de contact à l'eau. Cette mesure simple et rapide permet de valider les modifications réalisées sur les surfaces au cours des étapes de greffage. Cette méthode est détaillée en Annexe A (p. 217). Le verre sans traitement possède une valeur d'angle de contact à l'eau de $25,3^\circ \pm 4,3^\circ$ dû à la présence de résidus organiques en surface. Le verre témoin, après nettoyage au piranha, possède une valeur d'angle de contact à l'eau de $12,5^\circ \pm 3,4^\circ$. L'évolution de la mesure d'angle de contact en fonction des étapes du greffage est résumée sur la Figure III-10. Après le greffage de la PDOPA, il est impossible de mesurer la valeur de l'angle de contact à l'eau (la goutte s'étale totalement). Par la suite, l'ajout du PMADAME en surface fait augmenter l'hydrophobie de la surface, l'angle de contact à l'eau étant de $49,9^\circ \pm 5,7^\circ$ sur les lames de verre modifiées. Enfin, l'ajout des PI en surface fait diminuer l'hydrophobie de la surface et la mesure d'angle de contact à l'eau varie de 20 à 50° en fonction du PI greffé en surface. Ces premières analyses ont été complétées par des mesures sur deux autres liquides afin de calculer les énergies de surface des matériaux (décrites plus loin en section B.3.2).

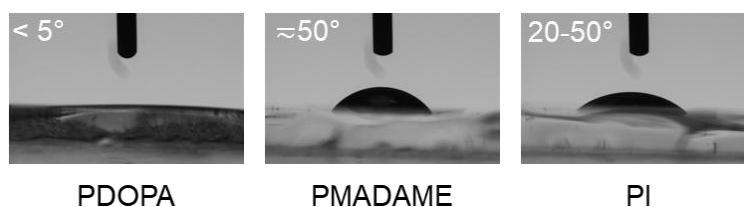


Figure III-10 : Evolution de la mesure d'angle de contact à l'eau en fonction de la couche greffée sur le verre

Maintenant que nous avons la preuve du greffage des PI sur les surfaces, il faut vérifier qu'ils conservent leurs propriétés antibactériennes une fois greffés mais aussi caractériser en détails

l'état des chaînes greffées sur les surfaces. Ces caractérisations biologiques et physico-chimiques vont faire l'objet de la partie suivante.

B. Caractérisations biologiques et physico-chimiques des surfaces

Les surfaces de verre greffées PI ont été soumises à des essais d'adhésion afin d'évaluer leurs propriétés antibactériennes, c'est-à-dire leur capacité à perturber l'adhésion bactérienne et inhiber la croissance bactérienne. Le terme antibactérien sera utilisé pour définir l'effet sur la viabilité des bactéries car les essais utilisés ne permettent pas de différencier entre un effet bactériostatique ou bactéricide. En vue d'une application dans l'alimentaire, des essais de cytotoxicité ont aussi été effectués sur des cellules mammaliennes. Le relargage a été évalué aussi bien sur les essais microbiologiques que cytotoxiques. Enfin, l'extrême surface des lames de verre greffées PI a été caractérisée par la mesure du potentiel zêta et le calcul des énergies de surface.

B.1 Essais d'adhésion

Les essais d'adhésion sont des tests qui vont permettre de déterminer la capacité des matériaux modifiés à moduler la contamination bactérienne puis potentiellement leur viabilité. Ils sont réalisés par immersion des matériaux avec une suspension bactérienne pendant un temps donné à une température donnée.

B.1.1 Principe des essais

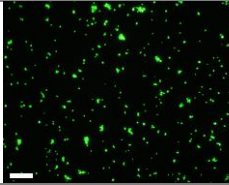
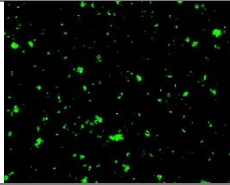
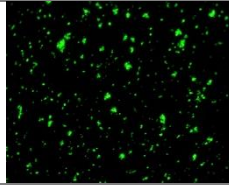
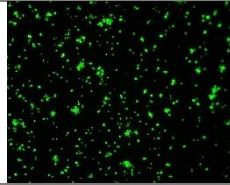
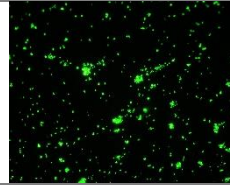
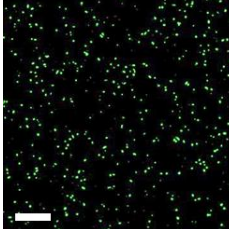
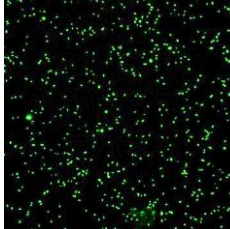
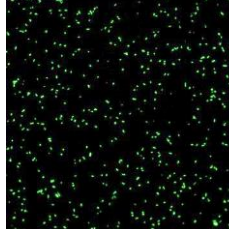
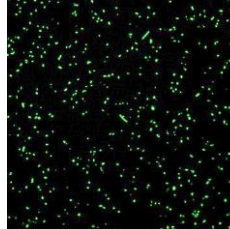
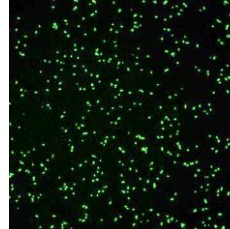
Les surfaces de verre greffées PI sont recouvertes d'une suspension bactérienne préparée dans l'eau déionisée à environ 10^6 UFC.mL⁻¹ (UFC : Unité Formant des Colonies). Ces surfaces sont ensuite laissées 3 h à l'étuve à 37°C pour permettre aux bactéries d'adhérer sur la surface sous l'effet de la gravité. A l'issue des 3 h d'adhésion, les bactéries non-adhérentes sont éliminées de la surface par des rinçages successifs. On évalue d'une part la quantité totale de bactéries qui a adhéré sur la surface, appelée flore totale (FT), grâce à une observation microscopique et un comptage des bactéries sur les clichés photographiques. D'autre part, on évalue la quantité de bactéries vivantes et capables de se multiplier après adhésion sur les surfaces modifiées, appelée bactéries viables cultivables adhérentes (VC), en les décrochant et en les dénombrant sur milieu de culture gélosé. Afin de vérifier l'absence de relargage de la surface, une étude a

été menée sur les surnageants des essais adhésion. Les essais d'adhésion ont été réalisés sur deux souches pathogènes modèles : *Staphylococcus aureus* 768 (*S. aureus*, Gram+) et *Escherichia coli* K12 (*E. coli*, Gram-). Les surfaces de verre greffées PI ont été comparées à une surface de verre témoin qui a été lavée avec une solution piranha (H₂O₂/H₂SO₄ ; 1:3). Les résultats présentés sont normalisés pour une suspension bactérienne à précisément 10⁶ UFC.mL⁻¹ et sont la moyenne de cinq manipulations différentes sur *S. aureus* et deux manipulations différentes sur *E. coli*. Les essais ont été réalisés avec des suspensions bactériennes préparées en eau déionisée afin d'éliminer l'interférence d'autres composés (ions, molécules, protéines). Les détails expérimentaux sont fournis en Annexe A (p. 217).

B.1.2 Observation de la flore totale

Les surfaces de verre greffées PI contaminées sont observées au microscope à épifluorescence afin d'évaluer la flore totale. La souche de *S. aureus* utilisée pour les essais est génétiquement modifiée pour être fluorescente sous U.V., par conséquent elle peut être observée au microscope sans coloration préalable. Pour l'observation d'*E. coli*, il a fallu utiliser une méthode de coloration et le choix s'est porté sur la sonde Syto 9. Ce colorant pénètre l'ensemble des bactéries de la flore totale (vivantes et mortes/non cultivables) en se liant à l'ADN double brin. Des clichés photographiques de la flore totale ont été pris aléatoirement à différents endroits sur les surfaces de verre modifiées. La flore totale a ensuite été estimée à partir des clichés photographiques par le logiciel de traitement d'image ImageJ. Les dénombrements de la flore totale sont le résultat de la moyenne de trois clichés représentatifs au grossissement x40 par essai. Des clichés pris lors de l'observation de *S. aureus* et *E. coli* au grossissement x40 sur les surfaces de verre modifiées sont regroupés dans le Tableau III-3.

Tableau III-3 : Flores totales de *S. aureus* et *E. coli* sur des surfaces de verre greffées PI observées au microscope à épifluorescence au grossissement x40 (échelle : barre blanche = 30 μm)

Surface	Verre témoin	PI 3-3	PI 6-6	PI 6-9	PI 6-12
FT <i>S. aureus</i> (bactérie. cm ⁻²)					
	1,1.10⁵ ± 3,3.10⁴	3,8.10⁵ ± 8,9.10³	5,7.10⁵ ± 7,2.10⁴	4,3.10⁵ ± 4,3.10⁴	4,5.10⁵ ± 4,8.10⁴
FT <i>E. coli</i> (bactérie. cm ⁻²)					
	6,1.10⁴ ± 4,3.10³	8,8.10⁴ ± 9,8.10³	6,6.10⁴ ± 1,9.10⁴	7,5.10⁴ ± 7,5.10³	7,9.10⁴ ± 5,7.10³

On peut constater une très grande adhésion de *S. aureus* sur les surfaces de verre greffées PI ainsi que la présence de nombreux amas. Cette adhésion est plus importante que sur le verre témoin, comme en témoigne les calculs de flore totale. Un test de Student sur les logarithmes des valeurs permet de confirmer cette tendance puisque la différence est significative entre les valeurs de la flore totale du verre témoin et de tous les verres greffés PI (p-valeurs < 0,05). Le verre modifié avec du PI est donc pro-adhésif pour la souche *S. aureus* et joue ainsi le rôle d'un piège à bactéries. Dans le cas de l'adhésion de *E. coli*, l'adhésion semble un peu plus importante sur les surfaces de verre greffées PI et on n'observe pas la présence d'amas. Aucun test statistique n'a été effectué sur les valeurs des manipulations sur *E. coli* car seulement deux répétitions ont été effectuées. L'effet pro-adhésif des surfaces de verre greffées PI paraît donc présent mais moindre sur la souche *E. coli*. Le calcul de la flore totale démontre qu'il y a aussi moins de bactéries *E. coli* adhérentes sur les surface de verre greffées PI que de bactéries *S. aureus* (7.10^4 bactérie.cm⁻² pour *E. coli* contre 4.10^5 bactérie.cm⁻² pour *S. aureus*). Il n'est pas surprenant que les adhésions de ces deux bactéries soient différentes car elles possèdent des propriétés physico-chimiques de surface et des physiologie différentes. On notera donc que *S. aureus* possède une affinité plus importante pour ces surfaces modifiées PI que *E. coli*. L'effet pro-adhésif des surfaces serait donc souche-dépendant. Une étude sur une plus grande variété de souches bactérienne est cependant nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

B.1.3 Dénombrement des bactéries viables cultivables adhérentes

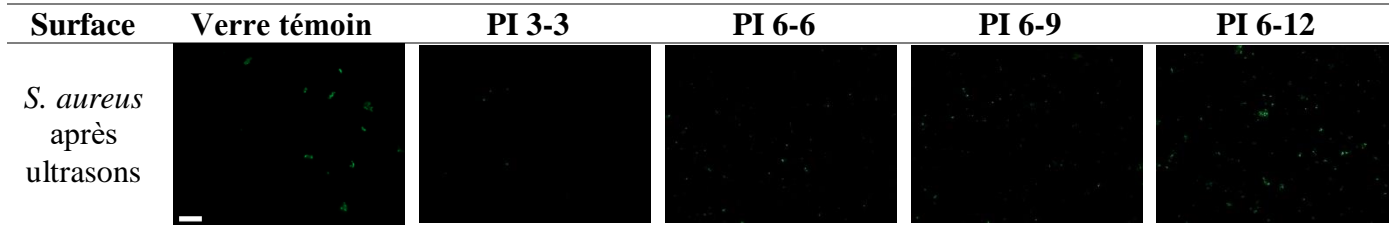
En parallèle de l'évaluation de la flore totale, on réalise aussi un dénombrement de la flore viable cultivable adhérente, c'est-à-dire que l'on dénombre les bactéries décrochées qui sont capables de reformer des colonies après exposition aux surfaces de verre greffées PI. Les bactéries adhérentes sont décrochées des surfaces en réalisant un passage dans un bain à ultrasons. Les bactéries décrochées sont ensuite dénombrées sur milieu de culture gélosé.

Les résultats du dénombrement de la flore totale (FT) et des bactéries viables cultivables adhérentes (VC) ont été mis en regard sur le même graphique. Bien que les unités de ces deux dénombrements soient différentes (bactérie.cm⁻² pour FT et UFC.cm⁻² pour VC), elles restent équivalentes. L'unité UFC suppose que chaque colonie a pour origine une seule bactérie, et non un amas de plusieurs d'entre elles, de par les dilutions et l'homogénéisation effectuées avant l'ensemencement. Ainsi, les UFC.cm⁻² peuvent être assimilées à des bactérie.cm⁻². Pour plus de clarté, on exprimera tous les résultats de FT et de VC en bactérie.cm⁻².

L'observation des supports après le passage aux ultrasons a permis d'attester de l'efficacité de la méthode de décrochage des bactéries adhérentes (Tableau III-4). Le dénombrement de ces

clichés photographiques et la comparaison avec les résultats de flore totale met en évidence qu'il reste en moyenne $3,6 \pm 1,6$ % des bactéries de la flore totale après le décrochage sur l'ensemble des verres modifiés, ce qui est négligeable.

Tableau III-4 : Flores totales de *S. aureus* sur des surfaces de verre greffées PI après ultrasons observées au microscope à épifluorescence au grossissement $\times 40$ (échelle : barre blanche = $30 \mu\text{m}$)



La comparaison du dénombrement de la FT et du VC sur *S. aureus* (Figure III-11) et *E. coli* (Figure III-12) atteste des propriétés antibactériennes des surfaces de verre greffées PI. En effet, le dénombrement du VC est bien inférieur à celui de la FT, ce qui n'est pas le cas du verre témoin. En microbiologie, on peut considérer qu'une différence d'un demi-log entre deux mesures atteste d'une différence significative et affranchit des imprécisions de manipulation.

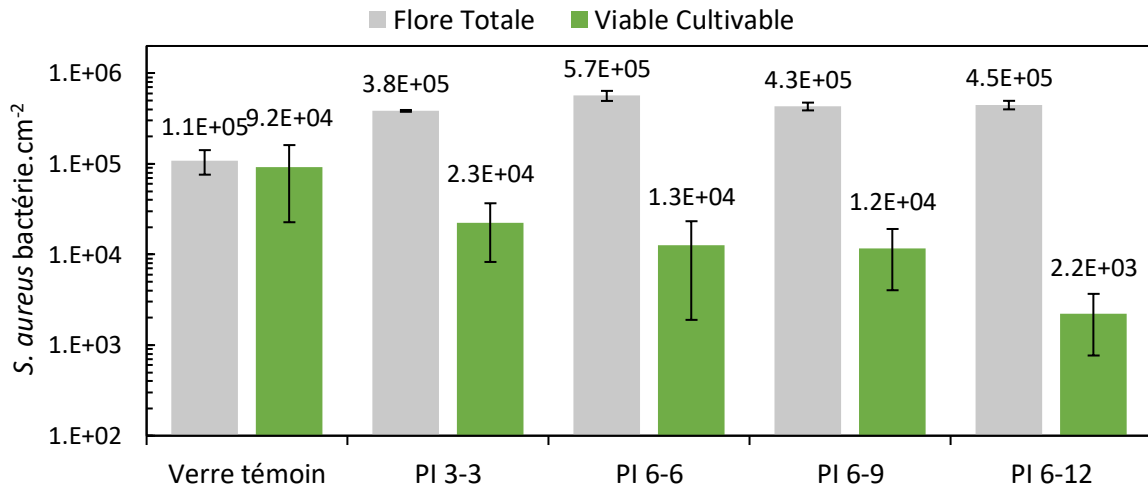


Figure III-11 : Dénombrement sur *S. aureus* de la flore totale et des bactéries viables cultivables adhérentes sur des surfaces de verre greffées PI ($n = 5$)

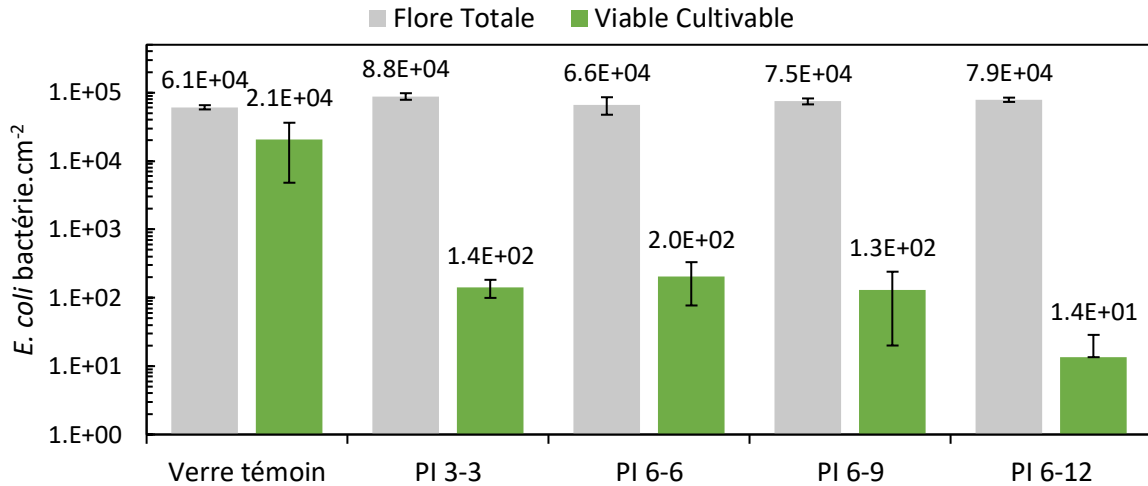


Figure III-12 : Dénombrement sur *E. coli* de la flore totale et des bactéries viables cultivables adhérentes sur des surfaces de verre greffées PI ($n = 2$)

Pour toutes les surfaces de verre greffées PI, la différence entre le dénombrement de la FT et du VC varie de 1,3 à 2,5 log bactérie.cm⁻² pour *S. aureus* et de 2,3 à 3,5 log bactérie.cm⁻² pour *E. coli*. Cette différence croît avec l'augmentation de la longueur du segment aliphatique des PI greffés. Les tests de Student appuient ces conclusions puisque la différence entre les valeurs de FT et de VC pour *S. aureus* est significative dans le cas des verres greffés PI (p-valeur < 0,05) mais pas dans le cas du verre témoin (p-valeur = 0,48). De plus, on constate une différence significative entre les valeurs de VC de *S. aureus* sur les verres greffés PI 3-3, PI 6-6 et PI 6-9 avec le verre greffé PI 6-12 (p-valeur = 0,004 ; p-valeur = 0,026 et p-valeur = 0,055 respectivement), ce qui confirme que le PI 6-12 a un impact plus important sur la diminution du VC que les autres.

A partir des valeurs de VC et de FT, on peut calculer le pourcentage d'efficacité (%_{eff}) de la surface. Le pourcentage d'efficacité évalue la réduction de la quantité de bactéries viables cultivables adhérentes par rapport à la flore totale. Il est calculé par la formule suivante :

$$\%_{eff} = \left(1 - \frac{VC_{PI}}{FT_{PI}}\right) \times 100 \quad (14)$$

Les résultats des calculs sont regroupés dans le Tableau III-5. En fonction du PI greffé, les surfaces modifiées sont capables d'inhiber de 94,2 à 99,5% des bactéries *S. aureus* et de 99,84 à 99,98% des bactéries *E. coli*. On constate bien une augmentation du pouvoir antibactérien avec l'augmentation de la longueur du segment aliphatique du PI greffé. Ainsi, comme pour les PI en solution, il est possible de moduler l'efficacité antibactérienne des PI greffés en jouant sur la structure du polymère.

Tableau III-5 : Pourcentage d'efficacité (%eff) des surfaces de verre greffées PI

Surface	%eff	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
PI 3-3	94,2	99,84
PI 6-6	97,8	99,69
PI 6-9	97,3	99,83
PI 6-12	99,5	99,98

Nous avons aussi comparé l'efficacité des surfaces de verre greffées PI à un autre polycation. Le poly(2-méthacryloyloxyéthyl) triméthylammonium chlorure (PMTAC) a été greffé en remplaçant le monomère vinylique MADAME dans l'étape « Graftfast » par le monomère 2-méthacryloyloxyéthyl) triméthylammonium chlorure. La FT et le VC ont été estimés sur une lame de verre greffée PMTAC et une lame de verre greffée PI 6-6 (Figure III-13).

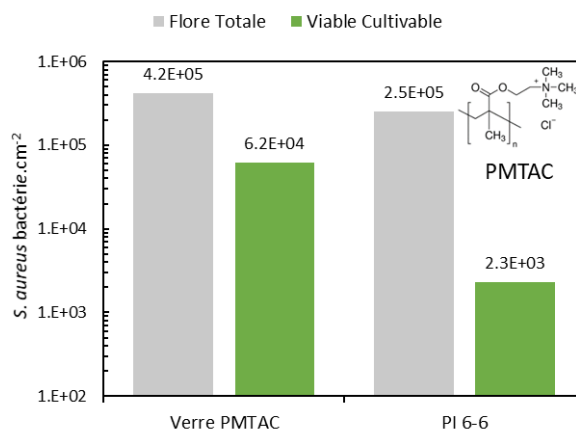


Figure III-13 : Dénombrement sur *S. aureus* de la flore totale et des bactéries viables cultivables adhérentes sur des surfaces de verre greffées PMTAC et PI 6-6

Les calculs de FT sur cet essai montrent que l'adhésion sur le verre greffé PMTAC est similaire au verre greffé PI 6-6. En revanche, l'efficacité antibactérienne du verre greffé PI 6-6 est supérieure avec un écart de 2,0 log bactérie.cm⁻² contre 0,8 log bactérie.cm⁻² pour le verre greffé PMTAC. Le verre greffé PMTAC est donc pro-adhésif mais ne limite pas efficacement la croissance bactérienne.

B.1.4 Evaluation du relargage

Les surnageants des essais d'adhésion, c'est-à-dire les suspensions bactériennes mises en contact avec les matériaux pendant 3 h, ont été récupérés afin de dénombrer le nombre de bactéries présentes dans la suspension et de la comparer au dénombrement de la suspension mère bactérienne qui a servi réaliser l'essai (SM). Les PI étant greffés de façon covalente et les surfaces lavées abondamment après réaction, il ne devrait pas y avoir de diminution de la quantité

de bactéries dans le surnageant sauf dans le cas d'un relargage. Les résultats de ces dénombrements pour deux essais sont regroupés sur la Figure III-14. On peut constater que sur les dénombrements des surnageants d'*E. coli*, il n'y a aucune différence entre les matériaux testés et la suspension bactérienne contaminante SM. Pour *S. aureus*, cette affirmation n'est pas valable sur tous les supports. Le surnageant du verre greffé PI 6-6, a un écart avec la suspension bactérienne SM d'environ 0,8 log UFC.mL⁻¹, ce qui peut être significatif d'un relargage.

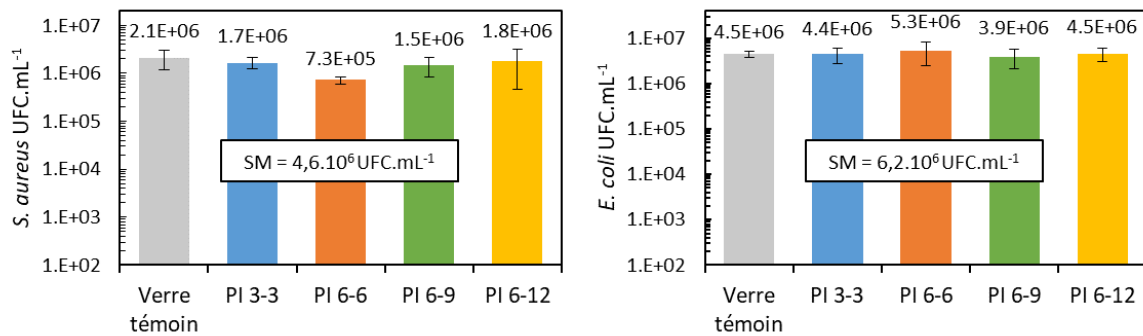


Figure III-14 : Dénombrement des surnageants d'adhésion du verre témoin et des verre greffés PI sur *S. aureus* et *E. coli*, SM = dénombrement de la suspension mère qui a servi à faire les essais (n = 2)

Afin d'approfondir l'évaluation du relargage, des surfaces de verre greffés PI ont été immergés dans l'eau déionisée, un bon solvant des PI, et ont été mises à l'étuve à 37°C pendant 3 h comme dans les conditions des essais d'adhésion. Les surnageants ont ensuite été récupérés et ont servi pour deux tests. Lors du premier test, on a récupéré une partie du surnageant que l'on a mis en présence d'une suspension de *S. aureus*. La croissance de la souche dans le milieu TSB (Trypcase Soy Broth) a été suivie par des mesure de densité optique avec le Bioscreen, comme pour les mesures de CMI. Pour l'ensemble des essais effectués avec les surnageants des verres greffés PI, il n'a pas été constaté d'inhibition ou de ralentissement de la croissance de *S. aureus* par rapport au témoin *S. aureus* dans le milieu TSB (Figure III-15). Cependant, cet essai est réalisé sur une faible quantité de surnageant (30 µL testé pour 10 mL de surnageant), il peut ne pas être représentatif de l'ensemble de la solution.

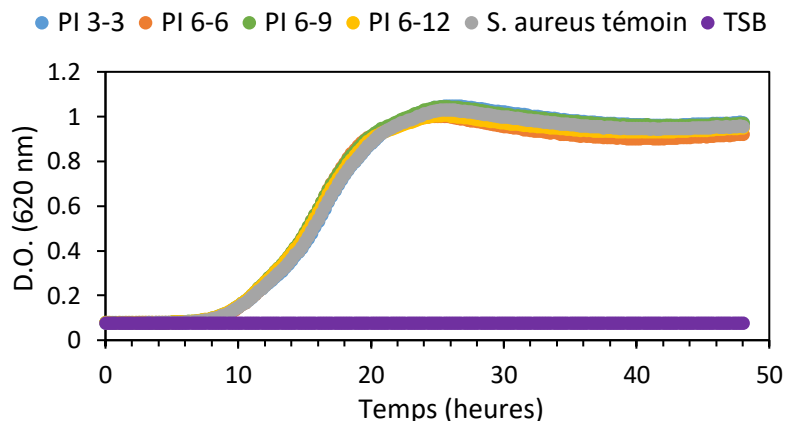


Figure III-15 : Suivi de densité optique dans le temps de *S. aureus* en milieu TSB avec les surnageants des verres greffés PI

Dans un deuxième essai, 1 ml de ce surnageant réalisé en eau déionisée a été récupéré et mis en présence d'un culot bactérien à environ 10^6 UFC.mL⁻¹. Après 3 h à 37°C, les culots bactériens ont été dilués et dénombrés sur milieu gélosé. Les valeurs des dénombrements varient de 5,8 à 6,0 log UFC.mL⁻¹ pour un culot bactérien à 6,0 log UFC.mL⁻¹. La variation est inférieure à 0,5 log donc non significative dans le cas d'essais microbiologiques. Ainsi, au vu de ces trois expériences, on peut supposer qu'il n'y a pas de relargage des surfaces et que les procédés de nettoyage post-synthèses sont efficaces.

B.2 Essais de cytotoxicité

Afin d'évaluer l'utilisation potentielle des surfaces de verre greffées PI dans l'alimentaire et d'approfondir les études de relargage faites en microbiologie, des essais de cytotoxicité ont été également menés. La cytotoxicité des verres greffés PI a été évaluée en observant des tapis cellulaires de fibroblaste de souris (L929), après une mise en contact direct de 48 h des verres sur les tapis. A l'issue des 48 h, les matériaux ont été retirés et un test MTT a été effectué pour évaluer la viabilité cellulaire. L'évaluation du relargage lors des tests microbiologiques est faite sur des temps courts (3 h), par conséquent, ces résultats vont être complétés par une évaluation de la cytotoxicité de solutions d'extractions réalisées sur 24 h à partir des verres greffés PI. Ces essais ont été réalisés par un laboratoire externe sur des épidermes reconstruits de peaux humaines (Skin+). Les détails expérimentaux de ces méthodes sont fournis en Annexe A (p. 217).

B.2.1 Tests de cytotoxicité au contact des matériaux

B.2.1.1 Principe

Il a été réalisé une variante du test MTT en solution, appelé « test MTT au contact », afin de l'appliquer à des matériaux solides. Ce test a permis d'évaluer la cytotoxicité au contact de matériaux massifs mis en présence de cellules L929. Pour des matériaux solides, la norme ISO EN NF 10993-5 prévoit seulement une observation qualitative des tapis cellulaires en présence des matériaux après 48 h pour déterminer sa cytotoxicité. Nous avons cependant choisi d'effectuer un test MTT sur les tapis cellulaires après avoir retiré les matériaux pour évaluer la viabilité cellulaire. Les verres greffés PI ont été comparés à un verre témoin sans greffage et un contrôle sans matériaux. Le protocole est assez similaire à celui effectué en solution mais il a fallu adapter les quantités et les récipients pour faire les essais sur des matériaux massifs. Une condition est considérée comme cytotoxique si la viabilité cellulaire est inférieure à 70%. Les essais ont été répétés sur trois matériaux distincts.

B.2.1.2 Résultats

Les observations au microscope faites après 48 h d'exposition aux surfaces de verre greffées PI n'ont pas montré de cytotoxicité. Les cellules mortes se limitaient à la surface en-dessous de l'échantillon, ce qui correspond selon la norme à une cytotoxicité bénigne. Le poids des surfaces de verre peut être responsable de la mortalité des cellules puisque le verre témoin sans greffage présentait aussi des cellules mortes sous sa surface. Après avoir retiré les lames de verre, des tests MTT ont été réalisés sur les tapis cellulaires. Les résultats sont présentés sur la Figure III-16.

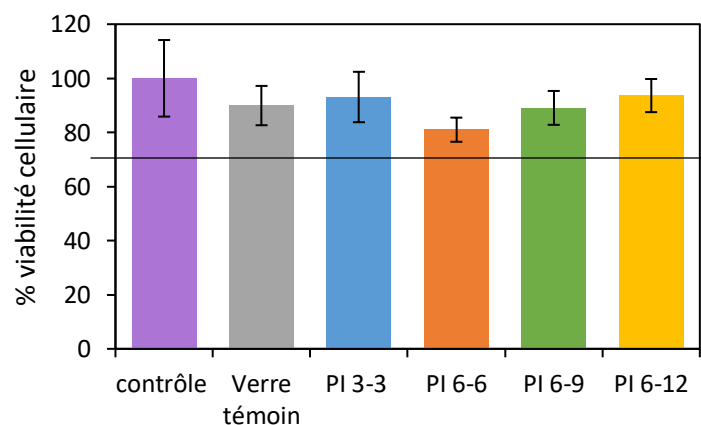


Figure III-16 : Résultats de cytotoxicité sur L929 pour des verres greffés PI et un verre témoin ($n = 3$)

Une diminution de la viabilité cellulaire est notable pour l'ensemble des surfaces y compris le verre témoin sans greffage. Le test de Student montre qu'il n'y a pas de différence significative

entre le verre témoin et tous les verres greffés PI (p-valeur > 0,05). Cette diminution de viabilité peut donc bien être attribuée au poids du verre. Le test statistique a seulement été effectué sur trois valeurs il serait donc nécessaire de refaire des répétitions pour affiner l'étude, notamment dans le cas du verre greffé PI 6-6 qui semble un peu inférieur aux autres. Dans tous les cas, la diminution n'est pas suffisamment importante, par rapport au contrôle sans surface de verre, pour être considéré comme cytotoxique dans ces conditions. En effet, toutes les viabilités cellulaires sont supérieures à 70%.

B.2.2 Tests de cytotoxicité sur des extraits de matériaux

B.2.2.1 Principe

Un procédé d'extraction a été appliqué aux lames de verre greffées PI afin d'évaluer la cytotoxicité du potentiel relargage. Les extraits des verres modifiés ont été réalisés en les immergeant dans du PBS (Phosphate Buffer Saline), sous agitation, pendant 24 h à 37 °C. Les extraits ont ensuite été mis en présence des épidermes humains reconstruits pendant 24 h. A l'issue de cette période, un test MTT est effectué sur l'épiderme pour évaluer sa viabilité cellulaire par une mesure de densité optique. Les verres greffés PI ont été comparés à un verre témoin sans greffage. Le contrôle négatif est un épiderme humain reconstruit avec du PBS et le contrôle positif est un épiderme humain reconstruit en présence d'un extrait de gants en latex. Une condition est considérée comme cytotoxique si la viabilité cellulaire est inférieure à 70%. Les essais ont été répétés sur trois épidermes distincts.

B.2.2.2 Résultats

Le PBS a été choisi comme solvant d'extraction car il n'induit pas de toxicité sur les épidermes humains reconstruits, ce qui n'est le cas des milieux de culture standards comme le DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). La quantité d'eau contenue dans ce type de milieu peut étouffer les tissus, particulièrement dans le cas de tests longs, où la condition cytotoxique est évaluée pendant au moins 24 h. Le PBS est aussi connu pour dissoudre difficilement les composés hydrophobes. Les PI sont cependant des polymères cationiques hydrophiles et la solubilité des PI dans le PBS a été évaluée au préalable. Il a été possible de dissoudre le PI 3-3, le PI 6-6 et le PI 6-9 à une concentration de 125 mg.mL⁻¹ dans le PBS et le PI 6-12 à une concentration de 100 mg.mL⁻¹ après seulement 15 minutes d'agitation. Les résultats des essais de cytotoxicité des extraits sur les épidermes humains reconstruits sont présentés sur la Figure III-17.

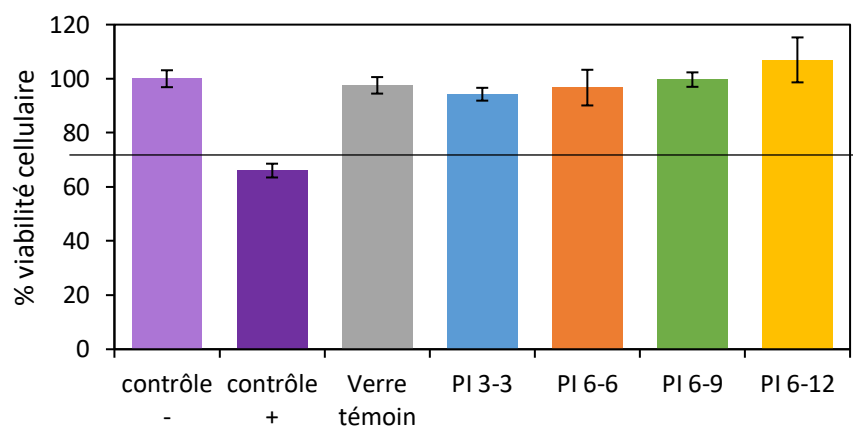


Figure III-17 : Résultats de cytotoxicité sur épidermes humains reconstruits pour les extraits issus des verres greffés PI et du verre témoin ($n = 3$)

Aucun des extraits ne présentent de cytotoxicité dans les conditions du test. Ce résultat atteste à minima de l'absence de cytotoxicité de l'éventuel relargage et à maxima d'une absence de relargage. De plus, le test de Student montre qu'il n'y a pas de différence significative entre le contrôle négatif et le verre témoin ainsi que tous les verres greffés PI (p -valeur $> 0,05$) à l'exception du verre greffé PI 3-3 (p -valeur = 0,007). La différence avec le verre greffé PI 3-3 peut venir de l'écart-type moins important sur ces valeurs. Comme mentionné précédemment, le test est effectué sur seulement trois échantillons et il serait nécessaire d'effectuer des répétitions supplémentaires pour confirmer les résultats du test de Student. Néanmoins, ces résultats de cytotoxicité combinés à ceux de l'évaluation des surnageants dans les essais microbiologiques, permettent d'affirmer que les surfaces greffées PI n'induisent pas de relargage.

B.3 Caractérisations physico-chimiques

Les essais biologiques ont permis de mettre en évidence l'absence de relargage et de cytotoxicité des surfaces de verres greffés PI. Il a été constaté lors des essais d'adhésion microbiologiques que les verres greffés PI sont d'autant plus antibactériens que le segment aliphatique du PI est long. Nous allons maintenant chercher à élucider la conformation des chaînes PI greffées en surface. L'objectif est de mettre en lumière pourquoi le PI 6-12 est le plus antibactérien des PI du lot aliphatique. Pour ce faire, nous avons réalisés des mesures de potentiel zêta et nous avons calculé les énergies de surface des verres greffés PI en utilisant la méthode de la goutte sessile et l'équation de Young-van Oss.²⁶

B.3.1 Potentiel zêta

Le potentiel zêta représente la charge qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent en solution. Bien que généralement utilisé pour prédire la stabilité de nano et microparticules dans des formulations, cette technique peut aussi être appliquée à des surfaces macroscopiques afin de déterminer la charge globale apparente de l'extrême surface d'un matériau dans un électrolyte. On peut ainsi évaluer les éventuelles attractions ou répulsions électrostatiques entre une surface solide modifiée et des solutés.

La densité de charge d'un revêtement polymère en contact avec une solution crée une double couche électrostatique. Dans le modèle de Gouy-Chapman-Stern, la double couche électrostatique est constituée d'une première couche d'ions de charge opposée à la surface, appelé couche de Stern, et puis d'une atmosphère ionique plus diffuse, appelée couche de Gouy (Figure III-18).²⁷⁻²⁹

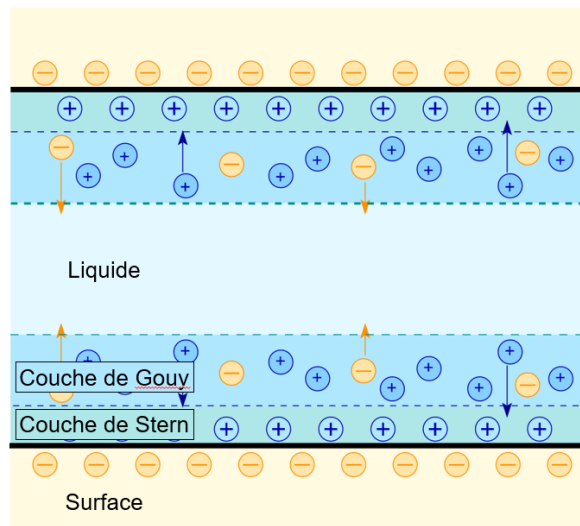


Figure III-18 : Représentation de la double couche électrostatique sur une surface

Le plan de glissement, situé dans la couche de Gouy, représente un volume de liquide qui reste en interaction avec la surface. Le potentiel zêta reflète le potentiel électrique qui existe au niveau du plan de glissement. C'est la différence de potentiel entre la couche dense de Stern et le liquide. Il caractérise donc la répartition des charges électriques sur la surface.

Le potentiel zêta en fonction du pH a été mesuré pour les surfaces de verre greffées PI 3-3, PI 6-6, PI 6-9 et PI 6-12 dans une solution de NaCl à $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans l'eau déionisée. Les valeurs sont reportées sur la Figure III-19. Le pH non ajusté correspond à environ $5,5 \pm 0,2$.

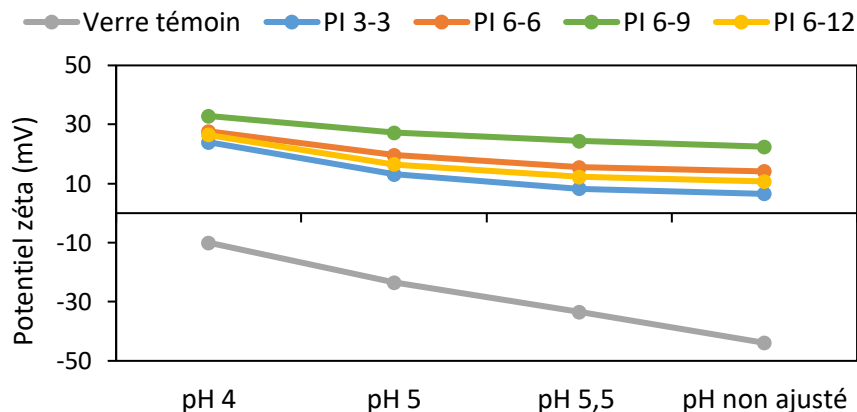


Figure III-19 : Evolution du potentiel zêta en fonction du pH pour les surfaces de verre greffées PI

Le potentiel zêta du verre sans greffage est de $-43,9$ mV à pH non ajusté. Le verre possède des groupes silanol (SiOH) en surface qui peuvent se dissocier au contact de l'eau pour libérer des protons H^+ . Ainsi, des charges de surface négatives apparaissent à la surface du verre. Pour contre-balancer ces charges, une couche de charges positives s'accumule sur la surface formant ainsi la couche de Stern.²⁹ Sous un champ électrique, la couche diffuse ou plan de glissement se polarise sous la tension appliquée et donne un potentiel zêta négatif. On constate que pour toutes les surfaces de verre greffées PI, le potentiel zêta devient positif à pH non ajusté, ce qui implique la présence de charges positives en surface dues aux PI. On remarque aussi que pour l'ensemble des surfaces greffées PI, le potentiel zêta augmente lorsque l'on diminue le pH. L'apparition de plus de charges positives à pH acide sur les surfaces est due à la présence de plus de protons H^+ dans l'électrolyte.

Le potentiel zêta du verre greffé PI 6-9 est globalement plus élevé que ceux des autres verres greffés PI. Ceci peut être dû à une plus grande épaisseur et/ou une densité de greffage plus importante de la couche PI en surface et est donc potentiellement lié à la masse molaire des chaînes greffées. Nous faisons l'hypothèse que les chaînes libres ont des masses molaires équivalentes aux chaînes greffées en nous basant sur un résultat de la littérature qui a montré cette équivalence dans le cas de la polyaddition en surface.³⁰ Nous ne l'avons pas vérifié dans le cas de nos surfaces mais ces valeurs donnent un ordre d'idée des masses molaires relatives des chaînes de PI greffées. Les masses molaires moyennes en nombre (M_n), les indices de polydispersité (I_p) ainsi que les degrés de polymérisation (DP_n) ont été récapitulés dans le Tableau III-6. Les valeurs de potentiel zêta à pH non ajusté ont également été reportées. Puisqu'il y a deux ammoniums quaternaires par unité de répétition dans les PI, nous avons évalué le nombre de charge par chaîne en multipliant le DP_n par deux.

Tableau III-6 : M_n , I_p , DP_n des chaînes libres issues des solutions de greffage et potentiel zêta des surfaces de verre greffées PI

Surface	M_n (g.mol ⁻¹)	I_p (M_w/M_n)	DP_n	Nombre de charge +/-chaîne	Potentiel zêta (mV)
PI 3-3	3 400 (±24%)	2,9 (±24%)	10,2	20,4	+ 6,5
PI 6-6	7 900 (±29%)	2,8 (±29%)	19,0	38,0	+ 14,1
PI 6-9	9 500 (±7%)	1,6 (±7%)	20,7	41,4	+ 22,5
PI 6-12	9 150 (±7%)	1,6 (±7%)	18,3	36,6	+ 10,7

Le potentiel zêta est d'autant plus grand que le nombre de charges positives sur la chaînes de PI est important. Ainsi, on pourrait expliquer les différences de potentiel zêta des surfaces de verre greffées PI par les différences de masses molaires et d'unités de répétition des PI greffés. Wang *et al.* avait montré que l'efficacité antibactérienne de leurs surfaces modifiées était d'autant plus importante que la quantité de charges positives présentes en surface était grande.³¹ Ils avaient notamment utilisé la mesure du potentiel zêta pour évaluer cette quantité de charges en surface. A l'exception du PI 6-12, les surfaces de verre greffées PI sont d'autant plus antibactériennes que leurs potentiels zêta sont élevés. Ceci suit la tendance observée dans les essais d'adhésion, à savoir que le PI 6-9 inhibe plus la contamination bactérienne que le PI 3-3. Pour autant, les analyses faites en solution ont montré que les masses molaires des PI dans notre gamme d'étude, et par extension le nombre de charge sur la chaîne, n'a qu'une influence moindre sur la CMI ou la cytotoxicité. La quantité de charge n'est donc pas le seul élément qui explique l'efficacité antibactérienne et le segment aliphatique long sur le PI 6-12 contribue aussi à son meilleur effet antibactérien. Une autre hypothèse serait donc que la différence de potentiel zêta proviendrait d'une différence de conformation des chaînes en surface, qui exposeraient plus ou moins les charges. Cette conformation, qui surviendrait dans le cas de segments aliphatiques longs, apporterait plus de flexibilité à la chaîne greffée et améliorerait son interaction avec la paroi bactérienne.

B.3.2 Energies de surface et d'hydratation

Les mesures d'angle de contact à l'eau ont été complétées par des mesures d'angle de contact avec du formamide et du diiodométhane. Les mesures d'angle de contact pour les trois liquides sur les surfaces de verre greffées PI et le verre témoin sont regroupées dans le Tableau III-7. Les masses molaires, déterminées par SEC-MALS, des PI synthétisés dans la solution de greffage ont été ajoutées dans le Tableau III-7. Elles varient de 3 300 g.mol⁻¹ pour le PI 3-3 à 7 400 g.mol⁻¹ pour le PI 6-12. Les masses molaires sont comparables à celles des PI synthétisés en solution pour des concentrations en monomères de 0,9 M (Chapitre II.A.). Les valeurs

d'angle de contact à l'eau décroissent avec l'augmentation de la longueur du segment aliphatique, de $54,9 \pm 6,0^\circ$ pour le verre greffé PI 3-3 à $22,1 \pm 3,8^\circ$ pour le verre greffé PI 6-12. Une tendance à la décroissance de la mesure d'angle de contact avec l'augmentation de la longueur du segment aliphatique est aussi observée pour les mesures avec les deux autres liquides.

Tableau III-7 : Mesures d'angles de contact à l'eau, au formamide et au diiodométhane pour les surfaces de verre greffées PI ($n = 5$) et masses molaires des PI des solutions de greffage évaluées par SEC-MALS

Surface de verre avec	Angle de contact ($^\circ$)			Masse molaire M_n (g.mol $^{-1}$)
	Eau	Formamide	Diiodométhane	SEC-MALS
PI 3-3	$54,9 \pm 6,0$	$31,5 \pm 7,6$	$43,7 \pm 2,3$	3 300 ($\pm 12\%$)
PI 6-6	$34,2 \pm 4,1$	$13,2 \pm 3,1$	$33,5 \pm 3,4$	4 300 ($\pm 16\%$)
PI 6-9	$36,6 \pm 3,1$	$14,3 \pm 3,2$	$27,9 \pm 3,5$	3 900 ($\pm 10\%$)
PI 6-12	$22,1 \pm 3,8$	$8,6 \pm 0,7$	$36,1 \pm 0,7$	7 400 ($\pm 12\%$)
Verre témoin	$7,5 \pm 1,8$	$6,5 \pm 0,5$	$46,3 \pm 2,7$	-

L'énergie de surface d'une surface γ_s^T (Equation 15) peut être calculée à partir des paramètres des contributions de Lewis-Van der Wals γ_s^{LW} et des contributions acide-base γ_s^{AB} . Cette dernière est calculée à partir des contributions électron-donneur γ_s^- et électron-accepteur γ_s^+ (Equation 16).

$$\gamma_s^T = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad (15)$$

$$\gamma_s^{AB} = 2(\gamma_s^+ \gamma_s^-)^{\frac{1}{2}} \quad (16)$$

Les valeurs d'angles de contact obtenues par ces trois liquides permettent de remonter aux paramètres des contributions de l'énergie de surface grâce à l'équation de Young-van Oss (équation 17).²⁶ Le détail des calculs à partir de l'équation de Young-van Oss est fourni en Annexe A (p. 217).

$$\gamma_L^T (1 + \cos\theta_L) = 2[(\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW})^{0,5} + (\gamma_s^+ \gamma_L^-)^{0,5} + (\gamma_s^- \gamma_L^+)^{0,5}] \quad (17)$$

Une fois les paramètres γ_s^{LW} , γ_s^- et γ_s^+ déterminés pour la surface, on peut calculer l'énergie d'hydratation totale de la surface $\Delta G_{s/eau}^T$ avec les composantes $\Delta G_{s/eau}^{LW}$, la contribution de Lewis –Van der Wals et $\Delta G_{s/eau}^{AB}$, la contribution acide-base de l'énergie d'hydratation (équation 18, 19 et 20)

$$\Delta G_{s/eau}^T = \Delta G_{s/eau}^{LW} + \Delta G_{s/eau}^{AB} \quad (18)$$

$$\Delta G_{s/eau}^{LW} = -2\sqrt{\gamma_s^{LW}\gamma_{eau}^{LW}} \quad (19)$$

$$\Delta G_{s/eau}^{AB} = -2\sqrt{\gamma_s^+\gamma_{eau}^-} - 2\sqrt{\gamma_s^-\gamma_{eau}^+} \quad (20)$$

Les valeurs calculées pour l'ensemble de ces paramètres sont récapitulées dans le Tableau III-8.

Tableau III-8 : Valeurs des paramètres d'énergies de surface et d'hydratation calculées pour les surfaces de verre greffées PI (n = 5)

Surface de verre avec	Paramètres d'énergie de surface γ (mJ.m ⁻²) et d'hydratation ΔG (mJ.m ⁻²)							
	γ^{LW}	γ	γ^+	γ^{AB}	γ_s^T	$\Delta G_{s/eau}^{AB}$	$\Delta G_{s/eau}^{LW}$	$\Delta G_{s/eau}^T$
PI 3-3	37,5 ±1,2	17,9 ±7,8	2,1 ±1,2	12,2 ±5,1	49,9 ±5,2	-57,3 ±11,5	-57,3 ±0,9	-114,7 ±11,5
PI 6-6	42,7 ±1,5	35,1 ±4,7	1,5 ±0,4	14,3 ±2,7	57,0 ±3,1	-72,0 ±5,3	-61,0 ±1,1	-133,0 ±5,4
PI 6-9	45,1 ±1,4	32,9 ±3,7	1,1 ±0,3	12,1 ±2,2	57,1 ±2,6	-68,6 ±4,4	-62,7 ±1,0	-131,3 ±4,5
PI 6-12	41,5 ±0,3	45,8 ±3,3	1,4 ±0,2	15,7 ±1,6	57,3 ±1,7	-80,1 ±3,3	-60,2 ±0,3	-140,3 ±3,3
Verre témoin	39,0 ±1,6	54,3 ±0,7	1,5 ±0,3	17,9 ±1,9	56,9 ±3,5	-86,8 ±1,0	-58,2 ±1,2	-145,0 ±2,2

Pour toutes les surfaces de verre greffées PI, les valeurs du paramètre γ^+ sont relativement faibles et les valeurs du paramètre γ^- sont relativement élevées. Ceci indique que les surfaces greffées PI ont un caractère de Lewis basique. Ce caractère basique augmente avec la longueur du segment aliphatique (17,9 mJ.m⁻² pour le PI 3-3, contre 45,8 mJ.m⁻² pour le PI 6-12) tandis que les valeurs de γ^+ restent constantes. Cet effet est peut-être dû à une augmentation locale de la concentration en contre-ions bromes à cause de changements dans la conformation des chaînes avec des segments aliphatiques plus longs. Cette hypothèse de changement de conformation à cause d'une plus grande flexibilité de la chaîne est appuyée par les valeurs d'énergie d'hydratation. La diminution de $\Delta G_{s/eau}^T$ confirme une augmentation du caractère hydrophile de la surface de verre greffées PI avec l'augmentation de la longueur du segment aliphatique conduisant à une plus grande interaction avec l'eau et une plus grande flexibilité des chaînes greffées. Ainsi, en fonction de la longueur du segment aliphatique, une conformation différente est peut-être adoptée par les chaînes greffées sur la surface. Cet effet a déjà été observé en solution, conduisant dans certains cas à la formation de micelles.^{32,33} Ceci pourrait expliquer la meilleure efficacité bactériostatique du verre greffé PI 6-12 qui possède une quantité de charge positive importante sur la chaîne et un segment aliphatique long qui lui procure de la flexibilité.

C. Etude en réflectivité des rayons X et des neutrons

Afin d'étudier d'avantage les propriétés de surface, et en particulier la conformation des chaînes greffées, une étude a été menée en réflectivité des rayons X et des neutrons. La réflectivité est une méthode puissante pour analyser la surface en obtenant des valeurs moyennées sur l'ensemble de la surface. Il est possible d'étudier les chaînes polymères à sec et en conditions hydratées, et ainsi d'observer des variations d'extension en fonctions des conditions du milieu. Les détails théoriques de la réflectivité des neutrons et des rayons X sont développés en Annexe E (p. 253). L'objectif est de mettre en lumière si un segment aliphatique plus grand offre une conformation différente à la chaîne. Cette différence de conformation pourrait expliquer la meilleure efficacité antibactérienne des surfaces de verre greffées PI avec les segments aliphatiques les plus grands.

C.1 Adaptation du procédé de greffage aux wafers de silicium

Pour réaliser des études en réflectivité de neutrons ou de rayons X, il est nécessaire d'avoir des substrats plans et avec une rugosité minimale si on souhaite maximiser la détection du signal réfléchi. De plus, en réflectivité des neutrons, il faut utiliser des substrats transparents aux neutrons afin de ne pas perdre le signal réfléchi une fois que le faisceau a traversé la couche d'étude. Les wafers de silicium sont donc des surfaces particulièrement bien adaptés à ce type d'analyse. Ils absorbent peu les neutrons et possèdent une faible rugosité (rugosité rms de quelques Å). De plus, la présence de groupes silanol sur leurs surfaces permet de nombreuses modifications chimiques et un greffage aisé de nombreuses molécules ou polymères. Enfin, ils sont faciles à produire et abordables de par leur très grande utilisation dans l'industrie électronique. L'observation s'effectue avec un faisceau très large en réflectivité des neutrons, il faut donc utiliser des wafers larges et épais, typiquement au moins 3 mm d'épaisseur et 51 mm de diamètre.

Une première étude en réflectivité des neutrons a été faite en appliquant directement le protocole établi sur le verre, sur des wafers de silicium. Les premiers essais ont révélé que la rugosité des couches était trop importante et ne permettait d'avoir suffisamment de réflectivité pour faire des observations. De plus, la sous-couche de PMADAME et la couche PI gonflaient en conditions hydratées, il était donc difficile de distinguer des différences entre ces deux couches polymères. Un nouveau protocole de greffage sur les wafers de silicium a donc été

élaboré pour diminuer la rugosité des couches greffées et s'affranchir de la sous-couche de PMADAME.

C.1.1 Stratégie de greffage

La sous-couche PMADAME apportait des fonctions diméthylamines afin de réaliser la polyaddition en surface des PI. Nous allons d'abord greffer la PDOPA sur les wafers de silicium puis réaliser un surgreffage de cette couche PDOPA pour apporter les fonctions nécessaires. Cette stratégie est issue d'une publication de Lepoittevin *et al.* où ils ont surgreffé une couche de PDOPA avec des chlorure d'acyle fluorés pour créer des surfaces hydrophobes.⁹ Les fonctions diméthylamines sont apportés par le 4-(diméthylamino) benzoyl chloride (DMABC). La fonction amine de la PDOPA réagit avec la fonction chlorure d'acyle du DMABC pour former une amide *via* la réaction de Schotten-Baumann (Figure III-20).

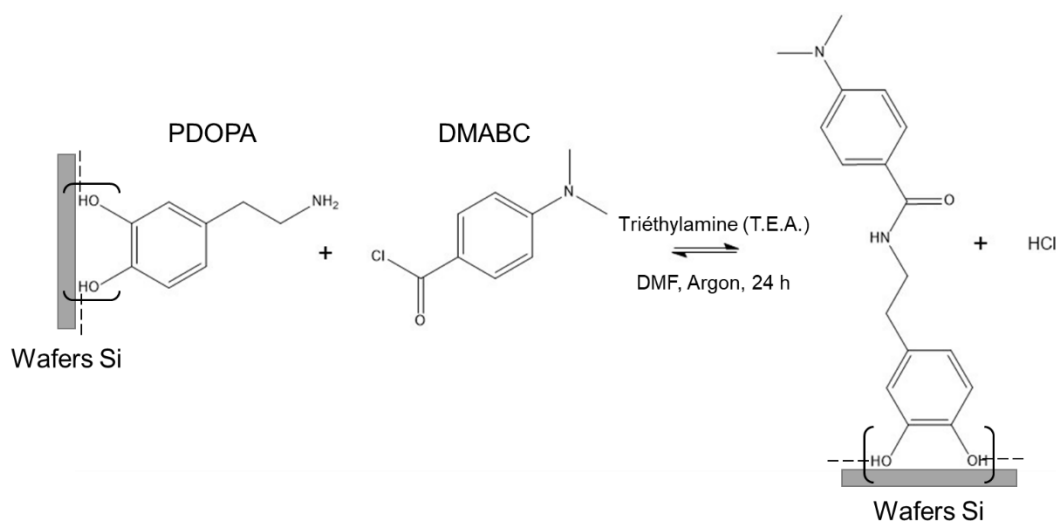


Figure III-20 : Réaction entre la polydopamine (PDOPA) et le 4-(diméthylamino) benzoyl chloride (DMABC)

La fonction amine en surface est libre pour réagir puisque la PDOPA est un agrégat supramoléculaire maintenu par des interactions de transfert de charges, de π -stacking et de liaisons hydrogènes au niveau des diols et du cycle aromatique.⁷ Le DMABC peut aussi réagir sur les fonctions alcools de la PDOPA pour former un ester. En condition basique, le groupe nucléophile, l'amine, attaque le groupe carbonyle du composé acylé pour former un intermédiaire. Cet intermédiaire se décompose en expulsant le groupe nucléofuge, le chlore. Enfin, l'amine est déprotoné en présence de la base pour former l'amide. Les chlorures d'acyles sont des composés très réactifs qui se dégradent dans une réaction parasite avec l'eau, il est donc nécessaire d'effectuer ce greffage sous atmosphère inerte.

C.1.2 Protocole de greffage des polyionènes sur les wafers de silicium

Le greffage des PI sur les wafers de silicium s'effectue en trois étapes résumées sur la Figure III-21. Le protocole détaillé est fourni en Annexe A (p. 217) mais il sera résumé brièvement.

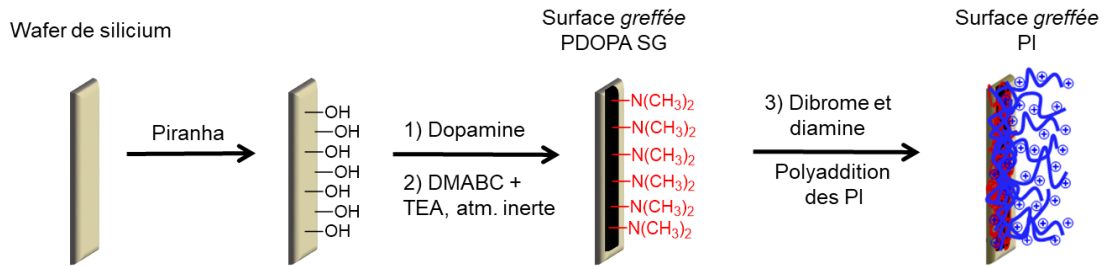


Figure III-21 : Schéma du procédé de greffage des PI sur les wafers de silicium

Les wafers de silicium sont d'abord lavés à l'éthanol dans un bain à ultrasons afin d'obtenir une surface propre. Ils sont ensuite immergés dans une solution piranha (H_2O_2/H_2SO_4 , 1:3) afin de retirer toute trace organique et de générer des groupements silanols en surface. Après un rinçage abondant à l'eau déionisée, les wafers de silicium sont plongés dans une solution de dopamine préparée dans l'eau déionisée à pH ajusté à 8,5 avec une solution tampon. Les wafers sont immergés seulement 3 h dans une solution à 3 mg.mL^{-1} de dopamine afin de ne pas former une couche trop épaisse et rugueuse de polydopamine. Les wafers sont lavés et séchés avant de passer à l'étape suivante. Le wafer de silicium PDOPA et le DMABC sont introduits dans un réacteur fermé et mis sous atmosphère inerte. Le DMF anhydre est ajouté à la seringue dans le réacteur. Une fois le DMABC solubilisé, la triéthylamine (TEA) est ajoutée goutte à goutte pour amorcer la réaction. La réaction est laissée pendant 24 h sous agitation. Les wafers de silicium avec la polydopamine surgreffée (PDOPA SG) sont lavés et séchés avant de passer à l'étape suivante. Enfin, on effectue la polyaddition en surface des PI de la même manière que pour le verre. Les greffages ont été réalisés en proportion stœchiométrique et pour des concentrations en monomères de départ de 0,9 et 1,2 M.

C.1.3 Caractérisation du greffage par XPS

Pour vérifier que le greffage des PI a bien été effectué sur les wafers de silicium, on réalise des analyses XPS. Les spectres globaux démontrent que la PDOPA SG et le PI 6-6 ont bien été greffés sur le wafer avec la présence des pics caractéristiques des contributions C et N (Figure III-22, a). En particulier, la présence des contributions des contre-ions Br^- uniquement sur le spectre global du PI 6-6 atteste de la présence du PI. Les pics caractéristiques de la silice sont présents sur les spectres globaux, les couches organiques greffées ont donc des épaisseurs inférieures à 15 nm.

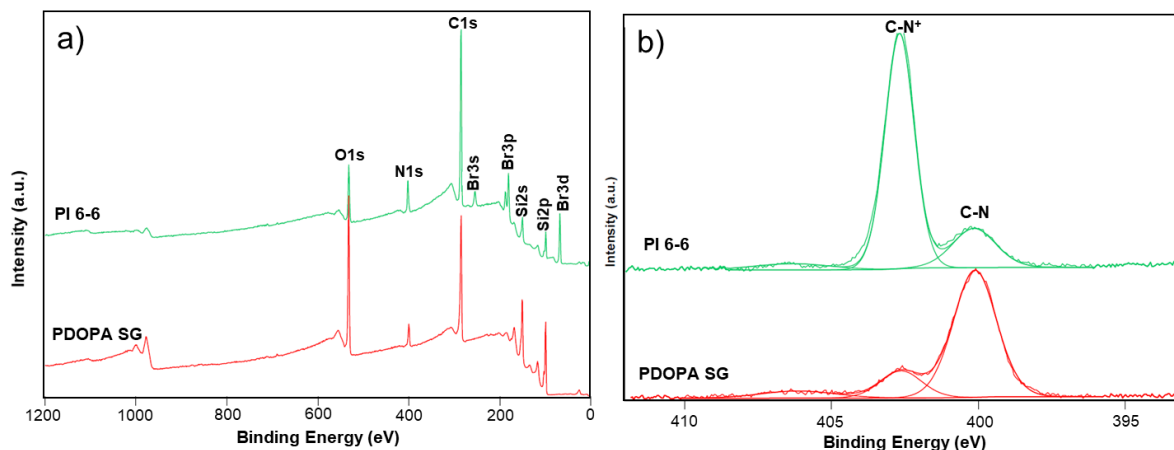


Figure III-22 : a) Spectres globaux XPS des wafers de silicium greffés PDOPA SG et PI 6-6 et b) spectres à haute résolution du pic N 1s sur ces mêmes surfaces

Sur le spectre à haute résolution du N 1s de la couche PI 6-6 (Figure III-22, b), la contribution de l'azote se divise entre celles des liaisons C-N à 400 eV, issues des diméthylamines et des amides, et celles des liaisons C-N⁺ à 402 eV, issues des ammoniums quaternaires. La contribution C-N⁺ sur le spectre à haute résolution du N 1s de la couche PDOPA SG pourrait provenir d'un réarrangement intramoléculaire de la PDOPA qui engendre par exemple, l'apparition d'une charge quand l'azote se lie au carbone du cycle aromatique. Une petite partie des contributions du pic N 1s sur les deux couches est aussi dû à la présence de liaisons N-O à 406 eV qui peuvent également provenir de phénomènes de réarrangement ou de contaminations au vu des très faibles contributions observées. Les spectres à haute résolution du pic N 1s, montrent que la contribution des liaisons C-N⁺ est majoritaire par rapport à la contribution des liaisons C-N sur la couche PI 6-6 alors que c'est l'inverse sur la sous-couche PDOPA SG (Figure III-22, b).

A partir des spectres globaux, il a été possible de calculer les proportions (% atomique) des espèces chimiques présentes sur les wafers de silicium modifiés. Les compositions chimiques des surfaces sont reportées dans le Tableau III-9.

Tableau III-9 : Compositions chimiques des surfaces modifiées (% atomique) déterminées sur les spectres globaux

Couche	Si 2p	C 1s	O 1s	N 1s	Br 3d
PDOPA SG	25,4 %	48,6 %	20,8 %	5,2 %	-
PI 6-6	10,8 %	68,1 %	8,5 %	7,0 %	5,6 %

Le greffage de la couche de PI 6-6 fait augmenter la proportion d'azote mais surtout la proportion de carbone sur la surface. De plus, la proportion de silicium est plus faible après l'ajout de la couche PI, donc l'épaisseur totale de la couche organique en surface a augmenté.

Le spectre à haute résolution de la contribution N 1s permet aussi de calculer le ratio entre la contribution des C-N⁺ et des contre-ions Br⁻ (Tableau III-10). Le calcul donne un ratio de 0,9 pour un ratio théorique de 1, le résultat est donc cohérent avec la structure du PI. Tous ces éléments permettent d'affirmer que le greffage des PI sur les wafers de silicium par ce procédé est réussi.

Tableau III-10 : Contributions du pic N 1s des surfaces modifiées (% atomique) déterminées sur les spectres à haute résolution

Couche	C-N (400 eV)	C-N ⁺ (402 eV)	N-O (406 eV)
PDOPA SG	76,6 %	15,8 %	7,6 %
PI 6-6	18,9 %	75,8 %	5,3 %

C.2 Etudes des couches à sec : réflectivité des rayons X

Le contraste en réflectivité des neutrons dépend de la densité de longueur de diffusion neutronique (Scattering Length Density, SLD) qui exprime l'interaction entre les neutrons et les noyaux atomiques. La SLD de l'air est nulle et la SLD calculée des PI varie du PI 3-3 au PI 6-12 de -0,082 à -0,174.10⁻⁶ Å⁻². Malikova *et al.* avaient aussi mesuré la SLD en solution de ces PI et avaient trouvé des valeurs comprises entre -0,142 et -0,228.10⁻⁶ Å⁻² du PI 3-3 au PI 6-12.³² Les PI greffés en surface ne présentent pas ou peu de contraste avec l'air en réflectivité des neutrons, nous avons donc analysé les couches polymères à sec par réflectivité des rayons X dans le vide. En réflectivité des rayons X, le contraste dépend de l'interaction des rayons X avec la densité électronique des atomes de la couche analysée.

Ces méthodes d'analyse permettent de moyennner les résultats sur l'ensemble de la surface sondée de l'échantillon mais aussi de différencier les couches organiques entre elles dans le cas de systèmes multicouches. L'évaluation des caractéristiques des couches est réalisée en ajustant une modélisation avec des valeurs connues sur les données expérimentales. Pour chaque courbe expérimentale, l'ajustement a pu être réalisé avec le logiciel GenX à l'aide du module « Reflectivity ».³⁴ L'ajustement est réalisé avec un modèle standard de couches homogènes de faible rugosité par une approche récursive (formalisme de Parrat³⁵). Cet ajustement nous permet d'estimer l'épaisseur, la rugosité et la densité électronique (F) de chacune des couches polymères présentes sur la surface.

C.2.1 Sous-couche PDOPA SG

La sous-couche de PDOPA SG a d'abord été examinée. Les couches ont été réalisées sur des wafers de silicium dans les mêmes conditions pour le lot 1 et le lot 2. Comme précisé

préalablement, on nettoie et on génère une couche d'oxyde sur les surfaces avec une solution piranha. Les caractéristiques de cette couche d'oxyde ont été évaluées par réflectivité des rayons X et ces paramètres (épaisseur, rugosité et densité électronique) ont ensuite été fixés pour l'ensemble des ajustements. Pour les échantillons issus d'un même lot, les sous-couches PDOPA ont été réalisées sur des wafers de silicium partageant le même bain de greffage de dopamine. Chaque wafer PDOPA a ensuite été surgreffé individuellement avec le DMABC dans un réacteur fermé. L'observation à sec des courbes de réflectivité des rayons X (Figure III-23) et la comparaison des données issues des ajustements (Tableau III-11) permettent d'attester de la bonne reproductibilité du greffage de la sous-couche PDOPA SG. Les sous-couches obtenues sont fines, moins de 30 Å et relativement rugueuses, de 17 à 22 Å.

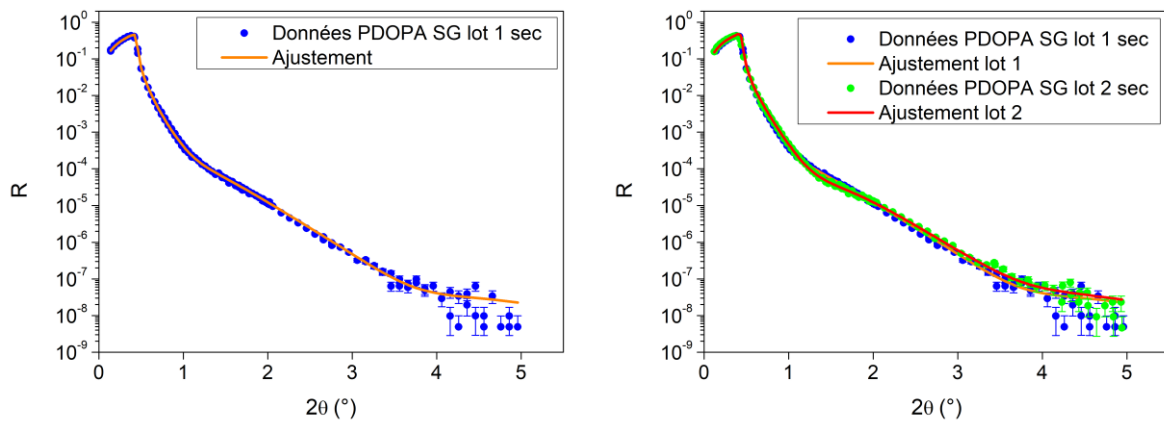


Figure III-23 : Courbes de réflectivité des rayons X de la PDOPA SG lot 1 (gauche) et des PDOPA SG lot 1 et 2 (droite)

Tableau III-11 : Paramètres des ajustements des PDOPA SG lot 1 et 2 par réflectivité des rayons X

RX	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	F (el/at)
PDOPA SG lot 1	sec	Oxide	13,9	6,2	0,66
		PDOPA SG	29,5 ± 2,0	21,5 ± 1,4	0,36 ± 0,01
PDOPA SG lot 2	sec	Oxide	13,9	5,9	0,66
		PDOPA SG	28,0 ± 1,2	17,4 ± 1,0	0,36 ± 0,01

C.2.2 Couche PI 6-9

Dans un deuxième temps, nous observons les échantillons des lot 1 et 2 après la polyaddition en surface du PI 6-9. Le greffage a été effectué dans les mêmes conditions entre les deux lots avec une concentration en monomère de 0,9 M. En comparant les courbes de réflectivité des rayons X de la sous-couche PDOPA SG du lot 1 et de cette même sous-couche après la polyaddition du PI 6-9, on constate l'apparition d'une oscillation une fois le PI 6-9 greffé (Figure III-24, gauche). Cette oscillation marque une augmentation de l'épaisseur des couches

polymères en surface. L'ajustement met en évidence la présence d'une couche de PI de 60 Å d'épaisseur (Tableau III-12). La même conclusion peut être faite sur le lot 2, en revanche l'épaisseur de la couche de PI 6-9 est seulement de 29 Å. Les deux lots ont produit des couches de PI 6-9 du même ordre de grandeur mais pas identiques comme dans le cas de la sous-couche PDOPA SG (Figure III-24, droite).

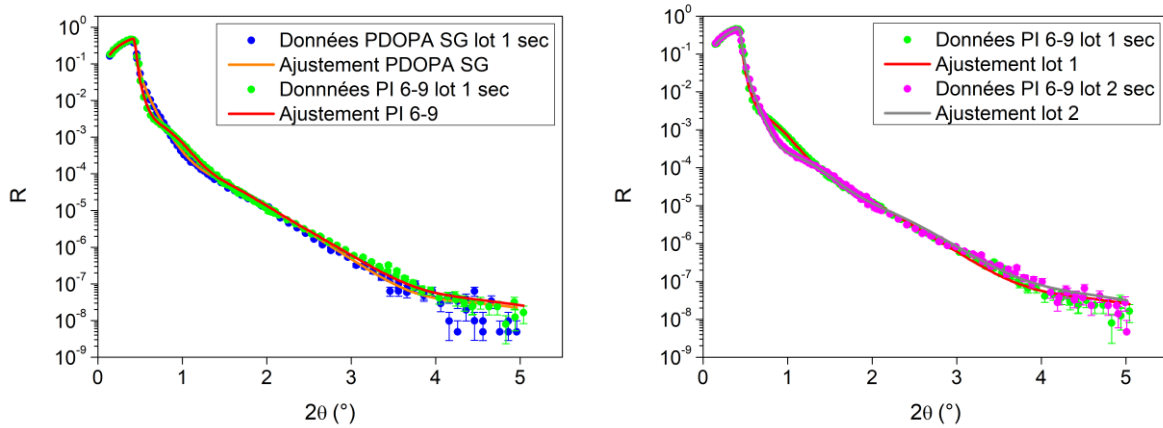


Figure III-24 : Courbes de réflectivité des rayons X de la PDOPA SG et du PI 6-9 lot 1 (gauche) et des PI 6-9 lot 1 et 2 (droite)

Tableau III-12 : Paramètres des ajustements des PI 6-9 lot 1 et 2 par réflectivité des rayons X

RX	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	F (el/at)
PI 6-9 0,9 M lot 1	sec	Oxide	13,9	5,9	0,66
		PDOPA SG	29,5	21,5	0,36
		PI 6-9	60,0 ± 4,8	23,4 ± 2,8	0,23 ± 0,04
PI 6-9 0,9 M lot 2	sec	Oxide	13,9	5,6	0,66
		PDOPA SG	28,0	11,4	0,36
		PI 6-9	28,7 ± 4,6	17,9 ± 1,7	0,23 ± 0,03

La différence peut venir d'une erreur expérimentale lors de l'ajout des monomères. En effet, la polyaddition en surface est un procédé de polymérisation par étapes, il est donc très sensible à la stœchiométrie des monomères. Le moindre écart à l'état stœchiométrique se traduit par une diminution de la masse molaire des chaînes polymères et donc de l'épaisseur de la couche polymère produite. Cette différence a aussi été observée sur les greffages des autres PI de la gamme. Les épaisseurs des couches de PI restent cependant toutes du même ordre de grandeur, de 20 à 60 Å lorsque les concentrations en monomère de départ sont de 0,9 M. Les épaisseurs à sec de ces couches polymères sont cohérentes avec les conclusions des analyses XPS et sont inférieures à 15 nm.

C.3 Etude des couches hydratées : réflectivité des neutrons

Une fois le profil des couches étudiées à sec, les couches sont étudiées dans des conditions hydratées. L'étude en conditions hydratées nous permet d'être plus proche de la réalité d'utilisation des matériaux, les essais microbiologiques étant effectués dans l'eau. Pour ce faire, les wafers de silicium greffés sont analysés en réflectivité des neutrons dans le D₂O. L'utilisation d'un solvant deutéré permet une meilleure analyse grâce à un contraste exalté, la densité de longueur de diffusion du D₂O étant bien plus grande que celle des couches polymères hydrogénées greffées ($6,4 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ pour le D₂O contre $-0,142/-0,228 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ pour les PI). Afin de mettre en évidence plus clairement les variations de signaux, nous avons choisi de représenter les courbes expérimentales avec une échelle logarithmique et en $RQ^4(Q)$ (multiplication des valeurs de réflectivité R par les valeurs du vecteur de diffusion Q^4 associé) plutôt qu'en $R(Q)$.

C.3.1 Modèle des ajustements

L'évaluation des caractéristiques des couches est réalisée en ajustant un modèle avec des valeurs connues sur les données expérimentales. Dans le cas des couches polymères greffées étudiées ici, l'ajustement des courbes de réflectivité des neutrons a nécessité l'utilisation d'une approche quelque peu différente de celle utilisée lors des ajustements des courbes de réflectivité des rayons X. La potentielle grande rugosité des couches gonflées rend la paramétrisation du profil de densité de longueur de diffusion (SLD(z)) caduc en utilisant le formalisme précédent. Nous avons donc choisi de paramétrer ce profil en utilisant le modèle dit de « effective density layer model ».³⁶ Ce modèle est composé comme précédemment d'un système de n couches caractérisées par une épaisseur, une rugosité et une densité de longueur de diffusion (SLD). Lorsque la rugosité est faible vis-à-vis des couches de part et d'autre de l'interface, cette paramétrisation est strictement identique à celle utilisé précédemment. Dans le cas contraire, ce modèle permet de décrire des interfaces fines et diffuses où on applique localement le formalisme précédent. Ce modèle d'ajustement a été programmé en python.

C.3.2 Gonflement des couches dans le D₂O

Les wafers greffés avec la sous-couche PDOPA SG et la couche PI sont immergés dans le D₂O pour analyser dans un premeir temps le gonflement de chacune des couches polymères.

C.3.2.1 Sous-couche PDOPA SG

La courbe de réflectivité des neutrons de la couche de PDOPA SG dans le D₂O présente une légère oscillation entre 0,02 et 0,4 \AA^{-1} (Figure III-25, gauche). Le modèle choisi permet de bien

décrire les courbes comme l'atteste la bonne superposition de l'ajustement sur les données expérimentales. Le profil de densité électronique ($F(z)$) obtenu en réflectivité des rayons X, donc à sec, peut être converti en profil de densité de longueur de diffusion ($SLD(z)$) en multipliant les valeurs $F(z)$ par le rayon d'un électron en Å et la densité du matériau. En comparant les profils de densité de longueur de diffusion à sec et dans l'état hydraté (obtenus par les analyses en réflectivité des neutrons), on constate un gonflement de la couche PDOPA SG lot 1 une fois qu'elle est immergée dans le D_2O (Figure III-25, droite). La PDOPA SG lot 1 possède une épaisseur et une rugosité bien plus importantes dans l'état hydraté (environ 170 Å), que à sec (environ 50 Å) (Tableau III-13). La rugosité des couches est un paramètre qui témoigne du gonflement de la brosse, une petite rugosité implique une brosse collapsée alors qu'une forte rugosité implique un gonflement de celle-ci.

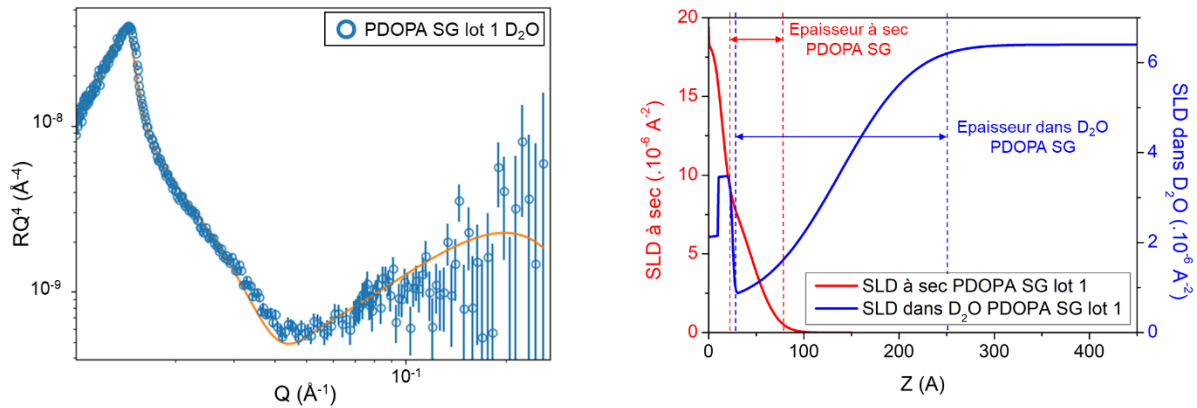


Figure III-25 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion à sec et dans le D_2O (droite) de la PDOPA SG lot 1

Tableau III-13 : Paramètres des ajustements de la PDOPA SG lot 1 par réflectivité des rayons X et des neutrons

RX	Conditions	Couches	Épaisseur (Å)	Rugosité (Å)	F (el/at)
PDOPA SG lot 1	sec	Oxide	13,9	6,2	0,66
		PDOPA SG	$29,5 \pm 2,0$	$21,5 \pm 1,4$	$0,36 \pm 0,01$
Neutrons	Conditions	Couches	Épaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$)
PDOPA SG lot 1	D_2O	Oxide	15	2	3,4
		PDOPA SG	$112,0 \pm 1,7$	$61,8 \pm 0,4$	$0,63 \pm 0,02$

De par le modèle utilisé pour calculer le profil de densité de longueur de diffusion ($SLD(z)$) et les rugosités importantes, il n'est pas possible d'évaluer une valeur précise pour l'épaisseur de la couche polymère en conditions hydratés. La valeur du paramètre épaisseur issue de l'ajustement est associée à une « rugosité large ». Une « rugosité large » implique que l'épaisseur de la couche est du même ordre de grandeur que les variations à son interface (Figure III-26). Le profil de densité de longueur de diffusion est cependant suffisant pour comparer

qualitativement les évolutions d'épaisseurs entre différents échantillons et conditions. Il est aussi possible de faire une comparaison qualitative des paramètres d'un ajustement à un autre.

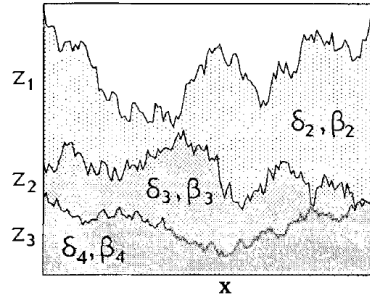


Figure III-26 : Système multicouche avec des « rugosités larges »³⁶

C.3.2.2 Couche PI 3-3

L'ajout de la couche de PI 3-3 provoque un décalage de l'oscillation observée précédemment sur la courbe de réflectivité des neutrons de la couche PDOPA SG vers les petits Q (Figure III-27, gauche). Ceci est une indication de l'augmentation de l'épaisseur de la couche organique greffée sur la surface. Le modèle bi-couche permet donc de bien décrire les mesures expérimentales. Sur le profil de densité de longueur de diffusion de la couche PI 3-3, on peut observer deux régions (Figure III-27, droite). La première région, proche du substrat, correspond à la sous-couche PDOPA SG qui s'étend sur environ 100 Å. On note ensuite un point d'inflexion délimitant une deuxième région sur le profil. Cette seconde région qui fait suite à l'inflexion est attribuée à la présence des chaînes de PI. Par conséquent, nous montrons ici que la réflectivité des neutrons permet de sonder à l'échelle moléculaire le gonflement des chaînes de PI.

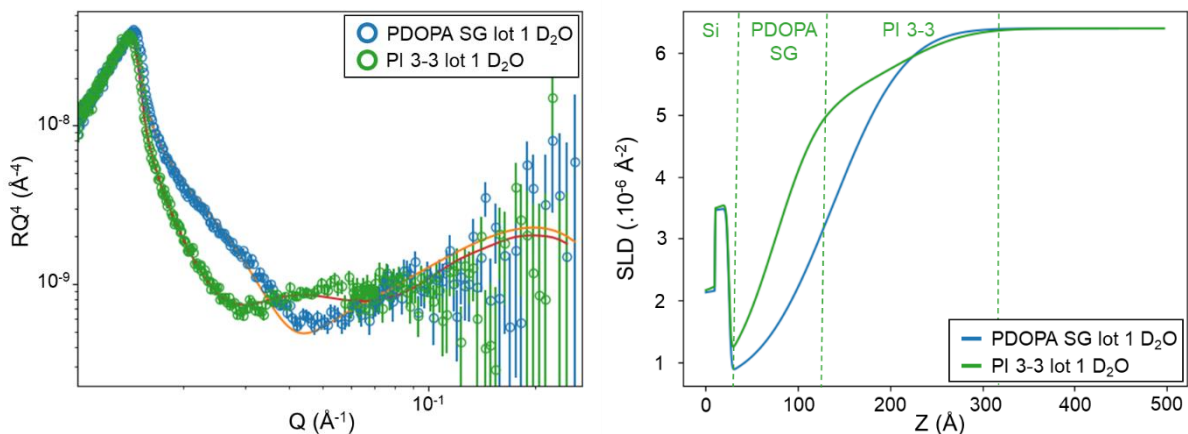


Figure III-27 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion dans le D_2O (droite) de la PDOPA SG et du PI 3-3 lot 1

En comparant les profils de densité de longueur de diffusion, on constate un gonflement de la couche PI 3-3 lot 1 entre l'état sec et l'état hydraté (Figure III-28). On remarque aussi un gonflement de la couche de PI avec une épaisseur et une rugosité en D₂O bien plus grandes que l'épaisseur à sec (Tableau III-14). Il est donc probable que les deux couches greffées, PDOPA SG et PI, interdiffusent l'une dans l'autre aux vues des grandes rugosités calculées.

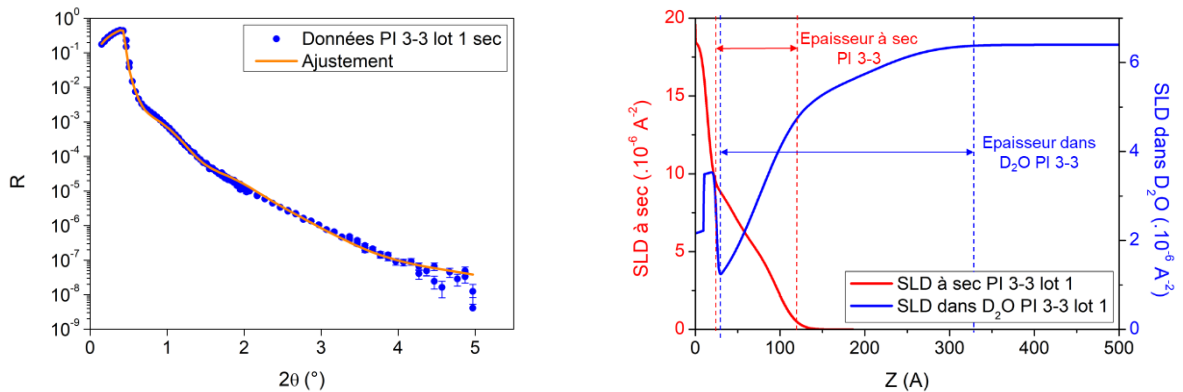


Figure III-28 : Courbes de réflectivité des rayons X (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion à sec et dans le D₂O (droite) du PI 3-3 lot 1

Tableau III-14 : Paramètres des ajustements à sec et dans le D₂O du PI 3-3 lot 1 par réflectivité des rayons X et des neutrons

RX	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	F (el/at)
PI 3-3 0,9 M lot 1	sec	Oxide	13,9	5,4	0,66
		PDOPA SG	29,5	21,5	0,36
		PI 3-3	53,4 ± 6,2	17,9 ± 3,6	0,18 ± 0,06
Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$)
PI 3-3 0,9 M lot 1	D ₂ O	Oxide	15	2	3,4
		PDOPA SG	49,7	39,7	0,63
		PI 3-3	132,6 ± 2,6	57,9 ± 2,3	5,22 ± 0,04

C.3.3 Reproductibilité des lots dans le D₂O

C.3.3.1 Sous-couche PDOPA SG

Les courbes de réflectivité des neutrons des sous-couches PDOPA SG des lots 1 et 2 ne se superposent pas aussi bien que dans le cas des courbes de réflectivités des rayons X, la bonne reproductibilité des couches est donc moins flagrante (Figure III-29, gauche). Par ailleurs, les ajustements donnent des paramètres de couches hydratées proches mais pas identiques (Tableau III-15). Cette différence est d'autant plus visible sur les profils de densité de longueur de diffusion dans le D₂O des deux lots (Figure III-29, droite). Comme pour les études à sec, on retrouve bien que la PDOPA SG lot 1 est plus épaisse que la PDOPA SG lot 2. Cette légère différence d'épaisseur à sec est donc plus marquée une fois que les sous-couches sont hydratées.

En effet, Les deux lots présentent des rugosités importantes similaires d'environ 60 Å, qui témoignent du gonflement des couches en conditions hydratées, mais avec des épaisseurs différentes.

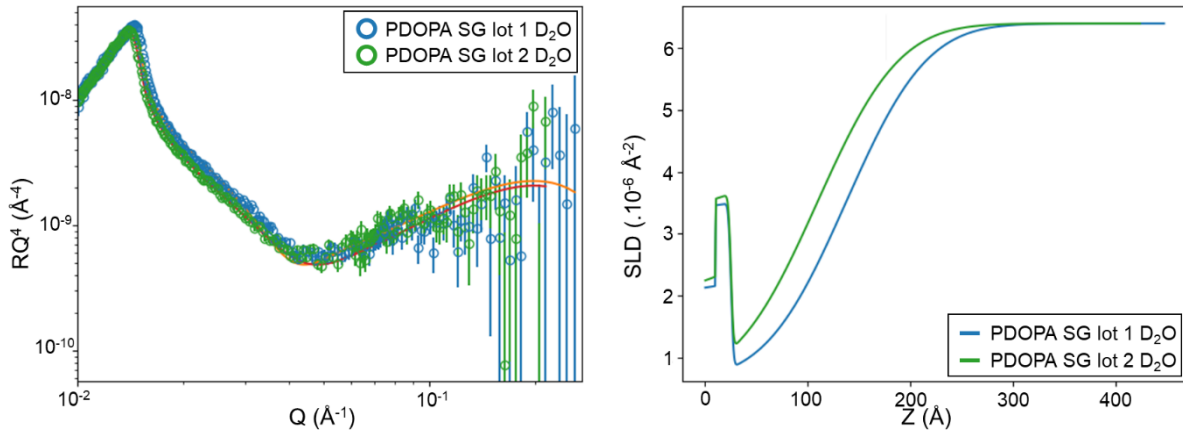


Figure III-29 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion (droite) des PDOPA SG lot 1 et 2

Tableau III-15 : Paramètres des ajustements dans le D_2O des PDOPA SG lot 1 et 2 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$)
PDOPA SG lot 1	D_2O	Oxide	15	2	3,4
		PDOPA SG	$112,0 \pm 1,7$	$61,8 \pm 0,4$	$0,63 \pm 0,02$
PDOPA SG lot 2	D_2O	Oxide	15	2	3.4
		PDOPA SG	$83,5 \pm 1,2$	$62,8 \pm 0,8$	$0,60 \pm 0,03$

C.3.3.2 Couches PI 6-9

Les lots 1 et 2 de PI 6-9 sont similaires, avec des épaisseurs et des rugosités proches pour les paramètres des deux couches PDOPA SG et PI, ce qui semble indiquer une bonne reproductibilité pour l'étude des lots en conditions hydratées (Figure III-30 et Tableau III-16). En effet, la différence d'épaisseur constatée entre les deux couches à sec est moins perceptible dans l'état hydraté à cause du gonflement des couches. Les inflexions sur les profils de densité de longueur de diffusion attestent bien de la présence du PI. Les courbes en RQ^4 sont similaires mais ne se superposent pas probablement à cause de rugosités et de densités de greffage différentes.

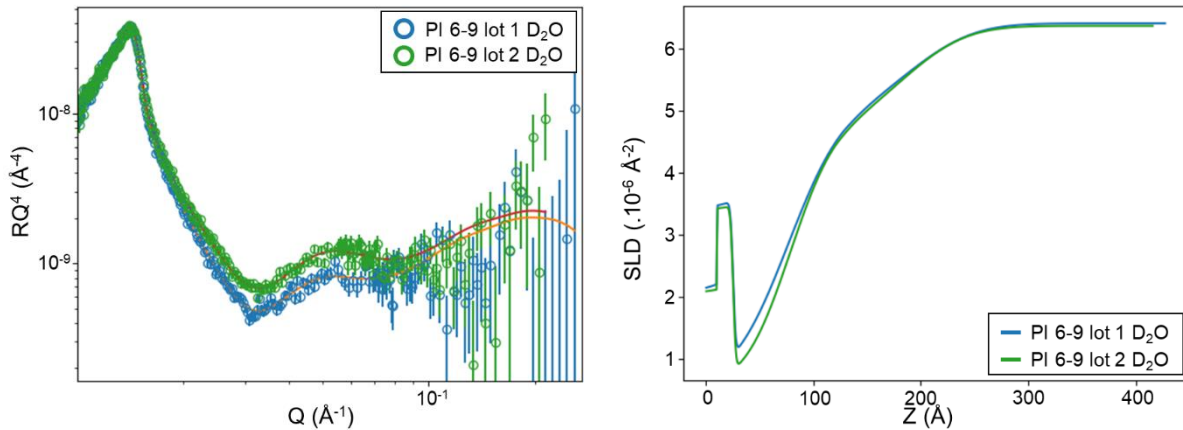


Figure III-30 : Courbe de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profil de densité de longueur de diffusion (droite) des PI 6-9 lot 1 et 2

Tableau III-16 : Paramètres des ajustements dans le D_2O des PI 6-9 lot 1 et 2 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$)
Pour toutes les conditions		Oxide	15	2	3,4
PI 6-9 0,9 M lot 1	D_2O	PDOPA SG	$49,7 \pm 2,9$	$39,7 \pm 1,8$	0,63
		PI 6-9	$115,6 \pm 2,1$	$47,2 \pm 2,5$	$4,90 \pm 0,10$
PI 6-9 0,9 M lot 2	D_2O	PDOPA SG	$52,1 \pm 1,4$	$33,1 \pm 0,7$	0,60
		PI 6-9	$106,3 \pm 2,3$	$46,4 \pm 2,3$	$4,67 \pm 0,12$

Les ajustements mettent également en avant un autre phénomène. Bien que les sous-couches PDOPA SG soient similaires sur les ajustements avec la couche de PI 6-9, on constate que les épaisseurs calculées de celles-ci sont inférieures à celles des couches de PDOPA SG avant l'ajout du PI 6-9. Les sous-couches PDOPA SG ont des paramètres d'épaisseurs de 80 et 110 Å avant le greffage du PI 6-9 et diminuent à 50 Å après le greffage du PI 6-9. Le même phénomène a été constaté en réflectivité des rayons X sur certains échantillons. Deux hypothèses sont possibles pour expliquer cette diminution. Un dégreffage pourrait venir de la couche de PDOPA SG. La PDOPA est maintenue par une combinaison de transfert de charge, de π -stacking et de liaisons hydrogènes. Ces liaisons non-covalentes pourraient donc être brisées par des variations de température ou de solvant. La différence d'épaisseur peut aussi venir d'un comportement différent de la PDOPA SG, avec un gonflement moins important de cette sous-couche quand elle fait partie d'un système multicouche. Du fait de cette variation, il est plus pertinent de comparer les échantillons issus d'un même lot car ils possèdent la même sous-couche (même bain de greffage de dopamine).

C.3.4 Comparaisons des polyionènes aliphatiques du lot 1 dans le D₂O

Les courbes de réflectivité des neutrons dans le D₂O des quatre PI d'un même lot (PI 3-3, 6-6, 6-9 et 6-12 du lot 1) ont été mis en regard sur le même graphique (Figure III-31, gauche). L'objectif de l'expérience est d'étudier l'allure des courbes RQ⁴ (franges de Kiessing) et des profils de densité de longueur de diffusion (inflexion) afin de déduire éventuellement une différence de conformation en fonction de la longueur des segments aliphatiques des PI greffés. Au sein de ce lot 1, les épaisseurs des différentes couches organiques ne sont pas comparables dans l'état hydraté (Figure III-31, droite et Tableau III-17). Le PI 6-6 et le PI 6-12 présentent des épaisseurs inférieures aux PI 3-3 et 6-9 (environ 90-100 Å contre 170-180 Å), sans oscillation visible sur les courbes de réflectivité des neutrons. De plus, l'inflexion caractéristique de la présence des PI n'est visible que sur les profils de densité de longueur de diffusion des PI 3-3 et 6-9 (Figure III-31, droite).

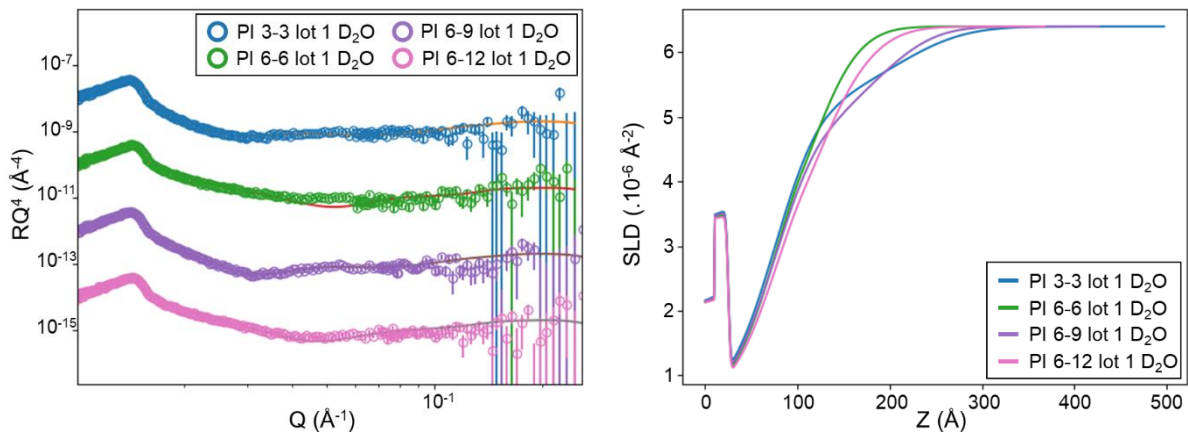


Figure III-31 : Courbes de réflectivité des neutrons RQ⁴ (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion (droite) du PI 3-3, PI 6-6, PI 6-9 et PI 6-12 du lot 1

Tableau III-17 : Paramètres des ajustements dans le D₂O du PI 3-3, du PI 6-6, du PI 6-9 et du PI 6-12 lot 1 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$)
Pour toutes les conditions		Oxide	15	2	3.4
PI 3-3 0,9 M lot 1	D ₂ O	PDOPA SG	49,7	39,7	0,63
		PI 3-3	132,6 ± 2,6	57,9 ± 2,3	5,22 ± 0,04
PI 6-6 0,9 M lot 1	D ₂ O	PDOPA SG	49,7	39,7	0,63
		PI 6-6	53,3 ± 7,8	39,7 ± 2,4	4,38 ± 0,23
PI 6-9 0,9 M lot 1	D ₂ O	PDOPA SG	49,7	39,7	0,63
		PI 6-9	115,7 ± 2,0	47,2 ± 2,0	4,90 ± 0,07
PI 6-12 0,9 M lot 1	D ₂ O	PDOPA SG	49,7	39,7	0,63
		PI 6-12	64,7 ± 4,2	45,6 ± 2,1	3,97 ± 0,19

Les solutions de greffage des PI ont été précipitées afin de déterminer les masses molaires moyenne en nombre (M_n) et les degrés de polymérisation (DP_n) des chaînes libres (Tableau III-18). Les masses molaires des PI 6-6 et PI 6-12 sont supérieures à celle du PI 6-9 alors que le wafer greffé PI 6-9 possède une épaisseur de couche organique plus importante que les wafers greffés PI 6-6 et PI 6-12. Le PI 3-3, comme à l'accoutumé, à une masse molaire inférieure aux trois autres. Le greffage du PI 6-6 et du PI 6-12 n'a peut-être pas bien fonctionné à cause d'une faible quantité de fonction d'ancrage à la surface dû à une mauvaise réactivité lors du surgreffage de la PDOPA. Il est aussi possible que les densités de greffage soient différentes entre les échantillons mais il nous est impossible de l'évaluer par des techniques de réflectivité à cause des rugosités importantes des échantillons. Une faible densité de greffage impliquerait un contraste très faible avec le D_2O et donc ceci expliquerait l'absence d'inflexion sur les profils de densité de longueur de diffusion.

Tableau III-18 : Masses molaires (M_n), indices de polydispersité (I_p), masses molaires des unités de répétition ($M_{\text{unité}}$) et degrés de polymérisation (DP_n) des PI des solutions de greffage des wafers greffés PI du lot 1

Lot 1	M_n (g.mol ⁻¹)	I_p (Mw/Mn)	$M_{\text{unité}}$ (g.mol ⁻¹)	DP_n
PI 3-3	2 300 (±6%)	3,5 (±6%)	332	6,9
PI 6-6	7 800 (±10%)	2,4 (±10%)	416	18,8
PI 6-9	5 500 (±4%)	1,6 (±4%)	458	12,0
PI 6-12	7 900 (±10%)	1,8 (±10%)	500	15,8

L'épaisseur n'étant pas la même sur tous les échantillons, tout comme probablement les masses molaires des chaînes greffées, il est difficile de conclure sur le comportement des chaînes en fonction de la longueur du segment aliphatique. On peut cependant comparer le PI 3-3 et le PI 6-9 du lot 1 qui possèdent des épaisseurs et des rugosités à sec similaires et des profils de densité de longueur de diffusion dans l'état hydraté comparables (inflexions présentes). Les chaînes greffées sur le PI 3-3 ($DP_n = 6,9$) sont plus petites que celles greffées sur le PI 6-9 ($DP_n = 12,0$). Pour autant, si on compare les profils de densité de longueur de diffusion, le gonflement de la brosse polymère est un peu plus important dans le cas du PI 3-3 que du PI 6-9 (Figure III-31, droite). L'inflexion est aussi un peu plus marquée sur le profil du PI 3-3 que du PI 6-9. La SLD du D_2O est également atteinte pour une épaisseur plus importante dans le cas du PI 3-3. Ces différences laissent supposer que la brosse polymère est potentiellement plus « tendue » dans le cas du PI 3-3. La brosse de PI 6-9 aurait donc une conformation plus flexible, comme le suggèrent les mesures d'énergie d'hydratation sur les verres greffés PI, avec moins de répulsion électrostatique au sein de la chaîne. Les épaisseurs mesurées restent cependant assez faibles et la rugosité importante. Couplés à la reproductibilité moyenne, les résultats actuels ne permettent

pas de dégager une tendance nette. Il faudrait faire plus de mesure en variant différents paramètres de greffage pour confirmer cette tendance.

C.3.5 Variation de la concentration en monomère

Nous avons choisi de faire varier la concentration en monomère de départ pour essayer de former des couches polymères plus épaisses afin de faciliter l'observation. Le lot 3 est constitué de wafers de silicium avec le greffage d'une couche de PI 6-6 à deux concentrations en monomère de départ : 0,9 et 1,2 M. Les autres paramètres de greffage sont restés inchangés et les sous-couches PDOPA ont été effectuées dans le même bain de greffage. Les franges de Kiessing sur les courbes de réflectivité des neutrons dans le D₂O apparaissent à plus petits Q et sont plus marquées dans le cas du PI 6-6 1,2 M que celui du PI 6-6 0,9 M (Figure III-32, gauche). Cela laisse supposer une épaisseur plus grande des brosses de PI 6-6 à 1,2 M. On remarque également qu'à forte concentration, l'inflexion du profil de densité de longueur de diffusion est bien plus marquée (Figure III-32, droite). Par conséquent, l'observation de la brosse de PI est d'autant plus aisée. On peut ainsi constater une épaisseur d'environ 200 Å des couches organiques greffées sur le PI 6-6 0,9 M contre 320 Å sur le PI 6-6 1,2 M.

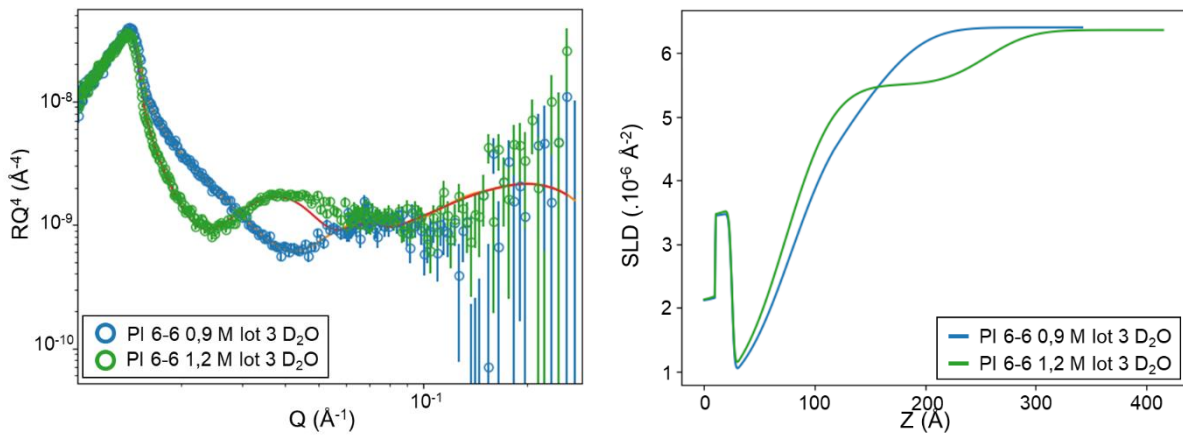


Figure III-32 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion (droite) des PI 6-6 0,9 et 1,2 M du lot 3

Tableau III-19 : Paramètres des ajustements dans le D₂O des PI 6-6 0,9 et 1,2 M du lot 3 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$)
Pour toutes les conditions		Oxide	15	2	3,4
PI 6-6 0,9 M lot 3	D ₂ O	Dopamine SG	$50,6 \pm 0,6$	$35,5 \pm 0,1$	0,62
		PI 6-6	$84,2 \pm 2,5$	$36,4 \pm 2,7$	$4,74 \pm 0,15$
PI 6-6 1,2 M lot 3	D ₂ O	Dopamine SG	$48,2 \pm 2,1$	$34,4 \pm 1,2$	0,62
		PI 6-6	$181,6 \pm 1,0$	$32,0 \pm 1,8$	$5,50 \pm 0,01$

Cette augmentation de l'épaisseur avec une augmentation de la concentration en monomère est confirmée par les résultats de l'ajustement (Tableau III-19). Les sous-couches de PDOPA SG sont similaires pour les deux échantillons et les rugosités des deux couches PI 6-6 sont comparables mais l'épaisseur est deux fois plus grande dans le cas du PI 6-6 1,2 M.

La mesure des masses molaires des solutions de greffage confirme que les PI 6-6 formés en suspension sont plus grands pour une concentration en monomère de départ à 1,2 M (Tableau III-20). En supposant que les masses molaires des chaînes libres sont équivalentes aux masses molaires des chaînes greffées dans le cas des polymérisations par étapes,³⁰ on déduit que l'augmentation de la masse molaire des PI permet d'augmenter l'épaisseur des couches organiques greffées. On peut ainsi jouer sur la concentration en monomères de départ pour augmenter les épaisseurs des couches organiques et faciliter l'observation en réflectivité des neutrons.

Tableau III-20 : Masse molaire moyenne en nombre (M_n) et en masse (M_w) et indice de polydispersité (I_p) des PI des solutions de greffage des wafers greffés PI 6-6 du lot 3

Lot 3	M_n (g.mol ⁻¹)	M_w (g.mol ⁻¹)	I_p (Mw/Mn)
PI 6-6 0,9 M	4 600 (\pm 11%)	8 400 (\pm 3%)	1,8 (\pm 11%)
PI 6-6 1,2 M	7 500 (\pm 14%)	18 600 (\pm 0,8%)	2,5 (\pm 14%)

En conclusion, il faudrait donc reprendre la comparaison des différents PI avec des concentrations en monomère de 1,2 M afin d'obtenir des masses molaires plus importantes. Ainsi, nous observerions plus aisément des différences de gonflement des couches polymères sur les profils de densité de longueur de diffusion et donc potentiellement de conformation.

C.3.6 Variation du solvant deutéré

Pour vérifier que les couches ont bien la capacité à se contracter, nous avons regardé l'effet de la modification de solvant (bon ou mauvais solvant des PI). En fonction du solvant utilisé pour faire gonfler la couche polymère, les contre-ions de la brosse peuvent être dissociés ou condensés, et donc le gonflement de la brosse peut être plus ou moins important. Le caractère dissociant d'un solvant est donné par sa permittivité relative (ϵ_r) et n'est pas forcément proportionnelle à son caractère polaire. En changeant de solvant, on peut changer la permittivité relative du milieu et ainsi faire évoluer la dissociation des contre-ions pour étudier le caractère ionique de la brosse polymère. Les échantillons ont déjà été immergés dans le D₂O, un solvant très dissociant (ϵ_r de l'eau = 78,4), nous avons donc choisi de les immerger dans un solvant beaucoup moins dissociant qui est un solvant de précipitation des PI : le THF-d (ϵ_r du THF = 7,6). La SLD du THF-d est de $6,36 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$.

C.3.6.1 *Sous-couche PDOPA SG*

Nous étudions d’abord l’impact de ce solvant deutéré sur la sous-couche. Les ajustements des courbes révèlent que les épaisseurs des couches sont similaires (Tableau III-21). En revanche, la sous-couche de PDOPA SG semble un peu moins rugueuse en solvant THF-d qu’en D₂O. La sous-couche gonfle donc légèrement moins en THF-d, ce qui est confirmé par le profil de densité de longueur de diffusion (Figure III-33, droite). En effet, le profil de la PDOPA SG se contracte, et la densité de longueur de diffusion du THF-d est atteinte pour une épaisseur plus faible que dans le cas du D₂O. De plus, la frange de Kiessing sur la courbe de réflectivité des neutrons de la PDOPA SG dans le THF-d est décalé vers les grands Q, la couche polymère collapse donc légèrement dans ce solvant par rapport au D₂O (Figure III-33, gauche).

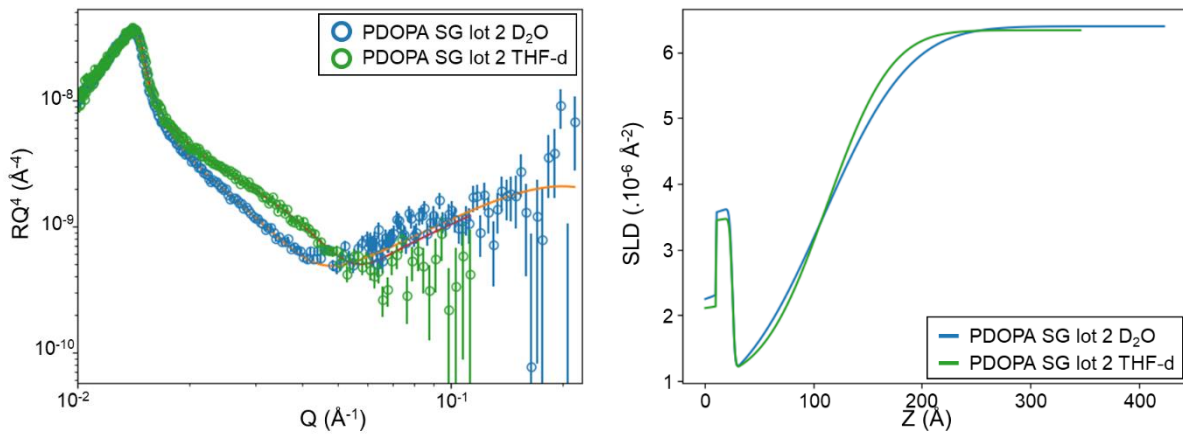


Figure III-33 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion (droite) de la PDOPA SG lot 2 dans le D₂O et le THF-d

Tableau III-21 : Paramètres des ajustements dans le D₂O et le THF-d de la PDOPA SG lot 2 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$)
PDOPA SG lot 2	D ₂ O	Oxide	15	2	3,4
		PDOPA SG	$83,5 \pm 1,2$	$62,8 \pm 0,8$	$0,60 \pm 0,03$
	THF-d	Oxide	15	2	3.4
		PDOPA SG	$86,7 \pm 1,0$	$46,8 \pm 0,6$	$0,99 \pm 0,04$

C.3.6.2 *Couche PI 6-9*

Comme pour la PDOPA SG, les courbes de réflectivité du PI 6-9 lot 1 dans le D₂O et le THF-d ne se superposent pas (Figure III-34, gauche). On peut déduire qu’il y a eu une contraction de la brosse au vue du décalage de l’oscillation vers les grands Q sur la courbe de réflectivité dans le THF-d. Le profil de densité de longueur de diffusion dans le THF-d est aussi plus contracté par rapport à celui en D₂O (Figure III-34, droite). Les différences sont ici plus marquées que

pour la sous-couche PDOPA SG, donc ces variations peuvent être attribuées à une différence de comportement de la brosse PI en fonction du solvant. Les rugosités et les épaisseurs sont aussi un peu moins importantes dans le cas du THF-d (Tableau III-22). Tous ces éléments confirment que la brosse de PI gonfle moins dans le THF-d et que la dissociation des contre-ions est moins importante. Le THF-d pénètre moins à l'intérieur de la brosse de PI, car c'est un mauvais solvant de ce polymère, et celle-ci est donc moins gonflée.

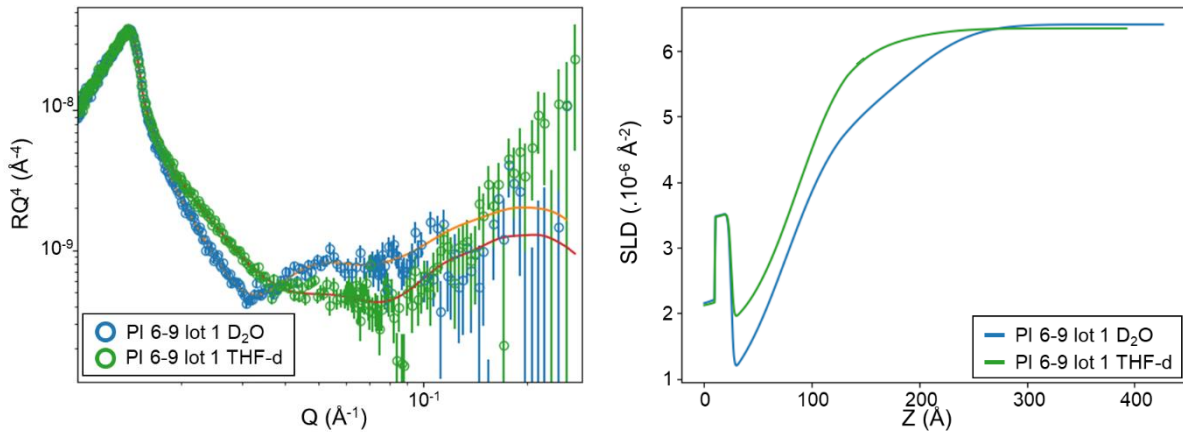


Figure III-34 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion (droite) du PI 6-9 lot 1 dans le D_2O et le THF-d

Tableau III-22 : Paramètre des ajustements dans le D_2O et le THF-d du PI 6-9 lot 1 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Épaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$)
Pour toutes les conditions		Oxide	15	2	3,4
PI 6-9 0,9 M lot 1	D ₂ O	PDOPA SG	$49,7 \pm 2,9$	$39,7 \pm 1,8$	0,63
		PI 6-9	$115,6 \pm 2,1$	$47,2 \pm 2,5$	$4,90 \pm 0,10$
	THF-d	PDOPA SG	$60,5 \pm 5,0$	$38,4 \pm 2,2$	1,63
		PI 6-9	$99,2 \pm 18,6$	$41,8 \pm 8,4$	$6,02 \pm 0,06$

Nous avons aussi immergé le PI 6-9 lot 1 dans un solvant plus polaire et dissociant que le THF mais moins que l'eau : le DMF-d (ϵ_r du DMF = 36,7). Les courbes de réflectivité des neutrons du PI 6-9 dans les deux solvants, D_2O et DMF-d, sont assez similaires, avec une deuxième oscillation visible aux grands Q dans le DMF-d (Figure III-35, gauche). Les profils de densité de longueur de diffusion sont proches, en particulier après l'inflexion du profil (Figure III-35, droite). Le gonflement de la brosse de PI est donc similaire dans les deux solvants. La partie avant l'inflexion du profil, qui représente le profil de la sous-couche PDOPA SG, est plus mou/large dans le DMF-d que dans le D_2O . L'épaisseur de la PDOPA SG dans les ajustements est aussi plus grande dans le cas de la DMF-d (Tableau III-23), il semblerait donc que la PDOPA SG gonfle plus dans le DMF-d que dans le D_2O . A cause de l'interdiffusion des couches et

l'absence de données sur la sous-couche PDOPA SG dans le DMF-d, on ne peut cependant pas affirmer que la sous-couche gonfle davantage dans ce solvant. Nous retiendrons simplement que le gonflement de la brosse de PI est plus important dans des solvants avec des permittivités relatives élevées.

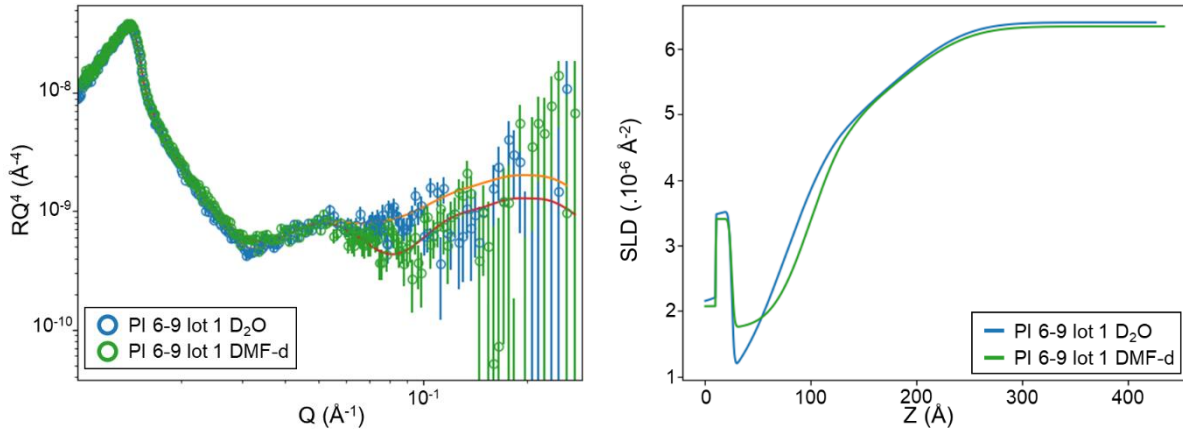


Figure III-35 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion (droite) du PI 6-9 lot 1 dans le D_2O et le DMF-d

Tableau III-23 : Paramètres des ajustements dans le D_2O et le DMF-d du PI 6-9 lot 1 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$)
Pour toutes les conditions		Oxide	15	2	3,4
PI 6-9 0,9 M lot 1	D_2O	PDOPA SG	$49,7 \pm 2,9$	$39,7 \pm 1,8$	0,63
		PI 6-9	$115,6 \pm 2,1$	$47,2 \pm 2,5$	$4,90 \pm 0,10$
	DMF-d	PDOPA SG	$74,7 \pm 6,0$	$28,3 \pm 5,0$	1,73
		PI 6-9	$87,2 \pm 19,1$	$49,5 \pm 10,0$	$4,78 \pm 0,80$

C.3.7 Variation du pH dans le D_2O

Les PI greffés en surface ne sont pas des polymères protonables ou déprotonables donc l'épaisseur de la brosse gonflée ne devrait pas varier avec le pH. En revanche, la sous-couche PDOPA SG possèdent des diméthylamines et des amines primaires protonables sur les fonctions qui n'ont pas servi à greffer des chaînes de PI en surface. La variation du pH entraîne l'apparition de nouveaux groupes dissociés, impliquant une augmentation de la densité de charge des chaînes. La répulsion électrostatique entre les motifs chargés à l'intérieur de la brosse devient plus forte, ce qui provoque le gonflement de la brosse. Les fonctions diméthylamines et amines primaires liées à des cycles aromatiques ont des pKa compris entre 3 et 5. Nous allons donc étudier les échantillons à pH 5 et 7,2 dans le D_2O .

C.3.7.1 Sous-couche PDOPA SG

A pH 5, la SLD du D₂O avec le tampon a été fixée à $6,3 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (contre $6,4 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ dans le D₂O pur) car la présence du tampon, dans ce cas-ci, diminue légèrement la SLD du mélange. Celle-ci a donc été calculée par la méthode des fractions volumiques pour un mélange binaire. Les courbes de réflectivité des neutrons de la sous-couche PDOPA SG lot 1 à pH 5 et 7,2 (Figure III-36, gauche) et les valeurs issues des ajustements (Tableau III-24) suggèrent que le pH, dans la gamme évaluée (5-7,2) n'a pas d'influence sur la sous-couche PDOPA SG. Les profils de densité de longueur de diffusion des deux échantillons ne se superposent pas parfaitement (Figure III-36, droite) mais on peut remarquer que l'ajustement des modélisations sur les données expérimentales n'est pas optimale. Les courbes de réflectivités se superposent parfaitement donc la variation de pH n'a pas d'effet sur la sous-couche PDOPA SG. Une variation de l'épaisseur en fonction du pH était plausible mais cela n'a pas été constaté dans ces conditions. Il faudrait élargir la gamme d'étude sur des pH plus acides pour voir éventuellement une variation.

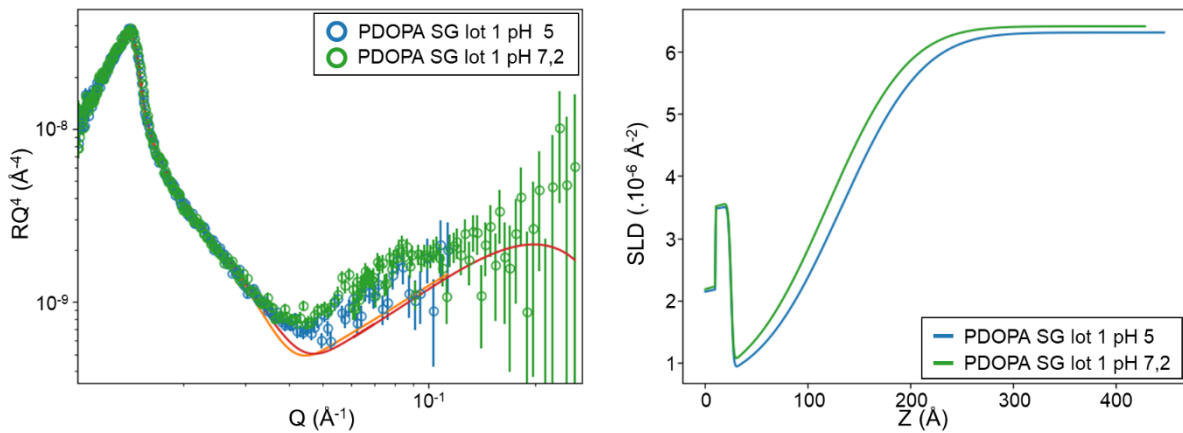


Figure III-36 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion (droite) de la dopamine SG lot 1 dans le D₂O à pH 5 et pH 7,2

Tableau III-24 : Paramètres des ajustements dans le D₂O à pH 5 et pH 7,2 de la PDOPA SG lot 1 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$)
PDOPA SG lot 1	pH 5	Oxide	15	2	3,4
		PDOPA SG	$106,5 \pm 1,7$	$63,1 \pm 0,4$	0,63
	pH 7,2	Oxide	15	2	3,4
		PDOPA SG	$93,8 \pm 2,0$	$61,9 \pm 0,6$	0,63

C.3.7.2 Couche PI 6-9

Les courbes de réflectivité des neutrons du PI 6-9 lot 1 à différents pH (Figure III-37, gauche) et les valeurs issues des ajustements (Tableau III-25) suggèrent que le pH, dans la gamme évaluée (5-7,2-8), n'a pas non plus d'influence sur l'épaisseur de la couche de PI et l'épaisseur totale. Les profils de densité de longueur de diffusion sont très proches (Figure III-37, droite). Les variations restent dans le cadre des incertitudes des ajustements et les courbes de réflectivité sont très similaires. De légères différences peuvent être constatées dans les grandes valeurs de Q mais celles-ci ne dépassent pas l'amplitude des barres d'erreurs des valeurs de réflectivité. L'absence de variation de l'épaisseur de la couche en fonction du pH n'est pas surprenante puisque les PI ne sont pas des polymères protonables ou déprotonables. On peut noter qu'en présence d'un tampon pour ajuster le pH du D₂O, l'inflexion marquant la présence du PI sur les profils de densité de longueur de diffusion est plus marquée que dans le D₂O pur.

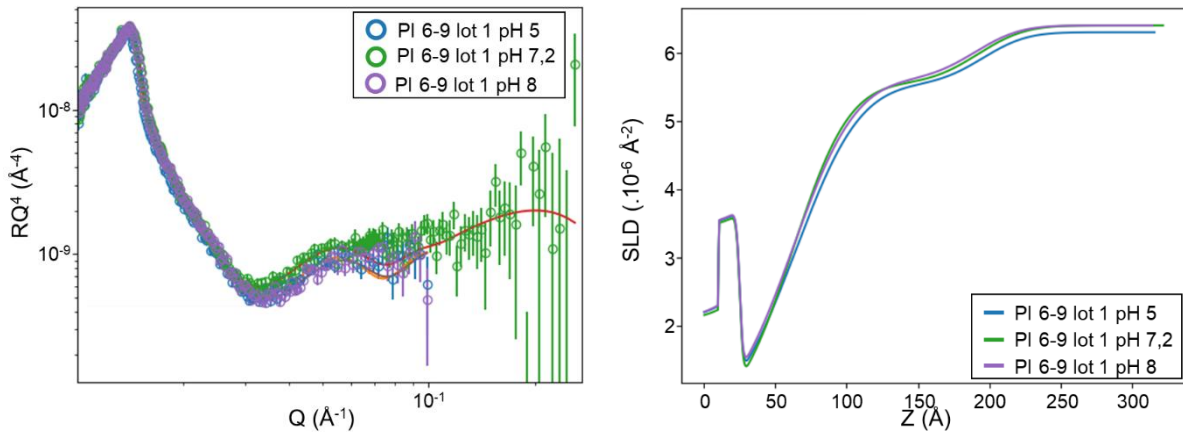


Figure III-37 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion (droite) du PI 6-9 lot 1 dans le D₂O à pH 5, pH 7,2 et pH 8

Tableau III-25 : Paramètres des ajustements dans le D₂O à pH 5, pH 7,2 et pH 8 du PI 6-9 lot 1 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$)
Pour toutes les conditions		Oxide	15	2	3.4
PI 6-9 0,9 M lot 1	pH 5	PDOPA SG	$38,8 \pm 4,2$	$35,7 \pm 2,5$	0,63
		PI 6-9	$131,4 \pm 1,8$	$24,0 \pm 3,6$	$5,56 \pm 0,04$
	pH 7,2	PDOPA SG	$36,7 \pm 4,9$	$31,2 \pm 2,6$	0,63
		PI 6-9	$129,8 \pm 2,4$	$25,9 \pm 4,9$	$5,56 \pm 0,07$
	pH 8	PDOPA SG	$36,9 \pm 4,8$	$34,8 \pm 2,8$	0,63
		PI 6-9	$127,8 \pm 2,2$	$24,9 \pm 4,3$	$5,63 \pm 0,05$

C.3.8 Variation de la force ionique par ajout de sel dans le D₂O

Les chaînes de PI sont considérées comme des polyélectrolytes de par les charges positives issues des ammoniums quaternaires répartis le long de la chaîne. Dans l'approche développée par Pincus,³⁷ les brosses de polyélectrolyte sont définies par trois grandeurs caractéristiques :

-l'épaisseur moyenne de la brosse L ,

-la longueur de neutralité ξ : c'est la distance au-delà de laquelle une charge test du polyélectrolyte est entièrement neutralisé,

-la longueur de Debye-Hückel κ^{-1} : c'est la distance sur laquelle les interactions électrostatiques sont écrantées.

La longueur de Debye-Hückel dépend de la force ionique du système. En ajoutant des sels dans le D₂O, on peut faire varier ce paramètre. En présence de sels, les brosses de polyélectrolyte peuvent adopter deux régimes : le régime dominé par la brosse, où l'écrantage des charges est faible, et le régime dominé par le sel, où l'écrantage est fort. Le régime dominé par la brosse est observé pour des densités de greffage faible et pour une longueur d'écran κ^{-1} suffisamment grande devant la longueur de neutralisation ξ ($L \ll \xi \ll \kappa^{-1}$). Les ions du sel n'agissent qu'à l'extérieur de la brosse. Ils ne jouent par conséquent aucun rôle dans la détermination de la structure de la brosse. L'épaisseur L est la même que dans le cas d'une brosse de polyélectrolyte de faible densité de greffage et avec un taux de charge faible dans l'eau sans sels (régime de Pincus). Dans le régime dominé par le sel, la longueur de neutralisation ξ est beaucoup plus grande que la longueur d'écran κ^{-1} ($L \gg \xi \gg \kappa^{-1}$). A mesure que la concentration saline augmente, l'écrantage réduit la répulsion des contre-ions qui est responsable de l'étirement des chaînes. On observe alors une contraction de la brosse. Toutefois, même pour des concentrations salines importantes, le comportement limite des brosses de polyélectrolyte contractées est celui d'une brosse de polymère neutre en bon solvant. Les chaînes de polyélectrolyte se contractent sous l'effet des sels jusqu'à une certaine limite. Les chaînes restent gonflées par des effets de volume exclu des contre-ions.

C.3.8.1 *Sous-couche PDOPA SG*

Nous allons faire varier la force ionique en ajoutant du NaCl et du KBr à différentes concentrations dans le D₂O afin de mettre en évidence la contraction des brosses de polyélectrolyte. On vérifie, dans un premier temps, l'impact de la présence des sels sur la sous-couche polymère neutre PDOPA SG. Une solution de D₂O avec 0,4 M de NaCl a été préparée. La concentration de 0,4 M en NaCl correspond à l'eau physiologique (9 g.L⁻¹ de NaCl dans

l'eau). La présence de NaCl à 0,4 M dans le D₂O n'affecte que très peu la sous-couche PDOPA SG. Les courbes de réflectivité et les profils de densité de longueur de diffusion de la PDOPA SG lot1 dans le D₂O avec ou sans NaCl sont très similaires (Figure III-38). Les valeurs issues de l'ajustement (Tableau III-26) sont très proches, dans la limite des incertitudes de la méthode. Quand on observe les courbes en RQ⁴, on peut constater un léger décalage de l'oscillation en présence de sels vers les petits Q, ce qui suggère un léger gonflement de la sous-couche par rapport à l'immersion en D₂O pur.

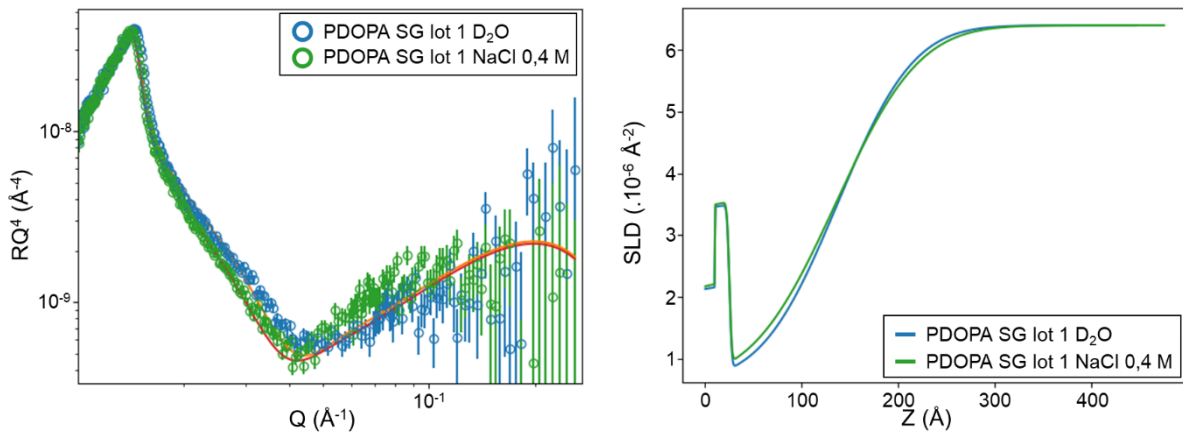


Figure III-38 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ⁴ (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion (droite) du PDOPA SG lot 1 dans le D₂O pur et le D₂O avec 0,4 M de NaCl

Tableau III-26 : Paramètres des ajustements dans le D₂O pur et le D₂O avec 0,4 M de NaCl de la PDOPA SG lot 1 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$)
PDOPA SG lot 1	D ₂ O	Oxide	15	2	3,4
		PDOPA SG	112,1 ± 1,7	61,9 ± 0,4	0,63
	NaCl 0,4 M	Oxide	15	2	3,4
		PDOPA SG	110,1 ± 1,2	68,0 ± 0,3	0,63

C.3.8.2 Couche PI 6-9

Le PI 6-9 lot 1 a été immergé dans du D₂O avec du NaCl ou du KBr à 0,4 M. Deux sels différents ont été testés afin de s'assurer qu'il n'y a pas un effet de sélection d'ions, les contre-ions de la chaîne PI étant des ions bromes. Les courbes de réflectivité sont très similaires mais avec une légère amplification de la frange de Kiessing du PI 6-9 lot 1 dans le D₂O avec les sels (Figure III-39, gauche). Les profils de densité de longueur de diffusion attestent d'une légère contraction de la couche PI dans le D₂O avec des sels (Figure III-39, droite). Les ajustements donnent des caractéristiques de couches avec moins de rugosité pour les essais dans le D₂O avec des sels, ce qui confirme la légère contraction des couches PI en présence de sels (Tableau

III-27). Cette contraction reste cependant très faible, malgré l'écart que l'on peut voir sur les profils de densité de longueur de diffusion, car les courbes de réflectivité se superposent très bien dans la limite des barres d'erreur. L'ajustement de la courbe de réflectivité pour le D₂O avec 0,4 M de KBr n'a pas été faite en fixant la SLD de la sous-couche PDOPA SG car nous n'avions pas pu vérifier la SLD en immergeant la sous-couche dans cette solution. L'ajustement de cette courbe n'a pas été fait exactement de la même manière que les deux autres. Le profil de densité de longueur de diffusion qui en découle est donc moins comparable que ceux des courbes dans le D₂O pur et le D₂O avec 0,4 M de NaCl entre eux car les ajustements ont été fait de la même manière.

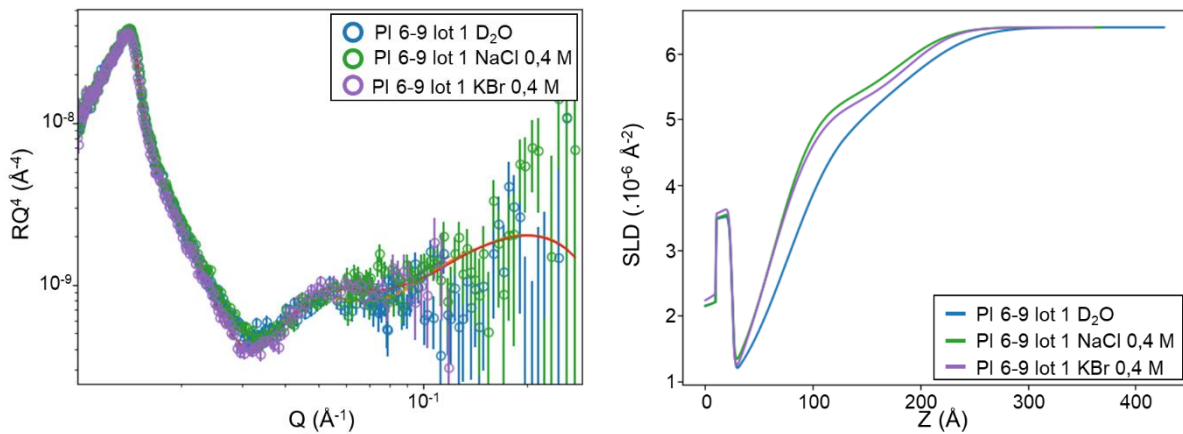


Figure III-39 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion (droite) du PI 6-9 lot 1 dans le D₂O pur et le D₂O avec 0,4 M de NaCl ou de KBr

Tableau III-27 : Paramètres des ajustements dans le D₂O pur, le D₂O avec 0,4 M de NaCl ou de KBr du PI 6-9 lot 1 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$)
Pour toutes les conditions		Oxide	15	2	3,4
PI 6-9 0,9 M lot 1	D ₂ O	PDOPA SG	$49,7 \pm 2,9$	$39,7 \pm 1,8$	0,63
		PI 6-9	$115,6 \pm 2,1$	$47,2 \pm 2,5$	$4,90 \pm 0,10$
	NaCl 0,4 M	PDOPA SG	$37,4 \pm 4,6$	$31,5 \pm 2,6$	0,63
		PI 6-9	$118,3 \pm 4,7$	$37,5 \pm 5,5$	$5,25 \pm 0,17$
	KBr 0,4 M	PDOPA SG	$32,7 \pm 3,8$	$36,2 \pm 3,0$	$0,10 \pm 0,10$
		PI 6-9	$130,4 \pm 2,8$	$34,5 \pm 6,2$	$5,21 \pm 0,20$

Le PI 6-9 lot 1 a ensuite été immergé dans une solution de D₂O avec du NaCl à 1 M. Pour le NaCl 1 M dans le D₂O, la SLD du solvant a été fixée à $6,3 \cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$ (contre $6,4 \cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$ dans le D₂O pure) car à haute concentration en sels, la SLD du mélange diminue légèrement. La frange de Kiessing sur la courbe de réflectivité des neutrons et l'inflexion sur le profil de densité de longueur de diffusion du PI 6-9 dans le D₂O avec 1 M de NaCl sont plus marquées que dans le

D₂O pur ou avec 0,4 M de NaCl (Figure III-40, Tableau III-27). Les résultats de l'ajustement suggèrent donc une contraction un peu plus importante de la brosse PI 6-9 dans le D₂O avec 1 M de NaCl. Il est cependant étonnant qu'à 0,4 M, seule une légère contraction soit observée. Pour une telle force ionique, les interactions électrostatiques sont déjà très fortement écrantées dans le cas des polyélectrolytes en solution. Cette faible dépendance est peut-être dû à la forte concentration locale en charges au sein de la brosse qui a pour effet d'écranter déjà en partie les interactions en jeu. Les contre-ions sont très condensés et ne se dissocient pas dans le solvant. De plus, les faibles masses molaires limitent aussi un éventuel collapse de la brosse. Il se peut également que la densité de greffage soit faible et donc, malgré la présence du sel, le régime dominé par la brosse est conservé, sans contraction visible des chaînes de PI. Une étude plus poussée en fonction de la densité de greffage et de la longueur des chaînes permettrait sans doute d'apporter plus d'information sur le comportement des brosses de PI.

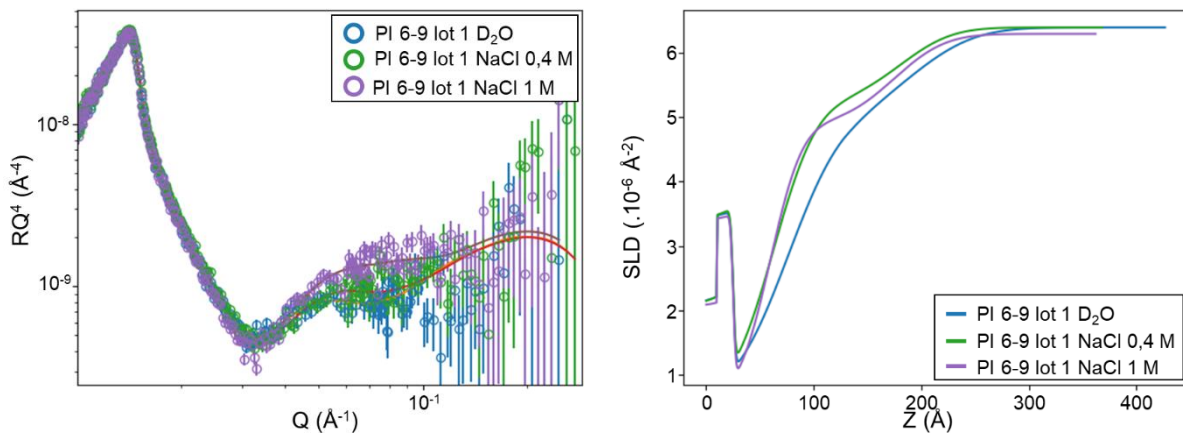


Figure III-40 : Courbes de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profils de densité de longueur de diffusion (droite) du PI 6-9 lot 1 dans le D₂O pur et le D₂O avec 0,4 ou 1 M de NaCl

Tableau III-28 : Paramètres des ajustements dans le D₂O pur et le D₂O avec 0,4 ou 1 M de NaCl du PI 6-9 lot 1 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$)
Pour toutes les conditions		Oxide	15	2	3,4
PI 6-9 0,9 M lot 1	D ₂ O	PDOPA SG	$49,7 \pm 2,9$	$39,7 \pm 1,8$	0,63
		PI 6-9	$115,6 \pm 2,1$	$47,2 \pm 2,5$	$4,90 \pm 0,10$
	NaCl 0,4 M	PDOPA SG	$37,4 \pm 4,6$	$31,5 \pm 2,6$	0,63
		PI 6-9	$118,3 \pm 4,7$	$37,5 \pm 5,5$	$5,25 \pm 0,17$
	NaCl 1 M	PDOPA SG	$34,3 \pm 3,4$	$23,5 \pm 3,4$	0,63
		PI 6-9	$115,0 \pm 4,5$	$37,5 \pm 6,3$	$4,90 \pm 0,22$

C.4 Bilan des analyses en réflectivité des rayons X et des neutrons

Après l'ensemble des analyses, un échantillon ayant subi des analyses en pH, sels et solvants deutérés a été de nouveau mesuré en D₂O pour vérifier que les différentes conditions n'ont pas endommagées les brosses polymères. Les courbes de réflectivité et les modélisations mettent en lumière une très légère diminution non significative (Annexe F, p. 265). Les échantillons sont donc identiques avant et après les mesures.

La méthode de greffage que nous avons employé sur les wafers de silicium a permis d'être au plus près des conditions de greffage réalisées sur le verre. Cette méthode de greffage n'est cependant pas suffisamment contrôlée en terme de rugosité pour la sous-couche PDOPA SG mais aussi en terme de masses molaires pour la couche de PI. La polyaddition en surface est très dépendante de la stœchiométrie et a donc un impact direct sur l'épaisseur des couches polymères greffées. Les faibles épaisseurs alliées aux rugosités importantes ainsi que la reproductibilité moyenne des couches de PI greffées n'ont pas permis de dégager une tendance nette en faveur d'une différence de conformation pour confirmer les mesures d'énergies de surface. Cette conformation différente des chaînes avec des segments aliphatiques plus ou moins longs pourrait expliquer les différences au niveau du pouvoir antibactérien des PI greffés.

L'étude a néanmoins permis de mesurer et de modéliser les profils de densité de longueur de diffusion de la sous-couche et des couches PI à l'échelle moléculaire sur des systèmes multicouches difficiles à étudier. Il a aussi été possible de déterminer avec précisions les épaisseurs à sec de ces couches. Ceci nous a permis de mettre en évidence des problèmes de reproductibilité des surfaces à l'échelle moléculaire qui n'ont cependant pas d'impact sur leurs propriétés antibactériennes au niveau microscopique. Les mesures à sec et dans le D₂O ont également permis d'évaluer l'extension des brosses en solution. Nous avons pu montrer notamment que l'extension des brosses de PI n'excèdent pas 20 nm dans le cas des concentrations en monomères à 0,9 M lors de la polyaddition. Il est alors intéressant de constater que des chaînes de l'ordre de la dizaine de nanomètre suffisent à perturber l'adhésion de bactéries au niveau micrométrique. Le mécanisme de perturbation de la membrane par les chaînes de PI est donc très local. Bien qu'il y ait peu de différence structurale sur les profils de densité de longueur de diffusion des PI de la gamme aliphatique, il y a une différence d'efficacité antibactérienne notoire entre les PI greffés comme nous l'avons montré sur les tests d'adhésion. On peut alors penser que l'extension de la brosse de PI, et donc sa conformation en milieu hydraté, n'est pas le seul paramètre influençant l'efficacité antibactérienne de ces surfaces. Pour aller plus loin dans ces considérations, il faudrait connaître les masses molaires des chaînes

greffées ainsi que les densités de greffage. Néanmoins, il n'est pas exclu que des réactions biochimiques locales dû aux segments hydrophobes longs puissent aussi expliquer l'efficacité antibactérienne. Enfin, nous avons également mis en évidence l'influence de différents paramètres (solvant, pH, force ionique) sur le gonflement des brosses de PI. Dans le cas de la force ionique, il est assez étonnant de constater que la contraction des brosses est très légère à 0,4 et 1 M de NaCl dans le D₂O. Il est probable que le gonflement dans le D₂O pur des brosses de polyélectrolyte étudiées soit proche de la limite de contraction en présence de sels. Les faibles masses molaires et la densité de charges importantes empêche de provoquer une contraction plus significative de la brosse même en présence de 1 mol.L⁻¹ de NaCl dans le D₂O. Le régime « dominé par la brosse » est alors conservé.

Plusieurs pistes sont cependant envisageables pour améliorer les futures mesures. L'étude en concentration a montré qu'il est possible d'augmenter les masses molaires et donc l'épaisseur des couches de PI greffées en augmentant la concentration des monomères de départ. Ainsi, l'observation des franges de Kiessing et l'influence des variations de conditions sur les profils de densité de longueur de diffusion pourraient être d'avantage marquées sur des échantillons avec des concentrations en monomères de 1,2 M. Nous pourrions aussi essayer de réaliser une sous-couche moléculaire afin d'obtenir une plateforme d'ancrage très contrôlée et reproductible pour réaliser la polyaddition en surface des PI. De plus, avec une sous-couche moléculaire, nous éliminerions aussi le problème de gonflement de la PDOPA SG. Cela faciliterait les analyses et les conclusions puisque seule la sous-couche PI serait en capacité de gonfler. Une autre approche pourrait être de s'affranchir complètement du greffage sur une surface en réalisant une analyse à l'interface air/liquide sur un film de Langmuir-Blodgett. Il faudrait pour cela synthétiser un copolymère à bloc PI avec un bloc hydrophobe comme du polyéthylène. Le bloc hydrophobe se collapserait à l'interface air/liquide du film et les chaînes PI du bloc hydrophile pourrait s'étirer dans le liquide. Nous pourrions ainsi étudier l'extension des chaînes avec un meilleur contrôle sur les masses molaires des copolymères grâce à des analyses par SEC-MALS préalablement à l'étude en réflectivité des neutrons.

D. Conclusions et perspectives

Le greffage des PI sur des lames de verre a été effectué avec succès comme l'atteste les mesures XPS et de potentiel zêta. Les analyses microbiologiques ont permis de démontrer que les PI conservaient leur pouvoir antibactérien même une fois greffés sur des surfaces. Les essais

d'adhésion mettent en évidence le pouvoir antibactérien des lames de verre greffées PI, c'est-à-dire leur capacité à inhiber ou perturber l'adhésion microbienne sur les surfaces. Pour montrer le pouvoir bactéricide des surfaces, comme c'est le cas pour les PI en solution, nous pourrions faire des essais supplémentaires pour vérifier la mortalité des bactéries après leurs décrochages des surfaces. Les tests de cytotoxicité, aussi bien ceux réalisés en interne qu'en externe, prouvent l'absence de cytotoxicité des matériaux modifiés et l'absence de relargage dans les conditions des essais. Ces résultats encourageants doivent être complétés par des études plus approfondies (souches supplémentaires par exemple) mais sont déjà un premier pas pour mettre en évidence la faisabilité de l'utilisation de ces matériaux dans l'agroalimentaire. La volonté croissante des consommateurs de ne plus utiliser des emballages à usage unique et d'acheter en vrac marque en effet un retour des emballages et récipients en verre.

Les mesures d'énergie de surface ont mis en évidence un gradient d'énergie d'hydratation (ΔG) en fonction de la longueur du segment aliphatique du PI greffé. Ceci est lié à une plus grande flexibilité des PI avec des segments aliphatiques plus longs, et donc potentiellement à une conformation différente de ces PI par rapport aux PI à segments courts qui conserveraient une conformation brosse plus tendue. Pour vérifier et compléter ces analyses, des études en réflectivité des rayons X et des neutrons ont été menées. Cela a permis dans un premier temps, de mettre en place un nouveau procédé de greffage des PI sur les wafers de silicium. Dans un deuxième temps, cette étude approfondie sur les couches de PI à sec et en milieu hydraté a mis en lumière les comportements particuliers des chaînes PI, notamment en fonction de la force ionique. Les épaisseurs à sec et les profils de densité de longueur de diffusion dans l'état hydraté des couches ont pu être déterminés. La faible variation observée malgré les très fortes concentrations en sel est un comportement inattendu pour des chaînes de polyélectrolyte qui mérite d'être étudié davantage par des mesures complémentaires. Un premier résultat a mis en avant une différence potentielle de conformation des brosses en fonction de la longueur du segment aliphatique, mais une tendance nette sur toute la gamme n'a cependant pas été observée.

Plusieurs pistes, évoquées précédemment, sont envisageables pour poursuivre l'étude et nous avons commencé à explorer l'une d'entre elle. Afin de s'affranchir de la sous-couche PDOPA SG lors des mesures de réflectivité (gonflement et rugosité), un nouveau procédé de greffage à base d'une sous-couche moléculaire avec des silanes possédant des fonctions diméthylamines (N, N (diméthylaminopropyl) triméthoxysilane) a été mis en place (Figure III-41).^{9,38} Les silanes sont particulièrement adaptés aux greffage sur les wafers de silicium et permettre

d'obtenir des sous-couches très peu rugueuses et contrôlées. La polyaddition des PI en surface a ensuite été menée sur les fonctions diméthylamines greffées, en ajoutant les monomères dibromes et diamines. La réussite du greffage a été attestée par des analyses XPS.

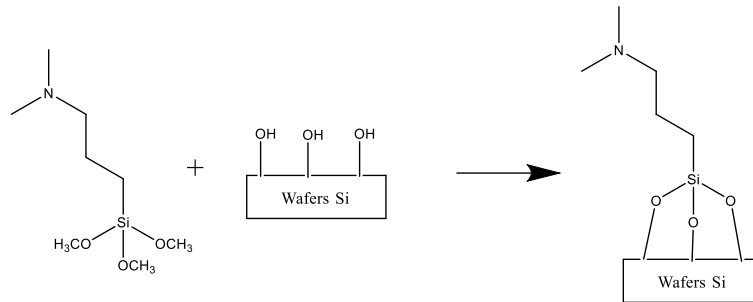


Figure III-41 : Schéma du procédé de greffage de la mono-couche silane sur des wafers de silicium

Les wafers greffés par ce procédé silane ont été analysés en réflectivité des rayons X afin d'évaluer l'épaisseur des couches de PI greffés. Les courbes de réflectivité montrent bien une accentuation des franges des Kiessing après l'ajout des chaînes PI (Figure III-42). Les paramètres des ajustements des couches à sec indiquent cependant que les couches de PI greffées sont très fines ($< 15 \text{ \AA}$), ce qui est problématique pour l'observation en réflectivité des neutrons (Tableau III-29).

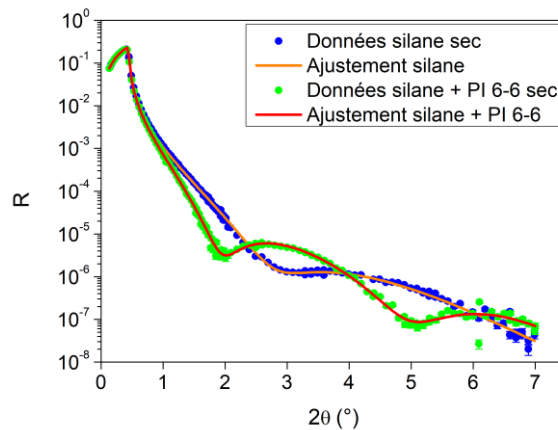


Figure III-42 : Courbes de réflectivité des rayons X à sec de la sous-couche silane et de la sous-couche silane avec le PI6-6

Tableau III-29 : Paramètres des ajustements à sec de la sous-couche silane et de la sous-couche silane avec PI 6-6 par réflectivité des rayons X

RX	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	F (el/at)
Silane 5h 1% v	sec	Oxide	10,2 ± 2,3	3,2 ± 0,3	0,69 ± 0,02
		Silane	15,4 ± 0,2	4,70 ± 0,5	0,29 ± 0,02
Silane 5h 1% v + PI 6-6	sec	Oxide	15,0 ± 1,3	5,4 ± 0,1	0,69
		Silane	13,2 ± 1,0	4,2 ± 1,2	0,29
		PI 6-6	12,4 ± 0,9	1,3 ± 0,4	0,20 ± 0,01

La densité de greffage de la sous-couche silane est probablement insuffisante dans les conditions testées. Si nous augmentons le temps d'immersion des wafers dans la solution silane au-delà de 5 h, les courbes de réflectivité des rayons X présentent des franges de Kiessing nombreuses et des épaisseurs plus importantes de la sous-couche silane sont observées. Ceci suggère dans ce cas la formation de multicouches. Or, il est nécessaire de former une monocouche afin d'éviter le gonflement de celle-ci. Les paramètres de temps et de concentration, mais aussi de solvant et de chauffage peuvent encore être améliorés afin de réussir à obtenir une couche moléculaire dense qui réponde à nos exigences. Comme démontré par l'étude en réflectivité des neutrons, nous pourrions aussi faire varier la concentration en monomères des PI afin d'augmenter l'épaisseurs des couches PI.

La faisabilité et l'efficacité du greffage des PI a été démontrées sur des lames de verre et des wafers de silicium. Nous souhaitons désormais réaliser le greffage des PI sur une surface plus inerte mais largement plus utilisée que le verre dans l'industrie agroalimentaire : le polyéthylène (PE), matériau de base des films alimentaires. L'adaptation du procédé de greffage à cette surface et l'étude en biologie (tests d'adhésion et de cytotoxicité) de ces matériaux va faire l'objet du chapitre suivant.

Bibliographie

- (1) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* **2007**, *318* (5849), 426–430. <https://doi.org/10.1126/science.1147241>.
- (2) Fullenkamp, D. E.; Rivera, J. G.; Gong, Y.; Lau, K. H. A.; He, L.; Varshney, R.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Silver-Releasing Antibacterial Hydrogels. *Biomaterials* **2012**, *33* (15), 3783–3791. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.027>.
- (3) Liao, Y.; Wang, Y.; Feng, X.; Wang, W.; Xu, F.; Zhang, L. Antibacterial Surfaces through Dopamine Functionalization and Silver Nanoparticle Immobilization. *Materials Chemistry and Physics* **2010**, *121* (3), 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.02.019>.
- (4) Xi, Z.-Y.; Xu, Y.-Y.; Zhu, L.-P.; Wang, Y.; Zhu, B.-K. A Facile Method of Surface Modification for Hydrophobic Polymer Membranes Based on the Adhesive Behavior of Poly(DOPA) and Poly(Dopamine). *Journal of Membrane Science* **2009**, *327* (1–2), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.11.037>.
- (5) Waite, J. H. The Adhesive Proteins Secreted by Mussels Are the Inspiration behind a Versatile Approach to the Surface Modification of a Wide Range of Inorganic and Organic Materials, Resulting in the Fabrication of Multifunctional Coatings for a Variety of Applications. *Nature Materials* **2008**, *7*, 8–9.
- (6) Wei, Q.; Zhang, F.; Li, J.; Li, B.; Zhao, C. Oxidant-Induced Dopamine Polymerization for Multifunctional Coatings. *Polym. Chem.* **2010**, *1* (9), 1430. <https://doi.org/10.1039/c0py00215a>.
- (7) Dreyer, D. R.; Miller, D. J.; Freeman, B. D.; Paul, D. R.; Bielawski, C. W. Elucidating the Structure of Poly(Dopamine). *Langmuir* **2012**, *28* (15), 6428–6435. <https://doi.org/10.1021/la204831b>.
- (8) Ku, S. H.; Lee, J. S.; Park, C. B. Spatial Control of Cell Adhesion and Patterning through Mussel-Inspired Surface Modification by Polydopamine. *Langmuir* **2010**, *26* (19), 15104–15108. <https://doi.org/10.1021/la102825p>.
- (9) Lepoittevin, B.; Bedel, S.; Dragoé, D.; Bruzard, J.; Barthés-Labrousse, M.-G.; Mazerat, S.; Herry, J.-M.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Roger, P. Antibacterial Surfaces Obtained through Dopamine and Fluorination Functionalizations. *Progress in Organic Coatings* **2015**, *82*, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.01.007>.
- (10) Sileika, T. S.; Kim, H.-D.; Maniak, P.; Messersmith, P. B. Antibacterial Performance of Polydopamine-Modified Polymer Surfaces Containing Passive and Active Components. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2011**, *3* (12), 4602–4610. <https://doi.org/10.1021/am200978h>.
- (11) Deniau, G.; Azoulay, L.; Bougerolles, L.; Palacin, S. Surface Electroinitiated Emulsion Polymerization: Grafted Organic Coatings from Aqueous Solutions. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (23), 5421–5428. <https://doi.org/10.1021/cm060739t>.
- (12) Tessier, L.; Chancolon, J.; Alet, P.-J.; Trenggono, A.; Mayne-L’Hermite, M.; Deniau, G.; Jégou, P.; Palacin, S. Grafting Organic Polymer Films on Surfaces of Carbon Nanotubes by Surface Electroinitiated Emulsion Polymerization. *phys. stat. sol. (a)* **2008**, *205* (6), 1412–1418. <https://doi.org/10.1002/pssa.200778159>.
- (13) Tessier, L.; Deniau, G.; Charleux, B.; Palacin, S. Surface Electroinitiated Emulsion Polymerization (SEEP): A Mechanistic Approach. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (18), 4261–4274. <https://doi.org/10.1021/cm901430t>.

- (14) Pinson, J.; Podvorica, F. Attachment of Organic Layers to Conductive or Semiconductive Surfaces by Reduction of Diazonium Salts. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (5), 429. <https://doi.org/10.1039/b406228k>.
- (15) Mévellec, V.; Roussel, S.; Tessier, L.; Chancolon, J.; Mayne-L'Hermitte, M.; Deniau, G.; Viel, P.; Palacin, S. Grafting Polymers on Surfaces: A New Powerful and Versatile Diazonium Salt-Based One-Step Process in Aqueous Media. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (25), 6323–6330. <https://doi.org/10.1021/cm071371i>.
- (16) Mesnage, A. Diazonium salts induced anchoring process: mechanism, application(s).
- (17) Zollinger, H. *Diazo Chemistry I*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, **1994**. <https://doi.org/10.1002/3527601724>.
- (18) Galli, C. Radical Reactions of Arenediazonium Ions: An Easy Entry into the Chemistry of the Aryl Radical. *Chem. Rev.* **1988**, *88* (5), 765–792. <https://doi.org/10.1021/cr00087a004>.
- (19) Heinrich, M. R. Intermolecular Olefin Functionalisation Involving Aryl Radicals Generated from Arenediazonium Salts. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (4), 820–833. <https://doi.org/10.1002/chem.200801306>.
- (20) Chen, B.; Flatt, A. K.; Jian, H.; Hudson, J. L.; Tour, J. M. Molecular Grafting to Silicon Surfaces in Air Using Organic Triazenes as Stable Diazonium Sources and HF as a Constant Hydride-Passivation Source. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (19), 4832–4836. <https://doi.org/10.1021/cm051104h>.
- (21) Lin, W.; Lin, W.; Wong, G. K.; Marks, T. J. Supramolecular Approaches to Second-Order Nonlinear Optical Materials. Self-Assembly and Microstructural Characterization of Intrinsically Acentric [(Aminophenyl)Azo]Pyridinium Superlattices. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (34), 8034–8042. <https://doi.org/10.1021/ja960395f>.
- (22) Galli, C. Stimulation by Sn⁺² or Ascorbic Acid on Diazonium Salts Reactions. *Tetrahedron Letters* **1980**, *21* (47), 4515–4516. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)74537-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)74537-0).
- (23) McAuley, A.; Oswald, T.; Haines, R. I. Kinetics and Mechanisms of the Oxidation of Ascorbic Acid and Benzene Diols by Nickel(III)Tetraazamacrocycles in Aqueous Perchloric Acid. *Can. J. Chem.* **1983**, *61* (6), 1120–1125. <https://doi.org/10.1139/v83-200>.
- (24) Ahmed, W.; Stefan Kooij, E.; van Silfhout, A.; Poelsema, B. Controlling the Morphology of Multi-Branched Gold Nanoparticles. *Nanotechnology* **2010**, *21* (12), 125605. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/12/125605>.
- (25) Wang, A.; Yin, H.; Ge, C.; Ren, M.; Liu, Y.; Jiang, T. Synthesis of Hollow Silver Spheres Using Poly-(Styrene-Methyl Acrylic Acid) as Templates in the Presence of Sodium Polyacrylate. *Applied Surface Science* **2010**, *256* (8), 2611–2615. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.11.003>.
- (26) Van Oss, C. J.; Chaudhury, M. K.; Good, R. J. Interfacial Lifshitz-van Der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems. *Chem. Rev.* **1988**, *88* (6), 927–941. <https://doi.org/10.1021/cr00088a006>.
- (27) Kirby, B. J.; Hasselbrink, E. F. Zeta Potential of Microfluidic Substrates: 1. Theory, Experimental Techniques, and Effects on Separations. *Electrophoresis* **2004**, *25* (2), 187–202. <https://doi.org/10.1002/elps.200305754>.
- (28) Kirby, B. J.; Hasselbrink, E. F. Zeta Potential of Microfluidic Substrates: 2. Data for Polymers. *Electrophoresis* **2004**, *25* (2), 203–213. <https://doi.org/10.1002/elps.200305755>.
- (29) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: New York, **2001**.

- (30) Khire, V. S.; Kloxin, A. M.; Couch, C. L.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. Synthesis, Characterization and Cleavage of Linear Polymers Attached to Silica Nanoparticles Formed Using Thiol-Acrylate Conjugate Addition Reactions. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2008**, *46* (20), 6896–6906. <https://doi.org/10.1002/pola.22999>.
- (31) Wang, C.; Zolotarskaya, O.; Ashraf, K. M.; Wen, X.; Ohman, D. E.; Wynne, K. J. Surface Characterization, Antimicrobial Effectiveness, and Human Cell Response for a Biomedical Grade Polyurethane Blended with a Mixed Soft Block PTMO-Quat/PEG Copolyoxetane Polyurethane. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (23), 20699–20714. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b04697>.
- (32) Malikova, N.; Čebašek, S.; Glenisson, V.; Bhowmik, D.; Carrot, G.; Vlachy, V. Aqueous Solutions of Ionenes: Interactions and Counterion Specific Effects as Seen by Neutron Scattering. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14* (37), 12898. <https://doi.org/10.1039/c2cp41859b>.
- (33) Ganewatta, M. S.; Rahman, M. A.; Mercado, L.; Shokfai, T.; Decho, A. W.; Reineke, T. M.; Tang, C. Facially Amphiphilic Polyionene Biocidal Polymers Derived from Lithocholic Acid. *Bioactive Materials* **2018**, *3* (2), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2018.02.001>.
- (34) Björck, M.; Andersson, G. *GenX*: An Extensible X-Ray Reflectivity Refinement Program Utilizing Differential Evolution. *J Appl Crystallogr* **2007**, *40* (6), 1174–1178. <https://doi.org/10.1107/S0021889807045086>.
- (35) Parratt, L. G. Surface Studies of Solids by Total Reflection of X-Rays. *Phys. Rev.* **1954**, *95* (2), 359–369. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.95.359>.
- (36) Metin Tolan, *X-Ray Scattering from Soft -Matter Thin Flms*; Springer Tracts in Modern Physics; **1999**; Vol. 148.
- (37) Pincus, P. Colloid Stabilization with Grafted Polyelectrolytes. *Macromolecules* **1991**, *24* (10), 2912–2919. <https://doi.org/10.1021/ma00010a043>.
- (38) Wang, P.-X.; Dong, Y.-S.; Lu, X.-W.; Du, J.; Wu, Z.-Q. Marrying Mussel Inspired Chemistry with Photoiniferters: A Novel Strategy for Surface Functionalization. *Polym. Chem.* **2016**, *7* (35), 5563–5570. <https://doi.org/10.1039/C6PY01223J>.

Chapitre IV Polyionènes en surface :

applications sur le polyéthylène

Tables des matières

A. Greffage des polyionènes sur le polyéthylène.....	170
A.1 Chimie et caractérisations du greffage des PI sur le PE	170
A.2 Caractérisations biologiques des PE greffés PI	173
A.2.1 Essais d'adhésion.....	173
A.2.2 Tests de cytotoxicité des PE greffés PI.....	178
A.3 Comparaison entre les PE et les verres greffés PI	180
B. Impression jet d'encre sur le polyéthylène.....	182
B.1 Création et impression de l'encre	182
B.1.1 Stratégie de préparation	182
B.1.2 Synthèse du PI fonctionnalisé	183
B.1.3 Formulation de l'encre et impression	185
B.1.4 Attestation du greffage.....	187
B.2 Caractérisations biologiques du PE avec l'encre PI 6-6 vinylique.....	189
B.2.1 Essais d'adhésion.....	189
B.2.2 Tests de cytotoxicité	190
C. Incorporation de polyionènes dans le polyéthylène	192
C.1 Protocole de fabrication des PE MM	192
C.1.1 Création du mélange-maître de PI 6-6.....	192
C.1.2 Fabrication du film de PE avec le mélange maître	193
C.2 Caractérisations biologiques des PE mélanges maîtres (MM)	195
C.2.1 Essais d'adhésion.....	195

C.2.2	Tests de cytotoxicité	197
C.3	Comparaison entre les PE greffés PI 6-6 et MM PI 6-6	199
D.	Conclusions et perspectives	201
	Bibliographie.....	204

Après une étude approfondie de systèmes modèles tels que le verre et le wafer de silicium, nous avons transposé ces connaissances au matériau d'intérêt dans le cadre du projet ANR BRICAPAC : le polyéthylène (PE). En effet, celui-ci est le constituant principal des films d'emballages alimentaires. Outre le greffage, deux autres méthodes de modification du PE ont été réalisées. Les films de PE utilisés dans ce chapitre ont été fournis par le partenaire du projet BRICAPAC : Bolloré Division Films Plastiques. Les films alimentaires de PE produits par Bolloré sont composés de différentes couches possédant chacune une composition et un rôle particuliers (Figure IV-1).

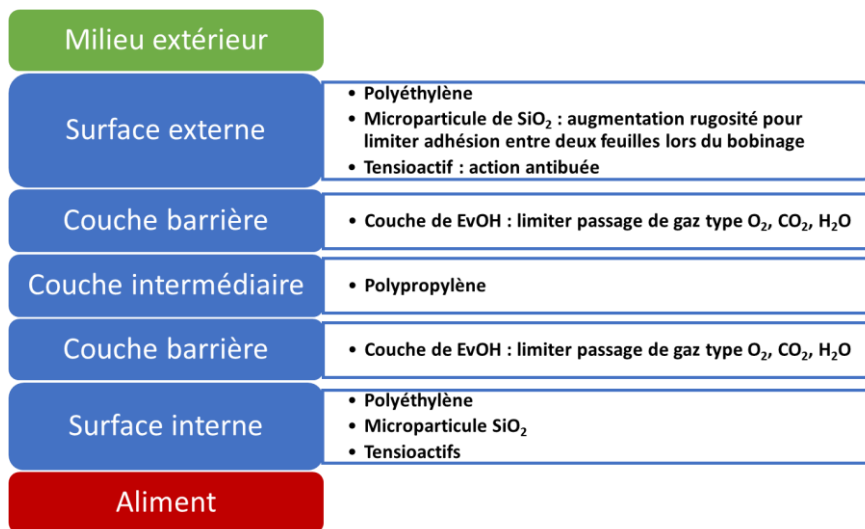


Figure IV-1 : Schéma d'un film alimentaire multicouche thermo-rétractable

La surface externe et la surface interne du film sont constituées de PE auquel on peut ajouter des tensioactifs pour empêcher la formation de buée. Des microparticules de silice peuvent être ajoutées pour augmenter la rugosité du film, limitant ainsi l'adhésion entre deux feuilles lors du bobinage (conditionnement). La couche barrière est constituée d'EvOH, un copolymère d'éthylène et d'alcool vinylique, qui empêche le passage de gaz comme le dioxygène ou le dioxyde de carbone. La couche intermédiaire est constituée de polypropylène ce qui donne de meilleures propriétés de structure et une meilleure résistance à l'étirement au film. Le film de Bolloré Division Films Plastiques est thermo-rétractable. C'est un film étiré qui va se contracter autour de la barquette lors du procédé d'emballage. Dans le cadre de ce projet, Bolloré Division Films Plastiques nous a fourni des films de 100 μm d'épaisseur, produit sur leur ligne pilote et constitué uniquement de polyéthylène, réticulé ou non.

La première méthode pour fonctionnaliser le PE consiste à transposer le greffage appliqué sur le verre au PE et ainsi créer des PE greffés polyionènes (PI). La sous-couche de polydopamine peut en effet se greffer sur de nombreux matériaux, y compris des matériaux peu réactifs.¹⁻⁵ La

deuxième méthode a pour objectif de formuler une encre réticulable sous U.V. contenant du PI afin d'imprimer, par impression jet d'encre, un revêtement antibactérien sur le PE. Enfin, dans une troisième méthode, le PI a été incorporé en masse (« bulk ») dans la matrice de PE *via* un mélange maître par un procédé d'extrusion (Collaboration avec l'équipe de Bolloré Division Films Plastiques). Pour chaque matériau créé, l'efficacité pro-adhésive associée ou non à un effet antimicrobien ainsi que la cytotoxicité sur des cellules mammaliennes ont été évaluées. La présence de relargage est un point qui a été particulièrement étudié. Ce chapitre regroupe les résultats des trois stratégies qui ont été mises au point pour fonctionnaliser le PE avec des PI en surface.

A. Greffage des polyionènes sur le polyéthylène

Nous avons choisi d'adapter le procédé développé sur le verre directement sur les films de PE. La polydopamine se greffe en effet très bien sur le PE.^{6,7} Le protocole est presque identique à celui appliqué sur le verre et est fourni en Annexe A (p. 217). Un résumé des étapes du protocole et les caractérisations du greffage des PI sur le PE sont rassemblés dans la première partie. Après les analyses XPS pour attester du greffage, des caractérisations biologiques ont été effectuées sur les PE greffés PI. Enfin, l'efficacité de ces PE modifiés a été comparée à celle des verres greffés PI développés dans le Chapitre III.

A.1 Chimie et caractérisations du greffage des PI sur le PE

Le procédé s'effectue toujours en trois étapes (Figure IV-2) avec le greffage de la polydopamine, puis la polymérisation « Graftfast » du méthacrylate de diméthylaminoéthyle (MADAME) et enfin la polyaddition en surface des polyionènes (PI).

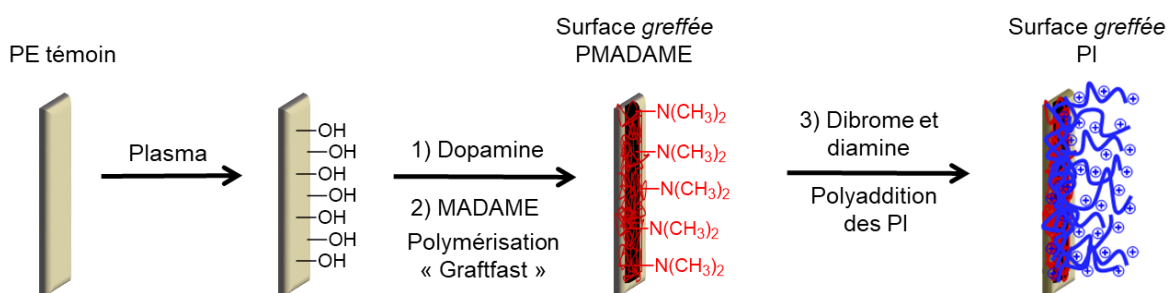


Figure IV-2 :Schéma du procédé de greffage des PI sur le PE

Au lieu du traitement piranha sur le verre, le PE a été nettoyé et rendu plus hydrophile par un traitement plasma. Le plasma est réalisé pendant 5 minutes sous flux de dioxygène à 0,2 mbar. La surface de PE est ensuite immergée dans une solution de dopamine à 3 mg.mL^{-1} dans une solution tampon TRIS dans l'eau déionisée à 10 mmol.mL^{-1} . Le pH de la solution tampon est ajusté à 8,5. La solution est également mise sous agitation pour apporter de l'oxygène et favoriser l'oxydation de la dopamine. Afin de former une couche dense sur le PE en un temps plus court, la concentration de la solution de dopamine a été augmentée par rapport au protocole sur le verre. Le PE est immergé seulement 24 h dans la solution de dopamine, contre 48 h dans le cas du verre.

La polymérisation en surface du MADAME par « Graftfast », pour former le polyméthacrylate de diméthylaminoéthyle (PMADAME), s'effectue par l'ajout successif, sous agitation, de différentes solutions comme décrit précédemment pour le greffage à partir du verre. On laisse réagir le PE pendant 2 h dans le mélange sous forte agitation. Après la réaction, le film de PE est lavé abondamment à l'acétone, l'eau déionisée et l'éthanol.

Le greffage de la couche de PI sur le PE greffé PMADAME s'effectue de la même manière que sur des lames de verre. Le film de PE greffé PMADAME est mis en présence des monomères dibromes et diamines pour former en surface le PI 3-3 et le PI 6-6. Les monomères nécessaires pour former chacun des PI sont les mêmes que ceux utilisés pour la polymérisation en solution (Chapitre II-B). Les monomères sont ajoutés en proportions stœchiométrique à une concentration de 0,9 M dans le méthanol. La réaction est effectuée sous agitation, à 65°C , pendant environ 16 à 18 h. A la fin de la réaction, le PE greffé PI subit un nettoyage plus approfondi que les autres surfaces car les premiers tests microbiologiques avaient révélé la présence de relargage. Il restait sur la surface beaucoup d'espèces physiosorbées, liées par des interactions électrostatiques ou hydrophobes, qu'il fallait éliminer avant les essais biologiques. Le PE greffé PI est lavé par des bains successifs de 30 minutes dans le méthanol et l'eau déionisée sous agitation. A la fin des lavages, les PE greffés PI sont séchés sous cloches à vide afin d'être caractérisés.

Le greffage des PI sur les surfaces de PE a été vérifié par des mesures XPS. Le greffage de la PDOPA est attesté sur le spectre global par l'apparition d'une contribution azote (N 1s) qui n'est pas présente sur le film de PE non-modifié (Figure IV-3, a). Le spectre à haute résolution du pic N 1s indique qu'il est situé autour de 400 eV et il est donc caractéristiques des liaisons C-N (Figure IV-3, b).

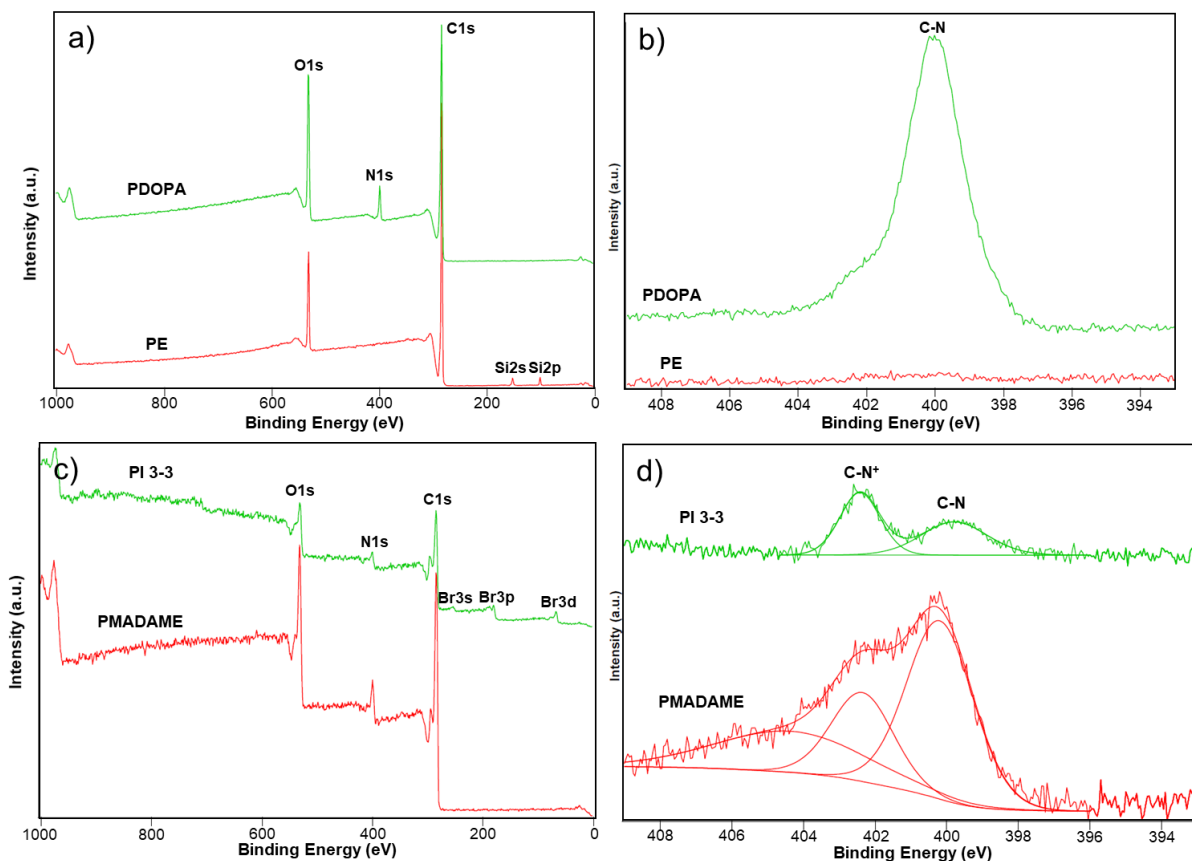


Figure IV-3 : a) Spectres globaux du PE et du PE greffé PDOPA et b) spectres à haute résolution N 1s sur ces mêmes surfaces. c) Spectres globaux des PE greffés PMADAME et PI 3-3 et d) spectres à haute résolution N 1s sur ces mêmes surfaces

Après le greffage du PMADAME, on constate sur le spectre à haute résolution que le pic N 1s se divise en trois contributions (Figure IV-3, d) : une à 400 eV caractéristique des liaisons C-N qui est majoritaire, et deux minoritaires à 402 eV et 406 eV caractéristiques des liaisons C-N⁺ et N-O respectivement. La présence de la contribution à 402 eV est probablement le résultat d'une protonation des groupes pendants diméthylamines du PMADAME, puisque ce greffage s'effectue dans des conditions acides. La présence de liaisons N-O provient des fonctions NO₂ issues de la formation *in-situ* du sel de diazonium à partir du 4-nitroaniline et de la couche de polyphénylène. Sur le spectre à haute résolution, le pic de l'azote après le greffage du PI 3-3 est réparti seulement entre les deux contributions à 400 eV et 402 eV (Figure IV-3, d).

La contribution à 402 eV devient majoritaire après le greffage du PI 3-3, signe de l'augmentation de la part des liaisons C-N⁺ caractéristique des PI (Tableau IV-2). De plus, sur le spectre global du PI 3-3, les signaux caractéristiques du contre-ion brome sont visibles (Figure IV-3, c). Ainsi, avec les %atomiques déterminées sur les spectres globaux (Tableau IV-1), il est possible de calculer le ratio entre la proportion des liaisons C-N⁺ de la contribution N 1s et la contribution Br 3d.

Tableau IV-1 : Compositions chimiques des PE modifiés (% atomique) déterminées sur les spectres globaux

Couches	C 1s	O 1s	N 1s	Br 3d	Si 2p
PE	86,5 %	10,4 %	-	-	3,1 %
PDOPA	77,7 %	16,0 %	6,3 %	-	-
PMADAME	74,8 %	17,5 %	7,7 %	-	-
PI 3-3	64,6 %	25,5 %	6,2 %	3,8 %	-

Tableau IV-2 : Contributions (% atomique) N 1s déterminées sur les spectres à haute résolution

Couches	400 eV (C-N)	402 eV (C-N ⁺)	406 eV (N-O)
PE	-	-	-
PDOPA	100 %	-	-
PMADAME	50,3 %	23,3 %	26,4 %
PI 3-3	46,5 %	53,6 %	-

Le ratio C-N⁺/Br⁻ calculé est de 0,9, pour un ratio théorique de 1, il est donc cohérent avec la structure du polymère. Tous ces éléments permettent d'affirmer que le greffage du PI en surface a été effectué avec succès. Il est cependant difficile d'évaluer l'épaisseur des couches car la majorité de la contribution carbone provient du film de PE. De plus, un effet de charge a été constaté lors des analyses sur les films de PE ce qui explique le bruit de fond important sur certains spectres.

A.2 Caractérisations biologiques des PE greffés PI

Comme précédemment, les essais biologiques menés ont pour objectif d'évaluer le pouvoir antibactérien des PI une fois greffés sur le PE et la cytotoxicité éventuelle des matériaux modifiés. Ces évaluations sont effectuées avec les mêmes essais d'adhésion et les mêmes tests de cytotoxicité que ceux présentés lors du Chapitre III. Les détails expérimentaux des méthodes sont fournis en Annexe A (p. 217). Les essais ont été effectués sur les PE greffés PI 3-3 et PI 6-6. Le PE sans traitement a été utilisé comme témoin lors des essais.

A.2.1 Essais d'adhésion

Les performances des matériaux ont été évalués sur la souche *Staphylococcus aureus* 768 (*S. aureus*, Gram+), pendant 3 h d'adhésion en eau déionisée à 37°C. Les résultats présentés sont normalisés pour une suspension bactérienne à précisément 10⁶ UFC.mL⁻¹. Ils sont la moyenne des résultats de trois manipulations pour le PE témoin et le PE PI 3-3, et de deux manipulations pour le PE PI 6-6. L'observation des supports au microscope, après le décrochage aux ultrasons,

permet d'attester de l'efficacité de la méthode puisqu'on observe après décrochage majoritairement des champs noirs.

Dans un premier temps, l'observation de la flore totale adhérente au microscope à épifluorescence des films de PE modifiés et témoin est effectuée (Figure IV-4). Il est important de remarquer que la quantité de bactéries ayant adhérees sur la surface de PE témoin est bien plus faible que sur les PE greffés. En effet, sur les clichés de microscopie à épifluorescence, la répartition de la flore totale est très hétérogène et en amas sur le PE témoin (Figure IV-4, a) ce qui n'est pas le cas sur les PE greffés PI (Figure IV-4, b).

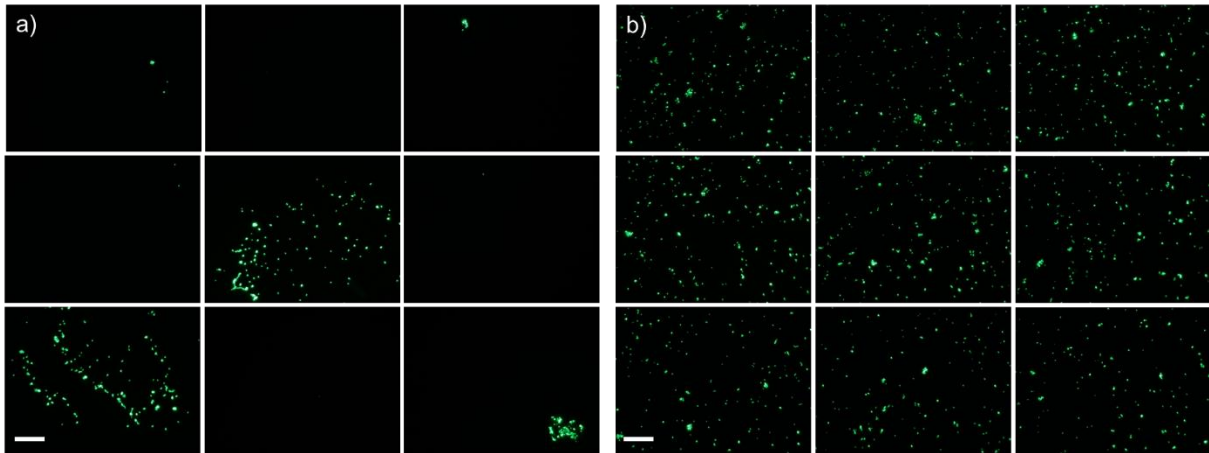


Figure IV-4 : Flore totale au microscope optique (grossissement x40) a) du PE témoin et b) du PE greffé PI 6-6 (échelle : barre blanche = 50 μm)

De part ces observations, la présence d'un effet pro-adhésif sur les films de PE greffés PI est avérée. L'adhésion faible et hétérogène sur le PE témoin est devenue une adhésion importante et homogène sur les surfaces de PE greffés PI grâce à la fonctionnalisation de surface réussie.

Le dénombrement de la flore totale est ensuite comparé au dénombrement des bactéries viables cultivables adhérentes. Les résultats sont reportés sur Figure IV-5. Le dénombrement de la flore totale est plus important sur les PE greffé PI que le PE témoin, l'effet pro-adhésif des PE modifiés est donc validé. En revanche, l'écart entre la flore totale et les bactéries viables cultivables adhérentes est plus important dans le cas du témoin. La différence est de 2,2 log bactérie.cm⁻² pour le PE témoin alors qu'elle n'est que de 1,2 et 1,6 log bactérie.cm⁻² pour le PE PI 3-3 et le PE PI 6-6 respectivement.

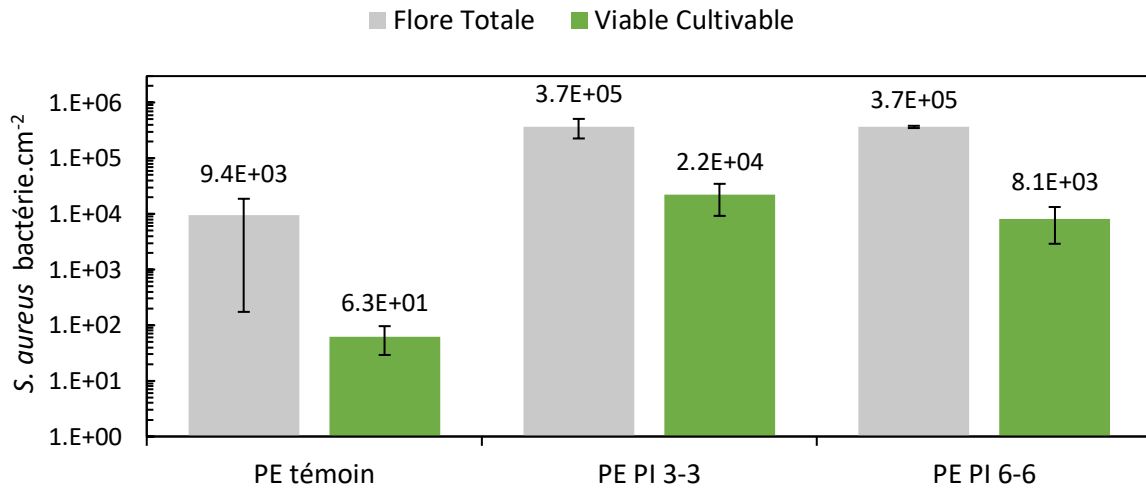


Figure IV-5 : Dénombrement sur *S. aureus* en eau déionisée de la flore totale et des bactéries viables cultivables adhérentes sur des surfaces de PE greffées PI (PE témoin et PE PI 3-3 n = 3 ; PE PI 6-6 n = 2)

Les données de flore totale obtenues sur le PE témoin témoignent d'une grande variabilité, et donc d'un écart-type important, de ces matériaux natifs liés à des hétérogénéités de surfaces. Cette variabilité n'est toutefois pas retrouvée sur le dénombrement des bactéries viables cultivables qui reste faible au regard des données sur les PE greffés PI. Si l'ensemble de ces résultats ne permet pas de statuer sur un effet antibactérien des PE greffés PI en les comparant à ce témoin, en revanche il permet de souligner l'intérêt de ces matériaux modifiés par une réduction de la charge bactérienne dans le fluide environnant. La différence entre la flore totale et la flore viable cultivable permet de calculer des pourcentages d'efficacité de 94,0% et 97,8% sur le PE greffé PI 3-3 et le PE greffé PI 6-6 respectivement. La diminution des bactéries viables cultivables adhérentes pourrait provenir d'un effet antibactérien, mais il n'est pas possible de quantifier la part de la diminution qui est due à des pertes expérimentales.

Nous avons donc cherché ce qui pouvait être la source de l'hétérogénéité des résultats de flore totale sur le PE témoin afin d'en améliorer le dénombrement. L'adhésion faible et hétérogène sur le PE témoin rendent la flore totale plus difficile à dénombrer sur les clichés photographiques, ce qui explique la grande incertitude observée sur les résultats du témoin. Malgré la prise en compte des champs noirs rencontrés dans le calcul de la flore totale, il est probable que nous la surestimions car nous ne pouvons pas analyser toute la surface.

Le PE est un matériau hydrophobe pour lequel *S. aureus* a visiblement moins d'affinité que pour le verre, la souche adhère donc en quantité réduite. L'évaluation du potentiel zêta du PE témoin à pH 5,5 donne une valeur de -34,2 mV, la charge de surface apparente du PE est donc négative. En eau déionisée, il n'y a pas de sels ou de molécules pour masquer les charges de

surface du substrat ou des bactéries. Ainsi, il y a une répulsion électrostatique entre ces deux éléments puisque les parois des bactéries sont globalement chargées négativement aussi. Cette répulsion pourrait expliquer la faible quantité de bactéries adhérentes et le manque d'affinité de *S. aureus* pour le PE témoin, alors que la souche adhère en grande quantité sur les PE greffés PI puisque les PI confèrent des charges positives en surface du matériau.

Afin d'augmenter la quantité de bactéries *S. aureus* adhérentes sur le témoin, nous avons fait un essai en changeant le milieu suspendant lors des essais d'adhésion par de l'eau physiologique (NaCl 9 g.L⁻¹ dans l'eau déionisée). Cet essai est présenté sur la Figure IV-6. L'ajout de sels permet de masquer en partie les charges apparentes de surface et devrait faciliter l'adhésion des bactéries sur la surface de PE témoin.

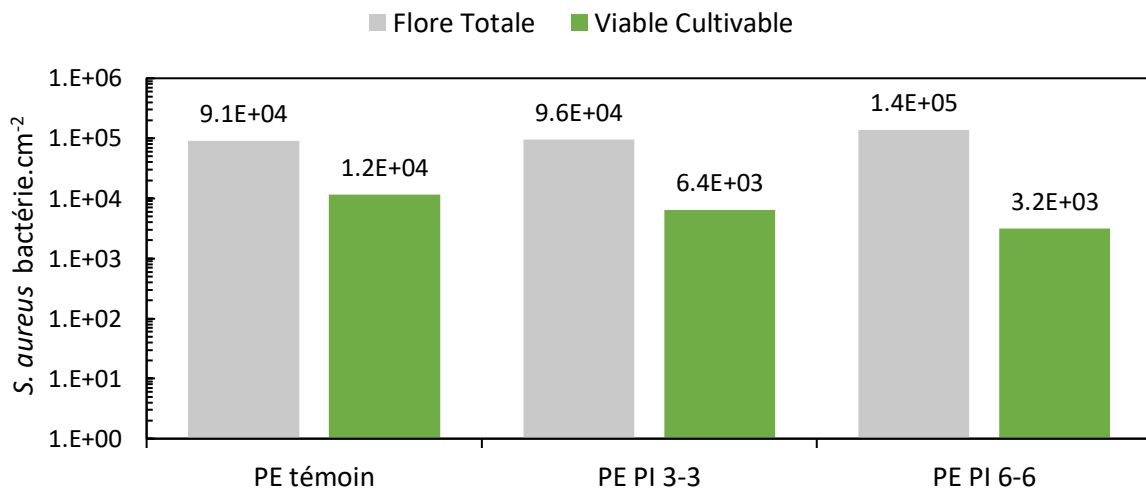


Figure IV-6 : Dénombrement sur *S. aureus* en eau physiologique de la flore totale et des bactéries viables cultivables adhérentes sur des surfaces de PE greffées PI

Dans cet essai en eau physiologique, une augmentation de la flore totale est constatée sur le PE témoin ainsi qu'une répartition plus homogène des bactéries sur la surface. Cependant, de par la présence de sels, l'effet pro-adhésif des PE greffés PI est beaucoup moins marqué dans ce cas-ci. L'écart entre le dénombrement de la flore totale et des bactéries viables cultivables adhérentes est de 0,9 ; 1,2 et 1,6 log bactérie.cm⁻² sur le PE témoin, le PE PI 3-3 et le PE PI 6-6 respectivement. Il est à noter que cet écart est un peu plus important dans le cas des PE modifiés que sur le témoin. De plus, les écarts pour les PE greffés PI sont les mêmes, que les essais soient faits en eau physiologique ou en eau déionisée. L'écart entre la flore totale et le dénombrement des viables cultivables sur ce PE témoin reste cependant plus grand que sur le témoin verre (0,1 log bactérie.cm⁻²). Une partie des bactéries décrochées est donc « perdue » lors de la manipulation des films de PE. La non planéité et la flottabilité des films les rendent

en effet difficiles à immerger sans tiges pour les maintenir. La diminution du nombre de bactéries viables cultivables observée sur les PE greffé PI est donc en partie dû à de la perte expérimentale. L'ensemble de ces données pourrait indiquer un pouvoir antibactérien des PI greffés mais plus faible que dans le cas des verres.

A l'issu de ces essais en eau déionisée et physiologique, on ne peut qu'hypothétiser sur le pouvoir antibactérien des PE greffés PI, pouvoir qui serait toutefois faible par rapport à un témoin où l'adhésion est équivalente à celle des PE modifiés. Des répétitions supplémentaires sont cependant nécessaires pour conclure définitivement, l'essai en eau physiologique n'a en effet été répété qu'une seule fois et le témoin ne semble pas idéal pour quantifier l'importance de l'effet antibactérien. Une possibilité intéressante pour conclure sur le pouvoir antibactérien serait de dénombrer la quantité de bactéries viables non cultivables, c'est-à-dire les bactéries vivantes mais qui n'ont pas été capables de se multiplier après l'exposition aux matériaux modifiés, et la quantité de bactéries mortes par des techniques de biologie moléculaire (cytométrie en flux). De tels méthodes permettraient notamment de repérer les bactéries métaboliquement actives. Nous pourrions ainsi attester du pouvoir antibactérien des surfaces mais aussi discriminer entre un pouvoir bactériostatique ou bactéricide des PE greffés PI.

Les PE greffés PI sont, en revanche, fortement pro-adhésifs sur *S. aureus* par rapport au témoin PE. Cette propriété a également été constaté dans certains cas lors de l'évaluation de 10 souches sauvages dans le cadre du projet ANR BRICAPAC (Tableau IV-3). Ainsi, le pouvoir pro-adhésifs des PE greffés PI est souche-dépendant.

Tableau IV-3 : récapitulatifs des effets des PE greffés PI sur les 10 souches sauvages du projet BRICAPAC

Catégorie	Noms de la souche	PE greffé PI 3-3	PE greffé PI 6-6
Pathogènes	<i>Salmonella Typhimurium</i>		Effet pro-adhésif
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	<i>Listeria monocytogenes</i>		
Altérations	<i>Pseudomonas sp.</i>		
	<i>Brochotrix</i>	Effet pro-adhésif	
	<i>Serratia sp.</i>	Effet pro-adhésif	Effet pro-adhésif
Lactiques	<i>Lactobacillus casei</i>		
	<i>Lactobacillus sakei</i>	Effet pro-adhésif	Effet pro-adhésif
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Effet pro-adhésif	
	<i>Lactococcus lactis</i>		

Cet effet témoigne de l'utilité de ces PE modifiés en tant que piège à bactérie. Dans le cas d'un emballage alimentaire, ces bactéries piégées ne se retrouveront pas dans le fluide environnant de l'aliment. Cela contribue à diminuer la charge infectieuse des bactéries viables cultivables.

Les films de PE greffés PI sont capables de piéger 10^5 bactérie.cm⁻² sur une suspension bactérienne contaminante de 10^6 UFC.mL⁻¹. La population microbienne sur les aliments étant d'environ 10^2 - 10^3 bactérie.cm⁻², les films de PE modifiés pourront capter la majorité des bactéries présentes dans l'emballage. La contamination des films de PE modifiés avec des suspensions bactériennes à 10^2 , 10^4 et 10^6 UCF.mL⁻¹ a en effet mis en évidence la linéarité de cet effet par rapport à la taille de l'inoculum. De plus, au vue des essais réalisés sur les souches sauvages, ces PE modifiés piègeraient préférentiellement les bactéries pathogènes et d'altération par rapport aux bactéries lactiques (« positives »).

A.2.2 Tests de cytotoxicité des PE greffés PI

La cytotoxicité des PE greffés PI a été évaluée en observant des tapis cellulaires de fibroblaste de souris (L929) après une exposition de 48 h aux matériaux. A l'issue des 48 h, les matériaux ont été retirés et un test MTT a été effectué pour évaluer la viabilité cellulaire. Les PE modifiés flottaient dans les puits de culture, par conséquent ils n'étaient pas en contact direct avec les tapis cellulaires. Ce test permet donc d'évaluer la présence d'un éventuel relargage après 48 h d'exposition aux matériaux. Le contrôle est un tapis cellulaire sans matériaux. Les essais ont été répétés pour trois matériaux distincts. Les pourcentages de viabilité cellulaire des L929 en présence du PE témoin et des PE greffés PI 3-3 et PI 6-6 sont récapitulés sur la Figure IV-7.

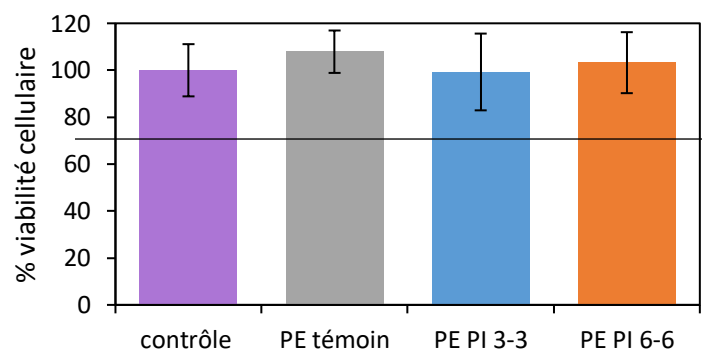


Figure IV-7 : Résultats de cytotoxicité sur L929 pour des PE greffés PI et un PE témoin (n = 3)

Les essais n'indiquent pas de cytotoxicité des PE greffés PI car les viabilités cellulaires sont au-dessus de 70% et comparables à celle du contrôle. En effet, un test statistique de Student a été effectué sur ces valeurs et confirme qu'il n'y a pas de différence significative entre le contrôle et le PE témoin, le PE PI 3-3 et le PE PI 6-6 (p-valeur > 0,05 dans tous les cas). Une répétition supplémentaire serait néanmoins nécessaire car les tests de Student ne sont effectués que sur une gamme de trois valeurs, alors qu'ils avaient été effectués sur une gamme de six valeurs dans le Chapitre II. Ces résultats indiquent que les nettoyages approfondis sont efficaces

et qu'on ne constate plus de relargage des PE greffés PI ou qu'à minima ce relargage est non cytotoxique. S'il y a du relargage, il est d'une concentration inférieure à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sur le PE PI 3-3 et $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le PE PI 6-6, les seuils de cytotoxicité déterminés sur les L929 dans le Chapitre II pour ces PI en solution.

L'évaluation de la cytotoxicité n'a pas été faite avec un contact direct de la surface sur les tapis cellulaires de L929. Par conséquent ces résultats ont été complétés par une évaluation de la cytotoxicité des films de PE greffés PI par contact direct sur des épidermes humains pendant 24 h. Ces essais ont été réalisés par un laboratoire externe sur des épidermes de peau humains reconstruits (Skin+). Pour le contrôle négatif, les épidermes ne sont pas traités et pour le contrôle positif, les épidermes sont traités avec une solution de sodium dodecyl sulfate (SDS) à 0,5% dans le milieu de culture. Les essais ont été répétés pour trois matériaux distincts. Les pourcentages de viabilité cellulaire des épidermes humains en présence du PE témoin et des PE greffés PI 3-3 et PI 6-6 sont récapitulés sur la Figure IV-8.

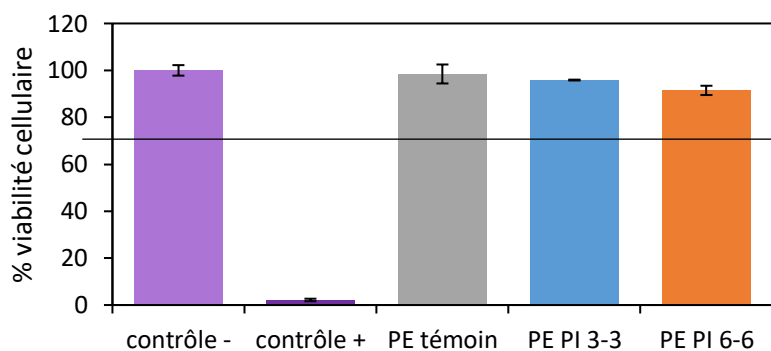


Figure IV-8 : Résultats de cytotoxicité sur épidermes humains reconstruits pour des PE greffés PI et un PE témoin ($n = 3$)

Les essais n'indiquent pas de cytotoxicité des PE greffés PI car les viabilités cellulaires sont au-dessus de 70%. Le test de Student indique qu'il n'y a pas de différence significative entre le contrôle négatif et le PE témoin (p -valeur $> 0,05$). En revanche, il existe une différence significative entre le contrôle négatif et les PE greffés PI 3-3 et PI 6-6 (Student, p -valeur = 0,003 et p -valeur = 4.10^{-6} respectivement). La légère diminution de viabilité cellulaire à cause des PE greffés PI est donc significative mais elle n'est pas suffisamment importante pour être considérée comme cytotoxique. Cette diminution n'a pas été constatée sur les essais de cytotoxicité des cellules L929 alors que les cultures cellulaires monocouches sont plus fragiles et sensibles à la toxicité que les cultures cellulaires multicouches, comme les épidermes. Cette diminution peut donc être le fruit de la variabilité expérimentale mais seule la répétition des expériences permettrait de confirmer ou non cette hypothèse. Néanmoins, les résultats des

essais de cytotoxicité, par contact et par suspension, permettent en l'état de conclure sur l'absence de toxicité des PE greffés PI dans les conditions de ces tests.

A.3 Comparaison entre les PE et les verres greffés PI

Le PE étant un matériau inerte et peu réactif, une des hypothèses avancées pour expliquer la différence de pouvoir antibactérien par rapport aux verres modifiés est que le greffage a été moins efficace. En effet, si on compare les écarts de flore totale et de bactéries viables cultivables adhérentes ($\Delta(\log FT - \log VC)$) obtenus sur les verres modifiés avec ceux obtenus sur les PE modifiés, la différence par rapport au témoin est plus nette dans le cas du verre (Tableau IV-4).

Tableau IV-4 : Ecart entre les flores totales (FT) et les bactéries viables cultivables adhérentes (VC) pour les surfaces de verre et de PE greffés PI (verre $n = 5$; PE $n = 3$ sauf PE PI 6-6 $n = 2$)

Surface	$\Delta(\log FT - \log VC)$ Eau déionisée	Surface	$\Delta(\log FT - \log VC)$ Eau déionisée	$\Delta(\log FT - \log VC)$ Eau physiologique
Verre témoin	$0,1 \pm 0,5$	PE témoin	$2,2 \pm 0,8$	0,9
Verre PI 3-3	$1,2 \pm 0,4$	PE PI 3-3	$1,2 \pm 0,5$	1,2
Verre PI 6-6	$1,7 \pm 0,5$	PE PI 6-6	$1,6 \pm 0,3$	1,6

Les écarts ($\Delta(\log FT - \log VC)$) sont proches entre les verres et les PE greffés PI mais cela ne signifie pas pour autant qu'il y ait le même effet antibactérien sur la surface. La comparaison avec un témoin non greffé, sans propriétés antibactériennes, laisse supposer que dans le cas du PE, une partie plus importante de la diminution du viable cultivable proviendrait de perte expérimentale lors de la manipulation des échantillons. La flexibilité, la non planéité et la flottabilité des films de PE les rendent en effet plus difficiles à manipuler lors des essais.

Nous avons donc cherché à évaluer la quantité de PI présente en moyenne sur les surfaces de PE. La nature même du substrat ne nous permet pas d'évaluer les épaisseurs des couches organiques par des techniques de réflectivité comme dans le chapitre précédent. Le ratio signal sur bruit ne nous permettait pas non plus de faire une évaluation quantitative correcte par les analyses XPS. L'analyse FT-IR aurait pu être employée mais les signaux dus au substrat PE sont intenses par rapport à ceux du greffage des PI.

Des mesures de potentiel zêta ont cependant pu être effectuées pour vérifier la présence de charges positives sur l'extrême surface des films de PE après le greffage des PI (Figure IV-9).

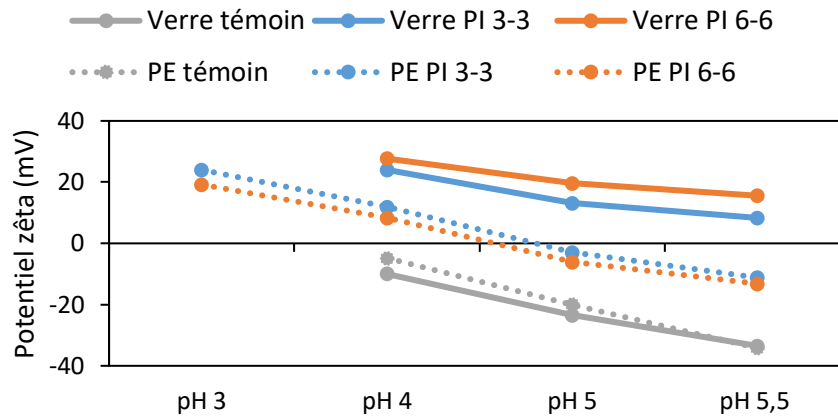


Figure IV-9 : Evolution du potentiel zêta en fonction du pH pour les surfaces de verre et de PE témoin et greffées PI 3-3 et 6-6

Le potentiel zêta du PE sans greffage à pH 5,5 est de -34,2 mV et celui du verre sans greffage au même pH est de -33,5mV. Leurs potentiels zêta sont donc similaires et indiquent une charge de surface globale négative. Pour autant, l'adhésion de *S. aureus* sur les surfaces de verre était plus importante et moins hétérogène que dans le cas du PE. Cependant, le verre est un matériau hydrophile avec de faibles aspérités alors que le PE est un matériau hydrophobe avec des hétérogénéités de surface plus marquées. La faible affinité de *S. aureus* pour la surface de PE pourrait donc provenir plutôt de répulsions hydrophobes que de répulsions électrostatiques.

L'ajout des PI en surface fait augmenter le potentiel zêta à pH 5,5 des PE greffés PI mais pas au point d'observer des valeurs positives comme dans le cas des verres greffés PI. Il y a donc plus de charges positives en surface par rapport au PE témoin mais pas suffisamment pour globalement inverser le signe de potentiel zêta moyen de la surface. En diminuant le pH, on observe cependant une inversion du signe du potentiel zêta qui atteste de la présence de charges positives sur les PE modifiés dûe aux PI.

A tous les pH étudiés, les potentiels zêta sont cependant plus importants dans le cas des verres greffés PI que celui des PE greffés PI, il y a donc globalement plus de charges positives en surface dans le cas du verre. Ce constat peut être expliqué par trois hypothèses. Cette présence plus importante de charges positives dans le cas du verre peut venir d'une densité de greffage plus importante ou bien de chaînes plus longues greffées en surface du verre. Si les densités de greffage sont similaires et faibles sur les deux matériaux alors il est aussi possible que les chaînes greffées adoptent des conformations différentes sur les deux matériaux. L'espace accordé autour de la chaîne pourrait engendrer une conformation qui enfouit ou expose les charges dans la couche PI et les rend plus ou moins visibles en extrême surface du matériau. Sur le PE, cette conformation pourrait, par exemple, avoir pour origine des interactions

hydrophobes entre le substrat et les segments aliphatiques des PI. Ces hypothèses pourraient toutes expliquer la meilleure efficacité antibactérienne des verres greffés PI par rapport aux PE greffés PI, mais des études supplémentaires seront nécessaires pour établir laquelle est la plus plausible.

Les essais sur le PE mettent donc en évidence que malgré le greffage réussi, la conformation ou la longueur des chaînes PI greffés et/ou la densité de greffage n'est pas suffisante pour obtenir un pouvoir antibactérien marqué sur cette surface. Les essais pourront être approfondis en testant le greffage des PI 6-9 et PI 6-12 sur les films de PE mais aussi en augmentant par exemple les concentrations en monomères lors de l'étape de polyaddition des PI. En effet, les études de réflectivité (Chapitre III.C.3) avaient démontré l'augmentation de l'épaisseur de la couche de PI greffés, et donc de la taille des chaînes en surface, avec l'augmentation de la concentration en monomère de départ, en passant de 0,9 M à 1,2 M. Cet effet avait également été montré en solution (Chapitre II.B.3).

B. Impression jet d'encre sur le polyéthylène

L'adaptation du procédé de greffage développé sur le verre n'a pas conduit à la création de surfaces fortement antibactériennes sur le PE. Nous avons donc exploré d'autres voies afin d'incorporer les PI en plus grande quantité sur le PE pour conférer des propriétés importantes à ce matériau mais aussi dans le souci d'aller vers un procédé plus industrialisable. La méthode décrite dans cette sous-section propose de créer des surfaces antibactériennes *via* une méthode rapide, reproductible et déjà employée en industrie : l'impression jet d'encre avec réticulation sous U.V. Cette méthode permet à la fois de réaliser rapidement des impressions de simple dépôt à une grande échelle, mais aussi des impressions de précision avec des designs plus complexes pour des produits à plus hautes valeurs ajoutées.

B.1 Création et impression de l'encre

B.1.1 Stratégie de préparation

L'objectif est de créer une encre antibactérienne photoréticulable à base de PI, utilisable en impression jet d'encre, afin de conférer des propriétés antibactériennes au PE. Pour pallier au problème de relargage, il est indispensable que le polymère bactériostatique soit greffé de manière covalente sur les surfaces. Afin de réaliser un greffage covalent du polymère, nous

avons synthétisé un PI doté de doubles liaisons en bouts de chaîne permettant son incorporation dans le dépôt lors de la réticulation de l'encre. Par simple recuit photonique, le PI se retrouve ainsi greffé de façon covalente au film PE.

La première phase de la mise au point de l'encre est donc la fonctionnalisation des PI avec une double liaison en bout de chaîne comme illustré par la Figure IV-10 ci-dessous.

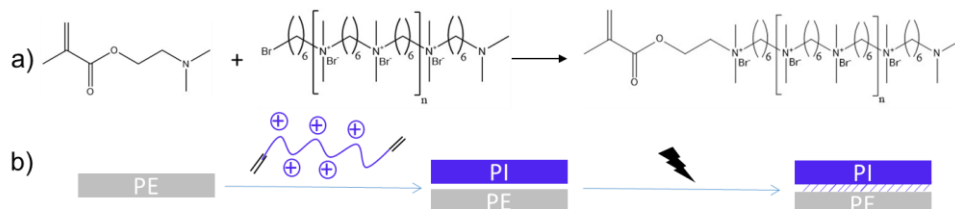


Figure IV-10 : a) Synthèse : PI + MADAME = PI fonctionnalisé double liaison et b) Principe : PI fonctionnalisé + photoamorceur + recuit photonique

La réaction de fonctionnalisation s'effectue avec du méthacrylate de diméthylaminoéthyle (MADAME) sur les bouts de chaîne bromés des PI (Figure IV-10, a). Ensuite, différentes formulations d'encre avec le PI fonctionnalisé et un photoamorceur seront réalisées puis déposées par impression jet d'encre sur le PE. Ce dépôt sera ensuite irradié sous recuit photonique et grâce aux doubles liaisons, le PI sera incorporé de façon covalente au réseau formé sur le film de PE (Figure IV-10, b).

B.1.2 Synthèse du PI fonctionnalisé

Nous choisissons de travailler sur une encre à base de PI 6-6 car il est très aisé de le produire en grande quantité et de le précipiter. La synthèse d'un PI 6-6 de faible masse molaire est effectué en suivant le protocole fourni en Annexe A (p. 217). Une fois le PI 6-6 obtenu, une deuxième étape consiste à maximiser les bouts de chaîne bromés, car c'est sur cette fonction que sera effectuée la substitution nucléophile de la troisième étape. En effet, à l'issue d'une synthèse de PI en proportion stœchiométrique, il existe trois types de polymères, en fonction des extrémités amines ou bromes (Figure IV-11). Nous choisissons d'augmenter les bouts de chaîne bromés par une post-fonctionnalisation des amines restantes plutôt que d'utiliser une stratégie qui consisterait en l'augmentation du nombre d'équivalents de dibrome vis-à-vis du nombre d'équivalents de diamine. En effet, s'éloigner de l'état stœchiométrique pour augmenter les extrémités bromées fait trop chuter la masse molaire des polymères finaux.

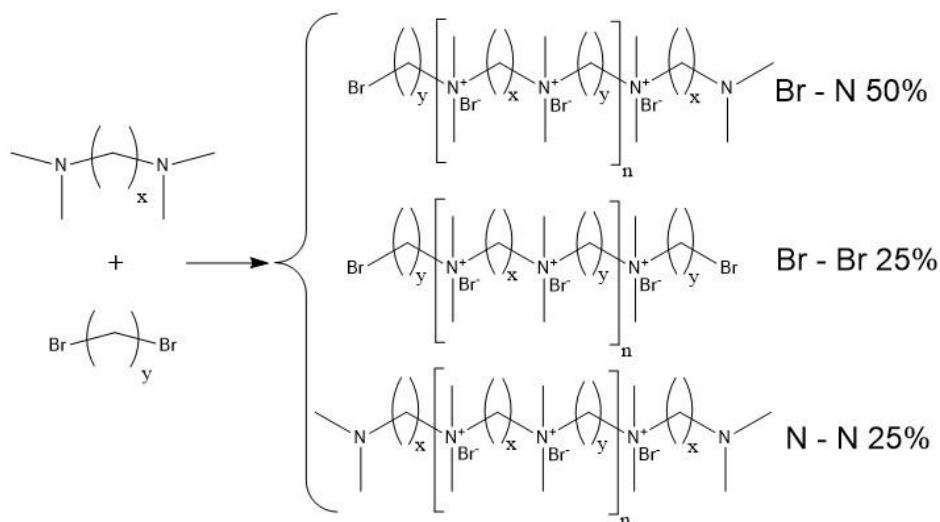
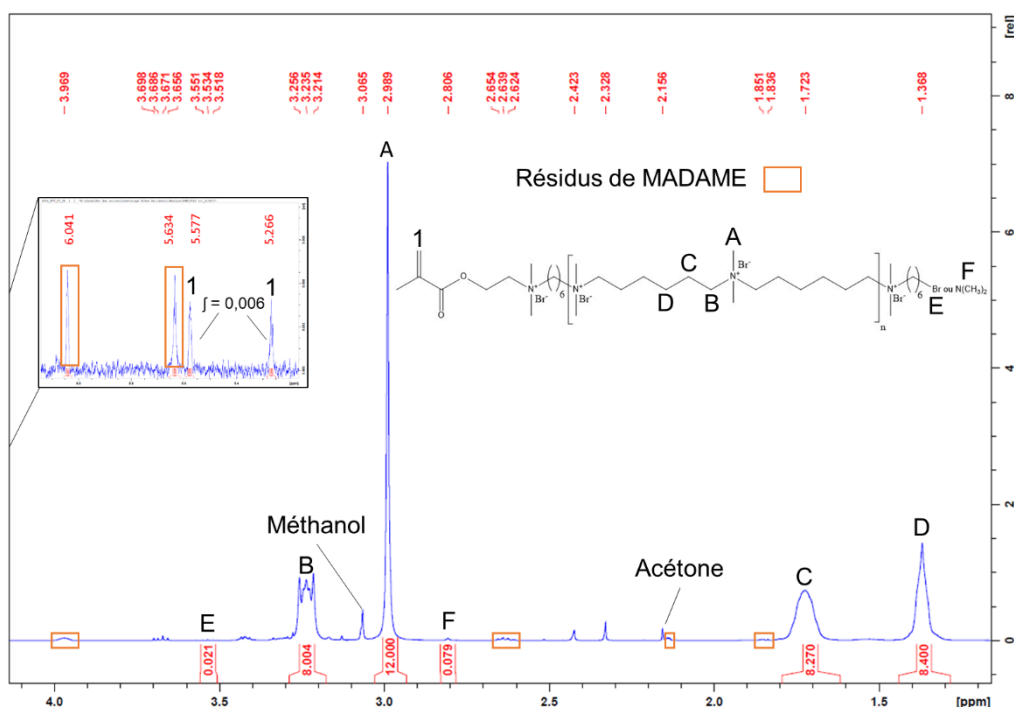


Figure IV-11 : Structures des PI synthétisés en proportion stœchiométrique en fonction des bouts de chaîne

Pour y parvenir, le PI 6-6 est solubilisé dans du méthanol sous atmosphère inerte auquel on ajoute du 1,6 dibromohexane en excès à la seringue de verre. La réaction est ensuite laissée pendant 24 h sous agitation à 65 °C. Des suivis par prélèvement et analyses RMN ^1H démontrent que la proportion des bouts de chaîne bromés reste stable, autour de 65 %, au-delà de 24 h de réaction. La faible réactivité des bouts de chaîne de polymère et une substitution nucléophile plus difficile dans le cas d'un monomère neutre sur un polymère chargé, peuvent expliquer l'impossibilité d'atteindre 100% d'extrémités bromés par ce procédé. A la fin de la réaction, le polymère, appelé PI 6-6 Br, est précipité dans l'acétone et filtré sur Büchner puis séché sous cloche à vide. Un spectre RMN ^1H d'un PI 6-6 Br avec un exemple de calcul des proportions de bouts de chaîne est fourni en Annexe B (p. 245).

La dernière étape consiste à réaliser la substitution nucléophile du MADAME sur les bouts de chaîne bromés du PI 6-6 Br. Le PI 6-6 Br est solubilisé dans du méthanol sous atmosphère inerte auquel on ajoute le MADAME en excès à la seringue en verre. Des suivis par prélèvement et analyses RMN ^1H pendant huit jours de manipulation ont mis en évidence que la proportion de bouts de chaînes vinyliques n'augmente plus au-delà de six jours de réaction. La fonctionnalisation n'est effective que sur environ 20% des bouts de chaîne, ce qui peut de nouveau être attribué à la faible réactivité des extrémités de polymère. A la fin de la réaction, le polymère, qu'on appelle PI 6-6 vinylique, est précipité dans l'acétone et filtré sur Büchner puis séché sous cloche à vide. La RMN du proton permet d'attribuer les déplacements chimiques aux fonctions correspondantes et de calculer la proportion de chacun des bouts de chaînes polymères : 44,4% d'extrémités amines, 35,4% d'extrémités bromés et 20,2% d'extrémités vinyliques (Figure IV-12).


 Figure IV-12 : Spectre RMN ^1H du PI 6-6 vinylique

Cette fonctionnalisation partielle entraîne la formation de chaînes monofonctionnelles en plus des chaînes difonctionnelles. Ceci n'est pas problématique car cela permet d'avoir des chaînes pendantes plus mobiles dans l'encre réticulée puisqu'elles ne sont liées au réseau polymère que par une seule extrémité. De plus, les résidus de MADAME présent sur le spectre RMN ne sont pas gênant pour la formulation de l'encre car ils seront éliminés par les nettoyages des surfaces imprimées si ces monomères ne s'intègrent pas au réseau polymère lors du recuit photonique.

B.1.3 Formulation de l'encre et impression

La formulation de l'encre antibactérienne la plus optimale, appelée encre PI 6-6 vinylique, est donnée dans le Tableau IV-5. Divers paramètres tels que la composition et la rhéologie de l'encre ont été optimisés afin d'assurer la tenue de l'encre sur la surface.

Tableau IV-5 : Composition de l'encre PI 6-6 vinylique

Composants	% masse	masse (g)	Mn ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
Eau déionisée	27,4%	2,500	18
Ethanol	48,6%	4,440	46,1
PI 6-6 vinylique	4,2%	0,380	3 200
Ethylène glycol diméthacrylate	10,9%	1,000	198,2
Triméthylolpropane éthoxylate triacrylate 428	6,2%	0,566	428
2 hydroxy (4' hydroxyethoxy) 2 methylpropio phenome (photoamorceur)	2,7%	0,250	224,3

car aucune variation de viscosité n'est observée sur les gammes de vitesse de cisaillement appliquées.

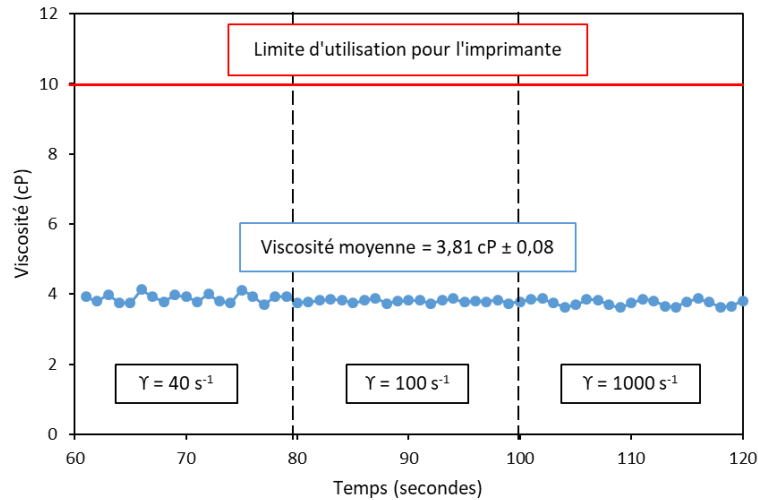


Figure IV-14 : Viscosité de l'encre PI 6-6 vinylique en fonction de trois vitesses de cisaillement γ

Les encres sont ensuite utilisées sur une imprimante jet d'encre avec des cartouches possédant une tête d'impression de 16 buses délivrant des volumes de 10 picolitres. Les impressions sont réalisées avec un « drop spacing » (espacement entre les gouttes déposées) de $50 \mu\text{m}$, à 1 mm de la surface à imprimer. Après impression, la surface subit un recuit sous une lampe Xenon avec 20 flashs de 2000 V d'une durée de 150 millisecondes. Une fois le recuit effectué, les surfaces imprimées et réticulées sont introduites dans un mélange eau déionisée/éthanol (50/50) et sont passées aux ultrasons à pleine puissance pendant 10 minutes afin d'éliminer tous les composants physissorbés en surface.

B.1.4 Attestation du greffage

Afin de contrôler l'intérêt du greffage et de la fonctionnalisation des PI, une encre comparative a été réalisée en plus de la première encre PI 6-6 vinylique. La deuxième encre, appelée encre PI 6-6, est une encre avec les mêmes proportions que l'encre PI 6-6 vinylique mais pour celle-ci, nous avons utilisé un PI 6-6 sans fonction vinylique. Les proportions des deux encres sont récapitulées dans le Tableau IV-6.

Tableau IV-6 : Composition des encres PI 6-6 vinylique et PI 6-6

Composants	Mn (g.mol ⁻¹)	masse (g)	
		Encre PI 6-6 vinylique	Encre PI 6-6
Eau déionisée	18	2,500	2,500
Ethanol	46	4,440	4,440
PI 6-6 vinylique	3 200	0,380	-
PI 6-6	2 800	-	0,380
Ethylène glycol diméthacrylate	198	1,000	1,000
Triméthylolpropane éthoxylate triacrylate 428	428	0,566	0,566
2 hydroxy (4' hydroxyethoxy) 2 methylpropio phenome (photoamorreur)	224	0,250	0,250

Une fois les encres imprimées et réticulées, les substrats de PE imprimés sont nettoyés aux ultrasons puis séchés sous cloche à vide, avant l'analyse XPS. Parmi tous les composants de l'encre, seul le PI 6-6 possède des azotes dans sa structure. Ainsi, la présence d'une contribution azote sur le spectre global (Figure IV-15, a) atteste de la présence de PI 6-6 dans l'encre PI 6-6 vinylique mais pas dans l'encre PI 6-6.

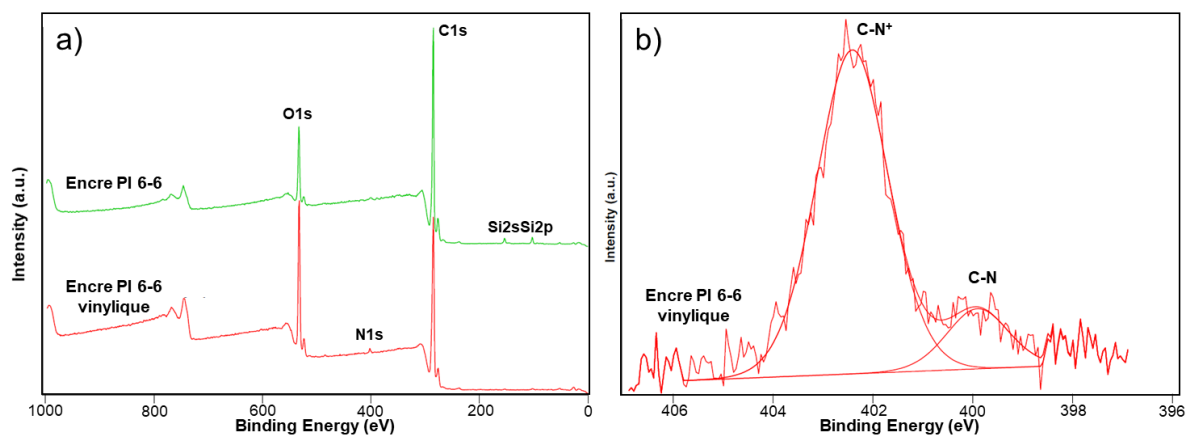


Figure IV-15 : a) Spectres globaux des surfaces de PE avec l'encre PI 6-6 vinylique et l'encre PI 6-6 et b) spectre à haute résolution du N 1s sur le PE avec l'encre PI 6-6 vinylique.

Ce constat permet d'affirmer la nécessité de la fonctionnalisation du PI 6-6 avec une double liaison pour l'intégrer au réseau lors de la réticulation de l'encre. Sans cette fonctionnalisation, le PI 6-6 est éliminé par le nettoyage aux ultrasons car il ne forme pas de liaisons covalentes avec l'encre réticulée. Le spectre à haute résolution du N 1s de l'encre PI 6-6 vinylique peut se diviser en deux contributions (Figure IV-15, b). La contribution à 402 eV est caractéristique des liaisons C-N⁺ et est majoritaire par rapport à la contribution à 400 eV des liaisons C-N, comme ce fut le cas dans les autres exemples de greffage des PI.

B.2 Caractérisations biologiques du PE avec l'encre PI 6-6 vinylique

Le PE témoin et le PE modifié avec l'encre PI 6-6 vinylique ont été testés par des essais d'adhésion. L'objectif est de vérifier si l'encre PI 6-6 vinylique possède un effet pro-adhésif associé ou non à un pouvoir antibactérien. Le relargage et la cytotoxicité du PE modifié avec l'encre ont aussi été caractérisés.

B.2.1 Essais d'adhésion

Comme précédemment, les tests d'adhésion sont réalisés avec *S. aureus* dans l'eau distillée pendant 3 h à 37°C avec une suspension bactérienne à environ 10^6 UFC.mL⁻¹. Les résultats présentés sur la Figure IV-16 sont normalisés pour une solution à 10^6 UFC.mL⁻¹ précisément, et sont la moyenne de deux essais différents. Après décrochage aux ultrasons, il est observé majoritairement des champs noirs lors de l'observation des supports, ce qui atteste de l'efficacité de la méthode de décrochage.

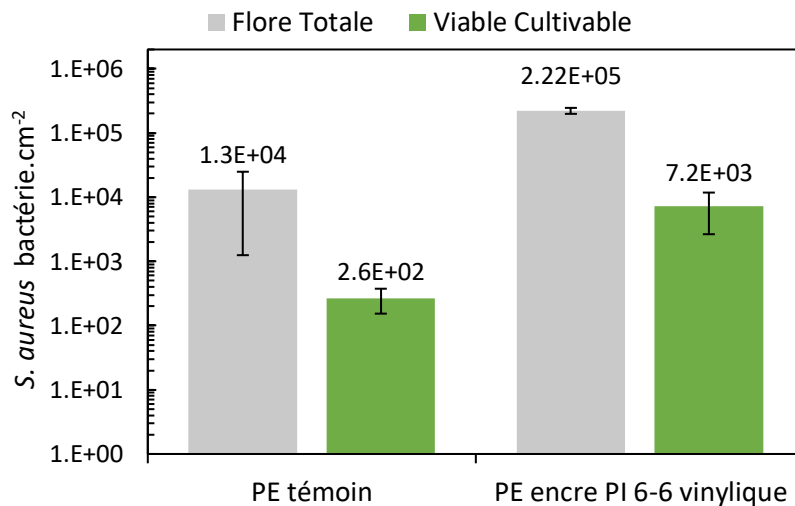


Figure IV-16 : Dénombrement sur *S. aureus* en eau déionisée de la flore totale et des bactéries viables cultivables adhérentes sur des surfaces de PE témoin et de PE avec l'encre PI 6-6 vinylique ($n = 2$)

Ces essais ont permis d'attester des propriétés pro-adhésives de l'encre car on peut constater, sur la Figure IV-16, une augmentation de la flore totale présente sur le film de PE modifié avec l'encre par rapport au film de PE témoin. Cette encre confère donc, comme les PE greffés PI, des propriétés de piège à bactéries à la surface de PE. L'écart entre la quantité de bactéries viables cultivables adhérentes par rapport à la flore totale sur le PE modifié avec l'encre PI 6-6 vinylique ($1,5 \log$ bactérie.cm⁻²), est similaire à celui du PE témoin ($1,7 \log$ bactérie.cm⁻²). La même problématique que lors des essais d'adhésion sur les PE greffés PI se pose : l'adhésion faible et hétérogène de *S. aureus* sur le témoin induit des incertitudes dans l'évaluation de la flore totale et donc un écart type important. Ces essais ne permettent donc pas de statuer sur un

effet antibactérien de l'encre PI 6-6 vinylique. La présence d'un tel effet reste cependant une hypothèse probable pour expliquer la diminution du dénombrement des bactéries viables cultivables adhérentes par rapport à la flore totale qui se traduit par un pourcentage d'efficacité de 96,8%. Il serait intéressant d'effectuer un essai dans l'eau physiologique pour améliorer l'adhésion sur le témoin. Ces essais seront à répéter afin de confirmer ou non les propriétés antibactériennes de l'encre PI 6-6 vinylique puisque nous observons ici le résultat de seulement deux manipulations. De plus, il faudra aussi réaliser un PE modifié avec une encre référence, de même composition mais sans PI 6-6, pour vérifier que l'effet antibactérien potentiellement observé est bien dû à la présence du PI 6-6.

Pour mettre en évidence l'absence de relargage, les dénombrements des surnageants des tests d'adhésion ont été effectués. Le dénombrement des bactéries viables cultivables dans les surnageants sur la Figure IV-17 montre qu'il n'y a pas de différence entre le film de PE sans traitement et le film de PE modifié avec l'encre PI 6-6 vinylique.

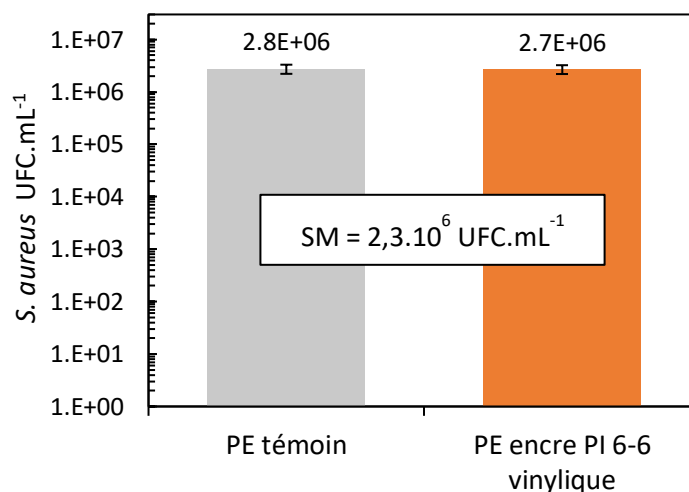


Figure IV-17 : Dénombrement des surnageants d'adhésion de *S. aureus* en eau déionisée des surfaces de PE témoin et PE avec l'encre PI 6-6 vinylique (SM = Suspension Mère contaminante) (n = 2)

L'absence de relargage de PI ou d'autres éléments de l'encre dans le surnageant semble donc avérée. Ces essais vont cependant être complétés avec une étude de cytotoxicité afin de le confirmer mais aussi de s'assurer de l'absence de toxicité du revêtement vis-à-vis de cellules de mammifères.

B.2.2 Tests de cytotoxicité

Comme pour les essais sur les PE greffés PI, les essais de cytotoxicité ont été effectués d'une part, dans notre laboratoire sur des tapis cellulaires de fibroblaste de souris (L929) après une exposition de 48 h au PE avec l'encre, et d'autre part, dans un laboratoire externe sur des

épidermes de peau humains reconstruits (Skin+) après une exposition de 24 h aux matériaux modifiés. Les essais ont été répétés sur trois matériaux distincts pour chacun des tests. Les détails expérimentaux des méthodes sont fournis en Annexe A (p. 217).

Pour les tests sur les L929, le PE encre PI 6-6 vinylique flotte au-dessus des tapis cellulaires dans les puits, on évalue donc le relargage avec ces essais (Figure IV-18).

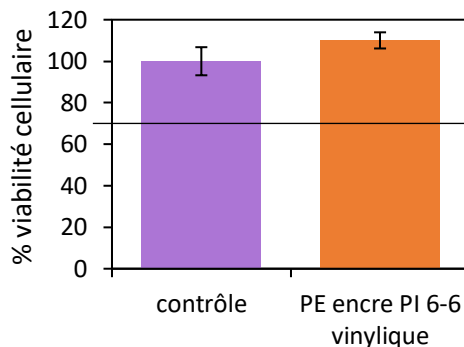


Figure IV-18 : Résultats de cytotoxicité sur L929 pour le PE avec encre PI 6-6 vinylique (n = 3)

Les tests n'indiquent pas de cytotoxicité du PE encre PI 6-6 vinylique puisque la viabilité cellulaire est au-dessus de 70% et est comparable à celle du contrôle. En effet, le test de Student donne une p-valeur > 0,05, donc la différence n'est pas significative entre les deux conditions.

Lors des tests sur les épidermes humains reconstruits, le PE témoin et le PE avec l'encre sont en contact direct avec les épidermes. Les essais n'indiquent pas de cytotoxicité du PE témoin et du PE encre PI 6-6 vinylique car les viabilités cellulaires sont au-dessus de 70% (Figure IV-19).

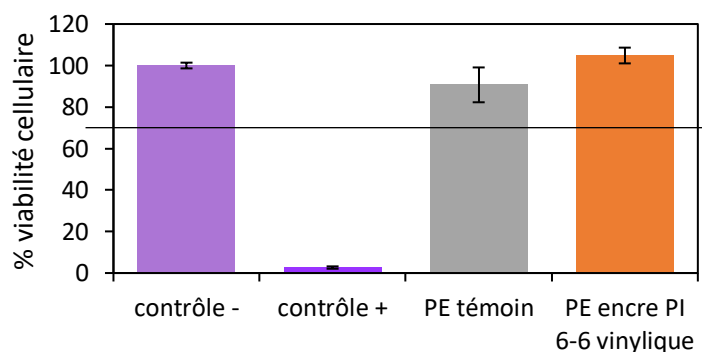


Figure IV-19 : Résultats de cytotoxicité sur des épidermes humains reconstruits pour des PE sans et avec encre PI 6-6 vinylique (n = 3)

Le test de Student indique cependant une différence significative entre le contrôle négatif et le PE témoin (p-valeur = 0,03), ainsi qu'une différence significative entre le contrôle négatif et le PE encre PI 6-6 vinylique (p-valeur = 0,01). Le PE témoin est issu du même matériaux que

celui pour les essais des PE greffés PI et il n'y avait pas eu de différence significative dans les essais présentés dans la partie A.2.2. Les p-valeurs n'étant pas très petites et le test étant effectué sur seulement trois matériaux, on peut considérer que cette différence significative est probablement due à de l'erreur expérimentale. En particulier, dans le cas du PE encre PI 6-6 vinylique, la différence significative est due à une augmentation de la viabilité cellulaire, et non à une diminution, par rapport au contrôle négatif.

C. Incorporation de polyionènes dans le polyéthylène

La réalisation de films de polyéthylène avec l'incorporation de PI dans la matrice polymère est issue de la collaboration avec l'entreprise Bolloré Division Films Plastiques et le plateau technique Compositic (Institut de Recherche Dupuy de Lôme UMR CNRS 6027). L'objectif est de réaliser dans un premier temps un mélange-maître de PE contenant du PI 6-6, c'est-à-dire des granulés de PE dans lesquels on est venu incorporer en masse une certaine quantité de PI 6-6. Dans un deuxième temps, les granulés issus de ce mélange-maître sont extrudés avec des granulés de PE standard pour produire un film de PE contenant du PI 6-6. Ces films de PE fabriqués avec les mélanges-maîtres sont appelés par la suite PE MM. En choisissant des granulés de PE de faible densité pour constituer la matrice principale du film, on favorise la migration des éléments en surface. C'est notamment le cas des tensioactifs qui convergent vers la surface et apportent des propriétés antibuées aux emballages en PE. Ainsi, bien que le PI soit ajouté dans la matrice du film, il devrait migrer en surface et produire un effet antibactérien par contact. Cette partie développe la préparation particulière de ces films et les caractérisations biologiques effectuées dessus.

C.1 Protocole de fabrication des PE MM

C.1.1 Création du mélange-maître de PI 6-6

Environ 150 g de PI 6-6 a été synthétisé en suivant le protocole de synthèse des polyionènes aliphatiques en solution explicité précédemment dans le Chapitre II. Le PI 6-6 obtenu a une masse molaire moyenne en nombre de $8\,200\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et un indice de polydispersité de 2,3. Le plateau technique Compositic a réalisé un mélange maître (MM) en mélangeant environ 950 g de PE basse densité à 50 g de PI 6-6. Ils ont donc réalisé un MM à 5% de PI 6-6 en masse. La réalisation du MM nécessite une étape d'extrusion, nous avons donc évalué la tenue thermique

des PI par des analyses thermogravimétriques (ATG) sous diazote et dioxygène. Les résultats sont regroupés dans le Tableau IV-7.

Tableau IV-7 : Résultats des analyses thermogravimétriques des PI sous O₂ et N₂

Echantillon	T10 (°C)		T90 (°C)		Tf (°C)	
	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂
PI 3-3	262	263	437	348	616	614
PI 6-6	276	281	357	350	590	621
PI 6-9	266	260	375	344	614	741
PI 6-12	255	254	356	344	599	675

T10 représente la température de dégradation de 10% de la masse initiale de l'échantillon, T90 la température de dégradation de 90% de la masse initiale et Tf la température en fin de dégradation. Ces analyses nous permettent d'affirmer que les PI pourront être extrudés jusqu'à une température de 250°C environ sans risque de dégradation de ces derniers.

Pour réaliser le MM, on introduit la poudre de polyionènes finement broyée dans un sachet en plastique. On y ajoute des granulés de PE et on injecte un jet d'air sous pression dans le sachet plastique pour mélanger la poudre aux granulés. Le mélange ainsi obtenu est ensuite introduit dans un compounder (mélangeur) avant d'être extrudé à 150 °C de manière à obtenir des joncs (Figure IV-20). Ces joncs sont découpés pour produire des granulés de MM PE-PI. Ils ont ainsi pu créer environ 900 g de MM PE-PI 6-6.

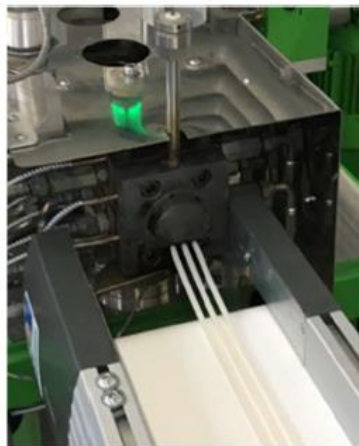


Figure IV-20 : photo des joncs en sortie de la filière d'extrusion

C.1.2 Fabrication du film de PE avec le mélange maître

L'entreprise Bolloré réalise par la suite la mise en œuvre par extrusion à 210°C des films de PE de 100 µm d'épaisseur en y incorporant le MM PE-PI 6-6 aux granulés de PE basse densité qui

constituent la matrice. Les différents éléments sont coextrudés à l'aide d'une extrudeuse à vis à plusieurs filières comme illustré sur la Figure IV-21.

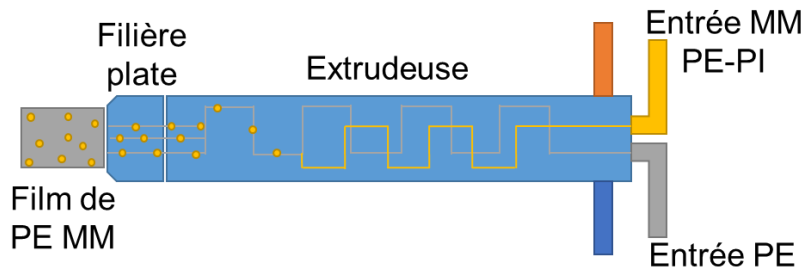


Figure IV-21 : Schéma d'une extrudeuse à vis à plusieurs filières

Les granulés de PE et les granulés de MM PE-PI sont introduits par des filières en différentes proportions en contrôlant le débit et les masses introduites. Ils sont ensuite fondus et mélangés lors du passage dans l'extrudeuse à vis. Une filière plate à la sortie de l'extrudeuse permet d'obtenir des films multicouches. La gaine (film de PE MM), obtenu à la sortie de l'extrudeuse, est refroidie en glissant sur un mandrin, puis par immersion dans un bain d'eau froide afin de se trouver dans un état amorphe. Le film est ensuite étiré à l'aide d'enrouleurs (Figure IV-22), chauffés et évoluant à différentes vitesses, avant d'être finalement bobiné.



Figure IV-22 : Photo des enrouleurs à la sortie de l'extrudeuse

L'entreprise Bolloré a extrudé un film de PE avec 10% en masse de MM et un film avec 30% en masse de MM. Puisque les granulés de MM contiennent 5% en masse de PI 6-6, alors les films finaux possèdent respectivement 0,5% et 1,5% en masse de PI 6-6. Les films produits sont récapitulés dans le Tableau IV-8.

Tableau IV-8 : Films de PE MM produits par Bolloré

N°	Nom	%masse de MM	Réticulation
2	PE MM témoin	0	80 Kgy
4	PE MM 10%	10	80 Kgy
6	PE MM 30%	30	80 Kgy

Les films ont été réticulés après leur production par un faisceau d'électrons. Cette réticulation crée des liaisons covalentes entre les chaînes de PE pour améliorer les propriétés d'étirement des films. Elle pourrait aussi créer des liaisons entre le PE et les PI et ainsi limiter le relargage. Le film n°2 constitue le témoin de la matrice PE sans MM. Les films n°4 PE MM 10% et n° 6 PE MM 30% sont les films avec respectivement 0,5% m/m et 1,5% m/m de PI 6-6 dans les films extrudés.

C.2 Caractérisations biologiques des PE mélanges maîtres (MM)

Les films de PE MM ont été caractérisés par des essais d'adhésion en microbiologie et des tests de cytotoxicité sur des cellules mammaliennes. Les tests d'adhésion ont été complétés par un dénombrement des surnageants afin d'évaluer le relargage de ces surfaces. En effet, contrairement au PE greffé PI, il n'y a pas de liaisons covalentes entre les PI et la matrice de PE. L'irradiation *via* le faisceau d'électron permet de créer de nouvelles liaisons au sein des chaînes de PE mais nous n'avons pas la preuve qu'elle en crée avec les PI.

C.2.1 Essais d'adhésion

Les tests d'adhésion sont réalisés avec *S. aureus* dans l'eau distillée pendant 3 h à 37°C avec une suspension bactérienne à environ 10^6 UFC.mL⁻¹. Les résultats présentés sur la Figure IV-23 sont normalisés pour une solution à 10^6 UFC.mL⁻¹ précisément et sont la moyenne de quatre essais différents sur les films PE MM témoin et PE MM 10%, et de deux essais différents sur le film PE MM 30%. Comme précédemment, l'efficacité du décrochage aux ultrasons est confirmée par l'observation majoritaire de champs noirs.

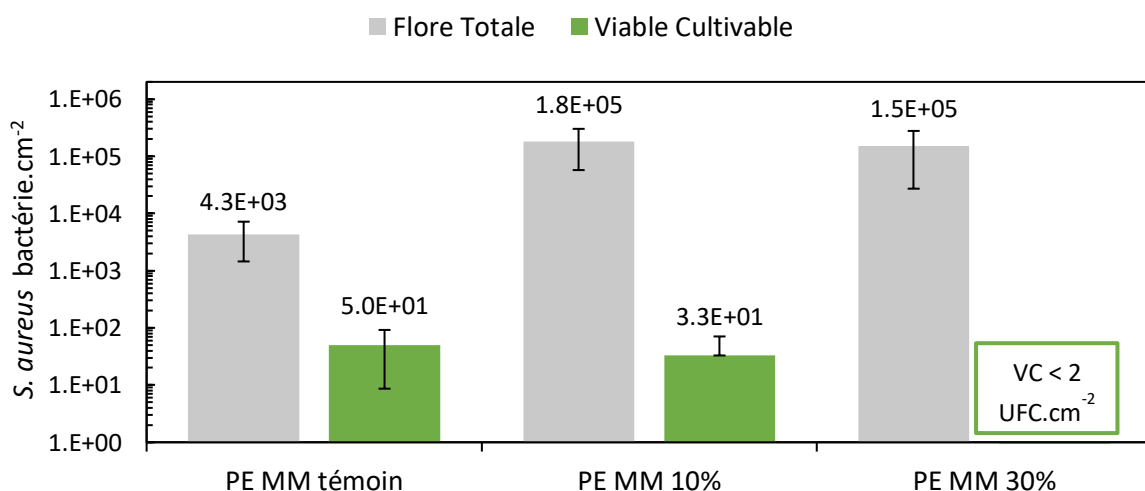


Figure IV-23 : Dénombrement sur *S. aureus* en eau déionisée de la flore totale et des bactéries viables cultivables adhérentes sur les films de PE MM témoin, 10% (n = 4) et 30% (n = 2)

Deux résultats significatifs peuvent être soulignés sur ces essais. La flore totale est bien plus importante sur les PE MM 10% et 30% (ceux possédant du PI 6-6) que sur le PE témoin MM. L'écart entre la quantité de bactéries viables cultivables adhérentes par rapport à la flore totale est plus important, et de manière significative, sur les films PE MM 10% et 30% que sur le film PE MM témoin. En effet, l'écart est de 1,9 ; 3,7 et 5,7 log bactérie.cm⁻² pour les PE MM témoin, 10% et 30% respectivement. Ces deux observations suggèrent donc que l'incorporation du PI dans la matrice de PE confère à la fois un effet pro-adhésif et antibactérien aux films. Il faut noter que, de nouveau, l'écart entre la flore totale et le dénombrement du viable cultivable sur le témoin est important à cause de l'hétérogénéité de l'adhésion et la difficulté de manipulation des échantillons. Cependant, l'effet antibactérien est tellement important dans le cas des PE MM que leur efficacité par rapport au témoin est indéniable. Les pourcentages d'efficacité sont de 99,98% et 99,9998% sur les PE MM 10% et 30% respectivement. Dans le cas du film PE MM 30%, il s'agit même d'un effet bactéricide puisque presque aucune bactérie vivante n'est retrouvée dans le dénombrement du viable cultivable après l'exposition à ce film. Il faut néanmoins vérifier que cet effet important n'est pas dû à un éventuel relargage des PI.

Le film de PE MM 10% a également été évalué sur les 10 souches du projet BRICAPAC. Comme pour les PE greffé PI, l'effet pro-adhésif est souche-dépendant et la capacité de piège du PE MM 10% cible majoritairement des bactéries pathogènes et d'altérations (Tableau IV-9). L'incorporation des PI dans les films de PE a conféré une propriété de piège à bactéries ciblé à ces surfaces. Ceci est une propriété très intéressante dans le cadre de la réalisation d'emballages alimentaires afin de limiter la prolifération des flores pathogènes et d'altérations sur les aliments tout en conservant la flore positive utile par exemple pour une bonne maturation de la viande.

Tableau IV-9 : récapitulatifs de l'effet pro-adhésif du PE MM 10% sur les 10 souches sauvages du projet BRICAPAC

Catégorie	Noms de la souche	PE MM 10%
Pathogènes	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Effet pro-adhésif
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Altérations	<i>Pseudomonas</i> sp.	Effet pro-adhésif
	<i>Brochotrix</i>	Effet pro-adhésif
	<i>Serratia</i> sp.	Effet pro-adhésif
Lactiques	<i>Lactobacillus casei</i>	
	<i>Lactobacillus sakei</i>	
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	<i>Lactococcus lactis</i>	

Pour mettre en évidence la présence de relargage, les dénombrements des surnageants des tests d'adhésion ont été effectués. Les dénombrements des bactéries viables cultivables dans les surnageants d'adhésion sont présentés sur la Figure IV-24.

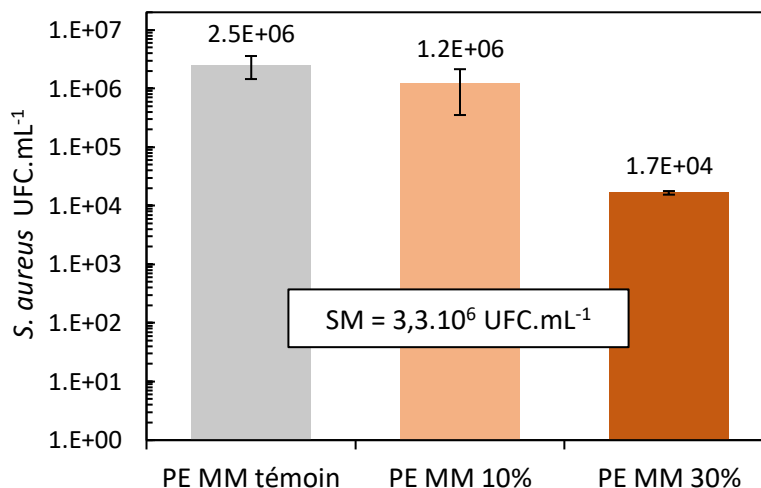


Figure IV-24 : Dénombrement des surnageants d'adhésion de *S. aureus* en eau déionisée des films PE MM témoin, 10% ($n = 3$) et 30% ($n = 2$) (SM =Suspension Mère contaminante)

Une diminution importante de la quantité de bactérie viable cultivable dans le surnageant par rapport à la suspension mère contaminante (SM) est observée dans le cas du film de PE MM 30%. Une légère diminution est aussi perceptible dans le cas du PE MM 10% mais celle-ci n'est pas significative (Student, p -valeur > 0,05). Un relargage est donc avéré dans le cas du film avec la concentration la plus importante en PI. Il est probable que dans le cas du PE MM 30%, la réticulation des films n'a pas été suffisante pour empêcher le relargage d'une partie des PI. Ces essais vont être complétés avec une étude de cytotoxicité afin d'évaluer la toxicité potentielle des matériaux et du relargage.

C.2.2 Tests de cytotoxicité

Comme pour les essais sur les PE greffés PI, les essais de cytotoxicité ont été effectués d'une part, dans notre laboratoire sur des tapis cellulaires de fibroblaste de souris (L929) après une exposition de 48 h aux films PE MM, et d'autre part, dans un laboratoire externe sur des épidermes de peau humains reconstruits (Skin+) après une exposition de 24 h aux films extrudés. Les essais ont été répétés sur trois matériaux distincts pour chacun des tests. Les détails expérimentaux des méthodes sont fournis en Annexe A (p. 217).

Comme les films PE MM flottent au-dessus des tapis cellulaires dans les puits lors des tests sur les L929, il est donc possible d'évaluer le relargage avec ces essais (Figure IV-25).

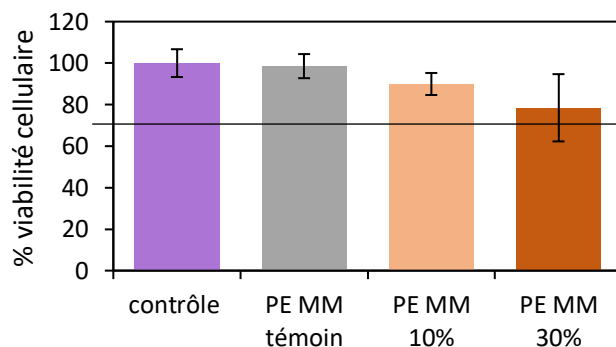


Figure IV-25 : Résultats de cytotoxicité sur L929 pour les PE MM témoin, 10% et 30% ($n = 3$)

Les essais n'indiquent pas de cytotoxicité des PE MM témoin et PE MM 10% puisque la viabilité cellulaire est au-dessus de 70%. Dans le cas du le PE MM 30%, la moyenne est aussi au-dessus de 70%, mais il faut noter que l'écart type est plus important sur cet essai et que le seuil de cytotoxicité est compris dans l'écart-type des mesures. Un test de Student sur les données a permis de montrer que la différence n'est pas significative entre le contrôle et le film PE MM témoin mais qu'elle l'est entre le contrôle et les films PE MM 10% et 30% (p -valeur = 0,04 et p -valeur = 0,006 respectivement). Cette différence est encore plus significative dans le cas du PE MM 30%. Comme lors de l'évaluation des surnageants, cet essai atteste aussi de la présence d'un relargage proportionnelle à la concentration de PI dans le film, et celui-ci peut générer une cytotoxicité dans le cas du film PE MM 30%. Lors de l'étude en solution, le PI 6-6 était cytotoxique sur les L929 à partir de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, le relargage observé pour le film PE MM 30% est donc légèrement inférieur mais proche de cette valeur.

Pour les essais sur les épidermes humains reconstruits, les films de PE MM sont en contact direct avec les épidermes (Figure IV-26).

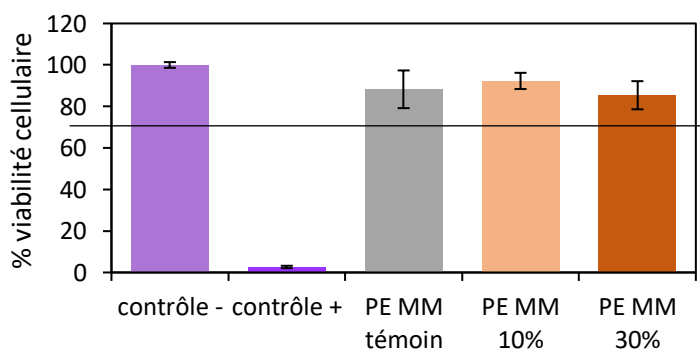


Figure IV-26 : Résultats de cytotoxicité sur épidermes humains reconstruits pour les PE MM témoin, 10% et 30% ($n = 3$)

Les essais n'indiquent pas de cytotoxicité des PE MM car les viabilités cellulaires sont au-dessus de 70%. Les pourcentages de viabilité cellulaire ne sont cependant pas comparables à

celui du contrôle négatif, même dans le cas du PE MM témoin qui ne contient pas de PI 6-6 (p-valeur < 0,05 dans tous les cas). Les résultats de ces essais suggèrent donc que le témoin MM provoque aussi une diminution de la viabilité cellulaire. Pourtant aucune diminution significative sur le témoin n'avait été constaté lors des essais de cytotoxicité sur les cellules L929 alors qu'elles sont plus sensibles à la cytotoxicité que les épidermes reconstruits. De plus, les tests de Student montrent aussi qu'il n'y a pas de différence significative entre le PE MM témoin et les PE MM 10% et 30% (p-valeur > 0,05 dans les deux cas). Cette diminution de viabilité cellulaire sur le PE MM témoin est donc probablement due à des erreurs expérimentales et au très petit écart type observé sur le contrôle négatif. Des répétitions supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. L'absence de cytotoxicité du PE MM 30% sur les épidermes humains par rapport aux cellules L929 peut aussi s'expliquer par la plus grande fragilité des cellules L929. Les L929 sont des tapis cellulaires monocouche alors que les épidermes humains reconstruits sont des systèmes multicouches (au moins 5). Ceci rend les épidermes humains reconstruits moins sensible à la toxicité que les cellules L929.

Au vu des résultats de microbiologie et de cytotoxicité, la présence d'un relargage pour des chargements importants en PI (PE MM 30%) est indéniable. Des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si celui-ci peut être nocif pour l'Homme sur de plus longues périodes d'exposition. Toutefois, le PE MM 10% ne s'est pas révélé cytotoxique dans les conditions des deux tests et il possède des propriétés antibactériennes et pro-adhésives relativement efficaces par rapport au PE MM témoin. Pour ce type de matériaux extrudés, il paraît donc préférable de limiter la concentration en PI dans la couche externe du film à 10%.

C.3 Comparaison entre les PE greffés PI 6-6 et MM PI 6-6

La comparaison de l'écart entre la flore totale et les bactéries viables cultivables adhérentes ($\Delta(\log FT - \log VC)$) des surfaces de PE greffé PI 6-6 et PE MM PI 6-6 ainsi que leurs témoins respectifs sont regroupées dans le Tableau IV-10.

Tableau IV-10 : Ecart entre les flores totales (FT) et la bactéries viables cultivables adhérentes (VC) pour les surfaces de PE greffés PI 6-6 (PE témoin n = 3 ; PE PI 6-6 n = 2) et PE MM PI 6-6 (PE MM témoin et 10% n = 4 ; PE MM 30% n = 2)

Surfaces	$\Delta(\log FT - \log VC)$ Eau déionisé	Surfaces	$\Delta(\log FT - \log VC)$ Eau déionisée
PE témoin	2,2 ± 0,8	PE MM témoin	1,9 ± 0,5
PE PI 6-6	1,6 ± 0,3	PE MM 10%	3,7 ± 0,6
		PE MM 30%	5,7 ± 0,4

L'écart $\Delta(\log FT - \log VC)$ est bien plus important dans le cas des films de PE MM 10% et 30% que du PE greffé PI 6-6, ce qui démontre une meilleure efficacité antibactérienne de ces PE MM. L'insertion du PI 6-6 dans la matrice dans le cas des MM permet d'introduire des quantités de PI importantes qui ne pourront jamais être atteintes par la méthode de greffage. Cette quantité plus importante joue bien évidemment sur l'efficacité des surfaces finales. Il est à noter que l'écart $\Delta(\log FT - \log VC)$ est équivalent sur les deux surfaces témoins. Ces deux témoins ont été fabriqués sur la même ligne pilote mais avec des granulés de PE basse densité différents.

Les potentiels zêta ont été mesurés sur le film de PE greffé PI 6-6, les films de PE MM 10% et 30% ainsi que les films de PE témoins. Les mesures à pH 4 et 5,5 sont indiquées sur la Figure IV-27.

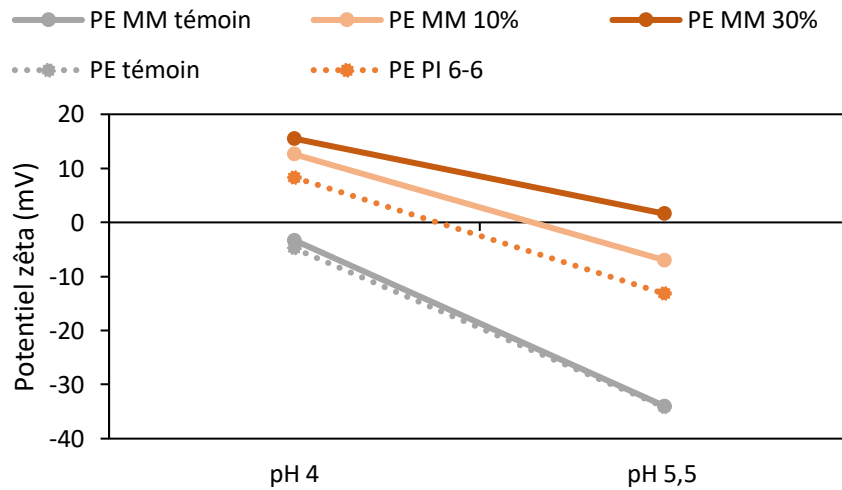


Figure IV-27 : Evolution du potentiel zêta en fonction du pH pour les surfaces de PE greffées PI 6-6 et PE MM

Sur les deux valeurs de pH, les PE MM 10% et 30% ont des potentiels zêta supérieurs à celui du PE MM témoin. Ceci témoigne d'une quantité de charges positives plus importante sur les films avec les MM PI 6-6. L'apparition de charges positives en surface des PE MM 10% et 30% démontre la migration réussie des PI de la matrice vers la surface du film. A pH 4, le potentiel zêta du PE greffé PI 6-6 est de 8,3 mV alors qu'il est de 12,3 mV pour le PE MM 10% et de 15,5 mV pour le PE MM 30%. Ces mesures attestent en effet que les surfaces de PE MM 10% et 30% possèdent un peu plus de charges positives en surface que le PE greffé PI 6-6. La présence de plus de charges positives provient probablement d'une densité de chaînes PI 6-6 en surface plus importante, car les quantités incorporées par le procédé de mélange-maître sont plus importantes que par greffage. D'autre part, les PI 6-6 utilisés pour réaliser le mélange-maître ont été synthétisés en solution ($M_n = 8\,200\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Il est donc également probable que cette longueur de chaîne soit supérieure à celle des PI polymérisés à partir des surfaces. Les PE

témoin et PE MM témoin ont des potentiels zêta identiques à pH 5,5, -34,2 mV et -34,0 mV respectivement, et très proches à pH 4, -4,8 mV et -3,3 mV respectivement. Bien que les formulations (granulés composant la matrice) soient différents, on retrouve des témoins similaires en ce qui concerne les propriétés de l'extrême surface de ces matériaux.

D. Conclusions et perspectives

Les trois méthodes mises en œuvre dans ce chapitre, que ce soit par greffage, impression ou extrusion en masse, ont toutes permis le greffage ou l'incorporation de PI sur des surfaces de PE. L'efficacité des surfaces antibactériennes ainsi créées et leur cytotoxicité sont néanmoins dépendantes de la méthode employée.

La transposition du procédé développé sur le verre au PE a permis de créer des surfaces non cytotoxiques et non relargantes dans les conditions des tests. Les essais de microbiologie démontrent de bonnes propriétés pro-adhésives des PE greffés PI. Cependant, il a été difficile d'évaluer correctement le pouvoir antibactérien de ces PE modifiés à cause de l'incertitude générée lors du dénombrement de la flore totale sur le PE témoin. Les pourcentages d'efficacité des verres et des PE greffés PI sont similaires (94% pour le PI 3-3 et 98% pour le PI 6-6) mais il faut vérifier que cette diminution, dans le cas des PE, est bien due à un effet antibactérien et non de la perte expérimentale. Suite aux essais sur les 10 souches du projet BRICAPAC, la propriété pro-adhésive des PE greffés PI s'est avérée être souche-dépendante. En particulier, les PE greffés PI ont piégé plus de souches pathogènes et d'altération que de lactiques (souches positives), ce qui est une propriété très intéressante pour la création d'emballages alimentaires antibactériens. De plus, dans les essais d'adhésion de ces travaux, les PE greffés PI piégeaient 10^5 bactérie.cm⁻² sur une suspension bactérienne à 10^6 UFC.mL⁻¹ en l'espace de 3 h. Or la flore bactérienne des aliments est de l'ordre de 10^2 - 10^3 bactérie.cm⁻², les surfaces de PE greffés PI ne seraient donc pas saturées rapidement et pourraient piéger de nombreuses bactéries sur une période prolongée. De tels surfaces pièges pourraient également être employées dans le cas de procédés de nettoyage ou de filtration pour capter certaines populations de bactéries problématiques par rapport aux autres. La poursuite de ce travail devra commencer par une répétition des essais en eau physiologique pour confirmer la tendance observée et statuer sur l'importance de l'effet antibactérien. Pour compléter cette étude, des analyses de biologie moléculaire permettraient également de quantifier les bactéries viables non cultivables et mortes après l'exposition aux PE modifiés. Par la suite, il serait intéressant d'augmenter les

concentrations en monomères de départ lors de la polyaddition en surface des PI afin d'augmenter la taille des chaînes polymères greffés comme démontré en solution.

Le PE imprimé avec l'encre PI 6-6 vinylique possède la même problématique que les PE greffés PI, à savoir des propriétés pro-adhésives avérées mais pas d'effet antibactérien marqué par rapport au PE témoin. De plus, ce PE modifié avec l'encre est également non-cytotoxique et aucun relargage n'a été mis en évidence sur les différents essais microbiologiques et de culture cellulaire. Il serait nécessaire de comparer l'encre PI à une encre référence pour s'assurer que l'éventuel effet observé est bien dû à l'incorporation du PI. Afin de renforcer l'effet antibactérien, il est possible d'augmenter la quantité de PI dans la formulation mais seulement dans une moindre mesure. En effet, la solubilité du PI dans le mélange de solvant eau/éthanol (1:2) est limitée. Il est aussi difficile d'augmenter la proportion d'eau dans la formulation car cela diminue d'une part, la solubilité des autres composants qui sont plutôt solubles dans l'éthanol, et modifie d'autre part, la rhéologie de l'encre, ce qui implique une nouvelle optimisation des paramètres d'impression.

Les films de PE réalisés par l'extrusion d'un mélange-maître (MM) contenant différentes quantités de PI 6-6 se sont révélés à la fois pro-adhésifs et fortement antibactériens, et même bactéricide dans le cas du PE MM le plus concentré en PI. De la même manière que pour les PE greffés PI, des essais d'adhésion avec les 10 souches sauvages du projet BRICAPAC ont mis en évidence que l'effet pro-adhésif du PE MM 10% est souche-dépendant. Cet effet vise majoritairement des souches pathogènes et d'altérations ce qui est particulièrement intéressant dans le contexte de cette étude. Appliqué en tant qu'emballage alimentaire, le PE MM 10% pourrait limiter la prolifération de la flore indésirable tout en conservant les flores d'intérêt technologiques (« positives »). Les essais de microbiologie ont mis en évidence un relargage du PI 6-6 incorporé dans le cas du PE MM 30%. Cependant, les tests cytotoxiques effectués mettent en évidence un effet toxique moindre de ce relargage dans le cas des cellules L929 et une absence de toxicité sur les épidermes humains. Il est donc nécessaire de faire des tests plus poussés dans un laboratoire externe avec des essais normés pour des surfaces avec un contact alimentaire. Une possibilité envisagée pour limiter le relargage des PI est de le lier à la matrice en réalisant un copolymère à bloc PE-PI. La partie PI migrerait en surface pour conférer des propriétés antibactériennes et la partie PE resterait dans la matrice et serait liée à celle-ci grâce au procédé de réticulation. La réalisation de ce copolymère peut être envisagé par des stratégies de chimie click^{11,12} comme la réaction azoture/alcyne^{13,14} (Figure IV-28, a) et la réaction thiol/alcyne^{15,16} (Figure IV-28, b). La voie par chimie click azoture/alcyne a été explorée, et

bien que les deux blocs aient pu être synthétisés, le copolymère à bloc PE-PI n'a pas été obtenu. La voie par chimie click thiol/alcyne semble plus prometteuse et pourrait être explorée dans la suite du projet.

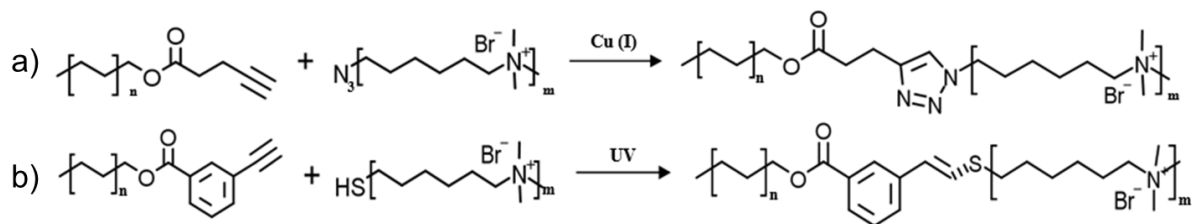


Figure IV-28 : Stratégie de synthèse d'un copolymère à bloc PE-PI par chimie click a) azoture/alcyne et b) thiol/alcyne

Bibliographie

- (1) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* **2007**, *318* (5849), 426–430. <https://doi.org/10.1126/science.1147241>.
- (2) Sileika, T. S.; Kim, H.-D.; Maniak, P.; Messersmith, P. B. Antibacterial Performance of Polydopamine-Modified Polymer Surfaces Containing Passive and Active Components. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2011**, *3* (12), 4602–4610. <https://doi.org/10.1021/am200978h>.
- (3) Waite, J. H. The Adhesive Proteins Secreted by Mussels Are the Inspiration behind a Versatile Approach to the Surface Modification of a Wide Range of Inorganic and Organic Materials, Resulting in the Fabrication of Multifunctional Coatings for a Variety of Applications. *Nature Materials* **2008**, *7*, 8-9.
- (4) Schanze, K. S.; Lee, H.; Messersmith, P. B. Ten Years of Polydopamine: Current Status and Future Directions. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2018**, *10* (9), 7521–7522. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b02929>.
- (5) Ryu, J. H.; Messersmith, P. B.; Lee, H. Polydopamine Surface Chemistry: A Decade of Discovery. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2018**, *10* (9), 7523–7540. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b19865>.
- (6) Xi, Z.-Y.; Xu, Y.-Y.; Zhu, L.-P.; Wang, Y.; Zhu, B.-K. A Facile Method of Surface Modification for Hydrophobic Polymer Membranes Based on the Adhesive Behavior of Poly(DOPA) and Poly(Dopamine). *Journal of Membrane Science* **2009**, *327* (1–2), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.11.037>.
- (7) Ryou, M.-H.; Lee, Y. M.; Park, J.-K.; Choi, J. W. Mussel-Inspired Polydopamine-Treated Polyethylene Separators for High-Power Li-Ion Batteries. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (27), 3066–3070. <https://doi.org/10.1002/adma.201100303>.
- (8) Decker, C. Polymérisation sous rayonnement UV. *Techniques de l'ingénieur* **2000**, 19.
- (9) Dong, B.; Jiang, H.; Manolache, S.; Wong, A. C. L.; Denes, F. S. Plasma-Mediated Grafting of Poly(Ethylene Glycol) on Polyamide and Polyester Surfaces and Evaluation of Antifouling Ability of Modified Substrates. *Langmuir* **2007**, *23* (13), 7306–7313. <https://doi.org/10.1021/la0633280>.
- (10) Ekblad, T.; Bergström, G.; Ederth, T.; Conlan, S. L.; Mutton, R.; Clare, A. S.; Wang, S.; Liu, Y.; Zhao, Q.; D'Souza, F.; Donnelly, G. T.; Willemsen, P. R.; Pettitt, M. E.; Callow, M. E.; Callow, J. A.; Liedberg, B. Poly(Ethylene Glycol)-Containing Hydrogel Surfaces for Antifouling Applications in Marine and Freshwater Environments. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (10), 2775–2783. <https://doi.org/10.1021/bm800547m>.
- (11) Sumerlin, B. S.; Vogt, A. P. Macromolecular Engineering through Click Chemistry and Other Efficient Transformations. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1-13. <https://doi.org/10.1021/ma901447e>
- (12) Qin, A.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. Click Polymerization: Progresses, Challenges, and Opportunities. *Macromolecules* **2010**, *43* (21), 8693–8702. <https://doi.org/10.1021/ma101064u>.
- (13) Drockenmuller, E.; Colinet, I.; Dameron, D.; Gal, F.; Perez, H.; Carrot, G. Efficient Approaches for the Surface Modification of Platinum Nanoparticles via Click Chemistry. *Macromolecules* **2010**, *43* (22), 9371–9375. <https://doi.org/10.1021/ma102188d>.
- (14) Castro, V.; Rodr, H. CuAAC: An Efficient Click Chemistry Reaction on Solid Phase. *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18*, 1-14. <https://doi.org/10.1021/acscmbosci.5b00087>.
- (15) Sprafke, J. K.; Spruell, J. M.; Mattson, K. M.; Montarnal, D.; McGrath, A. J.; Pöttsch, R.; Miyajima, D.; Hu, J.; Latimer, A. A.; Voit, B. I.; Aida, T.; Hawker, C. J. Revisiting

- Thiol-Yne Chemistry: Selective and Efficient Monoaddition for Block and Graft Copolymer Formation. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2015**, *53* (2), 319–326. <https://doi.org/10.1002/pola.27345>.
- (16) Nair, D. P.; Podgórski, M.; Chatani, S.; Gong, T.; Xi, W.; Fenoli, C. R.; Bowman, C. N. The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (1), 724–744. <https://doi.org/10.1021/cm402180t>.

Conclusion Générale

La biocontamination des surfaces est un enjeu sanitaire majeur d'actualité qui va bien au-delà du contexte des emballages alimentaires. Le développement de stratégies pour maîtriser cette biocontamination reste une priorité du fait de la prédominance des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. L'objectif principal de ce travail était la réalisation de surfaces avec des propriétés antibactériennes à partir du greffage covalent de polymères bactériostatiques et/ou bactéricides. Avec une stratégie bioactive « contact killing » par rapport à une stratégie « release killing », on s'assure de l'absence de relargage des composés dans l'environnement. Dans un premier temps, le lien entre structure et propriétés biologiques des polymères en solution a été étudié afin de choisir la gamme de polymère à greffer. Nous avons ensuite greffé ces polymères sur des surfaces modèles telles que le verre et le wafer de silicium. Le succès du greffage et la conservation des propriétés antibactériennes des polymères une fois greffés ont pu être attestés par des analyses XPS et des essais d'adhésion en microbiologie. Le lien entre structure des polymères en surface et propriétés biologiques a été étudié de manière approfondie par des mesures d'énergies de surface et par réflectivité des rayons X et des neutrons. Enfin, une fois que le procédé était maîtrisé et connu sur des surfaces modèles, nous l'avons appliqué à un matériau très utilisé dans l'emballage alimentaire : le polyéthylène. Les films de PE greffés n'ont cependant pas montré un effet antibactérien marqué comme sur le verre, nous avons donc développé en parallèle deux procédés pour greffer/incorporer de plus grande quantité de polymère en surface. Le premier consiste à réaliser un dépôt par impression jet d'encre avec une encre réticulable et le second implique une insertion du polymère en masse par extrusion au moment de la mise en œuvre du film.

Le choix des polymères antibactériens s'est porté sur les polyionènes (PI) qui, de par le contrôle précis du ratio charges/hydrophobie *via* leurs structures, permettent de moduler l'efficacité du pouvoir bactériostatique et/ou bactéricide.^{1,2} La variation de ce ratio a été effectuée à travers la synthèse de deux gammes de PI, aliphatiques et éthers, avec des longueurs et des natures variées pour les segments inter-ammoniums quaternaires. A l'issue des études microbiologiques (CMI), la gamme aliphatique était plus bactériostatique que la gamme éther, mettant donc en évidence la nécessité de la présence de segments hydrophobes, combinée aux charges positives, pour engendrer une perturbation efficace des membranes bactériennes.³ De plus, il est apparu que ce pouvoir antibactérien est d'autant plus important que le segment aliphatique est long. A

contrario, la gamme éther est moins cytotoxique de par la présence de segments plus hydrophiles. L'évaluation de ce pouvoir antibactérien sur 10 souches sauvages a également mis en évidence que celui-ci est souche-dépendant. Un point important à souligner est que la gamme aliphatique inhibe majoritairement des souches pathogènes et d'altération par rapport à des bactéries lactiques. A titre d'exemple, à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, le PI 6-6 inhibe la croissance de 4 souches pathogènes et d'altérations sur 6, sans inhiber les 4 souches lactiques testées. Enfin, la masse molaire de ces PI est aussi un paramètre à prendre en compte. Pour ce qui concerne la cytotoxicité, on ne constate pas de différence sur la gamme de masses molaires étudiées, mais pour le pouvoir antimicrobien, il s'avère que les masses molaires les plus petites de la gamme sont les plus bactériostatiques. Ceci est probablement lié à une facilité de pénétration des chaînes des petites masses au travers des différentes parois qui constituent les membranes des bactéries. En modulant le ratio charges/hydrophobie, nous avons pu obtenir des PI qui se sont montrés à la fois non-cytotoxiques et bactériostatiques pour des concentrations particulières sur trois souches (*S. aureus*, *E. coli*, *L. lactis*), aussi bien des bactéries à Gram + qu'à Gram -.

A l'issue de cette étude en solution, nous avons choisi de greffer la gamme de PI aliphatiques sur des surfaces modèles de verre. Une nouvelle stratégie de greffage a été mise au point et combine un dépôt de polydopamine, une polymérisation induite par les sels de diazonium et une polyaddition en surface. Les analyses XPS et les mesures de potentiel zêta ont démontré le succès du greffage. Les tests microbiologiques sur ces surfaces ont mis en évidence la conservation du pouvoir antibactérien des PI une fois greffés, mais aussi le même gradient d'efficacité avec la longueur du segment aliphatique. De plus, des essais complémentaires en microbiologie et en culture cellulaire (menés en interne et en externe) attestent de l'absence de relargage et de cytotoxicité de ces verres modifiés dans les conditions des tests. La suite de l'étude s'est alors portée sur la compréhension de la meilleure efficacité des verres greffés PI avec des segments aliphatiques longs. Dans un premier temps, nous avons évalué les énergies de surface et d'hydratation par des mesures d'angles de contact. Il s'est avéré que l'énergie d'hydratation augmente avec la longueur du segment aliphatique, ce qui suggère une plus grande flexibilité des chaînes avec les segments aliphatiques les plus longs. Il s'agirait potentiellement d'une conformation différente en surface pour les chaînes PI 6-12 par rapport aux chaînes PI 3-3 qui pourrait expliquer une meilleure efficacité antibactérienne. Une étude récente a d'ailleurs porté sur l'influence de la flexibilité des chaînes des PI en solution sur l'efficacité antibactérienne.⁴

La réflectivité des neutrons est une technique particulièrement bien adaptée à l'étude de chaînes polymères greffées en surface. L'adaptation du procédé de greffage a cependant été nécessaire pour travailler sur des wafers de silicium mais aussi pour diminuer la rugosité des couches pour l'observation. L'une des sous-couches polymères (PMADAME) a notamment été retirée afin de limiter le gonflement global et de mieux observer les variations sur la couche PI. Les épaisseurs à sec des couches PI ont été déterminées avec précision par des mesures en réflectivité des rayons X et sont typiquement comprises entre 20 et 60 Å avec 10 à 25 Å de rugosité. Les mesures en réflectivité des neutrons, dans des conditions hydratées, ont quant à elles, permis de mesurer les profils de densité de longueur de diffusion des couches au niveau moléculaire et d'évaluer que l'extension des chaînes dans le D₂O est comprise entre 100 et 200 Å. Il est alors intéressant de constater que des chaînes de l'ordre de la dizaine de nanomètre suffisent à perturber l'adhésion de bactéries au niveau micrométrique. La faible épaisseur des couches couplée à une rugosité importante empêchent cependant de conclure sur une différence de conformation en fonction de la longueur du segment aliphatique sur l'ensemble de la gamme. Néanmoins, sur des échantillons d'épaisseurs comparables à sec, le gonflement en conditions hydratées de la couche PI est plus important dans le cas du PI 3-3, avec des chaînes de faibles masses molaires, que dans le cas du PI 6-9, avec des chaînes de masses molaires plus élevées. Ce résultat suggère donc que les chaînes seraient plus « tendues » pour la couche PI 3-3, mais des études complémentaires seront nécessaires afin de le confirmer.

Enfin, trois stratégies innovantes ont été développées pour conférer des propriétés antibactériennes à des films de polyéthylène (PE) *via* l'ajout de PI. La première consiste à transposer le protocole de greffage effectué sur le verre. Ceci a permis la réalisation de films de PE fortement pro-adhésifs, avec une activité antibactérienne à confirmer et non-cytotoxiques dans les conditions des tests en interne et en externe. Des mesures de potentiel zêta ont mis en évidence la présence de PI mais aussi l'existence potentielle d'une différence de densité de greffage ou de conformation des chaînes par rapport aux greffages sur le verre. Cette différence peut provenir de la plus faible réactivité que possèdent les films de PE. Les propriétés pro-adhésives de ces films de PE en font de bons candidats pour des emballages alimentaires, et particulièrement l'adhésion sélective entre des souches pathogènes ou d'altération et des souches d'intérêt technologiques démontrée sur les 10 souches sauvages du projet BRICAPAC. De plus, même si les bactéries ne sont que faiblement perturbées par l'éventuel effet antibactérien, cela influence la physiologie de celles-ci et peut impacter leurs aptitudes à former un biofilm sur la surface.

Conclusion Générale

La deuxième stratégie s'est orientée sur la création d'une encre réticulable sous U.V. à base de PI. La réalisation du revêtement sur les films de PE s'est ensuite faite par le procédé d'impression jet d'encre, qui est facilement industrialisable et adapté à la fonctionnalisation de surfaces de plus grandes dimensions. L'encre mise au point a conféré des propriétés pro-adhésives importantes aux films de PE avec de probables propriétés antibactériennes. Le PE modifié avec l'encre s'est également révélé non-cytotoxique et non-relarguant dans les conditions des tests en interne et en externe, comme pour les PE greffés PI. Contrairement aux essais sur le verre, les activités antibactériennes des films PE modifiés (greffés PI et encre PI) n'ont pu être évaluées. En effet, le témoin (indispensable pour valider ces analyses) est du PE natif. Comme cette surface est hydrophobe, cela engendre une adhésion très faible et très hétérogène des bactéries. Ceci entraîne alors des incertitudes dans le dénombrement de la flore totale et donc dans l'évaluation du pouvoir antibactérien.

Dans une dernière stratégie, les PI ont été ajoutés en masse dans les films de PE par un procédé d'extrusion. Ces surfaces possèdent un effet pro-adhésif et un fort pouvoir bactériostatique voire bactéricide, mais il a été constaté la présence de relargage dans le cas du chargement le plus important en PI (PE MM 30%). L'étude de ce relargage a cependant mis en évidence sa non-cytotoxicité sur des épidermes humains (tests externes) mais sa potentielle cytotoxicité sur les cellules L929 (tests internes) incite à la prudence et à la réalisation d'essais supplémentaires. Le PE avec le plus faible chargement (PE MM 10%) s'est quant à lui révélé non-cytotoxique dans les conditions des deux essais (tests internes et externes), ce qui en fait un très bon candidat pour la poursuite des recherches sur un emballage alimentaire. De la même manière que pour les PE greffés PI, le pouvoir pro-adhésif du PE MM 10% est souche-dépendant, avec une adhésion préférentielle pour les souches pathogènes et d'altération par rapport aux bactéries lactiques.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont fait l'objet d'une publication,¹ « Robust Grafting of Polyionenes : New Potent and Versatile Antimicrobial Surfaces » publié en 2020 dans *Macromolecular Bioscience* (image issue de ce travail sélectionnée pour faire la couverture du journal), mais aussi de deux brevets français, l'un déposé en 2019 avec une extension internationale,⁵ « Procédé de préparation d'une surface à activité bactériostatique et surface ainsi préparée », et l'autre soumis en 2020 qui est en cours de dépôt,⁶ « Procédé de préparation d'une surface polymère à activité bactériostatique sur films plastiques au moyen d'une encre réticulée sous recuit photonique ».

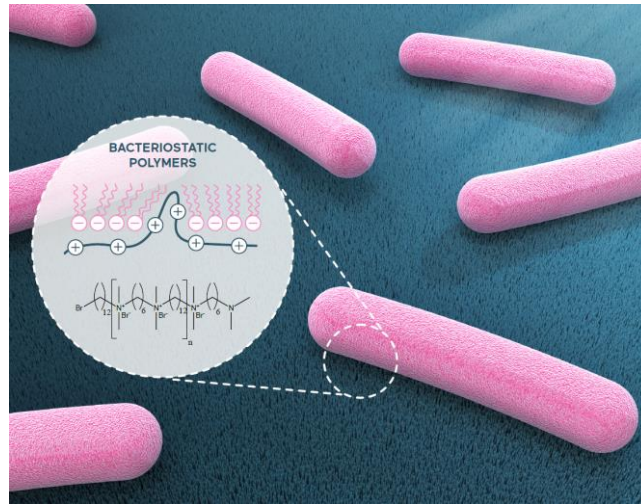


Figure : Image issue de la publication Bernardi et al.¹ Sélectionnée pour faire la couverture du journal *Macromolecular Bioscience* (crédit Image Marion Bernardi)

Afin de poursuivre les études développées lors de cette thèse et d'approfondir les connaissances sur le lien entre structures et propriétés biologiques des surfaces antibactériennes à base de PI, plusieurs perspectives de travail sont envisageables.

La synthèse en solution de PI avec des segments aliphatiques plus longs (PI 9-9, PI 12-12) peut être explorée pour vérifier la possible présence d'un seuil dans l'amélioration du pouvoir bactériostatique par la variation de la longueur du segment. La nature des segments peut également être variée avec des cycles aromatiques pour avoir des segments plus hydrophobes mais aussi plus rigides. En effet, une étude avec des PI possédant des cycles aromatiques a démontré leur grande efficacité et, en particulier, l'absence de développement de résistance sur les souches testées.⁷ Ce point important pourra faire l'objet d'expérience sur les PI aliphatiques et éthers de notre étude en exposant à de multiples reprises une souche à des doses inférieures à la CMI des PI puis à la CMI de ceux-ci pour vérifier l'absence de résistance.

Les verres greffés PI ont démontré de bonnes propriétés antibactérienne mais les études n'ont été menées que dans le cas d'une utilisation avec une faible durée de vie. Si on souhaite utiliser ces surfaces modifiées sur de longues périodes, la surface finira inévitablement par être recouverte de bactéries et l'effet pro-adhésif et antibactérien sera alors obstrué. En effet, il a été démontré que les bactéries sont parfaitement capables de produire des biofilms sur des lits de bactéries mortes/inhibées.⁸ Il serait donc intéressant de vérifier si la réutilisation des verres greffés PI est possible après de multiples nettoyages pour s'assurer de la conservation du pouvoir antibactérien et de son efficacité. Afin de répondre aux interrogations sur l'impact de la conformation et de la flexibilité des chaînes sur les propriétés biologiques des PI, nous pourrions faire une étude en réflectivité des neutrons sur des films de Langmuir-Blodgett dans

Conclusion Générale

une interface air/liquide. Pour cela, il faudrait synthétiser un copolymère à bloc avec un bloc PI et un bloc hydrophobe comme du PE. Le bloc hydrophobe collapse à l'interface air/liquide tandis que le bloc hydrophile, le PI, gonfle dans le D₂O. On pourrait ainsi observer les variations de conformation des chaînes PI en s'affranchissant des problématiques de reproductibilité qu'induisent les greffages en surface. De plus, des analyses SEC-MALS, préalables à l'étude en neutrons, permettraient de connaître avec exactitude la masse molaire des chaînes étudiées.

Enfin, l'approche copolymère est aussi envisageable pour l'extrusion en masse des PI dans le PE. Un bloc PE permettrait une réaction plus efficace avec la matrice lors de la réticulation du film, afin d'empêcher le relargage tout en conservant les propriétés antibactériennes avec la migration du bloc PI en surface. La chimie click avec les réactions azoture/alcyne et thiol/alcyne semble envisageable pour réaliser ce copolymère à bloc PE-PI. Cependant, pour ces deux voies, le couplage peut être limité par la présence de charges sur le PI. Une autre voie possible serait la polymérisation du PI à partir d'un PE fonctionnalisé avec un groupe diméthylamine en bout de chaîne (Figure).

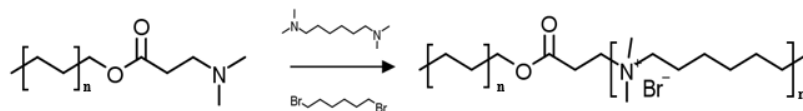


Figure : Stratégie de synthèse d'un copolymère à bloc PE-PI par polymérisation du PI sur un PE fonctionnalisé

Il serait également intéressant d'apporter plus de PI sur les surfaces de PE greffés en augmentant la concentration en monomères lors de l'étape de polyaddition. En effet, les études en solution et en réflectivité des neutrons ont montré qu'il était possible d'augmenter la masse molaire des PI et l'épaisseur des couches polymères greffées par ce procédé. Avec une plus grande quantité de PI en surface, l'effet antibactérien serait éventuellement plus marqué lors des essais d'adhésion. La poursuite des études sur les PE fonctionnalisés avec du PI doit également passer par l'évaluation de la présence et de la quantification du pouvoir antibactérien en surface. Des études en biologie moléculaire permettraient d'identifier les bactéries métaboliquement actives après l'exposition aux PE modifiés et ainsi de les dénombrer par rapport à celles exposées à un PE témoin. De plus, ces études apporteraient la réponse sur la nature de ce pouvoir antibactérien : est-il bactériostatique (bactéries vivantes inhibées) ou bactéricide (bactéries mortes) ?

Pour conclure ce manuscrit, il nous semble important de nous pencher sur l'avenir des surfaces antibactériennes d'une façon plus générale. Comme souligné dans le Chapitre I, différentes stratégies coexistent avec chacune leurs défauts (bactéries non tuées pour les surfaces antiadhésives, relargage des surfaces « release killing », saturation en bactéries des surfaces « contact killing ») et leurs qualités (respectivement : limitation de l'adhésion, fort effet antibactérien, absence de relargage). Le meilleur moyen pour tirer parti de chacune d'entre elles serait donc de se tourner désormais vers des surfaces multifonctionnelles. Afin d'augmenter l'efficacité antibactérienne dans le temps, Pissinis *et al.* ont combiné une approche « contact killing » en greffant de la pénicilline et une approche « release killing » en relarguant des ions Ag^+ depuis la surface.⁹ Une fois les stocks d'ions Ag^+ écoulés, c'est la pénicilline qui prend le relai pour inhiber les bactéries sur la surface. On peut aussi combiner des stratégies antiadhésives et « contact killing ». C'est ce qu'ont développé Paris *et al.* en greffant sur du PE haute densité, de l'acide hyaluronique et des peptides antimicrobiens.¹⁰ La couche de PE avec les acides limite l'adhésion des bactéries et les peptides peuvent tuer par contact les bactéries qui se fixent malgré tout sur la surface.

Une autre approche intéressante serait la création de surfaces antibactériennes « stimuli responsive » afin de déclencher le pouvoir antibactérien seulement en présence des bactéries. Ces matériaux sont de bonnes alternatives aux autres méthodes de revêtement bioactifs car ils peuvent produire leurs effets antibactériens dans des conditions spécifiques et donc de manière plus durable dans le temps. Les surfaces activées par la lumière avec des photosensibilisants greffés sont l'une de ces nouvelles méthodes.¹¹ Les photosensibilisants sont des molécules capables de produire un composé toxique (ions, radicaux ou oxygène singulet très réactif) sous l'effet de l'irradiation. Les membranes, les enzymes et les acides nucléiques sont ciblés par ces composés photogénérés, conduisant à la mort de la bactérie par un stress oxydant.

Bibliographie

- (1) Bernardi, S.; Renault, M.; Malabirade, A.; Debou, N.; Leroy, J.; Herry, J.; Guilbaud, M.; Arluison, V.; Bellon-Fontaine, M.; Carrot, G. Robust Grafting of Polyionenes: New Potent and Versatile Antimicrobial Surfaces. *Macromol. Biosci.* **2020**, 2000157. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000157>.
- (2) Mattheis, C.; Zheng, M.; Agarwal, S. Closing One of the Last Gaps in Polyionene Compositions: Alkylxyethylammonium Ionenes as Fast-Acting Biocides. *Macromolecular Bioscience* **2012**, *12* (3), 341–349. <https://doi.org/10.1002/mabi.201100316>.
- (3) Narita, T.; Ohtakeyama, R.; Nishino, M.; Gong, J. P.; Osada, Y. Effects of Charge Density and Hydrophobicity of Ionene Polymer on Cell Binding and Viability. *Colloid & Polymer Science* **2000**, *278* (9), 884–887.
- (4) Kopiasz, R. J.; Tomaszewski, W.; Kuźmińska, A.; Chreptowicz, K.; Mierzejewska, J.; Ciach, T.; Jańczewski, D. Hydrophilic Quaternary Ammonium Ionenes—Is There an Influence of Backbone Flexibility and Topology on Antibacterial Properties? *Macromol. Biosci.* **2020**, 2000063. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000063>.
- (5) Bernardi, S.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Carrot, G. Procédé de Préparation d'une Surface à Activité Bactériostatique et Surface Ainsi Préparée. PCT/FR2019/052921, **2019**.
- (6) Bernardi, S.; Guilbaud, M.; Hauquier, F.; Carrot, G. Procédé de Préparation d'une Surface Polymère à Activité Bactériostatique Sur Films Plastiques Au Moyen d'une Encre Réticulée Sous Recuit Photonique. FR2005148, **2020**.
- (7) Liu, S.; Ono, R. J.; Wu, H.; Teo, J. Y.; Liang, Z. C.; Xu, K.; Zhang, M.; Zhong, G.; Tan, J. P. K.; Ng, M.; Yang, C.; Chan, J.; Ji, Z.; Bao, C.; Kumar, K.; Gao, S.; Lee, A.; Fevre, M.; Dong, H.; Ying, J. Y.; Li, L.; Fan, W.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. Highly Potent Antimicrobial Polyionenes with Rapid Killing Kinetics, Skin Biocompatibility and in Vivo Bactericidal Activity. *Biomaterials* **2017**, *127*, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.027>.
- (8) Wang, Z.; Gong, X.; Xie, J.; Xu, Z.; Liu, G.; Zhang, G. Investigation of Formation of Bacterial Biofilm upon Dead Siblings. *Langmuir* **2019**, *35* (23), 7405–7413. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01962>.
- (9) Pissinis, D. E.; Benítez, G. A.; Schilardi, P. L. Two-Step Biocompatible Surface Functionalization for Two-Pathway Antimicrobial Action against Gram-Positive Bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2018**, *164*, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.057>.
- (10) Paris, J.-B.; Seyer, D.; Jouenne, T.; Thébault, P. Elaboration of Antibacterial Plastic Surfaces by a Combination of Antiadhesive and Biocidal Coatings of Natural Products. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *156*, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.025>.
- (11) Felgenträger, A.; Maisch, T.; Späth, A.; Schröder, J. A.; Bäuml, W. Singlet Oxygen Generation in Porphyrin-Doped Polymeric Surface Coating Enables Antimicrobial Effects on *Staphylococcus Aureus*. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (38), 20598–20607. <https://doi.org/10.1039/C4CP02439G>.

Chapitre V : Annexes

Tables des matières

Annexe A : Partie expérimentale.....	217
Annexe B : Spectres RMN ¹ H.....	245
Annexe C : CMI sur 10 souches sauvages dans le cadre du projet ANR BRICAPAC.....	251
Annexe D : Tests de cytotoxicité des PI sur la gamme 1 de concentration.....	252
Annexes E : Réflectivité des neutrons et des rayons X.....	253
Annexes F : Nouvelle mesure des épaisseurs dans le D ₂ O après les analyses.....	265
Bibliographie.....	266

Annexe A : Partie expérimentale

Synthèses en solution

Les réactifs proviennent de Sigma-Aldrich et les solvants de Carlo Erba Reagents. Sauf indication contraire, tous les réactifs et solvants ont été utilisés sans purification supplémentaire. L'ensemble des polymères synthétisés et leurs noms abrégés sont résumés dans le Tableau V-1.

Tableau V-1 : Nomenclature des PI synthétisés

Polyionène	Monomère Diamine	Monomère Dibrome/Dichlore
3-3	N,N,N',N'-tétraméthyl-1,3-diaminopropane	1,3 dibromopropane
6-6	N,N,N',N'-tétraméthyl-1,6-diaminohexane	1,6 dibromohexane
6-9	N,N,N',N'-tétraméthyl-1,6-diaminohexane	1,9 dibromononane
6-12	N,N,N',N'-tétraméthyl-1,6-diaminohexane	1,12 dibromododécane
et5-3	Bis[2-(N,N-diméthylamino)éthyl] ether	1,3 dibromopropane
et5-6	Bis[2-(N,N-diméthylamino)éthyl] ether	1,6 dibromohexane
et5-9	Bis[2-(N,N-diméthylamino)éthyl] ether	1,9 dibromononane
et5-12	Bis[2-(N,N-diméthylamino)éthyl] ether	1,12 dibromododécane
et5-et5	Bis[2-(N,N-diméthylamino)éthyl] ether	2-Chloroéthyl ether

Synthèse générale des polyionènes aliphatiques

Tous les composés sont introduits à l'aide d'une seringue dans un tricol de 100 mL sous atmosphère inerte surmonté d'un réfrigérant, dans l'ordre : le monomère diamine (0,054 mol), 50 mL de méthanol, le monomère dibrome (0,054 mol) et 10 mL de méthanol. Les quantités à introduire en fonction des monomères sont indiquées dans le Tableau V-2. Le mélange réactionnel, homogène et limpide, est chauffé à 65 °C pendant 16-17 h sous agitation (300 rpm). La réaction est arrêtée en mettant le ballon dans un bain d'eau froide. Le mélange obtenu est précipité dans 600 mL d'acétone. Le précipité est filtré sur Büchner puis séché sous vide pendant 2 h à 50 °C.

Tableau V-2 : Quantités des monomères par synthèses de PI aliphatiques

Polyionène	Monomère Diamine	Monomère Dibrome
PI 3-3	9 mL	5,5 mL
PI 6-6	11,5 mL	8,2 mL
PI 6-9	11,5 mL	10,9 mL
PI 6-12	11,5 mL	17,7 g

Particularité de la synthèse du PI 6-12 : Dans un tricol de 100 mL, surmonté d'un réfrigérant, le 1,12-dibromododécane (17,7 g, 0,054 mol) est mis à solubiliser avec 20 mL de DMF. Le

ballon est mis sous atmosphère inerte. Lorsque le 1,12-dibromododécane est partiellement solubilisé, on ajoute 30 mL de méthanol avec une seringue en verre. On peut chauffer légèrement le montage pour accélérer la dissolution du produit. Le N,N,N',N'-tétraméthyl-1,6-diaminohexane (11,5 mL, 0,054 mol) est introduit à l'aide d'une seringue, puis on ajoute 10 mL de méthanol. Le mélange réactionnel est chauffé à 65 °C pendant 16-17 h sous agitation (300 rpm). La réaction est arrêtée en mettant le ballon dans un bain d'eau froide. Le mélange obtenu, limpide et jaune clair, est précipité dans 600 mL d'acétone. Un solide marron clair, à la texture un peu collante, se forme au fond du bécher. On retire le surnageant du bécher et on remet 300 mL d'acétone. On agite le solide avec une spatule. L'opération est répétée 1 fois. On retire le surnageant et on met le solide, devenu plus clair, à sécher sous vide 1 h à température ambiante. Le solide est récupéré et écrasé finement avec une spatule. On remet le solide à sécher sous vide pendant 2 h à 50 °C.

Rendements, RMN ¹H et structures des polyionènes aliphatiques

PI 3-3 : on obtient un solide blanc de masse m = 17,1 g (rendement : 95,3%). RMN ¹H (D₂O, δ en ppm) : 2,39 (s, 4H, N⁺CH₂CH₂) ; 2,68 (s, 0,27H, NCH₃ extrémité amine) ; 3,20 (s, 12H, N⁺CH₃) ; 3,26-3,41 (t, 0,69H, BrCH₂ extrémité bromée) ; 3,49-3,53 (t, 8H, N⁺CH₂).

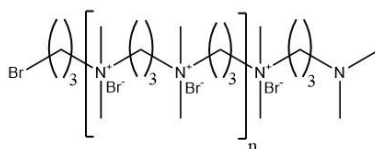


Figure V-1 : Structure du PI 3-3

PI 6-6 : on obtient un solide blanc de masse m = 21,0 g (rendement : 93,4%). RMN ¹H (D₂O, δ en ppm) : 1,37 (s, 8H, N⁺CH₂CH₂CH₂) ; 1,72 (s, 8H, N⁺CH₂CH₂) ; 2,81 (s, 0,24H, NCH₃ extrémité amine) ; 2,99 (s, 12H, N⁺CH₃) ; 3,21-3,26 (m, 8H, N⁺CH₂) ; 3,52-3,55 (t, 0,16H, BrCH₂ extrémité bromée).

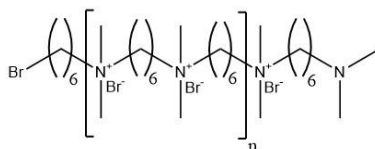


Figure V-2 : Structure du PI 6-6

PI 6-9 : on obtient un solide blanc de masse m = 17,4 g (rendement : 70,3%). RMN ¹H (D₂O, δ en ppm) : 1,29 (s, 10H, N⁺CH₂CH₂(CH₂)₅) ; 1,36 (s, 4H, N⁺CH₂CH₂(CH₂)₂) ; 1,70 (s, 8H,

$N^+CH_2CH_2$) ; 2,81 (s, 0,22H, NCH_3 extrémité amine) ; 2,98 (s, 12H, N^+CH_3) ; 3,20-3,23 (m, 8H, N^+CH_2) ; 3,51-3,54 (t, 0,09H, $BrCH_2$ extrémité bromée).

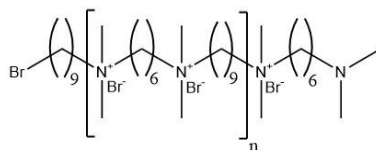


Figure V-3 : Structure du PI 6-9

PI 6-12 : on obtient un solide blanc de masse $m = 17,6$ g (rendement : 65,2%). RMN 1H (D_2O , δ en ppm) : 1,23-1,29 (d, 16H, $N^+CH_2CH_2(CH_2)_8$) ; 1,36 (s, 4H, $N^+CH_2CH_2(CH_2)_2$) ; 1,69 (s, 8H, $N^+CH_2CH_2$) ; 2,81 (s, 0,16H, NCH_3 extrémité amine) ; 2,97 (s, 12H, N^+CH_3) ; 3,20-3,22 (m, 8H, N^+CH_2) ; 3,45-3,48 (t, 0,07H, $BrCH_2$ extrémité bromée).

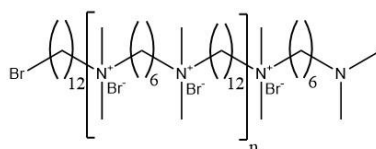


Figure V-4 : Structure du PI 6-12

Synthèse générale des polyionènes éthers

Tous les composés sont introduits à l'aide d'une seringue dans un ballon sous atmosphère inerte surmonté d'un réfrigérant, dans l'ordre : le Bis[2-(N,N-diméthylamino)éthyl] éther (4,3 mL, 0,0224 mol), 12,4 mL de méthanol, le monomère dibrome ou dichlore (0,0224 mol) et 12,4 mL de méthanol. Les quantités à introduire en fonction des monomères sont indiquées dans le Tableau V-3. Le mélange réactionnel, homogène et limpide, est chauffé à 65 °C pendant 17 h sous agitation (300 rpm). La réaction est arrêtée en mettant le ballon dans un bain d'eau froide. Le mélange prend en masse. Le solide obtenu est solubilisé en ajoutant dans le mélange 20 à 40 mL de méthanol puis précipité dans un volume d'acétone $V_{\text{acétone}} = 10V_{\text{mélange}}$ (typiquement de 200 à 400 mL). Le précipité est filtré sur Büchner puis séché sous vide pendant 2 h à 50 °C.

Tableau V-3 : Quantités des monomères par synthèses de PI éthers

Polyionène	Monomère Diamine	Monomère Dibrome/Dichlore
PI et5-3	4,3 mL	2,3 mL
PI et5-6	4,3 mL	3,4 mL
PI et5-9	4,3 mL	4,6 mL
PI et5-12	4,3 mL	7,35 g
PI et5-et5	4,3 mL	2,6 mL

Particularité de la synthèse PI et5-9 : à la fin de la réaction, le mélange n'a pas pris en masse. Il est précipité dans 250 mL d'acétone. Le précipité est filtré sur Büchner puis séché sous vide pendant 2 h à 50 °C. Le solide devient visqueux. Il est solubilisé dans 25 mL de méthanol puis précipité dans 250 mL d'acétone. Le précipité est filtré sur Büchner puis séché sous hotte à température ambiante. Comme le solide est visqueux, on répète l'étape de précipitation/filtration/séchage 1 fois.

Particularité de la synthèse du PI et5-12 : Dans un tricol de 100 mL surmonté d'un réfrigérant, le 1,12-dibromododécane (7,3501 g, 0,0224 mol) est mis à solubiliser avec 9,9 mL de DMF. Le ballon est mis sous atmosphère inerte. Le Bis[2-(N,N-diméthylamino)ethyl] ether (4,3 mL, 0,0224 mol) est introduit à l'aide d'une seringue, puis 14,9 mL de méthanol. Le mélange réactionnel est chauffé à 65 °C pendant 17 h sous agitation (300 rpm). La réaction est arrêtée en mettant le ballon dans un bain d'eau froide. Le mélange devient solide. Il est solubilisé dans 20 mL de méthanol. Le mélange est précipité dans 500 mL de THF froid, dans un bain de glace. Le précipité est filtré sur Büchner puis séché sous vide pendant 2 h à 50 °C. Le solide devient visqueux. Il est solubilisé dans 10 mL de méthanol puis précipité dans 100 mL d'acétone. Après filtration sur Büchner, on obtient un solide blanc.

Particularité de la synthèse du PI et5-et5 : à la fin de la réaction, le mélange n'a pas pris en masse. Il est précipité est précipité en l'ajoutant dans 200 mL de THF. Très peu de produit précipite. Le mélange est mis au frigo pendant 2 semaines. Un solide s'est formé au fond du bécher. Il est solubilisé dans 10 mL de méthanol puis précipité dans 100 mL d'éther éthylique froid. Le mélange est filtré sur Büchner puis séché sous vide pendant 2 h à 50 °C. On obtient une pâte visqueuse qui devient un solide blanc après séchage à température ambiante.

Rendements, RMN ¹H et structures des polyionènes éthers

PI et5-3 : on obtient un solide blanc de masse $m = 7,8$ g (rendement : 96,2%). RMN ¹H (D₂O, δ en ppm) : 2,09-2,33 (m, 2H, N⁺CH₂CH₂) ; 2,81 (s, 0,21H, NCH₃ extrémité amine) ; 3,14-3,18 (d, 12H, N⁺CH₃) ; 3,46-3,55 (m, 4H, N⁺CH₂) ; 3,69 (m, 4H, OCH₂CH₂) ; 3,81-3,83 (t, 0,14H, BrCH₂ extrémité bromée) ; 4,00 (s, 4H, OCH₂).

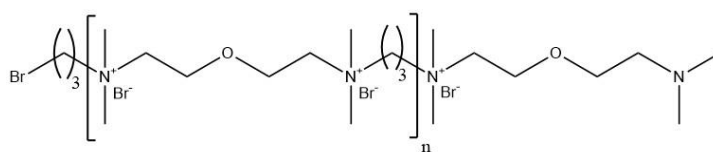


Figure V-5 : Structure du PI et5-3

PI et5-6 : on obtient un solide blanc de masse $m = 5,5$ g (rendement : 60,7%). RMN ^1H (D_2O , δ en ppm) : 1,38 (s, 4H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$) ; 1,75 (s, 4H $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 2,65 (s, 0,26H, NCH_3 extrémité amine) ; 3,08 (s, 12H, N^+CH_3) ; 3,31-3,35 (m, 4H, N^+CH_2) ; 3,55-3,58 (t, 4H, OCH_2CH_2) ; 3,74-3,76 (t, 0,15H, BrCH_2 extrémité bromée) ; 3,93 (s, 4H, OCH_2).

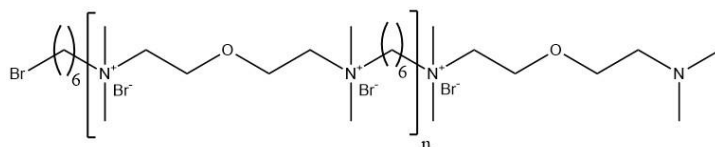


Figure V-6 : Structure du PI et5-6

PI et5-9 : on obtient un solide blanc de masse $m = 9,4$ g (rendement : 94,0%). RMN ^1H (D_2O , δ en ppm) : 1,30 (s, 10H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5$) ; 1,71 (s, 4H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 2,57 (s, 0,27H, NCH_3 extrémité amine) ; 3,07 (s, 12H, N^+CH_3) ; 3,29-3,33 (m, 4H, N^+CH_2) ; 3,54-3,56 (t, 4H, OCH_2CH_2) ; 3,71-73 (t, 0,18H, BrCH_2 extrémité bromée) ; 3,92 (t, 4H, OCH_2).

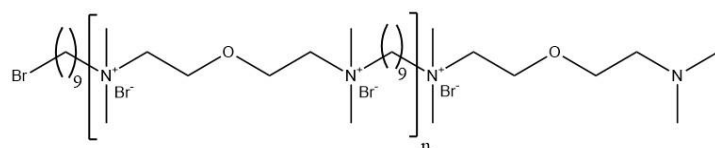


Figure V-7 : Structure du PI et5-9

PI et5-12 : on obtient un solide blanc de masse $m = 5,4$ g (rendement : 49,4%). RMN ^1H (D_2O , δ en ppm) : 1,23-1,29 (s, 16H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8$) ; 1,70 (s, 4H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 2,39 (s, 0,64H, NCH_3 extrémité amine) ; 3,05, (s, 12H, N^+CH_3) ; 3,27-3,32 (m, 4H, N^+CH_2) ; 3,54 (t, 4H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 3,62 (t, 0,26H, BrCH_2 extrémité bromée) ; 3,91 (s, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$).

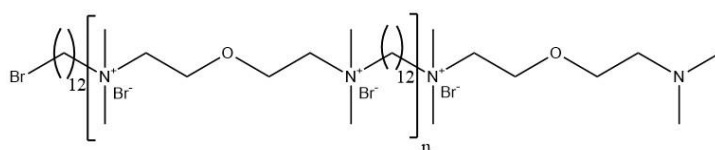


Figure V-8 : Structure du PI et5-12

PI et5-et5 : on obtient un solide blanc de masse $m = 1,2$ g (rendement : 17,7%). RMN ^1H (D_2O , δ en ppm) : 2,78 (s, 0,20H, NCH_3 extrémité amine) ; 3,15 (s, 12H, N^+CH_3) ; 3,46-3,49 (t, 0,11H, ClCH_2 extrémité chloré) ; 3,65-3,66 (t, 8H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 3,93 (s, 8H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

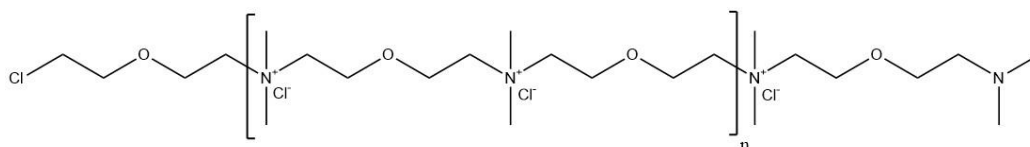


Figure V-9 : Structure du PI et5-et5

Greffage chimique sur des surfaces

Les greffages chimiques ont été réalisés sur trois surfaces : des lames de verre, des wafers de silicium et des films de polyéthylène. Les lames de verre sont des lames de microscope optique de chez Fisher Scientific. Les wafers de silicium sont fournis par Siltronic. Les films de polyéthylène de 100 μm d'épaisseur sont fournis par Bolloré Division Films Plastiques. Les réactifs proviennent de Sigma-Aldrich et Alfa Aesar, et les solvants de chez Carlo Erba Reagents. Sauf indication contraire, tous les réactifs et les solvants ont été utilisés sans purification supplémentaire.

Les manipulations sont effectuées dans des réacteurs cylindriques à fond plat avec des grilles surélevées de 2 cm pour glisser un agitateur magnétique en-dessous. Les proportions sont données pour la préparation de 3 surfaces greffées PI rectangulaires de 14 x 25 mm dans des volumes d'environ 60 mL sauf pour les surfaces de polyéthylène où on effectue le greffage sur une surface de 10 x 12 cm dans environ 350 mL de solution.

Protocole de greffage sur le verre

Nettoyage des lames de verre

Les lames sont lavées par immersion dans de l'éthanol et mises dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes. Elles sont séchées par flux d'azote. Elles sont ensuite introduites dans une solution piranha, un mélange $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (45/15 mL) pendant 30 minutes sans agitation. Elles sont lavées en les immergeant complètement dans de l'eau déionisée pendant 30 minutes avec agitation, en changeant l'eau déionisée au bout de 15 minutes. Les lames sont rincées avec la pissette d'eau déionisée, puis séchées par flux d'azote.

Greffage de la couche de polydopamine (PDOPA)

On dilue 0,060 g de 4-(2-aminoéthyl)benzène-1,2-diol, appelé par la suite dopamine, dans 60 mL d'eau déionisée dans un réacteur à fond plat. On met cette solution sous agitation (300 rpm) et on introduit la grille avec les lames de verre. On verse ensuite, à la pipette pasteur sur les bords du réacteur, une solution de NaOH à 1 mol.L⁻¹. On vérifie que le pH de la solution est à 11. On arrête l'agitation, on recouvre le réacteur d'aluminium et on le laisse ainsi pendant 48 h. A la fin de la réaction, on lave les lames de verre à l'eau déionisée puis à l'éthanol. Enfin, elles sont séchées par flux d'azote.

Greffage de la couche de PMADAME

On commence par préparer les quatre solutions décrites dans le Tableau V-4. La solution S1 de nitroaniline à $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$ dans du HCl 0,5 N est mise sous agitation dans un erlenmeyer. La solution S2 de nitrite de sodium à $0,33 \text{ mol.L}^{-1}$ dans du HCl 0,5 N, est versée dans une ampoule de coulée, et est ajoutée goutte à goutte lentement à la solution S1 de nitroaniline. On laisse réagir pendant 10 minutes. Le mélange S1+S2 est une solution hétérogène de couleur jaunâtre. A ce mélange S1+S2, on introduit le mélange S3 de MADAME à $0,55 \text{ mol.L}^{-1}$ dans du DMF, par une ampoule de coulée avec un goutte à goutte lent. La solution obtenue est hétérogène et de couleur rouille. On dispose les lames de verre greffées polydopamine sur une grille dans un réacteur à fond plat et on verse dessus la solution S1+S2+S3. La solution réductrice S4 d'acide ascorbique à $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ dans du H₂O est ajoutée le long des parois du réacteur, lentement, à l'aide d'une pipette pasteur. La solution est hétérogène de couleur rouge foncé. On laisse réagir pendant 1 h sous agitation forte. Après la réaction, les lames sont rincées à l'acétone, à l'eau déionisée, et à l'éthanol et finalement séchées sous flux d'azote.

Tableau V-4 : Solutions pour la polymérisation en surface du PMADAME

Solutions	Composés	Masse ou volume
S1	4-Nitroaniline	0,5508 g
	HCl 0,5 N dans H ₂ O	20 mL
S2	Nitrite de sodium	0,276 g
	HCl 0,5 N dans H ₂ O	12 mL
S3	N,N-Diméthylformamide (DMF)	36,6 mL
	méthacrylate de 2-diméthylaminoéthyle (MADAME)	3,4 mL
S4	5-(1,2-dihydroxyéthyl)-3,4-dihydroxyfuran-2-one (acide ascorbique)	0,0720 g
	H ₂ O D.I.	8 mL

Greffage de la couche de polyionène (PI)

Les lames de verre greffées PMADAME sont disposées sur une grille et mise dans un réacteur à fond plat avec un agitateur magnétique. Le réacteur est surmonté d'un tricol, avec des septums et du papier téflon, sur lequel on fixe un réfrigérant. On positionne un bain d'huile sous le réacteur. Le montage est mis sous atmosphère inerte d'argon. En fonction du polyionène (PI) que l'on veut greffer, on utilise les monomères et les quantités indiqués dans le Tableau V-5. L'ensemble des greffages se font avec des concentrations en monomères à $0,9 \text{ mol.L}^{-1}$.

Tableau V-5 : Monomères et quantités pour greffer les couches PI

Polyionène	Monomère Diamine	Monomère Dibrome	Solvant
3-3	N,N,N',N'-tétraméthyl- 1,3-diaminopropane 9 mL (0,054 mol)	1,3 dibromopropane 5,5 mL (0,054 mol)	Méthanol 60 mL
6-6	N,N,N',N'-tétraméthyl- 1,6-diaminohexane 11,5 mL (0,054 mol)	1,6 dibromohexane 8,2 mL (0,054 mol)	Méthanol 60 mL
6-9	N,N,N',N'-tétraméthyl- 1,6-diaminohexane 11,5 mL (0,054 mol)	1,9 dibromononane 10,9 mL (0,054 mol)	Méthanol 60 mL
6-12	N,N,N',N'-tétraméthyl- 1,6-diaminohexane 11,5 mL (0,054 mol)	1,12 dibromododécane 17,7 g (0,054 mol)	Méthanol 40 mL DMF 20 mL

Les réactifs sont introduits avec une seringue en verre *via* le septum, le long des parois du réacteur. On introduit dans l'ordre la diamine, la moitié du méthanol, le dibrome et enfin le reste du méthanol.

Particularité du greffage du PI 6-12 : on solubilise d'abord le 1-12 dibromododécane dans le DMF dans le réacteur à fond plat en chauffant. On y place la grille avec les lames de verre, on ferme le réacteur et on met le montage sous atmosphère inerte. On introduit ensuite dans l'ordre : la moitié du méthanol, la diamine et l'autre moitié du méthanol.

Le réacteur est placé dans un bain d'huile chauffé à 65 °C sous agitation (300 rpm) pendant 16-17 h (une nuit). On ajoute le bain d'huile quand tous les réactifs ont été introduits. On enlève la sortie, on laisse saturer en argon 5 minutes, puis on enlève l'entrée pour être en saturation d'argon. Le mélange réactionnel est homogène et limpide. Le lendemain, on récupère les lames de verre dans un milieu épais et blanchâtre pour le PI 3-3 ou limpide et de couleur jaune clair pour les autres PI. On conserve les solutions de greffage pour les faire précipiter suivant le même mode opératoire que la synthèse des PI en solution. Les lames de verre sont lavées à l'eau déionisée et à l'éthanol puis on les sèche sous flux d'azote.

Protocole de greffage sur wafers de silicium

La face greffée est la face miroir du wafer, elle est toujours placée vers le haut sur la grille. Le même protocole est utilisé pour greffer des wafers de silicium de 5,1 cm de diamètre et de 3 mm d'épaisseur pour les essais en réflectivité des neutrons et des rayons X en adaptant la verrerie et les quantités utilisées.

Nettoyage des wafers de silicium

Les wafers de silicium sont lavés par immersion dans de l'éthanol et mis dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes. Ils sont séchés sous flux d'azote. Ils sont ensuite introduits dans une solution piranha, un mélange $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (45/15 mL) pendant 30 minutes sans agitation. Ils sont lavés en les immergeant complètement dans de l'eau déionisée pendant 30 minutes avec agitation, en changeant l'eau déionisée au bout de 15 minutes. Les wafers sont rincés avec la pissette d'eau déionisée, puis séchés par flux d'azote.

Greffage de la couche de polydopamine (PDOPA)

On prépare 60 mL d'une solution de Tris(hydroxyméthyl)aminométhane à 10 mmol.L^{-1} dans de l'eau déionisée. On ajuste le pH de cette solution à 8,5 avec un pHmètre et une solution de HCl à 1 mol.L^{-1} . On appelle cette solution le buffer Tris. On prépare une solution de dopamine à 3 mg.mL^{-1} en diluant 0,180 g de dopamine dans 60 mL de buffer Tris dans un réacteur à fond plat avec agitation forte pour introduire de l'oxygène dans la solution. La solution de dopamine prend une couleur rose saumon. On arrête l'agitation et on introduit la grille avec les wafers dans la solution. Les wafers plongent dans le bain de dopamine pendant 3 h. A la fin de la réaction, la solution est devenue hétérogène avec des particules noires en suspension et un film de polydopamine à la surface. On rince les wafers à la pissette d'eau déionisée et à la pissette d'éthanol. On les sèche sous flux d'azote.

Surgreffage de la couche PDOPA par le 4-(diméthylamino) benzoyl chloride (DMABC)

La verrerie est mise à l'étuve la veille afin qu'elle soit bien sèche pour la réaction. On introduit les wafers greffés PDOPA sur une grille, dans un réacteur à fond plat avec un agitateur magnétique, et on ferme le montage avec une sortie tricol entourée de papier téflon. Sur la sortie du milieu, on positionne une ampoule de coulée avec une hampe remplie de 10,5 mL de triéthylamine (TEA). On laisse le montage sous argon pendant 30 minutes. On introduit rapidement 6 g de 4-(diméthylamino) benzoyl chloride (DMABC), issu d'un flacon neuf de chez Alfa Aesar, dans le montage à l'aide d'un sabot. On laisse le montage se saturer d'argon pendant 20 minutes. On ajoute, à l'aide d'une seringue en verre, 42 mL de DMF anhydre dans le réacteur et on met le mélange sous agitation. La solution prend une couleur bleu clair. On attend la dissolution complète de la DMABC avant de poursuivre. La dissolution peut être longue, aussi on peut ajouter un cristalliseur avec de l'eau chaude sous le réacteur pour faciliter la dissolution. Quand la DMABC est dissoute, on ajoute goutte à goutte la TEA située dans l'ampoule de coulée. La solution prend progressivement une couleur jaune-orange. Une fumée

blanche se dégage lors de l'ajout de la TEA et vers la fin, un précipité se forme en solution. On laisse la réaction se poursuivre pendant 24 h en surpression d'argon à température ambiante et avec agitation. A la fin de la réaction, la solution a pris une couleur rouge avec un précipité orange en solution. Les wafers sont rincés à la pissette d'acétone puis d'éthanol. Ils sont mis dans de l'éthanol absolue pendant 10 minutes dans un bain à ultra-sons. Enfin, ils sont séchés sous flux d'azote.

Greffage de la couche de polyionène (PI)

Le greffage de la couche de PI sur les wafers surgreffés DMABC s'effectue de la même manière que le protocole décrit lors du greffage de PI sur des lames de verre. On greffe les polyionènes avec des solutions en monomères à une concentration de $0,9 \text{ mol.L}^{-1}$. La seule variation est le nettoyage final. Les wafers greffés PI sont rincés à la pissette d'eau déionisée et d'éthanol, puis immergés dans l'éthanol absolu pendant 10 minutes dans un bain à ultra-sons et séchés sous cloche à vide pendant 2 h à température ambiante, avant d'être analysés en réflectivité des rayons X ou des neutrons.

Protocole de greffage sur le polyéthylène (PE)

Nettoyage du film de PE

Le morceau de PE est lavé à l'éthanol et séché sous flux d'azote. Il subit ensuite un traitement au plasma sous O_2 à 0,2 mbar pendant 5 minutes. On lui applique un traitement plasma afin de rendre la surface plus hydrophile et réactive en vue des prochaines étapes de greffage.

Greffage de la couche de polydopamine (PDOPA)

Le greffage de la couche de polydopamine sur le PE s'effectue avec la même solution que celle décrite dans le protocole pour les wafers de silicium. On prépare 500 mL d'une solution de dopamine à 3 mg.mL^{-1} dans un buffer Tris à 10 mmol.L^{-1} fait en eau déionisée avec un pH ajusté à 8,5. On place cette solution sous forte agitation pour introduire de l'oxygène dans la solution. La solution de dopamine prend une couleur rose saumon. On arrête l'agitation et on introduit le morceau de PE dans la solution en mettant la face à greffer vers le fond du contenant. Le PE plonge dans le bain de dopamine pendant environ 24 h. A la fin de la réaction, la solution est devenue hétérogène avec des particules noires en suspension et un film de polydopamine à la surface. On lave le PE à l'eau déionisée, en l'immergeant dans un grand volume, puis à

l'éthanol avec une pissette. On stocke le PE sous cloche pour le faire sécher jusqu'au prochaine traitement.

Greffage de la couche de PMADAME

Pour effectuer la polymérisation en surface du PMADAME sur la surface de polyéthylène, on réalise le même protocole que celui décrit sur les lames de verre, en adaptant les proportions des solutions utilisées (Tableau V-6). On fait les ajouts des solutions S1, S2 et S3 comme décrit précédemment. On dispose le film de PE greffé dopamine sur une grille dans un cristallisateur et on verse dessus la solution S1+S2+S3. La solution réductrice S4 d'acide ascorbique est ajoutée le long des parois, lentement, à l'aide d'une pipette pasteur. La solution finale est hétérogène et de couleur rouge foncé. On laisse réagir pendant 2 h sous agitation forte. Après la réaction, le morceau de PE est lavé en l'immergeant dans un bécher rempli d'acétone, puis on élimine les résidus à la pissette d'acétone. On applique le même procédé avec de l'eau déionisée et de l'éthanol. On stocke le PE sous cloche pour le faire sécher jusqu'au prochaine traitement.

Tableau V-6 : Solutions pour la polymérisation en surface du PMADAME

Solutions	Composés	Masse ou volume
S1	4-Nitroaniline	2,4243 g
	HCl 0,5N dans H ₂ O	90 mL
S2	Nitrite de sodium	1,5280 g
	HCl 0,5N dans H ₂ O	67,5 mL
S3	N,N-Diméthylformamide (DMF)	206,3 mL
	méthacrylate de 2-diméthylaminoéthyle (MADAME)	15,3 mL
S4	5-(1,2-dihydroxyéthyl)-3,4-dihydroxyfuran-2-one (acide ascorbique)	0,5024 g
	H ₂ O D.I.	45 mL

Greffage de la couche de PI

Le greffage de la couche de PI sur le PE greffé PMADAME s'effectue de la même manière que le protocole décrit lors du greffage de PI sur des lames de verre. Le film de PE greffé PMADAME est disposé sur une grille, fixé avec des attaches, et on positionne la face à greffer vers le haut. On greffe les polyionènes avec des solutions en monomères à une concentration de 0,9 mol.L⁻¹ en adaptant les quantités comme décrit dans le Tableau V-7. La seule variation est le nettoyage final. Le film de PE est lavé en l'immergeant dans un bécher rempli d'eau déionisée, puis on élimine les résidus à la pissette d'eau déionisée. On applique le même procédé avec de l'éthanol. On stocke le PE sous cloche pour le faire sécher.

Tableau V-7 : Monomères et quantités pour greffer les couches de PI

Polyionène	Monomère Diamine	Monomère Dibrome	Solvant
3-3	N,N,N',N'-tétraméthyl- 1,3-diaminopropane 45,3 mL (0,271 mol)	1,3 dibromopropane 27,5 mL (0,271 mol)	Méthanol 300 mL
6-6	N,N,N',N'-tétraméthyl- 1,6-diaminohexane 57,75 mL (0,270 mol)	1,6 dibromohexane 41 mL (0,271 mol)	Méthanol 300 mL

Nettoyage approfondi du PE greffé PI

Le PE greffé PI subit un nettoyage plus approfondi que les autres surfaces car les premiers tests microbiologiques ont révélé la présence de relargage. Le PE greffé PI est maintenu sur une grille et immergé dans un cristalliseur rempli de méthanol. On place le cristalliseur dans un bain-marie d'eau chaude à 50 °C. On laisse le PE sous agitation pendant 30 minutes dans cette configuration. Le PE est sorti du bain et lavé avec de l'éthanol. On lave 4 fois le PE greffé PI dans un bain de méthanol. On procède de la même manière en remplaçant le méthanol par de l'eau déionisée pour refaire 4 lavages. A la fin de tous les lavages, on place le PE greffé PI sous cloche pour le sécher.

Formulation de l'encre PI 6-6 vinylique

Afin de réaliser l'encre, les réactifs nécessaires ont été commandés chez Sigma-Aldrich. Les solvants ont été commandés chez Carlo Erba Reagent. Tous les réactifs ont été utilisés sans purification supplémentaire.

Synthèse du PI 6-6

Tous les composés sont introduits à l'aide d'une seringue dans un tricol de 50 mL sous atmosphère inerte surmonté d'un réfrigérant, dans l'ordre : le N,N,N',N'-tétraméthyl-1,6-diaminohexane (5,6 mL, 0,0262 mol), 22 mL de méthanol, le 1,6-dibromohexane (4,0 mL, 0,0264 mol) et 22 mL de méthanol. Le mélange réactionnel, homogène et limpide, est chauffé à 65 °C pendant 17 h sous agitation (300 rpm). La réaction est arrêtée en mettant le ballon dans un bain d'eau froide. Le mélange obtenu est précipité dans 300 mL d'acétone. Le précipité est filtré sur Büchner puis séché sous vide pendant 2 h à 50 °C. On obtient un solide blanc de masse $m = 8,86$ g (rendement : 80,7%).

RMN ^1H (D_2O , δ en ppm) : 1,39 (s, 8H, CCH_2) ; 1,74 (s, 8H, CCH_2) ; 2,83 (s, 0,27H, NCH_3 extrémité amine) ; 3,01 (s, 12H, N^+CH_3) ; 3,23-3,30 (m, 8H, N^+CH_2) ; 3,46-3,49 (t, 0,38H, BrCH_2 extrémité bromé). SEC-MALS : $M_n = 2\,993$ ($\pm 4,989\%$) ; $M_w = 5\,057$ ($\pm 1,399\%$) ; $I_p = 1,689$ ($\pm 5,181\%$).

Synthèse du PI 6-6 Br

Dans un tricol de 100 mL surmonté d'un réfrigérant, le PI 6-6 (8,0214 g, 0,0028 mol) est introduit, puis, une fois le montage fermé, on met le solide sous atmosphère inerte. On ajoute à la seringue en verre 100 mL de méthanol et on attend la dissolution complète du solide. Le 1,6 dibromohexane (9 mL, 0,059 mol) est introduit à l'aide d'une seringue, puis 18 mL de méthanol. Le mélange réactionnel est chauffé à 65 °C pendant 24 h sous agitation (500 rpm). La réaction est arrêtée en mettant le ballon dans un bain d'eau froide. Le mélange obtenu est précipité dans 1300 mL d'acétone. Le précipité est filtré sur Büchner puis séché sous vide pendant 2 h à 50 °C. On obtient un solide blanc de masse $m = 6,56$ g (rendement : 75,4%).

RMN ^1H (D_2O , δ en ppm) : 1,39 (s, 8H, CCH_2) ; 1,74 (s, 8H, CCH_2) ; 2,83 (s, 0,22H, NCH_3 extrémité amine) ; 3,01 (s, 12H, N^+CH_3) ; 3,23-3,30 (m, 8H, N^+CH_2) ; 3,46-3,49 (t, 0,49H, BrCH_2 extrémité bromé). SEC-MALS : $M_n = 3\,058$ ($\pm 4,525\%$) ; $M_w = 4\,854$ ($\pm 1,552\%$) ; $I_p = 1,587$ ($\pm 4,784\%$).

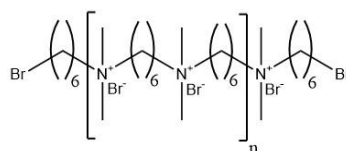


Figure V-10 : Structure du PI 6-6 Br

Synthèse du PI 6-6 vinylique

Dans un tricol de 100 mL surmonté d'un réfrigérant, le PI 6-6 Br (6,00 g, 0,0021 mol) est introduit, puis, une fois le montage fermé, on met le solide sous atmosphère inerte. On ajoute à la seringue en verre 90 mL de méthanol et on attend la dissolution complète du solide. Le 2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate (36 mL, 0,2137 mol) est introduit à l'aide d'une seringue, puis 16 mL de méthanol. Le mélange réactionnel est chauffé à 65 °C pendant 48 h sous agitation (300 rpm). La réaction est arrêtée en mettant le ballon dans un bain d'eau froide. Le mélange est précipité dans 1400 mL d'acétone. Le précipité est filtré sur Büchner puis séché sous vide pendant 2 h à 50 °C. On obtient un solide blanc de masse $m = 5,56$ g (rendement : 83,4%).

RMN ^1H (D_2O , δ en ppm) : 1,39 (s, 8H, CCH₂) ; 1,74 (s, 8H, CCH₂) ; 2,15 (s, 0,07H, n°4 CH₃ extrémité DMAEMA) ; 2,66-2,69 (t, 0,12H, n°1 N+CH₂C extrémité DMAEMA) ; 2,81 (s, 0,07H, NCH₃ extrémité amine) ; 3,01 (s, 12H, N+CH₃) ; 3,23-3,30 (m, 8H, N+CH₂) ; 3,46-3,49 (t, 0,03H, BrCH₂ extrémité bromé) ; 3,97 (s, 0,21H, n°2 OCH₂C extrémité DMAEMA) ; 5,37 (1, 0,004H, n°3' CH=C extrémité DMAEMA) ; 5,57 (s, 0,004H, n°3 CH=C extrémité DMAEMA). SEC-MALS : $M_n = 3\,212 (\pm 9,222\%)$; $M_w = 5\,015 (\pm 2,265\%)$; $I_p = 1,561 (\pm 9,496\%)$.

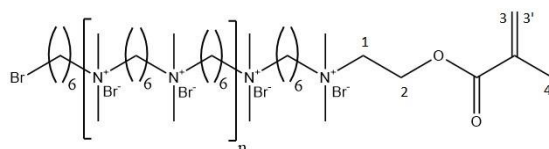


Figure V-11 : Structure du PI 6-6 vinylique

Formulation de l'encre et paramètres d'impression

L'encre se formule en pesant séparément les liquides et les solides. On laisse agiter les liquides ensemble pendant au moins 1 h. On ajoute ce mélange dans celui des solides et on laisse la formulation agiter au moins 1 nuit. L'encre est enfin filtrée sur une membrane de 13 mm de diamètre en PTFE avec des pores de 0,45 μm . La formulation se conserve ensuite à l'abri de la lumière et à 4°C pour protéger l'activité du photoamorceur. Elle peut ainsi être conservée plusieurs mois (le test a été fait avec une encre réutilisée 2 mois après sa fabrication). La formulation de l'encre optimisée correspond à celle de l'encre décrite dans le Tableau V-8.

Tableau V-8 : Formulation de l'encre PI 6-6 vinylique

Composants	% masse	masse (g)	M_n ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
Eau déionisée	27,4%	2,500	18
Ethanol	48,6%	4,440	46,1
Polyionène 6-6 vinylique	4,2%	0,380	2820
Ethylène glycol diméthacrylate	10,9%	1,000	198,2
Triméthylolpropane éthoxylate triacrylate 428	6,2%	0,566	428
2 hydroxy (4' hydroxyethoxy) 2 methylpropio phenone	2,7%	0,250	224,3

Les encres sont ensuite utilisées sur une imprimante jet d'encre DIMATIX. Environ 2 mL d'encre sont introduits dans des cartouches avec une tête d'impression de 16 buses délivrant des volumes de 10 picolitres. Les impressions sont réalisées avec un « drop spacing » de 50 μm à 1 mm de la surface à imprimer (PE, PVC, PET). Une fois imprimée, la surface subit un recuit sous la lampe Xenon (S-2200 de chez Polytec) avec des flashes à 2000 V pendant 150

millisecondes, puis une absence de flash pendant 300 millisecondes. La série de flash est répétée 20 fois. Une fois le recuit effectué, les surfaces imprimées et réticulées sont introduites dans un mélange eau déionisée/éthanol (50/50) et passées aux ultrasons à pleine puissance pendant 10 minutes.

Caractérisations physico-chimiques

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les polymères ont été étudiés en RMN ^1H en phase liquide. Les spectres ont été obtenus sur un spectromètre Bruker AC 400Mhz situé au LCMCE (NIMBE, CEA-Saclay). Les échantillons sont préparés dans un solvant deutéré, le D_2O , à raison de 15 mg de produit pour 0,7 mL de solvant.

Rhéomètre

Les mesures de viscosité ont été effectuées sur un rhéomètre Modular Compact Rheometer MCR 302 de chez Anton Paar. La configuration cône-plan a été utilisée, avec un cône de $0,998^\circ$ et de 49,977 mm de diamètre, modèle CP50-1 de chez Anton Paar.

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC-MALS)

Afin de déterminer la masse molaire absolue des polymères synthétisés, une chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angles (Multi Angle Light Scattering = MALS) a été utilisée.

La SEC permet de séparer les polymères par leur volume hydrodynamique et donc par leur « taille ». La colonne est remplie de billes poreuses de gel polymère ou de silice. Le principe est schématisé sur la Figure V-12. Les petites chaînes (violet) vont pénétrer dans les pores des billes, alors que les grandes chaînes (rouge) n'y rentreront pas. Lorsqu'un mélange de chaînes dissoutes dans le solvant est injecté au sommet de la colonne, les petites chaînes se trouvent alors réparties dans un volume de solvant qui est bien plus important que le volume dans lequel les grandes chaînes sont. Par conséquent, les grandes chaînes se déplacent plus vite dans la colonne, et ainsi le mélange est séparé en ses composantes.

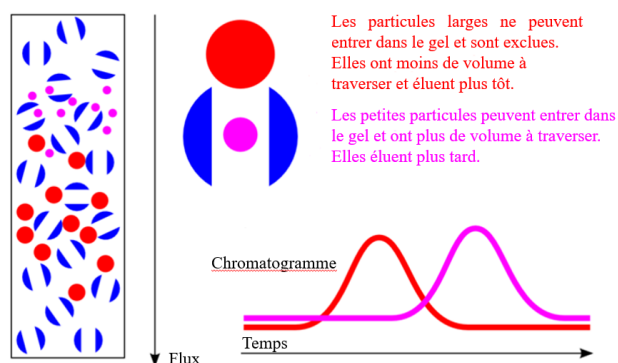


Figure V-12 : Principe d'une chromatographie d'exclusion stérique (crédit image : Wyatt Technology Corporation 2015)

Le temps ou volume d'éluion d'une molécule est lié à son volume hydrodynamique. Pour relier le volume d'éluion d'une molécule à son poids moléculaire, il faut alors faire une calibration avec des standards de poids moléculaire connus. Par conséquent, la SEC utilisée seule est une méthode relative. La mesure de la masse molaire par diffusion de la lumière est quant-à elle, une méthode absolue. Le couplage de la SEC avec le MALS permet de mesurer la masse molaire absolue, et donc indépendamment d'une calibration de colonne. La relation entre l'intensité mesurée et la masse molaire est définie par l'équation (21) :

$$I(\theta) \propto c \times M_w \times \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \quad (21)$$

Avec $I(\theta)$ l'intensité de la lumière diffusée, c la concentration massique du polymère en solution, M_w la masse molaire moyenne en masse du polymère et dn/dc son incrément d'indice de réfraction dans un solvant donné.

La technique requiert par contre de connaître l'incrément d'indice de réfraction dn/dc du polymère analysé, valeur qui dépend du solvant dans lequel il est solubilisé et de la longueur d'onde du détecteur utilisé pour l'analyse. Les valeurs utilisées dans le cadre de cette thèse ont toutes été calculées. Le dn/dc peut être déterminé pour une valeur de concentration massique en polymère tendant vers 0 dans un solvant. Pour cela, on réalise des injections directes du polymère à différentes concentrations massiques dans le détecteur d'indice de réfraction et le détecteur de diffusion de la lumière. Chaque concentration donne une valeur d'indice de réfraction. Le dn/dc est la pente de cette droite (équation 22) :

$$\Delta n = \frac{d(\Delta n)}{d(c)} \times \Delta c \text{ soit } \Delta n = \frac{dn}{dc} \times \Delta c \quad (22)$$

Pour déterminer les valeurs de dn/dc des polymères, il a fallu tenir compte de la présence du contre ion pour déterminer les concentrations massiques réelles en polymère dans la solution. Les valeurs utiles sont toutes récapitulées dans le Tableau V-9.

Tableau V-9 : Valeurs de dn/dc et pourcentage de contre-ions pour les PI synthétisés

Polymères	dn/dc (mL.g ⁻¹)	% contre-ion (Br ⁻ ou Cl ⁻)
PI 3-3	0,2669 ± 0,0150	48,1% (Br ⁻)
PI 6-6	0,1776 ± 0,0225	38,4% (Br ⁻)
PI 6-9	0,1936 ± 0,0072	34,9% (Br ⁻)
PI 6-12	0,1783 ± 0,0082	32,0% (Br ⁻)
PI et5-3	0,2445 ± 0,0031	44,1% (Br ⁻)
PI et5-6	0,2213 ± 0,0188	39,6% (Br ⁻)
PI et-9	0,1901 ± 0,0304	35,8% (Br ⁻)
PI et5-12	0,1920 ± 0,0102	32,7% (Br ⁻)
PI et5-et5	0,1928 ± 0,0069	23,4% (Cl ⁻)

Les analyses SEC sont effectuées à partir d'un appareil HPLC Shimadzu muni de 2 colonnes OHpack-LB 800 (300 x 8,0 mm) (Shodex), couplé à un réfractomètre RID-20A (Shimadzu) et un MALS mini-Dawn TREOS (Wyatt). Les mesures sont réalisées dans une phase eau déionisée 18 mΩ avec acétate de sodium 0,54 M / méthanol / acide acétique glacial (54% / 23% / 23% en volume) à 40°C pour l'ensemble des polyionènes synthétisés. Les solvants utilisés sont tous de pureté « HPLC grade ».

Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique est une technique quantitative qui suit l'évolution de la masse d'un échantillon en fonction d'une rampe de température. Cette technique permet de définir dans notre cas, la température de dégradation des polymères. Les mesures d'ATG sont réalisées sur un appareil Mettler-Toledo TGA/DSC situé au LIONS (NIMBE, CEA-Saclay). Les polymères sont introduits dans une coupelle en oxyde d'aluminium. La température augmente de 25 à 100°C à une vitesse de 20°C/min, puis un plateau de 10 minutes est appliqué à 100°C pour éliminer toute trace d'eau résiduelle. La température est ensuite augmentée jusqu'à 800°C afin d'éliminer toute la matière organique. Les mesures sont réalisées sous oxygène ou sous azote.

X-ray Photoemission Spectroscopy (XPS)

La spectroscopie photoélectronique X est une méthode physique d'analyse de surface qui détermine les propriétés électroniques et chimiques de la surface des matériaux. L'échantillon est irradié par des rayons X provoquant l'ionisation des atomes par effet photoélectrique. L'électron du niveau de cœur est alors arraché de la surface avec une énergie cinétique (E_c) caractéristique de l'atome. Cette énergie mesurée permet de connaître l'énergie de liaison (E_l) en fonction de l'énergie du rayonnement utilisé (équation 23) et de déterminer l'environnement chimique des atomes du matériau.

$$h\nu = E_c + E_l \quad (23)$$

Avec h la constante de Planck et ν la longueur d'onde du rayon en nm.

Les analyses XPS ont été réalisées sur l'appareil Kratos Analytical Axis Ultra DLD utilisant une source de rayon X monochromatique haute résolution Al-K α (1486,7 eV) à une puissance de 150 W et un système de compensation de charges. Les spectres globaux ont été enregistré à 160 eV et les spectres à hautes résolutions à 40 eV. De plus, l'angle de détection des photoélectrons « arrachés » étant toujours de 90° par rapport à la surface à examiner, la profondeur d'analyse est toujours de 15 nm maximum. La déconvolution des spectres se fait avec le logiciel Casa XPS et les concentrations ont été estimées en tenant compte des sections efficaces calculées par Scofield.

Angle de contact, énergie de surface et énergie d'hydratation

Principe

La mesure d'angle de contact (θ) rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. C'est l'une des rares techniques qui permet de caractériser l'extrême surface d'un substrat. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat (Figure V-13). Elle permet de mesurer l'énergie de surface du liquide ou du solide. Si le liquide utilisé est l'eau, la mesure de l'angle de contact permet également, par extension, de déduire le caractère hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) ou hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) du substrat analysé. Les mesures d'angle de contact ont été effectuées sur un macrogoniomètre KRUSS DSA 100 situé au BHM (SayFood, AgroParisTech-Massy). Les déviations sont déterminées par le calcul d'un écart type standard sur au moins cinq mesures différentes.

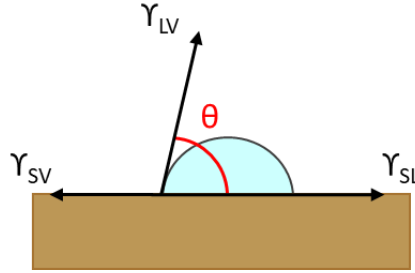


Figure V-13 : Schéma de principe des tensions interfaciales d'une goutte sur une surface

La forme d'une goutte à la surface d'un solide est régit par 3 paramètres :

- La tension interfaciale solide liquide γ_{SL}
- La tension interfaciale solide vapeur γ_{SV}
- La tension interfaciale liquide vapeur γ_{LV}

Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation de Young :

$$-\gamma_{SV} + \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos(\theta) = 0 \quad (24)$$

Dans cette thèse, on va s'intéresser à la valeur de l'angle de contact à l'eau afin d'avoir une estimation de l'hydrophobie/hydrophilie relative de surface des échantillons mais aussi aux valeurs des angles de contact au diiodométhane et au formamide pour calculer les énergies de surface.

Calcul d'énergie de surface

L'énergie de surface d'un substrat γ_s^T (équation 25) peut être calculée à partir des paramètres des contributions de Lewis-Van der Wals γ_s^{LW} et des contributions acide-base γ_s^{AB} . Cette dernière est calculée à partir des contributions électron-donneur γ_s^- et électron-accepteur γ_s^+ (équation 26).

$$\gamma_s^T = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad (25)$$

$$\gamma_s^{AB} = 2(\gamma_s^+ \gamma_s^-)^{\frac{1}{2}} \quad (26)$$

Pour déterminer l'ensemble des paramètres γ_s^{LW} , γ_s^- et γ_s^+ il faut réaliser des mesures d'angle de contact à l'équilibre θ_L avec 3 liquides dont on connaît les valeurs des contributions de Lewis-Van der Wals et acide-base. Il faut ensuite résoudre un système de 3 équations à 3 inconnues en utilisant la formule générale :

$$\gamma_L^T (1 + \cos\theta_L) = 2[(\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW})^{0,5} + (\gamma_s^+ \gamma_L^-)^{0,5} + (\gamma_s^- \gamma_L^+)^{0,5}] \quad (27)$$

L = liquide ; S = solide ; d = diiodométhane ; f = formamide ; e = eau ; T = totale

Le système de 3 équations à 3 inconnues est constitué des équations 28, 29 et 30.

en rouge = les valeurs que l'on cherche ; **en bleu** = les valeurs d'angle de contact qui varient suivant le liquide ; **en vert** = les valeurs connues.

Diiodométhane

Pour le diiodométhane : $\gamma_{Ld}^+ = 0$ et $\gamma_{Ld}^- = 0$

$$\gamma_S^{LW0,5} = \frac{1}{\gamma_{Ld}^{LW0,5}} \left(\frac{\gamma_{Ld}^T (1 + \cos \theta_d)}{2} \right) \quad (28)$$

Formamide

$$\gamma_S^{+0,5} = \frac{1}{\gamma_{Lf}^{-0,5}} \left[\frac{\gamma_{Lf}^T (1 + \cos \theta_f)}{2} - \gamma_S^{LW0,5} \gamma_{Lf}^{LW0,5} - \gamma_S^{-0,5} \gamma_{Lf}^{+0,5} \right] \quad (29)$$

Eau

$$\gamma_S^{-0,5} = \frac{1}{1 - \frac{\gamma_{Le}^{-0,5} \gamma_{Lf}^{+0,5}}{\gamma_{Lf}^{-0,5} \gamma_{Le}^{+0,5}}} \left[\frac{\gamma_{Le}^T (1 + \cos \theta_e)}{2 \gamma_{Le}^{+0,5}} - \frac{\gamma_S^{LW0,5} \gamma_{Le}^{LW0,5}}{\gamma_{Le}^{+0,5}} - \frac{\gamma_{Le}^{-0,5} \gamma_{Lf}^T (1 + \cos \theta_f)}{\gamma_{Lf}^{-0,5} 2 \gamma_{Le}^{+0,5}} + \frac{\gamma_{Le}^{-0,5} \gamma_S^{LW0,5} \gamma_{Lf}^{LW0,5}}{\gamma_{Lf}^{-0,5} \gamma_{Le}^{+0,5}} \right] \quad (30)$$

Calcul d'énergie d'hydratation

Une fois les paramètres γ_S^{LW} , γ_S^- et γ_S^+ déterminés pour le substrat, on peut calculer les énergies d'hydratation du substrat avec les formules suivantes :

$$\Delta G_{s/eau}^T = \Delta G_{s/eau}^{LW} + \Delta G_{s/eau}^{AB} \quad (31)$$

$$\Delta G_{s/eau}^{LW} = -2 \sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_{eau}^{LW}} \quad (32)$$

$$\Delta G_{s/eau}^{AB} = -2 \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_{eau}^-} - 2 \sqrt{\gamma_S^- \gamma_{eau}^+} \quad (33)$$

Avec $\Delta G_{s/eau}^T$ l'énergie d'hydratation totale du substrat, $\Delta G_{s/eau}^{LW}$ la contribution de Lewis –Van der Wals et $\Delta G_{s/eau}^{AB}$ la contribution acide-base de l'énergie d'hydratation.

Microscopie à épifluorescence

La microscopie à épifluorescence (ou en fluorescence) est une technique utilisant un microscope optique en tirant profit du phénomène de fluorescence et de phosphorescence, au lieu de l'observation classique par réflexion (physique) ou absorption de la lumière visible naturelle ou artificielle. La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie (dans notre cas ça sera l'orange d'acridine absorbée par les bactéries). La microscopie à épifluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise. Cette lumière peut être émise directement par les bactéries elles-mêmes si elles sont génétiquement modifiées pour être fluorescente sous U.V. comme c'est le cas du *Staphylococcus aureus s-gfp* utilisé dans les essais. Le sigle « gfp » signifie « Green Fluorescent Protein ». Le *S. aureus s-gfp* génétiquement modifié est capable de produire cette photoprotéine qui confère des propriétés de fluorescence à l'ensemble de la bactérie. Dans le cas de l'observation d'*Escherichia coli*, un colorant a dû être utilisé, le Syto 9. Ce colorant pénètre l'ensemble des bactéries de la flore totale (vivantes et mortes/inhibées) et se lie à l'ADN double brin (excitation/émission : 485/498 nm). Les observations sont effectuées avec un microscope optique Leica DMLB, aux grossissements x10 et x40, situé au BHM (SayFood, AgroParisTech-Massy).

Potentiel zêta

La mesure du potentiel zêta à une interface solide/liquide est basée sur la mesure de potentiels d'écoulement et de courant d'écoulement.¹ L'électrolyte s'écoule entre deux surfaces identiques à analyser, positionnées dans une cellule de mesure. L'espace entre les deux surfaces est ajusté avec des cales pour créer une différence de pression entre l'entrée et la sortie de la cellule de mesure. Pendant l'analyse, la pression augmente de manière continue. La différence de pression au travers de la cellule de mesure (Δp) et du potentiel d'écoulement (ΔU) sont utilisées pour calculer le potentiel zêta (ζ) selon la méthode de Fairbrother-Mastin (équation 34).²

$$\zeta = \frac{\Delta U}{\Delta p} \times \frac{\eta}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \times K_B \quad (34)$$

Avec ζ le potentiel zêta, $\Delta U/\Delta p$ la pente de potentiel d'écoulement en fonction de la différence de pression, η la viscosité de l'électrolyte, ε le coefficient diélectrique du solvant, ε_0 la permittivité du vide et K_B la conductivité de l'électrolyte.

La concentration en surface de groupes fonctionnels, l'adsorption d'ions, les effets de la pression et le pH sont les variables principales qui peuvent influencer le potentiel zêta. Lors des mesures, la géométrie des échantillons, la pression, la température et la concentration de l'électrolyte ont été maintenues constantes. Les valeurs de potentiels zêta mesurées restent cependant spécifiques à la géométrie de la cellule de mesure et des paramètres énoncés.

Les valeurs de potentiel zêta des surfaces solides ont été mesurées par un analyseur électrocinétique ZetaCAD (CAD Instrument, France) situé au BHM (SayFood, AgroParisTech-Massy). L'électrolyte utilisé pour toutes les analyses est une solution de NaCl à $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans l'eau déionisée.

Caractérisations biologiques

Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

L'activité bactériostatique d'un polyionène (PI) est caractérisée par sa concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la plus petite concentration pour laquelle la croissance bactérienne est inhibée. Les paramètres importants à définir sont : la température, la longueur d'onde, le temps de croissance et l'intervalle entre deux mesures optiques. Les paramètres de temps et de température sont choisis en fonction de la souche bactérienne dans le but d'optimiser sa croissance. La longueur d'onde est choisie en fonction de la couleur de la solution afin d'avoir une meilleure discrimination par rapport au trouble formé par les bactéries.

Matériels

Les CMI ont été mesurées au laboratoire de microbiologie P2 situé au BHM (SayFood, AgroParisTech-Massy). Les CMI ont été déterminées sur 3 bactéries : *Lactococcus lactis* 505 (*L. lactis*), *Staphylococcus aureus* 768 (*S. aureus*) et *Escherichia coli* K12 (*E. coli*) cultivées respectivement dans du milieu M17 (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), du milieu TSB (Trypcase Soy Broth, Biomerieux, Lyon, France) et du milieu LB (*Luria Bertani*, BD Difco, Illkirch, France) supplémenté de 20% de glycérol en volume. Les souches ont été ensemencées avec 3 repiquages à 30 °C pour *L. lactis* et 37 °C pour *S. aureus* et *E. coli*. Les expériences ont été réalisées sur des souches au début de l'état stationnaire de croissance avec

une densité optique (D.O.) à 620 nm de 0,8, ce qui correspond à une concentration d'environ 10^9 Unité Formant des Colonies par mL (UFC.mL⁻¹) qui a été vérifiée par dénombrement sur milieu de culture gélosés.

Les 10 souches sauvages du projet BRICAPAC ont été cultivées de la même manière dans des milieux de culture et des températures de croissance adéquats. *Salmonella* Typhimurium N°1612 et *Staphylococcus aureus* N°1616 ont été cultivés dans du milieu TSB à 37 °C. *Pseudomonas sp.* N°1619 et *Listeria monocytogenes* N°1618 ont été cultivés dans du milieu TSB à 30 °C et 25 °C respectivement. *Serratia sp.* N°1621 et *Brochotrix* N°1620 ont été cultivés dans du milieu BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) à 30 °C et 25 °C respectivement. *Lactobacillus sakei* N°1624 et *Lactococcus lactis* N°1629 ont été cultivés dans du milieu MRSB (Man Rogosa Sharpe Broth, BD Difco, Illkirch, France) à 30 °C. *Lactobacillus casei* N°1622 et *Leuconostoc mesenteroides* N°1625 ont été cultivés dans du milieu MRSB supplémenté de 0,5% de glucose en volume à 30 °C.

Méthode

Pour toutes les mesures réalisées dans cette thèse, les suivis de croissance ont été effectués sur des plaques 100 puits pendant 48 h à 620 nm avec une mesure toutes les 15 min et une agitation de 10 secondes avant la mesure. Les suivis des 3 souches modèles (*L. lactis*, *S. aureus*, *E. coli*) ont été faits dans les mêmes milieux de culture que ceux décrits dans la sous-section *Matériels* à 30 °C. Les suivis des 10 souches sauvages du projet BRICAPAC ont été fait dans les mêmes milieux de culture et aux mêmes températures que ceux décrits dans la sous-section *Matériels*. La gamme de concentration testée varie de 0,5 à 150 µg.mL⁻¹. Les puits sont répartis selon 3 catégories : blanc, témoin et test de polymère. Un puit « blanc » est rempli avec 300 µL de milieu de culture pur. Un puit « témoin » est rempli avec 30 µL d'eau distillée et 270 µL de milieu de cultureensemencé avec la souche bactérienne à la concentration visée de 10^4 UFC.mL⁻¹. Un puit « test de polymère » est rempli avec 30 µL de polymère à la concentration choisie dans de l'eau distillée et 270 µL de milieu de cultureensemencé avec la souche bactérienne à la concentration visée de 10^4 UFC.mL⁻¹. Une série de tests sur un polymère est composée d'un blanc, d'un témoin et de 7 à 10 concentrations différentes en polymère. Chaque type de puits est réalisé en double pour vérifier la reproductibilité. La CMI correspond à la plus petite concentration testée pour laquelle la densité optique ne varie pas par rapport à la densité optique du blanc pendant les 48 h du test. La CMI a été déterminée par au moins deux essais indépendants. Si les valeurs de CMI ne sont pas identiques sur les deux essais mais proches à une dilution près, on choisit pour CMI la plus grande valeur des deux.

Test de cytotoxicité (MTT) sur L929

Pour caractériser la cytotoxicité des polymères, on détermine la plus petite concentration à laquelle la viabilité cellulaire est inférieure à 70%.

Matériels

La ligné cellulaire utilisée pour réaliser les tests MTT est la L929 (fibroblaste murin) fournie par l'ATCC (American Type Culture Collection). Elle est cultivée dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, dans un incubateur à 37 °C, dont l'atmosphère est saturée en humidité et contient 5% de CO₂. Les passages (procédé de sous-culture) sont effectués avec de la trypsine 0,05% (m/v), lorsque les cellules se trouvent à 80% de confluence environ. Pour l'ensemencement des différents tests, le comptage des cellules est effectué avec une cellule de Malassez.

Méthode en solution

Pour les tests MTT en solution, les cellules L929 sont ensemencées dans des plaques de 96 puits, à une densité de 2500 cellules/puits (50 µL/puits). Après une nuit d'incubation, on ajoute 50 µL de différentes solutions de polyionènes préparées la veille dans du milieu de culture supplémenté contenant 0,25 µg.mL⁻¹ d'amphotéricine B et 10 µg.mL⁻¹ de gentamicine. On réalise les tests sur deux gammes de concentrations, l'une de 1 à 100 µg.mL⁻¹ et l'autre de 1 à 15 µg.mL⁻¹. Les cellules sont exposées aux polyionènes pendant 48 h. Les solutions de polyionènes sont alors remplacées par 100 µL de DMEM supplémenté, auxquels sont ajoutés 25 µL d'une solution de MTT filtré, préparée à 5 mg.mL⁻¹ dans le DMEM supplémenté. Après une incubation de 2 h, le milieu est retiré, et 200 µL de DMSO sont ajoutés à la place, pour dissoudre les cristaux de formazan formés. Les mesures d'absorbance à 570 nm sont réalisées, après homogénéisation par agitation, sur un Spectramax Plus 384 (Molecular Devices). Chaque condition est répétée sur 6 puits. La viabilité cellulaire est calculée comme le ratio d'absorbance moyenne entre les cellules contrôles (traitées avec du DMEM supplémenté + amphotéricine B et gentamicine) et les cellules exposées aux polyionènes.

Méthode contact

Il a été réalisé une variante du test MTT en solution, appelé « test MTT au contact », afin de l'appliquer à des matériaux solides. Ce test a permis d'évaluer la cytotoxicité au contact de matériaux massifs mis en présence de cellules L929. Les matériaux testés sont de dimensions 8 x 14 mm, ce qui représente environ 1/10^{ème} de la surface des puits qui vont être utilisés. Les

matériaux testés sont des lames de verre et du polyéthylène qui ont été modifiés pour ajouter des polyionènes en surface. Au préalable du test, les matériaux sont immergés dans l'éthanol afin d'être nettoyés et séchés à l'étuve 37 °C dans des boîtes de pétri stériles.

Pour les tests MTT au contact, les cellules L929 sontensemencées dans des plaques de 6 puits, à une densité de 100 000 cellules/puits (2 mL/puits). Après une nuit d'incubation, on retire le milieu de culture supplémenté et on remet 4 mL de milieu de culture supplémenté contenant en plus 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'amphotéricine B et 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de gentamicine. On ajoute les matériaux, face greffée vers le tapis cellulaire, dans les puits. Les cellules sont exposées aux matériaux modifiés pendant 48 h. Les matériaux sont retirés ainsi que le milieu de culture du test qui est remplacé par 2 mL de milieu de culture supplémenté neuf. On ajoute par la suite 0,5 mL d'une solution de MTT préparée à 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans le DMEM supplémenté. Après une incubation de 2 h, le milieu est retiré, et 4 mL de DMSO sont ajoutés à la place, pour dissoudre les cristaux de formazan formés. Les mesures d'absorbance à 570 nm sont réalisées, après homogénéisation par agitation, sur un Spectramax Plus 384 (Molecular Devices). Chaque condition est répétée sur 3 puits. La viabilité cellulaire est calculée comme le ratio d'absorbance moyenne entre les cellules contrôles (traitées avec du DMEM supplémenté + amphotéricine B et gentamicine) et les cellules exposées aux matériaux modifiés.

Test de cytotoxicité (MTT) sur épidermes humains reconstruits

Une partie des tests de cytotoxicité a été effectuée par un laboratoire externe (STERLAB, Vallauris) sur des épidermes humains reconstruits. Le protocole est appliqué d'une part en testant des solutions d'extractions réalisées à partir des lames de verre modifiées (Méthode avec extraction) et d'autre part, en déposant des films de PE modifiés directement sur les épidermes (Méthode contact).

Matériels

Le test est effectué sur des épidermes humains reconstruits Skin+ âgés de 17 jours. Le modèle Skin+ est reconstruit à partir d'une culture primaire de kératinocytes (isolés à partir de prépuce), en utilisant un procédé de reconstruction à l'interface air-liquide sur du milieu défini. A 17 jours, les épidermes ont une épaisseur comprise entre 140 et 160 μm , avec 7 couches et une surface de 0,5 cm^2 .

Méthode avec extraction

Une extraction est réalisée sur chaque échantillon de verre pendant 24 h à 37 °C, sous agitation dans un tampon phosphate salin (PBS). Le poids/volume final de l'échantillon est de 0,2 g.mL⁻¹. Le contrôle négatif est réalisé avec du PBS. Le contrôle positif dans le test de viabilité est l'extrait d'un gant de latex dans le PBS. 30 µl de chaque extrait est mis en contact avec les épidermes dans du milieu de maintenance. Pour chaque condition, le test est réalisé trois fois. Les épidermes sont ensuite incubés pendant 24 h à 36,5 °C dans un incubateur dont l'atmosphère est saturée en humidité et contient 5% de CO₂. A l'issue des 24 h, la viabilité cellulaire est évaluée par un test MTT. Les épidermes sont d'abord rincés avec 10 mL de PBS stérile. Ils sont ensuite disposés dans 300 µL de solution de MTT à 0,5 mg.mL⁻¹ et incubés pendant 3 h à 36,5 °C et 5% de CO₂. Chaque épiderme est ensuite transféré dans un puit contenant 1,5 mL d'isopropanol et incubé de nouveau pendant 2 h à température ambiante. Après incubation, les épidermes sont retirés des puits. Les puits sont homogénéisés puis 200 µL sont transférés en triplicata dans une plaque 96 puits et une lecture d'absorbance est réalisée à 550 nm. La viabilité cellulaire est calculée comme le ratio d'absorbance moyenne entre les épidermes du contrôle négatif et les épidermes exposés aux extraits.

Méthode contact

Le contrôle négatif est réalisé avec des épidermes sans traitement. Le contrôle positif dans le test de viabilité est réalisé en appliquant une solution de sodium dodecyl sulfate (SDS) à 0,5% massique dans l'eau. Le film de PE est déposé au contact des épidermes reconstruits dans du milieu de maintenance. Pour chaque condition, le test est réalisé trois fois. Le test est ensuite réalisé de la même manière que pour la méthode avec extraction, en incubant les épidermes pendant 24 h à 36,5 °C dans 5% de CO₂ et en effectuant un test MTT à la suite de l'incubation. La viabilité cellulaire est calculée comme le ratio d'absorbance moyenne entre les épidermes du contrôle négatif et les épidermes exposés films de PE modifiés.

Essais d'adhésion

Matériels

Les essais d'adhésion ont été effectuées au laboratoire de microbiologie P2 situé au BHM (SayFood, AgroParisTech-Massy). Les essais d'adhésion ont été réalisés sur 2 bactéries : *Staphylococcus aureus* 768 (*S.aureus*, Gram+) et *Escherichia coli* K12 (*E. coli*, Gram-)

cultivées respectivement dans du milieu TSB (Trypcase Soy Broth, Biomerieux, Lyon, France) et du milieu LB (*Luria Bertani*, BD Difco, Illkirch, France) supplémenté de 20% de glycérol en volume. Les souches ont été ensemencées avec 3 repiquages à 37 °C pour *S. aureus* et *E. coli*. Les expériences ont été réalisées sur des souches au début de l'état stationnaire de croissance récolté par centrifugation (7000 g, 10 min, 4 °C). Les souches ont été lavées 2 fois avec de l'eau déionisée et remises en suspension en eau déionisée. Pour certains essais, la suspension bactérienne a été préparée en eau physiologique (NaCl à 9 g.L⁻¹ dans l'eau déionisé). La concentration a été ajustée de façon à avoir une densité optique (D.O.) à 620 nm de 0,8, ce qui correspond à une concentration d'environ 10⁹ Unité Formant des Colonies par mL (UFC.mL⁻¹) qui a été vérifiée par dénombrement sur milieu de culture gélosé TSA (Trypcase Soy Agar, Biomerieux) pour *S. aureus*, ou LBA (*Luria Bertani* Agar, BD Difco, Illkirch, France) pour *E. coli*.

Méthode : dénombrements des bactéries viables cultivables (VC)

Dans une première étape, on place les matériaux modifiés dans des boîtes de Petri stériles de 55 mm de diamètre. La suspension mère de bactéries est diluée afin d'obtenir une suspension fille à environ 10⁶ UFC.mL⁻¹ dans l'eau déionisée. La concentration de la suspension fille est vérifiée par dénombrement sur milieu de culture gélosé. Les matériaux modifiés sont recouverts de 10 mL de suspension fille et laissés à l'étuve 37 °C pour 3 h d'adhésion. A l'issue des 3 h d'adhésion, les bactéries non-adhérentes ou faiblement attachées à la surface sont retirées par 6 rinçages successifs dans de l'eau déionisée. La surface modifiée est ensuite placée dans 6 mL d'eau physiologique dans un tube essai. Les bactéries adhérentes sont décrochées en réalisant un passage de 2 minutes dans un bain à ultrasons (Branson Ultrasonics 1510, USA) et 30 secondes d'agitation sur un vortex à température ambiante. La solution contenant les bactéries décrochées est ensuite diluée et on dénombre les bactéries viables cultivables sur milieu de culture gélosé TSA (*S. aureus*) ou LBA (*E. coli*). Les résultats présentés sont normalisés pour une suspension fille à précisément 10⁶ UFC.mL⁻¹.

Méthode : observation de la flore totale (FT)

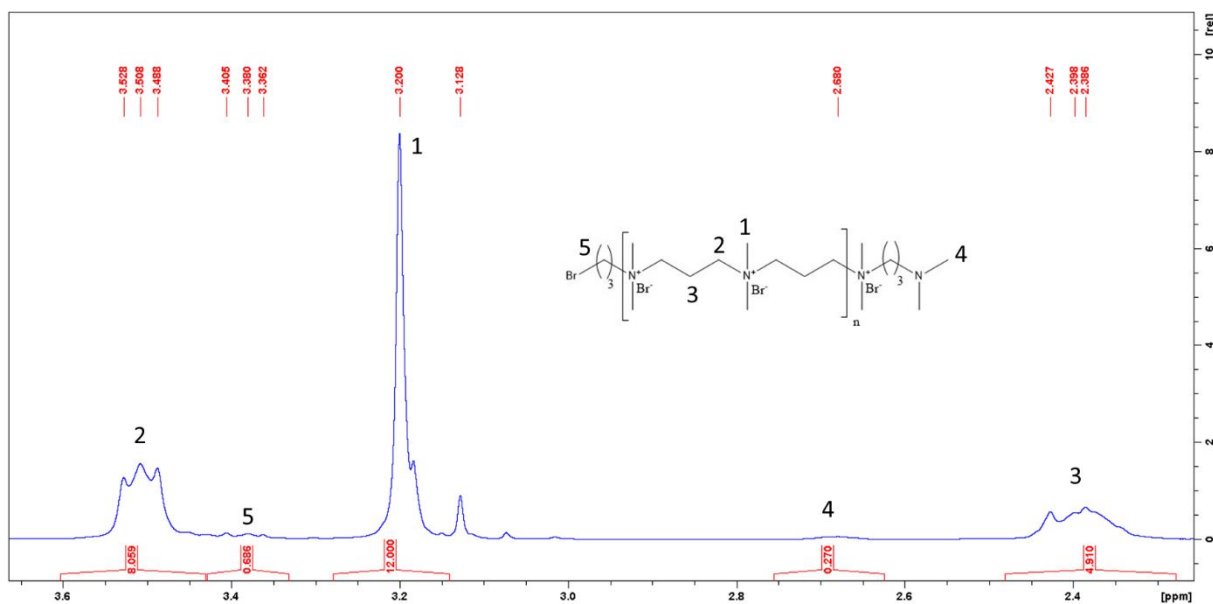
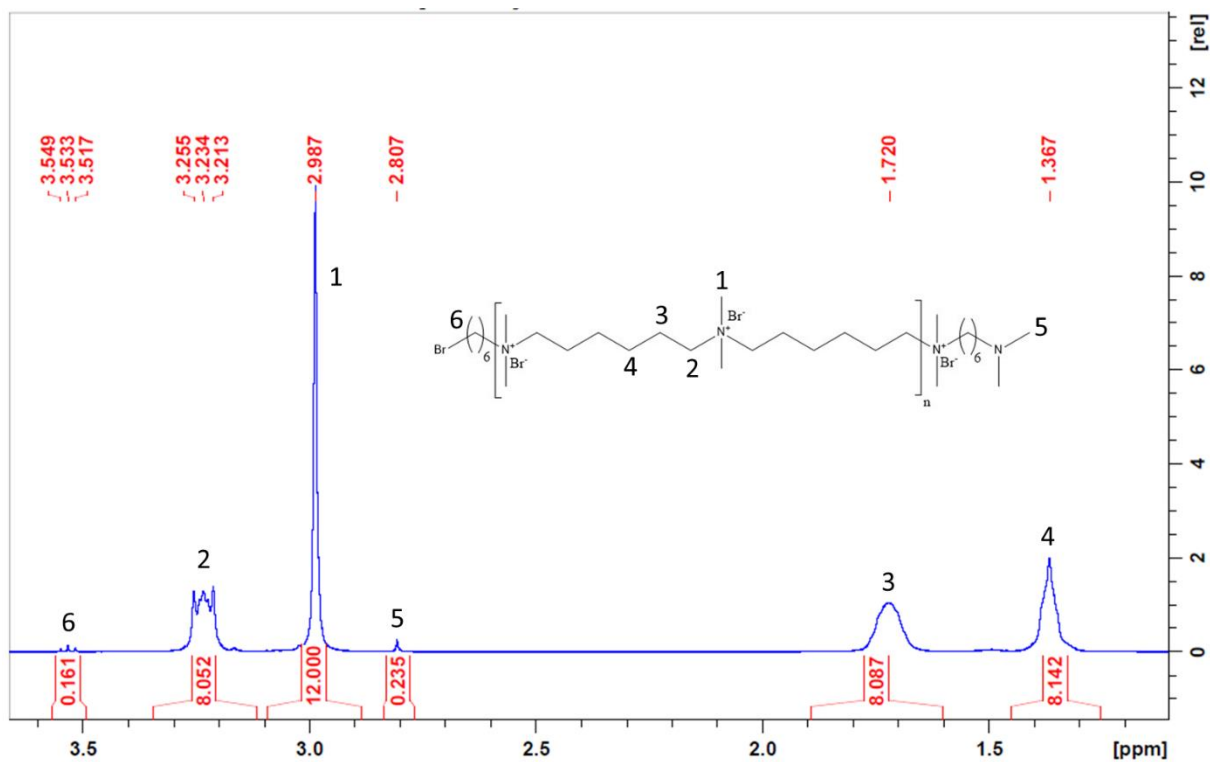
Comme décrit précédemment, les surfaces modifiées sont mis au contact d'une suspension bactérienne fille à environ 10⁶ UFC.mL⁻¹ pendant 3 h d'adhésion. Les bactéries non-adhérentes ou faiblement attachées à la surface sont ensuite retirées par 6 rinçages successifs dans de l'eau déionisée. A cette étape du test, il ne reste donc que les bactéries adhérentes (vivantes ou mortes) sur la surface que l'on appelle flore totale. La surface modifiée contaminée est placée entre une lame et une lamelle pour être observée au microscope à épifluorescence.

La souche de *S. aureus* utilisée pour les essais est génétiquement modifiée pour être fluorescente sous U.V., par conséquent, elle peut être observée au microscope sans coloration préalable. Pour l'observation d'*E. coli*, le choix de la méthode de coloration s'est porté sur la sonde Syto 9. On dilue 3 µl de colorant Syto 9 dans 1,5 mL d'eau déionisée avec 0,2 % m/v de NaCl. Ce mélange est ensuite réparti sur la lame avant l'observation au microscope à épifluorescence.

La flore totale a été estimée grâce à des clichés photographiques pris aléatoirement à différents endroits sur la surface modifiée (10 au grossissement x40 et 10 au grossissement x10). La flore totale a ensuite été estimée grâce au logiciel de traitement d'image ImageJ en convertissant les clichés photographiques de microscopie à épifluorescence en image en nuance de gris 8-bit. Les clichés sont ensuite binarisés en noir et blanc grâce à la méthode « Otsu » (fourni dans le logiciel). On estime la surface moyenne d'une bactérie en réalisant la moyenne des surfaces de 10 bactéries isolées sur les clichés. En utilisant la fonction « % area », on peut connaître la surface recouverte par l'ensemble des bactéries sur le cliché, et, en connaissant la surface moyenne d'une bactérie, on peut remonter au nombre de bactéries présentes sur le cliché. Les dénombrements de la flore totale sont le résultat de la moyenne de 3 clichés représentatifs au grossissement x40 par essai. Avant d'en faire la moyenne, les résultats ont été normalisés pour une suspension contaminante à 10^6 UFC.mL⁻¹.

Méthode : évaluation du relargage

Après une immersion de 3 h de la surface modifiée dans 10 mL d'eau déionisée, le surnageant du test d'adhésion est récupéré. On dispose 30 µL du surnageant de chaque surface modifiée dans un puits (plaque 100 puits)ensemencé avec 270 µL d'une suspension de *S.aureus* à environ 10^6 UFC.mL⁻¹ (concentration vérifiée par dénombrement sur milieu de culture gélosé). La cinétique de croissance bactérienne dans le puit est suivie par une mesure de densité optique dans l'appareil Bioscreen à 30 °C pendant 48 h. Une mesure de densité optique à 620 nm est effectuée toutes les 15 minutes après 10 secondes d'agitation. On a aussi évalué la quantité de bactéries présentes dans le surnageant d'adhésion en le diluant puis en dénombrant les bactéries viables cultivables sur milieu de culture gélosé (TSA pour *S. aureus* et LBA pour *E. coli*). On compare ensuite cette valeur à la quantité de bactéries dans la suspension contaminante.

Annexe B : Spectres RMN ^1H Figure V-14 : Spectre RMN ^1H du PI 3-3Figure V-15 : Spectre RMN ^1H du PI 6-6

Annexes

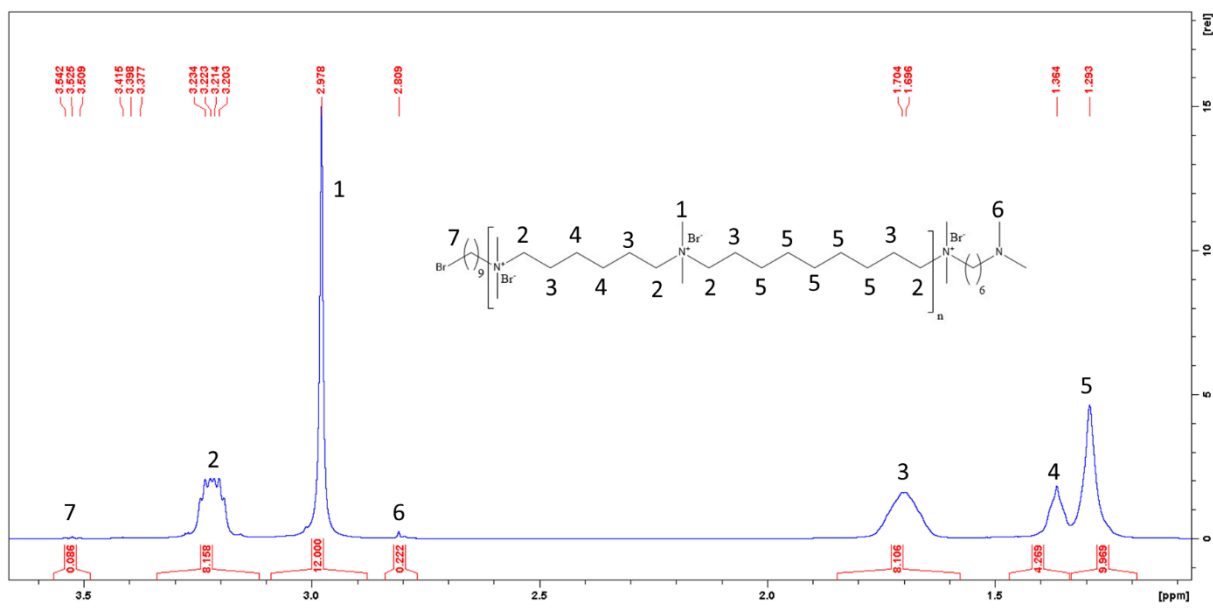


Figure V-16 : Spectre RMN ^1H du PI 6-9

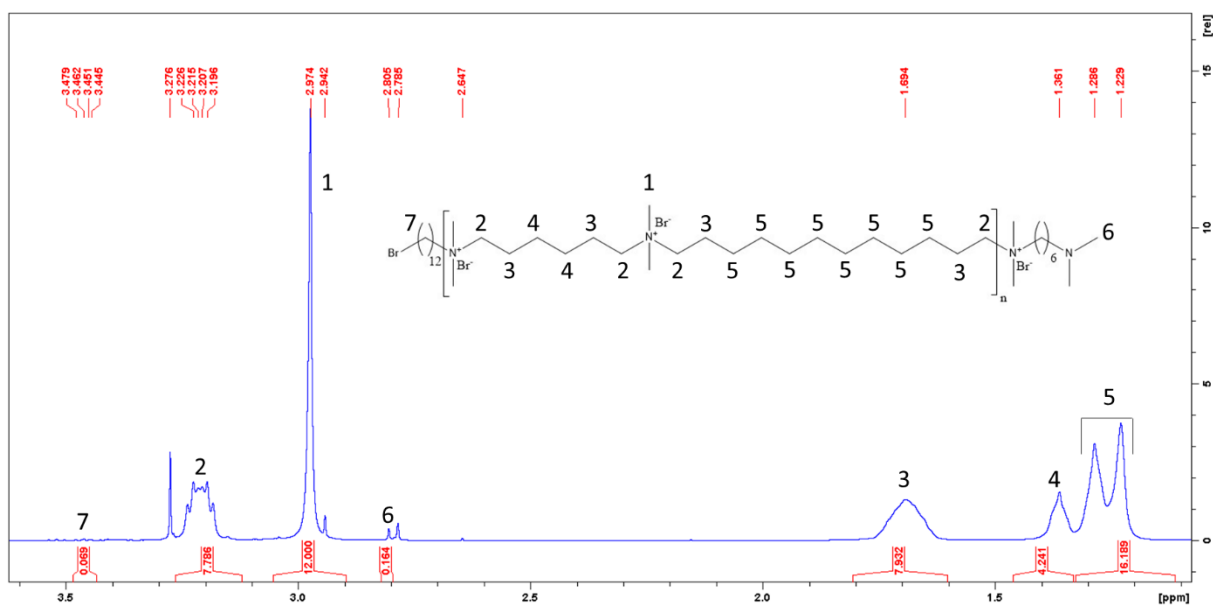


Figure V-17 : Spectre RMN ^1H du PI 6-12

Annexes

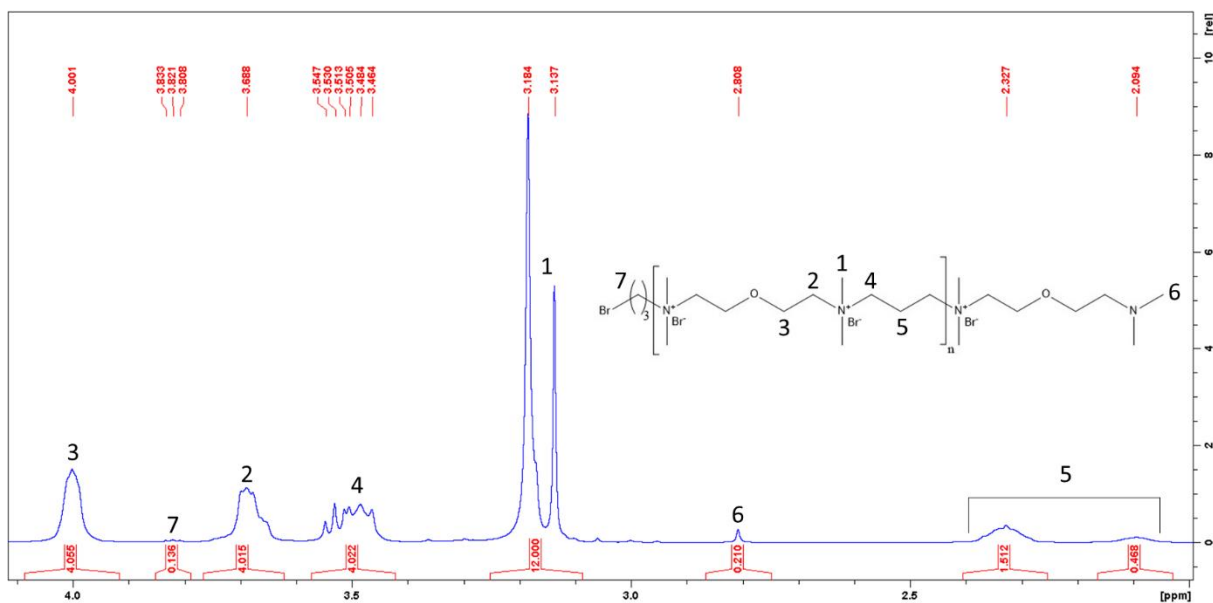


Figure V-18 : Spectre RMN ^1H du PI et5-3

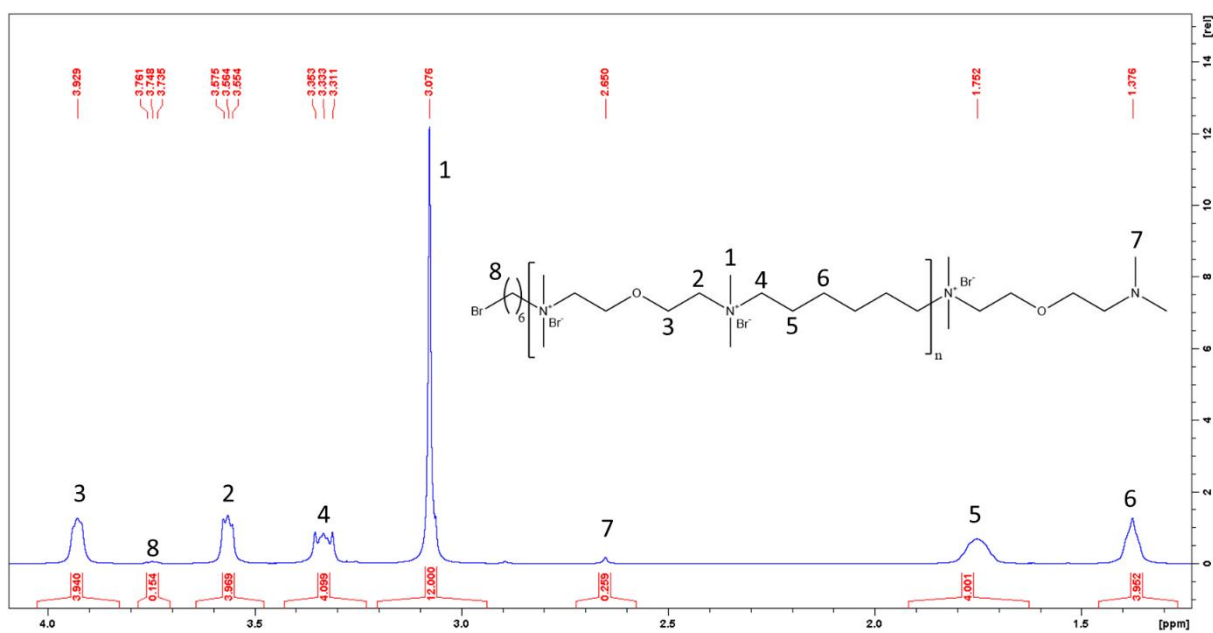
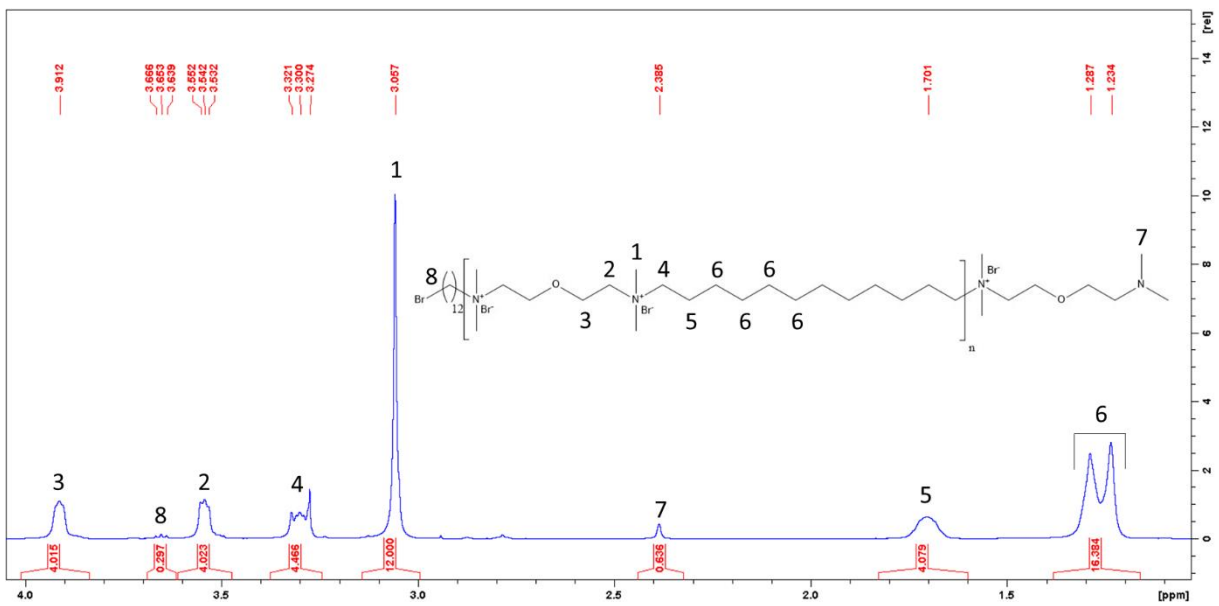
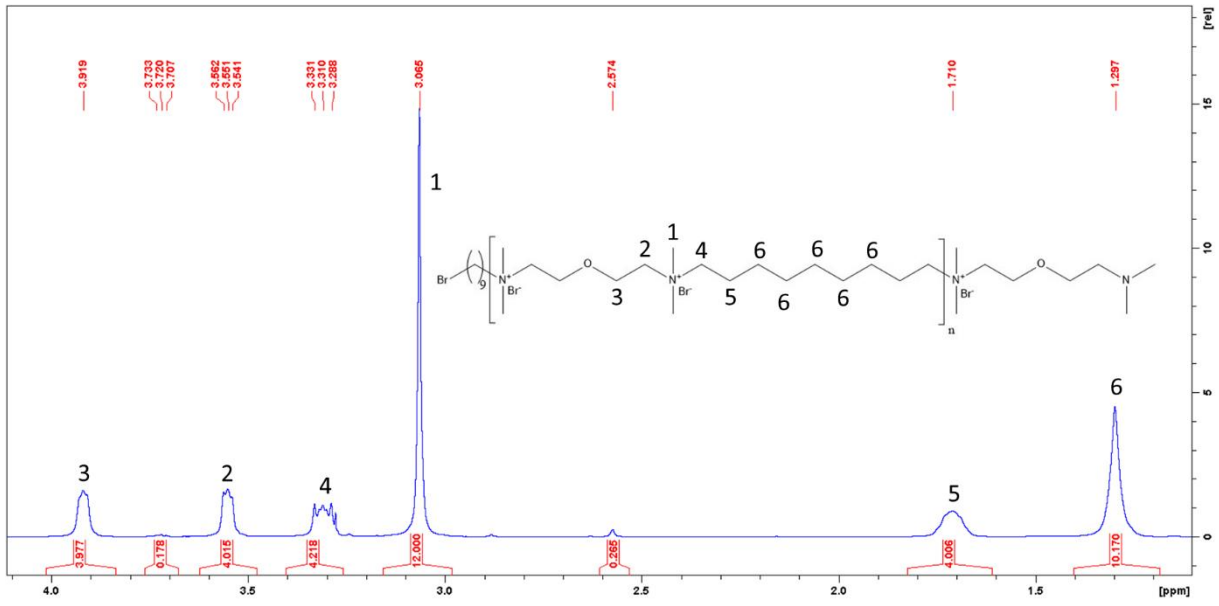


Figure V-19 : Spectre RMN ^1H du PI et5-6

Annexes



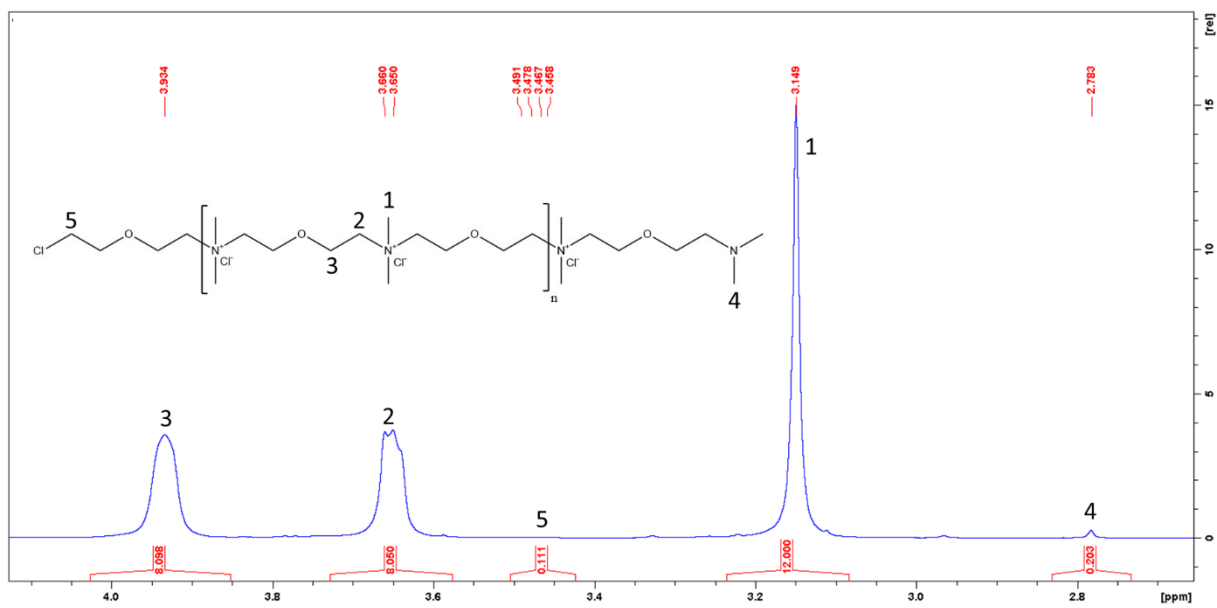


Figure V-22 : Spectre RMN ^1H du PI et5-et5

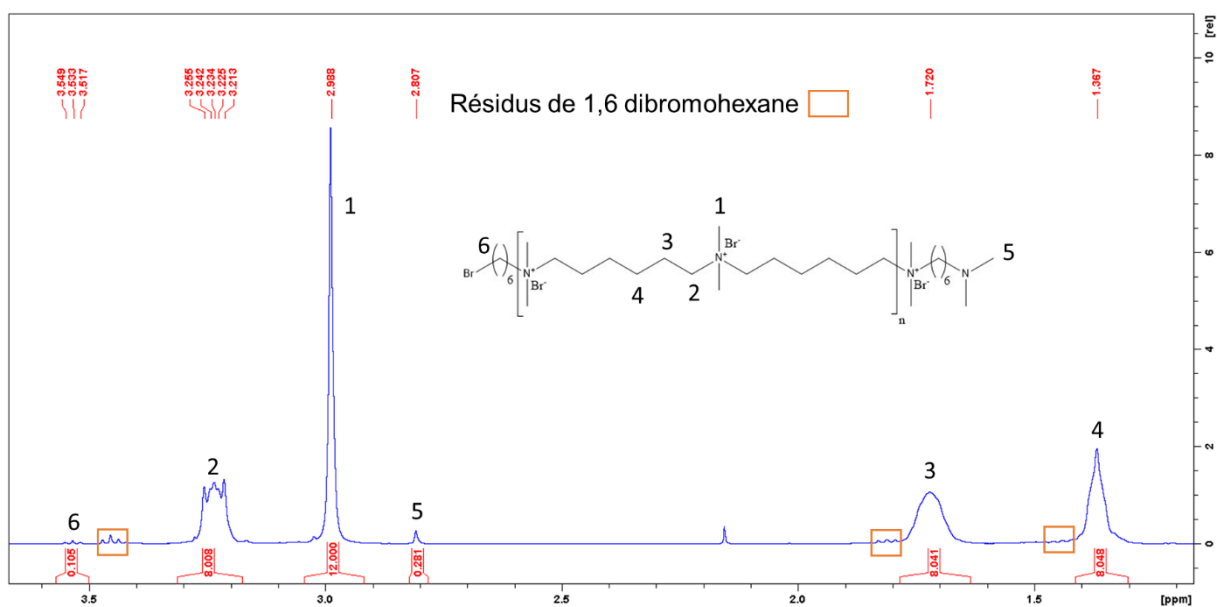


Figure V-23 : Spectre RMN ^1H du PI 6-6 pour l'encre PI 6-6 vinylique

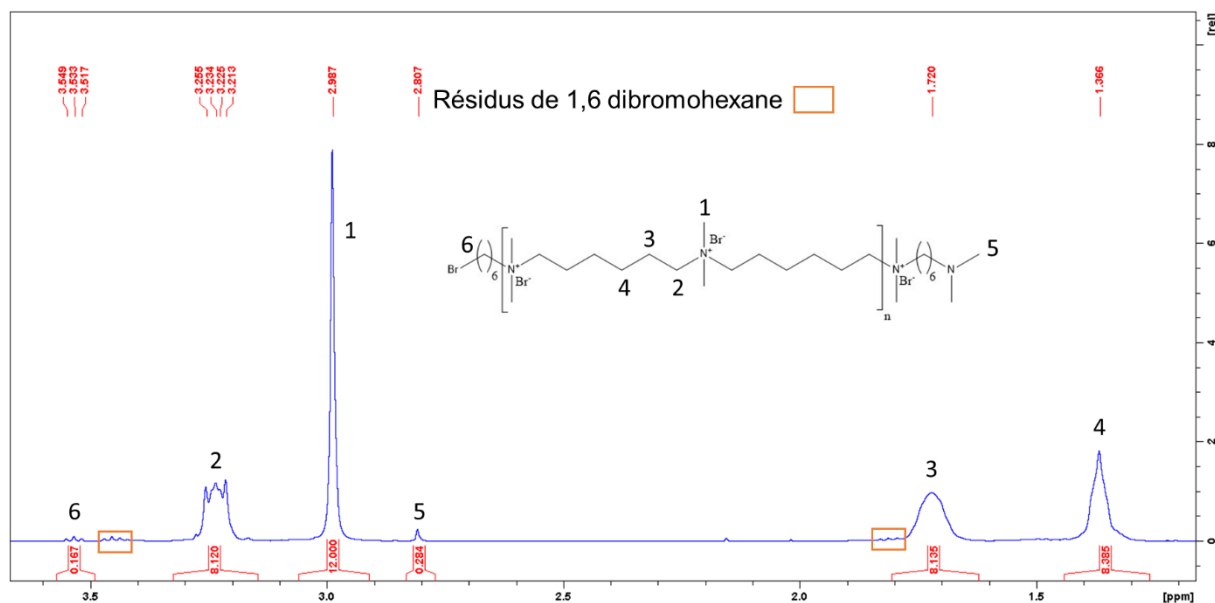


Figure V-24 : Spectre RMN ^1H du PI 6-6 Br pour l'encre PI 6-6 vinylique

Exemple de calcul des pourcentages des extrémités :

Sur le spectre du PI 6-6 (Figure V-23) :

$$\%N = \frac{\frac{0,281}{6}}{\frac{0,281}{6} + \frac{0,105}{2}} \times 100 = 47,2\% \quad (35)$$

$$\%Br = \frac{\frac{0,105}{2}}{\frac{0,281}{6} + \frac{0,105}{2}} \times 100 = 52,8\% \quad (36)$$

Sur le spectre du PI 6-6 Br (Figure V-24) :

$$\%N = \frac{\frac{0,284}{6}}{\frac{0,284}{6} + \frac{0,167}{2}} \times 100 = 36,2\% \quad (37)$$

$$\%Br = \frac{\frac{0,167}{2}}{\frac{0,284}{6} + \frac{0,167}{2}} \times 100 = 63,8\% \quad (38)$$

Annexe C : CMI sur 10 souches sauvages dans le cadre du projet ANR BRICAPAC

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des PI aliphatiques ont été évaluées sur 10 souches sauvages fournies par CHARAL. Les essais ont été effectués sur 3 concentrations : 1,5 ; 15 et 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dans cet essai, les concentrations minimales bactéricides (CMB) ont également été évaluées en remettant en culture les puits où il n'avait pas été observé de croissance de la souche. Les mesures ont été faites sur 48 h à 620 nm aux températures et milieux de croissances optimaux des différentes souches (cf Annexe A : Partie expérimentale).

Tableau V-10 : CMI et CMB des PI aliphatiques sur 10 souches sauvages

Souches	PI 3-3 (2500 g.mol^{-1})		PI 6-6 (3000 g.mol^{-1})		PI 6-9 (5300 g.mol^{-1})		PI 6-12 (2800 g.mol^{-1})		
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
Pathogènes	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	>150	>150	*	150	*	150	**	15
	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	15	>150	**	15	**	15	$\leq 1,5$	150
	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	15	>150	$\leq 1,5$	$\leq 1,5$	15	150	15	150
Altérations	<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i>	*	150	**	15	15	150	**	15
	<i>Brochotrix</i>	150	>150	15	>150	**	15	<1,5	1,5
	<i>Serratia sp.</i>	>150	>150	>150	>150	>150	>150	*	150
Lactiques	<i>Lactobacillus</i> <i>casei</i>	>150	>150	>150	>150	150	>150	<1,5	1,5
	<i>Lactobacillus</i> <i>sakei</i>	150	>150	150	>150	*	150	<1,5	1,5
	<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i>	150	>150	150	>150	15	150	<1,5	1,5
	<i>Lactococcus</i> <i>lactis</i>	*	150	*	150	15	150	<1,5	1,5

* : $15 < \text{CMI} < 150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (pas d'inhibition de la croissance observée à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

** : $1,5 < \text{CMI} < 15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (pas d'inhibition de la croissance observée à $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Annexe D : Tests de cytotoxicité des PI sur la gamme 1 de concentration

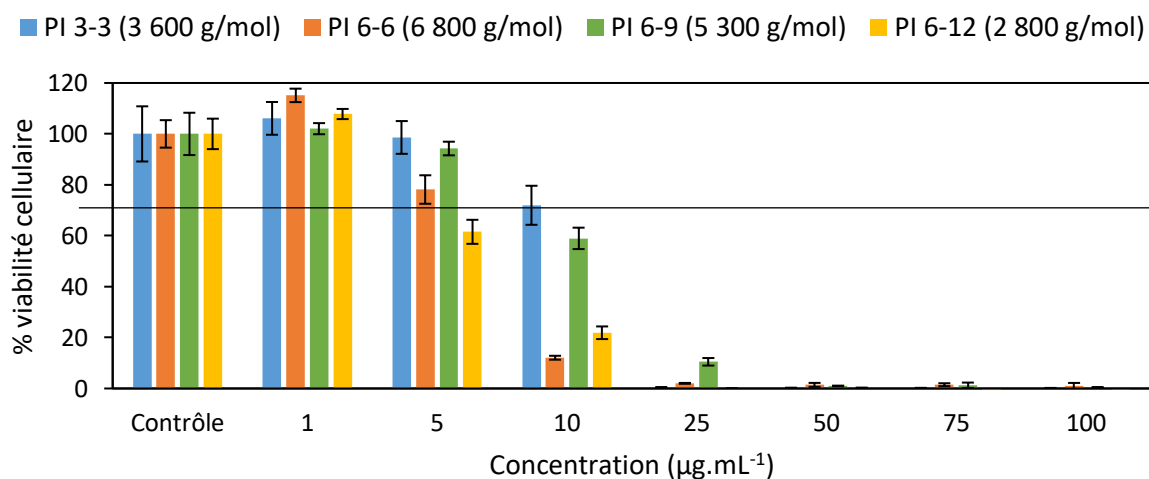


Figure V-25 : Cytotoxicité des PI aliphatiques sur les L929 sur la gamme 1 de concentrations (n = 6)

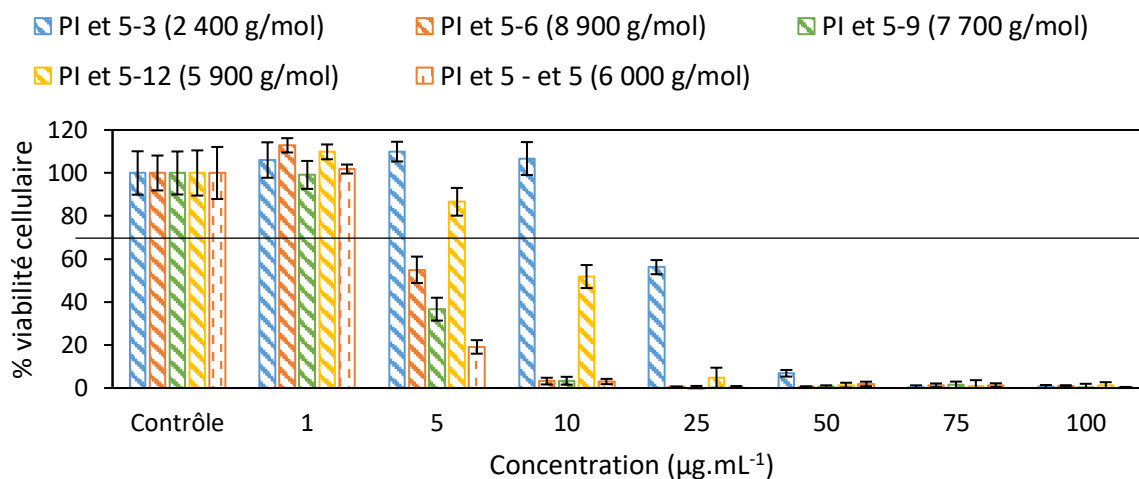


Figure V-26 : Cytotoxicité des PI éthers sur les L929 sur la gamme 1 de concentrations (n = 6)

Annexe E : Réflectivité des neutrons et des rayons X

Réflectivité des neutrons

La réflectivité des neutrons est une technique bien adaptée à l'étude de la structure de polymères greffés sur des surfaces. Dans ce manuscrit, il est seulement présenté la réflectivité spéculaire des neutrons qui permet d'obtenir le profil de densité de longueur de diffusion de plusieurs couches organiques perpendiculairement à la surface. Le principe de cette technique et le montage expérimental sont détaillés dans cette annexe ainsi que la méthode d'ajustement des courbes pour déterminer les profils de densité.

Les neutrons

Découvert en 1932 par James Chadwick, les neutrons sont à la fois une onde et une particule. Ainsi la particule de neutrons est définie par un vecteur d'onde k défini par la relation suivante :

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (39)$$

Où λ est une longueur d'onde de De Broglie définie par la relation $\lambda = h/mv$, avec h la constante de Planck, m la masse de la particule et v sa vitesse.

Cette particule possède également une énergie en joules définie par la relation :

$$E = \frac{\hbar^2}{2m} k^2 \quad (40)$$

Où \hbar est la constante de Planck réduite.

Interaction neutrons-matière

Les neutrons interagissent avec les noyaux des atomes et cette interaction neutron-matière, assimilé à un potentiel ponctuel, est représenté par un pseudo potentiel de Fermi V_F :

$$V_F(r) = b\left(\frac{2\pi\hbar^2}{m}\right)\delta(r) \quad (41)$$

Avec m la masse du neutron, $\delta(r)$ la fonction de Dirac, r la position de chaque noyau atomique et b la longueur de diffusion cohérente qui décrit l'amplitude de l'interaction entre les neutrons et le noyau de l'atome. La longueur de diffusion cohérente est composée d'une partie réelle (positive ou négative) et d'une partie imaginaire qui représente l'absorption des neutrons dans le noyau. Ce phénomène étant moindre, on néglige la partie imaginaire dans l'expression de b . $V_F(r)$ est seulement dépendant en z donc le potentiel moyen V_Z au sein d'une couche homogène est défini comme l'intégrale du pseudo-potentiel de Fermi $V_F(r)$:

$$V_Z = \frac{1}{V} \int_V V_F(r) dr = \frac{2\pi\hbar^2}{m} Nb \quad (42)$$

Où N est le nombre d'atome par unité de volume. On définit le produit Nb comme la densité de longueur de diffusion cohérente (SLD, Scattering Length Density) qui peut être positive ou négative.

Densité de longueur de diffusion cohérente Nb

La densité de longueur de diffusion cohérente est dépendante de l'élément périodique et de l'isotope de l'atome étudié. Cette différence d'interaction entre les isotopes est une spécificité des neutrons, très utilisée pour l'étude des polymères. En effet, cela permet d'obtenir un bon contraste entre un élément deutéré et un élément hydrogéné, sans pour autant changer de façon importante les interactions chimiques entre les éléments. Il est ainsi possible de distinguer des chaînes de polymères deutérées de chaînes hydrogénées. La densité de longueur de diffusion cohérente Nb d'une molécule peut se calculer à partir de tables rassemblant les valeurs de longueur de diffusion cohérente b des atomes et en utilisant la formule suivante :

$$Nb = \frac{N_A d}{M} \sum_i a_i b_i \quad (43)$$

Où a_i représente le nombre d'atome de longueur de diffusion cohérente b_i , N_A le nombre d'Avogadro, d la densité de la molécule et M sa masse molaire.

Dans le Tableau V-11, on a rassemblé les longueurs de diffusion cohérentes et les masses molaires des atomes utiles dans ce manuscrit.

Tableau V-11 : Longueurs de diffusion cohérente et masse molaire des atomes courants

Elément chimique	Longueur de diffusion cohérente b ($\cdot 10^{-12}$ cm)	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
^1H	-0,374	1
D (^2H)	0,667	2
C	0,665	12
O	0,580	16
N	0,936	14
Br	0,680	80
Si	0,415	28

A titre d'exemple le Nb de H_2O est calculé comme suit :

$$Nb_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{6,02 \cdot 10^{23} \times 1}{18} \times (-0,374 \times 2 + 0,58) \cdot 10^{-12} = -0,56 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$$

Notez que $-0,56 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-2} = -0,56 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$.

Le Tableau V-12 regroupe les densités de longueur de diffusion cohérente Nb utilisées dans ce manuscrit. Pour les polymères, on a indiqué les masses molaires des unités de répétition. La densité des polymères étudiés étant inconnue, elle a été approximée à $1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Ces valeurs de Nb calculées ne sont donc pas tout à fait exactes. Cependant, des valeurs mesurées par variation de contraste ont été trouvées dans la littérature³ et ont été ajoutées à titre de comparaison entre parenthèse dans le Tableau V-12. On peut noter que les valeurs sont relativement proches, donc l'approximation faite pour les densités des polymères était correcte.

Tableau V-12 : Densités de longueur de diffusion cohérente et masses molaire des certaines molécules d'intérêt

Molécule	Densité de longueur de diffusion cohérente Nb ($\cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$)	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
H_2O	-0,56	18
D_2O	6,38	20
SiO_2	3,41	60
Si (cristal)	2,07	28
PI 3-3	-0,082 (-0,142)	332
PI 6-6	-0,138	416
PI 6-9	-0,158	458
PI 6-12	-0,174 (-0,228)	500

Indice de réfraction neutronique et réflectivité sur une seule interface

En réflectivité spéculaire des neutrons, on observe des phénomènes de réfraction et de réflexion analogues à ceux de l'optique classique⁴. On prendra comme objet d'étude un faisceau de neutrons se réfléchissant sur une surface plane infinie avec un angle incident θ rasant d'environ

1° comme décrit sur la Figure V-27. La surface est définie comme l'interface entre l'air d'indice de réfraction $n = 1$ et un milieu homogène d'indice de réfraction n . Dans le formalisme décrit dans ce manuscrit, nous négligeons l'adsorption des neutrons par la matière et nous ne traiterons pas des propriétés magnétiques des neutrons.

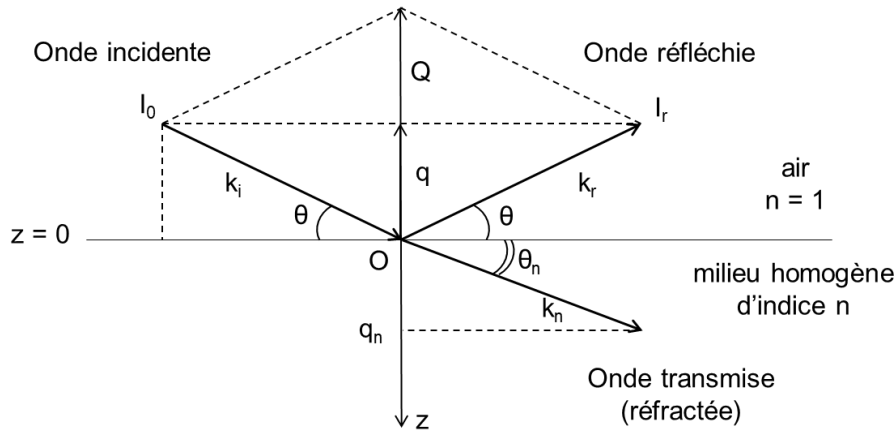


Figure V-27 : Réflexion d'un faisceau de neutrons sur une surface plane

Les faisceaux de neutrons incidents et transmis sont décrits par une fonction d'onde $\psi(r)$ qui vérifie l'équation de Schrödinger :

$$\frac{\hbar^2}{2m} \Delta \psi(r) + [E - V_F(r)] \psi(r) = 0 \quad (44)$$

En considérant que la structure du milieu est invariante dans le plan (xy) parallèle à la surface, il est possible de séparer les variables d'espace x , y et z dans l'équation 44. De plus, $V_F(r)$ est seulement dépendant en z (équation 42) donc on peut simplifier l'équation 44 avec le potentiel moyen V_z :

$$\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2 \psi_z}{dz^2} + [E_z - V_z] \psi_z = 0 \quad (45)$$

La solution générale de l'équation 45 est la superposition de deux ondes planes, une transmise et une réfléchiée :

$$\begin{cases} \psi_z(z) = A e^{iqz} + B e^{-iqz} & \text{pour } z < 0 \\ \psi_z(z) = C e^{iq_n z} & \text{pour } z > 0 \end{cases} \quad (46)$$

Avec $q = |k_i| \sin \theta = \frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta$, q étant la projection du vecteur d'onde incident \vec{k}_i sur la normale de la surface et q_n celle de \vec{k}_n , le vecteur d'onde transmis.

Dans l'hypothèse où les neutrons n'échangent pas d'énergie quand ils sont réfléchis dans le milieu d'indice de réfraction n (diffusion élastique), l'énergie se conserve en $z = 0$. On peut alors écrire :

$$\frac{\hbar^2 k_i^2}{2m} = \frac{\hbar^2 k_n^2}{2m} + V_z \quad (47)$$

La combinaison de l'équation 47 et de l'expression de V_z dans l'équation 42 donne la relation suivante :

$$k_n^2 = k_i^2 - 4\pi Nb \quad (48)$$

On peut alors définir un indice de réfraction neutronique n comme le rapport des vecteurs d'onde transmise \vec{k}_n et incidente \vec{k}_i :

$$n^2 = \left| \frac{k_n}{k_i} \right|^2 = 1 - \frac{\lambda^2}{\pi} Nb \quad (49)$$

Notons que cet indice de réfraction ne dépend que de la longueur d'onde du neutron et de la densité de longueur de diffusion cohérente Nb . Remarquons que, comme Nb peut être positive ou négative, il est possible d'avoir des indices de réfraction supérieurs comme inférieurs à 1. Ceci est une spécificité des neutrons.

Puisque l'indice de réfraction neutronique n est défini, il est maintenant possible de faire l'analogie entre l'optique géométrique et la réflectivité des neutrons. La loi de Snell-Descartes pour l'interface de deux milieux homogène d'indice de réfraction neutronique n_1 et n_2 s'exprime comme suit :

$$n_1 \cos\theta_1 = n_2 \cos\theta_2 \quad (50)$$

Si $n_1 \leq n_2$, il existe un angle d'incidence critique θ_c au-dessous duquel il y a réflexion totale du faisceau incident. En utilisant l'expression de l'indice de réfraction neutronique et en exprimant l'expression en fonction du sinus, on arrive à l'expression :

$$\sin\theta_c = \sqrt{\frac{Nb_2 - Nb_1}{\pi}} \lambda \quad (51)$$

Quand il y a réflexion totale, la mesure de l'angle critique θ_c pour une longueur d'onde λ donnée permet une mesure très précise de la densité de longueur de diffusion cohérente Nb d'un milieu si on connaît celle de l'autre milieu.

Réfectivité dans un milieu stratifié

Lors d'une expérience de réflectivité de neutrons, nous mesurons le coefficient de réflexion en intensité R , définie comme le rapport entre l'intensité réfléchie et l'intensité incidente :

$$R = |r|^2 \quad (52)$$

où r est le coefficient de réflexion en amplitude. Dans le cas d'un dioptre sans rugosité, le coefficient de réflexion est appelé réflectivité de Fresnel.

La réflectivité est une fonction qui dépend seulement du vecteur de diffusion \vec{Q} défini par :

$$\vec{Q} = \vec{k}_r - \vec{k}_i \quad (53)$$

$$Q = \|\vec{k}_r - \vec{k}_i\| = 2q = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda} \quad (54)$$

Il est égale à deux fois q , la projection du vecteur d'onde incident \vec{k}_i sur l'axe z perpendiculaire à la surface. L'ensemble des résultats du manuscrit présente la réflectivité R en fonction de Q . En particulier, les résultats sont présentés en RQ^4 , où les valeurs de R sont divisées par celles de Q^4 , pour exalter les oscillations.

Le cas d'une interface idéale, séparant deux milieux homogènes, est en réalité peu présent dans la nature. Il est plus fréquent de trouver une interface constituée d'un milieu inhomogène suivant la normale à la surface d'incidence du faisceau de neutrons. Le calcul de la réflectivité R pour un tel milieu est plus délicat. Nous présentons ici les principes utiles à cette détermination.

Considérons un milieu inhomogène suivant la direction z , normal à la surface d'incidence du faisceau de neutrons. Ce milieu de profil de densité de longueur de diffusion cohérente $Nb(z)$ peut être modélisé par un empilement de p milieux homogènes. Comme indiqué sur la Figure V-28, chaque couche i , où $i \in [1 ; p]$, est caractérisée par son épaisseur d_i , sa densité de longueur de diffusion cohérente Nb_i et son indice de réfraction neutronique n_i . Le substrat est la couche $p + 1$, caractérisée par sa densité de longueur de diffusion cohérente $Nb_{substrat}$ et son indice de réfraction $n_{substrat}$.

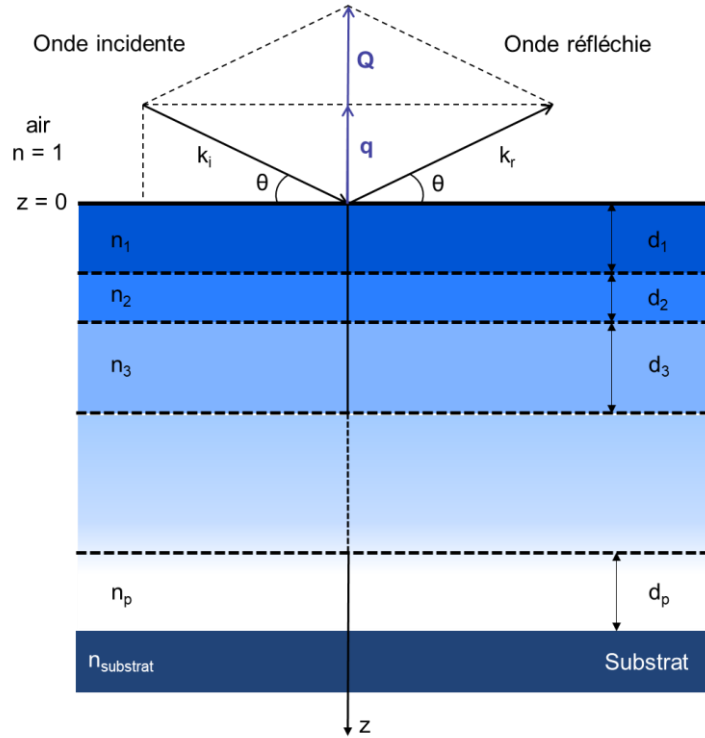


Figure V-28 : Schéma de la réflexion de neutrons sur un milieu stratifié

Pour chaque interface $i-1/i$, le coefficient de réflexion peut être défini par analogie avec l'optique géométrique :

$$r_{i-1/i} = \frac{q_{i-1} - q_i}{q_{i-1} + q_i} \quad (55)$$

Pour calculer chaque $r_{i-1/i}$, il est nécessaire de calculer au préalable l'ensemble des vecteurs d'onde q_i , pour $i \in [1 ; p]$, grâce à la continuité de l'énergie à l'interface $i - 1/i$:

$$q_i^2 = q_{i-1}^2 - 4\pi(Nb_{i-1} - Nb_i) \quad (56)$$

Par récurrence, nous obtenons :

$$q_i = \sqrt{q_0^2 - 4\pi(Nb_{i-1} - Nb_0)} \quad (57)$$

L'onde transmise à l'interface $i - 1/i$ interfère avec l'onde réfléchie à l'interface entre la couche i et la couche $i + 1$. Il est alors possible de calculer le coefficient de réflexion complexe $\tilde{r}_{i-1/i}$ pour l'interface $i - 1/i$, avec $j^2 = -1$:

$$\tilde{r}_{i-1/i} = \frac{r_{i-1/i} + \tilde{r}_{i/i+1} \times e^{2jq_i d_i}}{1 + r_{i-1/i} \times \tilde{r}_{i/i+1} \times e^{2jq_i d_i}} \quad (58)$$

Pour l'interface entre la couche p et la couche $p + 1$, c'est-à-dire le substrat, le coefficient de réflexion complexe est égale au coefficient de réflexion de Fresnel :

$$\tilde{r}_{p/\text{substrat}} = r_{p/\text{substrat}} = \frac{q_p - q_{\text{substrat}}}{q_p + q_{\text{substrat}}} \quad (59)$$

Il est donc possible de calculer la réflectivité à la dernière interface (entre la première couche p et le substrat $p+1$) et de calculer de façon récursive les réflectivités de chaque interface pour obtenir la réflectivité de l'ensemble du système multicouche. Le calcul des coefficients de réflexion $\tilde{r}_{i-1/i}$ se fait par itération en partant du substrat $i = p + 1$ jusqu'à $i = 0$, grâce à l'algorithme de Parratt.⁵ La réflectivité mesurée pour ce milieu stratifié est : $R(q) = |\tilde{r}_{0/1}|^2$.

Mesure sur le réflectomètre HERMES

Les mesures de réflectivité des neutrons ont été effectuées au Laboratoire Léon Brillouin (LLB, CEA-Saclay) sur le réflectomètre à temps de vol HERMES avec la collaboration d'Alexis Chennevière. Le principe de fonctionnement du réflectomètre est décrit dans la Figure V-29 :

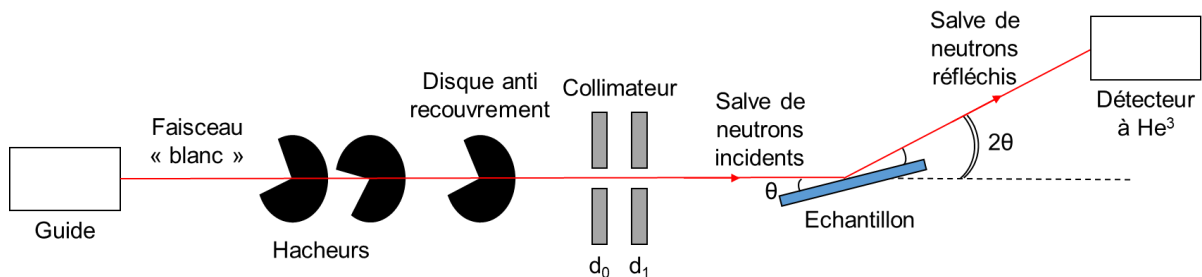


Figure V-29 : Schéma du réflectomètre HERMES

Principe d'un réflectomètre à temps de vol

Les neutrons se déplaçant à faible vitesse, on peut utiliser la méthode des temps de vol pour effectuer une analyse en réflectivité de neutrons. La vitesse des neutrons est liée à leur longueur d'onde par la relation de De Broglie $\lambda = h/mv$. Les neutrons sont produits par le réacteur Orphée (CEA-Saclay) et acheminés au réflectomètre par un guide. Ce faisceau « blanc » de neutrons contient un large spectre de longueur d'onde. Ils traversent ensuite une série de 2 hacheurs afin de couper le faisceau continu en salves de neutrons de même longueur d'onde. Un hacheur est un disque de gadolinium coupé afin de laisser passer une partie des neutrons, les autres étant absorbés par le matériau. Les hacheurs possèdent une vitesse de rotation de telle sorte qu'ils produisent une salve de neutrons toutes les 11 ms. Le troisième disque est un

hacheurs anti-recouvrement pour éviter la superposition de 2 salves, les neutrons les plus rapides d'une salve pouvant rattraper les plus lents de la précédente. Le faisceau de neutrons est ensuite colmaté vers l'échantillon grâce à deux fentes d'ouverture réglable.

Au sein de la salve, les neutrons se déplacent à différentes vitesses et donc ils mettent des temps de vol $t = L/v$ variables pour atteindre le détecteur de neutrons placé à une distance L du hacheur anti recouvrement. On lie par la relation de De Broglie, le temps de vol à la longueur d'onde du neutron par l'équation $\lambda = ht/mL$. En pratique, la gamme de longueurs d'onde accessibles est comprise entre 3 Å et 25 Å. La mesure de réflectivité se fait à angle d'incidence θ fixe. En changeant θ , il est possible de faire varier la gamme de vecteur d'onde q accessible puisque les 2 valeurs sont liées par la relation : $\lambda = \frac{2\pi}{q} \sin\theta$. Les mesures ont été effectuées à deux angles d'incidence : 1,2° et 2,5 ° pour atteindre des gammes de vecteur de diffusion jusqu'à 25 Å⁻¹. L'intensité réfléchiée est mesurée en fonction du temps de vol à l'aide d'un détecteur ponctuel à hélium. La réflectivité minimale détectable sur HERMES est de l'ordre de 10⁻⁶.

Configurations et matériaux utilisés

Lors des manipulations de réflectivité des neutrons, nous avons étudié des surfaces de wafers de silicium (51 mm de diamètre et 3 mm d'épaisseur) sur lesquelles ont été greffées des polyionènes, par un protocole détaillé en partie expérimentale.

Les 2 types d'interface les plus utilisées sont les interfaces air/solide et solide/liquide. Elles sont détaillées sur la Figure V-30. Dans la configuration solide/liquide, les neutrons arrivent sur le wafer de silicium et se réfléchissent à l'interface entre le matériau et le liquide. Nous avons étudié les polyionènes greffés seulement à une interface solide/liquide. En effet, la densité de longueur de diffusion des polyionènes étant proche de zéro, il n'y avait donc pas assez de contraste pour réaliser des analyses à l'interface air/solide. Pour obtenir les épaisseurs à sec des polymères greffés, nous les avons étudiés par réflectivité des rayons X. Cette méthode est détaillée dans l'annexe suivante.

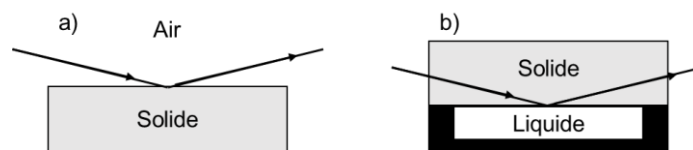


Figure V-30 : Configuration a) air/solide et b) solide/liquide

Traitement des données

Les données expérimentales obtenues pour les 2 angles étudiés sont normalisées et rassemblées afin d'obtenir une seule courbe de réflectivité $R = f(Q)$. On réalise ensuite un ajustement à partir d'un profil de densité de longueur de diffusion paramétré. Ce profil doit être physiquement cohérent avec le système étudié. Il est constitué de plusieurs couches, chacune définie par 3 paramètres : la densité de longueur de diffusion Nb de la couche p , son épaisseur et la rugosité à l'interface $p/p+1$. Pour élucider le profil de densité de longueur de diffusion expérimentale, il faut ajuster les 3 paramètres de chaque couche jusqu'à superposer l'ajustement sur les données expérimentales de réflectivité.

La rugosité est un paramètre important à prendre en compte lors de la réalisation des ajustements car les interfaces inter-couches ne sont jamais idéales. La présence de rugosité entre chaque couche influence le profil de densité de longueur de diffusion et crée des variations moins abruptes que ce qui est attendu dans le cas d'une surface idéale sans rugosité comme illustré sur la Figure V-31.

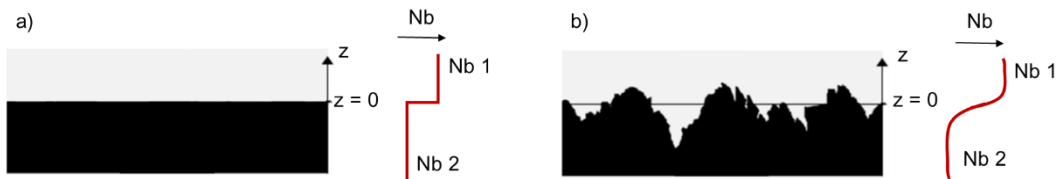


Figure V-31 : Profil de Nb d'une interface a) idéale et b) rugueuse

Les ajustements ont été réalisés par un programme Python écrit par Alexis Chennevière qui se base sur les algorithmes de Parratt⁵. Afin de tenir compte de l'importante rugosité des couches étudiées, nous choisissons un modèle dit de « effective density layer model »⁶. Ce modèle permet de décrire des interfaces fines et diffuses sur l'ensemble du système multicouche, chaque couche étant définies par 3 paramètres (épaisseur, rugosité, Nb). Ainsi, on peut utiliser localement le formalisme de Parratt sur ces fines couches puisqu'on respecte la condition où la rugosité est négligeable devant l'épaisseur de la couche. Les paramètres des couches préalablement définies sont alors affinés et ajustés, jusqu'à obtenir une superposition correcte entre l'ajustement et les données expérimentales.

Réflectivité des rayons X

La réflectivité spéculaire des rayons X a été utilisée pour caractériser les couches à sec des polymères greffés sur des wafers de silicium. C'est la seule méthode qui permet une caractérisation précise de l'épaisseur et la rugosité d'une surface à des échelles subnanométrique. Dans cette annexe, on détaille sommairement le principe de la réflectivité de rayons X qui se base sur la même analogie avec l'optique classique que la réflectivité des neutrons. Un descriptif plus complet peut être trouvé dans la littérature^{7,8} où les deux méthodes sont souvent présentées ensemble. On présente aussi le réflectomètre utilisé et le traitement des données.

Principe de la réflectivité des rayons X

Les rayons X ont été découverts en 1895 par Wilhelm Röntgen. Contrairement aux neutrons, les photons X interagissent avec les électrons des atomes, et sont donc sensibles à la densité électronique F du milieu traversé. Comme en réflectivité des neutrons en revanche, un faisceau de photons X, de longueur d'onde λ et d'intensité incidente I_i , est envoyé sur la surface à étudier avec un angle d'incidence variable θ . On mesure ensuite l'intensité réfléchie I_r par l'échantillon. Le principe étant le même qu'en réflectivité de neutrons, l'analogie peut être faite avec les équations détaillées précédemment en définissant un indice de réfraction électronique n_x :

$$n_x = 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi} r_{\text{électron}} F - j \frac{\lambda}{4\pi} \mu \quad (60)$$

Avec μ le coefficient d'absorption du milieu et $r_{\text{électron}}$ le rayon de l'électron.

La réflectivité $R(\theta)$ calculée est le ratio de l'intensité du rayon réfléchi I_r sur l'intensité du rayon incident I_i . Le principe étant le même qu'en réflectivité de neutrons, l'analogie peut être faite avec les équations détaillées précédemment.

Le réflectomètre XEUSS

Nous utilisons pour ces analyses un réflectomètre commercial de la marque Xenocs, le Xeuss 2.0 de la plateforme SWAXS-Lab du LLB/NIMBE (CEA-Saclay). Le faisceau polychromatique est rendu monochromatique par un monocristal (raie K_α du cuivre). Ce faisceau traverse ensuite un collimateur puis est envoyé, avec une incidence rasante, sur l'échantillon. Il

fonctionne à une longueur d'onde $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ en configuration $\theta/2\theta$. Le faisceau incident reste à l'horizontale et on fait varier l'angle θ à l'aide d'un goniomètre placé sous l'échantillon, comme le montre la Figure V-32. On mesure ainsi l'intensité réfléchie en fonction de l'angle θ avec un détecteur positionné à l'angle 2θ .

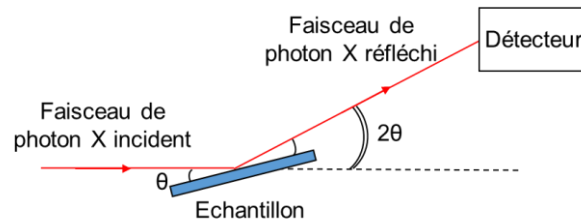


Figure V-32 : Schéma de la configuration $\theta/2\theta$ du réflectomètre XEUSS

Traitement des données

De même qu'en réflectivité des neutrons, on ne peut pas obtenir directement l'épaisseur des couches étudiées avec les données de réflectivité. Il faut d'abord rassembler les réflectivités mesurées à chaque angle θ sur un même fichier pour constituer les données expérimentales. Les données ont été rassemblées et traitées avec un programme Python réalisés par Alexis Chennevière. Ensuite, on postule un ajustement des couches qui soit cohérent physiquement avec le système étudié, chaque couche étant défini par une épaisseur, une rugosité et une densité électronique. Les paramètres sont ajustés jusqu'à obtenir un ajustement qui se rapproche des données expérimentales. Les ajustements ont été réalisés sur le logiciel GenX avec le module « Reflectivity »⁹.

Annexe F : Nouvelle mesure des épaisseurs dans le D₂O après les analyses

Après l'ensemble des analyses, un échantillon ayant subi des analyses en pH, sels et/ou solvants deutérés a été de nouveau mesuré en D₂O afin de vérifier que les différentes conditions n'ont pas modifié la structure greffée initialement. Les courbes de réflectivité du PI 6-6 1,2 M lot 3 avant et après analyses sont très similaires (Figure V-33). Les modélisations mettent en lumière une légère diminution de l'épaisseur de la couche organique qui reste cependant peu significative (Tableau V-13). La diminution peut être dû aux multiples rinçages et séchages entre chaque analyse. De plus, les ajustements pour ces échantillons ne se superposent pas parfaitement avec les données expérimentales donc la diminution est probablement encore plus faible que celle suggéré par les profils de densité de longueur de diffusion.

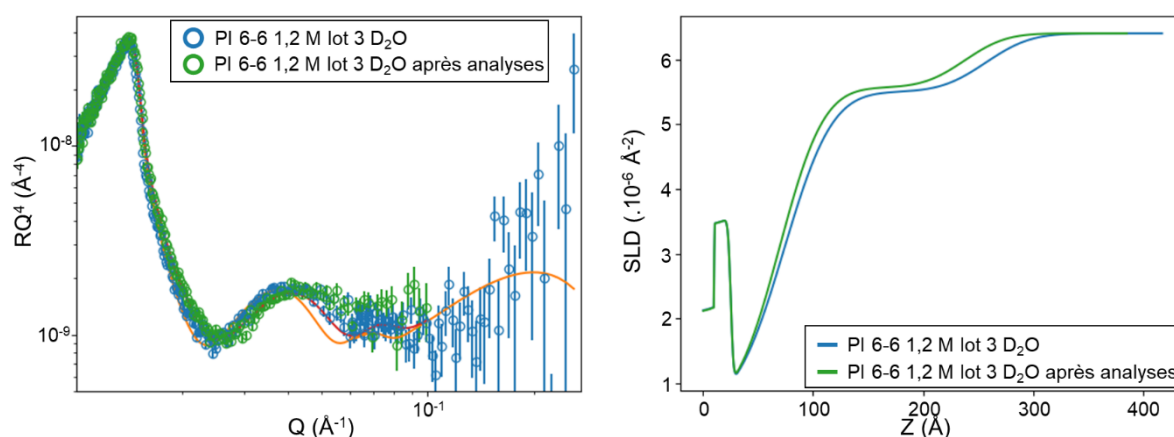


Figure V-33 : Courbe de réflectivité des neutrons en RQ^4 (trait plein = ajustement) (gauche) et profil de densité de longueur de diffusion (droite) du PI 6-6 1,2 M lot 3 dans le D₂O avant et après les analyses

Tableau V-13 : Paramètres des ajustements dans le D₂O avant et après les analyses du PI 6-6 1,2 M lot 3 par réflectivité des neutrons

Neutrons	Conditions	Couches	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)	SLD ($\cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$)
Pour toutes les conditions		Oxide	15	2	3.4
PI 6-6	D ₂ O	PDOPA SG	$48,2 \pm 2,1$	$34,4 \pm 1,2$	0,62
		PI 6-6	$181,6 \pm 1,0$	$32,0 \pm 1,8$	$5,50 \pm 0,01$
1,2 M lot 3	D ₂ O, après analyses	PDOPA SG	$44,1 \pm 6,5$	$31,5 \pm 3,1$	0,62
		PI 6-6	$168,2 \pm 1,7$	$29,5 \pm 5,7$	$5,56 \pm 0,05$

Bibliographie

- (1) Wang, C.; Zolotarskaya, O.; Ashraf, K. M.; Wen, X.; Ohman, D. E.; Wynne, K. J. Surface Characterization, Antimicrobial Effectiveness, and Human Cell Response for a Biomedical Grade Polyurethane Blended with a Mixed Soft Block PTMO-Quat/PEG Copolyoxetane Polyurethane. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (23), 20699–20714. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b04697>.
- (2) Fairbrother, F.; Mastin, H. Studies in Electro-Endosmosis Part I. *J. Chem. Soc., Trans.* **1924**, *125*, 2319–2330.
- (3) Malikova, N.; Čebašek, S.; Glenisson, V.; Bhowmik, D.; Carrot, G.; Vlachy, V. Aqueous Solutions of Ionenes: Interactions and Counterion Specific Effects as Seen by Neutron Scattering. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14* (37), 12898. <https://doi.org/10.1039/c2cp41859b>.
- (4) Cousin, F.; Chennevière, A. Neutron Reflectivity for Soft Matter. *EPJ Web of Conferences* **2018**, *188*, 04001. <https://doi.org/10.1051/epjconf/201818804001>.
- (5) Parratt, L. G. Surface Studies of Solids by Total Reflection of X-Rays. *Phys. Rev.* **1954**, *95* (2), 359–369. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.95.359>.
- (6) Metin Tolan, *X-Ray Scattering from Soft -Matter Thin Flms*; Springer Tracts in Modern Physics; **1999**; Vol. 148.
- (7) Als-Nielsen, J.; Jacquemain, D.; Kjaer, K.; Leveiller, F.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. Principles and Applications of Grazing Incidence X-Ray and Neutron Scattering from Ordered Molecular Monolayers at the Air-Water Interface. *Physics Reports* **1994**, *246* (5), 251–313. [https://doi.org/10.1016/0370-1573\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0370-1573(94)90046-9).
- (8) Russell, T. P. On the Reflectivity of Polymers: Neutrons and X-Rays. *Physica B: Condensed Matter* **1996**, *221* (1–4), 267–283. [https://doi.org/10.1016/0921-4526\(95\)00937-X](https://doi.org/10.1016/0921-4526(95)00937-X).
- (9) Björck, M.; Andersson, G. *GenX*: An Extensible X-Ray Reflectivity Refinement Program Utilizing Differential Evolution. *J Appl Crystallogr* **2007**, *40* (6), 1174–1178. <https://doi.org/10.1107/S0021889807045086>.

Titre : Surfaces polymères antibactériennes à base de polyionènes : synthèses et études aux interfaces en physico-chimie et biologie

Mots clés : polymères, effet antibactérien, chimie de surface, microbiologie, bioadhésion

Résumé : La contamination bactérienne des surfaces est une problématique majeure dans des domaines comme le médical ou l'agroalimentaire. Afin d'agir en amont de la formation du biofilm, nous avons choisi de réaliser des surfaces bioactives par contact pour inhiber les bactéries sans relargage d'agents actifs. L'objectif de cette thèse est de créer ces surfaces en greffant de façon covalente des polyionènes (PI) et d'en étudier les propriétés biologiques en faisant un lien avec la structure des polymères greffés.

Les PI possèdent des propriétés antimicrobiennes à la fois puissantes et modulables grâce à la possibilité de modifier le ratio charge/hydrophobie de façon contrôlée. Une gamme de PI a été synthétisée en faisant varier la longueur et la nature des segments (aliphatiques et éthers), ainsi que la masse molaire, afin d'étudier l'impact de ces trois paramètres sur l'efficacité antibactérienne et la cytotoxicité. La gamme aliphatique s'est révélée être la plus bactériostatique avec un gradient d'efficacité qui augmente avec la longueur du segment aliphatique.

La gamme de PI aliphatiques a ensuite été greffée de façon covalente sur des surfaces de verre et des wafers de silicium selon une procédure séquentielle combinant un dépôt de polydopamine, une étape de polymérisation induite par des sels de diazonium et une polyaddition en surface de PI. Les étapes de chimie ont été caractérisées en détails *via* diverses techniques d'analyse de surface (XPS, mesures d'énergies de surface et de potentiels zêta).

Les propriétés antibactériennes des surfaces greffées ont ensuite été évaluées par des essais d'adhésion (observations des flores totales et dénombrements des flores viables cultivables). Les résultats montrent que les surfaces greffées PI présentent des propriétés antibactériennes efficaces et modulables selon la longueur du segment aliphatique, associées à un effet pro-adhésif important. Des tests de cytotoxicité ont également démontré l'absence de relargage et de toxicité des matériaux. Les chaînes greffées en surface ont aussi été étudiées par réflectivité des rayons X et des neutrons pour déterminer avec précision l'épaisseur des couches polymères et tenter d'établir un lien entre la conformation des chaînes et leur mécanisme d'action sur les bactéries.

Lors de cette thèse, trois procédés ont aussi été développés afin de fonctionnaliser de façon covalente des surfaces de polyéthylène (PE), matériau principal des films alimentaires. Les PI ont d'abord été greffés sur le PE avec un procédé chimique analogue à celui du verre. Ensuite, la fonctionnalisation a été effectuée par impression après la formation d'une encre à base de PI. Enfin, dans le souci d'élaborer un procédé plus industrialisable, les PI ont été incorporés via un mélange-maître lors de l'extrusion du film de PE. Pour chacun de ces procédés, nous avons évalué la possibilité de leurs applications en caractérisant les propriétés antibactériennes et cytotoxiques des films PE modifiés.

Title: Polyionenes based antibacterial polymer surfaces: synthesis and studies at the interface in physico-chemistry and biology

Keywords: polymers, antibacterial effect, surface chemistry, microbiology, bioadhesion

Abstract: Bacterial contamination of surfaces is one of the most pressing concerns for the medical and the food industries. In order to act prior to the biofilm formation, we chose a preemptive strategy by creating contact-bioactive surfaces to inhibit bacteria without releasing bioactive agents. The main objective of this thesis is to prepare such surfaces by covalently grafting polyionenes (PI) and to study their biological characteristics, as well as the influence of the structure of the polymer on these properties.

PI possess both powerful and versatile antimicrobial properties, which can be controlled by fine-tuning the charges/hydrophobic spacers ratio. A range of PI was synthesized by varying both the length and the nature of the spacers (aliphatic and ether), as well as the molecular weight, in order to evaluate the impact of these parameters on antibacterial activity and cytotoxicity. The aliphatic series was found to be more bacteriostatic, with an efficiency gradient that increases with the length of the aliphatic spacer.

The aliphatic PI were then covalently grafted onto glass surfaces and silicon wafers using a sequential procedure combining polydopamine coating, diazonium salts induced polymerization and surface polyaddition of PI. The chemical steps were characterized in detail via various surface analysis techniques

(XPS, surface energy measurements and zetametry). Antibacterial properties of the grafted surfaces were then evaluated by adhesion tests (total flora observations and enumerations of viables cultivables flora). PI-grafted surfaces were shown to display effective and versatile antibacterial properties, associated with a pro-adhesive effect. Cytotoxicity tests also demonstrated the absence of release and the non-toxicity of these materials. X-ray and neutron reflectivity experiments were performed on PI grafted chains to determine the thickness of polymers layers and to establish a link between the chains conformation and their mechanism of action towards bacteria.

During this thesis, three procedures were developed to covalently functionalize polyethylene (PE) surfaces, the main component of food packaging. Firstly, PI were grafted onto PE with a chemical process similar to the one performed on glass. Secondly, a PI based ink was prepared to functionalize the PE film with an ink-jet printing process. Lastly, in order to develop a more industrializable process, PI were incorporated in bulk during the extrusion of PE films. For each procedure, we evaluated the possibility of their applications by characterizing their antimicrobial and cytotoxicity properties.