



HAL
open science

Méthodes physiques avancées pour caractériser et minimiser la bio-contamination

Mohamad Ammoun

► **To cite this version:**

Mohamad Ammoun. Méthodes physiques avancées pour caractériser et minimiser la bio-contamination. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASP087 . tel-03505896

HAL Id: tel-03505896

<https://theses.hal.science/tel-03505896>

Submitted on 1 Jan 2022

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.

Méthodes physiques avancées pour caractériser et minimiser la bio-contamination

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°572, Ondes et Matière (EDOM)

Spécialité de doctorat: Physique et chimie de la matière et des matériaux

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Sciences Moléculaires
d'Orsay (ISMO), 91405, Orsay, France

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue en visioconférence totale,
le 15 Décembre 2020, par**

Mohamad AMMOUN

Composition du Jury

Christophe HUMBERT

DR CNRS, Université Paris-Saclay (ICP)

Président

Vincent HUMBLLOT

CR CNRS (HDR), Université de Franche Comté (Femto-ST)

Rapporteur & Examineur

Yves CAUDANO

Chercheur FNRS (HDR), Université de Namur (Laboratoire
Lasers et Spectroscopies)

Rapporteur & Examineur

Claude HENRY

DR CNRS, Université Aix-Marseille (Centre de Nanosciences
de Marseille)

Examineur

Bernard BOURGUIGNON

DR CNRS, Université de Paris-Saclay (ISMO)

Directeur de thèse

Marie-Pierre FONTAINE-AUPART

DR CNRS, Université de Paris-Saclay (ISMO)

Co-Encadrante

Pascal THÉBAULT

MCF, Université de Rouen (Laboratoire Polymères,
Biopolymères, Surfaces)

Invité

Table des matières

<u>Introduction Générale</u>	7
<u>Chapitre 1 : Adsorption bactérienne</u>	13
1. <u>Diversité du monde bactérien</u>	13
2. <u>Propriétés des bactéries</u>	14
3. <u>Bactérie modèle utilisée dans notre étude</u>	17
4. <u>Adhésion bactérienne</u>	19
5. <u>Biofilm</u>	20
6. <u>Acides aminés, peptides, protéines</u>	21
6.1. <u>Structure des acides aminés, peptides, et protéines</u>	21
6.2. <u>Albumine de sérum bovine</u>	23
6.3. <u>Adsorption des protéines</u>	24
6.4. <u>Rôle des protéines dans l'adhésion bactérienne</u>	25
7. <u>Approches anti-bactériennes</u>	26
8. <u>Monocouches auto-assemblées (SAM)</u>	27
9. <u>Références du chapitre 1</u>	31
<u>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</u>	375
1. <u>Méthodes de caractérisation des échantillons</u>	37
1.1. <u>XPS</u>	37
1.2. <u>Microscopie à force atomique (AFM)</u>	39
1.3. <u>Mouillabilité et angle de contact</u>	43
1.4. <u>Spectroscopie infrarouge (FTIR)</u>	45

1.5. Spectroscopie vibrationnelle par Génération de Fréquence Somme (SFG) : aspects théoriques	48
1.6 Spectroscopie vibrationnelle par Génération de Fréquence Somme (SFG) : aspects expérimentaux .	60
1.7 Traitement des données issues des expériences SFG	73
2. Préparation des substrats	75
2.1 Dyade BODIPY – C ₆₀	75
2.2. SAM ODT	77
2.3. MUA[25] et nisine	79
3. Références du chapitre 2	81
Chapitre 3 : spectroscopie SFG des bandes amide.....	83
1. Revue de spectroscopie SFG des bandes amide.....	85
2. Spectres SFG de la chaîne peptidique portant la dyade BODIPY – C ₆₀	92
2.1 Spectres FTIR - RAIRS	94
2.2 Spectres SFG.....	95
2.3 Ratio amide II / amide I en SFG	98
2.4 Comparaison des spectres SFG de C ₆₀ – peptide et N ₃ peptide.....	101
2.5 Comparaison des intensités entre C ₆₀ - alkyle et C ₆₀ - peptide	101
2.6 Spectres SFG dans le domaine des bandes CH.....	101
2.7 Conclusion sur les spectres SFG de la dyade.....	102
3. Spectres SFG de SAM ODT	103
3.1 FTIR - IRAS	103
3.2 Spectres SFG dans la région des bandes CH.....	104
3.3 Spectres SFG dans la région des bandes amide	105
3.4 Adhésion de bactéries sur BSA – ODT-Au	107
4. Spectres SFG de MUA[25]-[nisine].....	108

<u>5. Conclusions du chapitre 3</u>	113
<u>6. Référence du chapitre 3</u>	117
<u>Chapitre 4 : Effet antibactérien d'un film de nisine contre <i>Staphylococcus Aureus</i></u>	121
<u>Conclusion générale</u>	145
<u>Résumés</u>	152

Introduction Générale

Un biofilm consiste en l'association de cellules bactériennes sur une surface au sein d'une matrice extracellulaire qu'elles produisent. Lorsque la colonisation de la surface atteint le stade de biofilm, la majorité (80%) des bactéries changent de métabolisme pour s'organiser collectivement. Le biofilm devient beaucoup plus résistant à son environnement (incluant les produits désinfectants et les antibiotiques), et il devient capable d'émettre de nouvelles cellules bactériennes qui vont à leur tour coloniser d'autres surfaces dans l'environnement voisin, ce qui peut conduire à une contamination grave d'équipements et de personnes, puisque les bactéries peuvent être pathogènes aussi bien que non pathogènes. Les conséquences peuvent être graves :

- Dans le domaine hospitalier (prothèses, instruments de chirurgie sur la table d'opération...) avec le risque de développement de maladies nosocomiales.
- Dans l'industrie alimentaire avec le risque d'infection intestinale, causée par *Salmonella*, par exemple.
- Dans les canalisations en général, par exemple sur les bateaux et sous-marins (tuyauteries, partie immergée de la coque des navires...), avec des risques de natures aussi différentes que la légionellose et la corrosion localisée dans les zones d'eau stagnante ou sous la coque des bateaux.

Il existe déjà une abondante littérature sur l'adhésion bactérienne, mais les connaissances sur l'interaction bactérie-surface, en particulier à l'échelle des interactions moléculaires, restent limitées car extrêmement complexes et variables. Elles sont complexes parce que l'adhésion bactérienne repose sur une variété de moyens pour la bactérie d'adhérer aux surfaces : interactions hydrophiles ou hydrophobes (parfois les deux selon la localisation sur une même paroi bactérienne), électrostatiques, électrochimiques, liaisons chimiques spécifiques, interactions liées à la structure de surface des bactéries : poils et pili, etc. L'étude expérimentale détaillée d'une grande diversité de bactéries et de surfaces est nécessaire avant qu'il soit possible de dégager un savoir prédictif de l'adhésion bactérienne et de la formation subséquente des biofilms permettant de

prévenir efficacement leur développement. Les études expérimentales ne sont pas simples et nécessitent de développer des méthodes sensibles aux interfaces et aux fonctions chimiques, dans un environnement complexe.

Les travaux menés dans cette thèse ont pour objectif de contribuer au développement d'une stratégie préventive en développant des surfaces antibactériennes empêchant l'adhésion des bactéries et/ou ayant une activité bactéricide. Nous avons étudié deux types de surfaces antimicrobiennes :

1. Une surface couverte d'un film protéique de « Bovine Serum Albumine » (BSA), qui peut donner lieu avec les bactéries à des interactions biospécifiques (liaisons covalentes, hydrogène) ou non spécifiques (telles que les interactions physiques : van der Waals, électrostatique...)

2. Une surface couverte d'un peptide antimicrobien (PAM), la Nisin Z, constitué d'une trentaine d'acides aminés, dont l'efficacité a été démontrée vis à vis des bactéries Gram positif comme le Staphylocoque doré.

En outre, une surface d'or couverte d'une chaîne peptidique courte portant une dyade BODIPY – C₆₀, conçue avec d'autres objectifs (pour étudier la séparation de charges photoinduite), a été étudiée par SFG pour fournir une base de comparaison.

Dans chaque cas de surface antimicrobienne, une monocouche auto-assemblée (« SAM ») de thiols (OctaDécane Thiol (ODT) (premier cas), ou d'acide 11-mercapto-undécanoïque (MUA) (second cas) est utilisée comme support. Cette monocouche normalement bien ordonnée donne lieu à un bon signal spectroscopique dans l'IR, qui permet de vérifier la qualité de l'auto-assemblage. Les surfaces sont structurées en « brosse », terminée par un groupe méthyle pour les ODT, un groupe acide pour les MUA, la fonction thiol permettant aux molécules de se greffer efficacement sur une surface d'or. L'auto-assemblage se produit spontanément en une dizaine d'heures typiquement, conduisant à une surface ayant un degré d'ordre élevé, spécialement dans le cas de l'ODT (les chaînes alkyle des molécules s'alignant en conformation tout trans avec une

interaction van der Waals significative tout au long des chaînes). Dans le cas du MUA, la chaîne alkyle plus courte, l'encombrement stérique du groupe acide et sa propension à former des liaisons hydrogène conduit à un degré d'ordre moins élevé. Dans ce travail, nous sommes intéressés à améliorer cet ordre en diluant les chaînes de MUA parmi des chaînes d'hexanethiol.

Nous avons sondé ces surfaces par une combinaison de méthodes expérimentales différentes, permettant de tirer des conclusions sur les facteurs qui régissent les interactions des bactéries et des protéines avec la SAM au niveau moléculaire : microscopie de fluorescence, hydrophobicité par mesure d'angle de contact, spectroscopie infra-rouge (FTIR), et Génération de Fréquence Somme (SFG), spectroscopie vibrationnelle exclusivement sensible aux milieux non centro-symétriques, donc particulièrement adaptée à l'étude des molécules aux interfaces.

La SFG dans sa version « BB » (*broad band*) consiste à superposer dans le temps et dans l'espace un faisceau visible picoseconde et un faisceau infrarouge femtoseconde sur l'échantillon, éventuellement en présence d'une couche de l'eau contenant les bactéries. La fréquence centrale du faisceau infrarouge, qui a une largeur spectrale utile d'environ 200 cm^{-1} , est choisie pour cibler une plage de longueur d'onde recouvrant des transitions vibrationnelles appropriées des molécules adsorbées : dans ce travail, l'ensemble des bandes d'élongation CH (méthyle, méthylène), ou les fonctions amide I et II. La SFG avec des impulsions femtoseconde permet ainsi d'enregistrer un spectre dans la région spectrale visée sans balayage du faisceau laser.

Ce travail fait suite à la thèse d'une précédente doctorante (Émilie Bulard). Ses résultats ont montré l'intérêt de la SFG pour l'étude des SAM-ODT. Elle a observé que les vibrations CH du film auto-assemblé sont sensibles à l'adsorption de protéines et de bactéries sur le film : l'interaction de la SAM avec les entités biologiques conduit à de faibles changements de la conformation de la SAM (orientation des groupements terminaux) que la SFG détecte de manière très sensible. Ces changements sont différents selon les entités biologiques (protéines BSA, souches hydrophobes et hydrophiles de bactéries *Lactococcus lactis*). Il a été mis en évidence (i) des réponses conformationnelles de la SAM opposées suivant que les bactéries étaient hydrophobes ou

hydrophiles (maximalisant ou minimisant la surface de contact) ; (ii) des propriétés anti-bactériennes différentes suivant la nature des entités biologiques ; (iii) une forte influence de la présence de protéines de BSA. Dans ce dernier cas, la BSA préadsorbée sur les surfaces d'ODT s'est révélée être très efficace pour empêcher l'adsorption des bactéries. Les données SFG recueillies dans ce précédent travail de thèse ne concernaient que les subtils changements de conformation de la SAM ODT (liaisons C-H des groupements méthylènes et méthyles de la SAM d'ODT) en absence et présence des entités biologiques bactéries et protéines. Dans ce travail, nous avons entrepris de sonder directement les fonctions amides de la protéine BSA pour les surfaces ODT et du peptide Nisin pour les surfaces PAM. Cette nouvelle approche accroît la difficulté expérimentale, car il est nécessaire de purger le système laser IR de la vapeur d'eau, les bandes d'absorption ro-vibrationnelles de l'eau gazeuse étant très intenses dans la région des bandes amide ($1550 - 1650 \text{ cm}^{-1}$, soit $6.5 - 6.0 \mu\text{m}$).

Le chapitre 1 présente l'étude bibliographique des entités biologiques et des surfaces étudiées, tels que bactéries, protéines, peptides, substrat.

Le chapitre 2 présente les différentes méthodes de caractérisation spectroscopique, physique, chimique et bio physique, utilisées dans notre travail, les fondements théoriques de la SFG, les caractéristiques particulières, spectrales et temporelles, de la SFG en régime femto seconde, ainsi que sa mise en œuvre expérimentale et la procédure de modélisation et déconvolution des spectres SFG. Il décrit ensuite les procédures de préparation des échantillons.

Le chapitre 3 est consacré à une revue de la spectroscopie des bandes amides, qui précède la présentation des résultats de SFG sur les 3 types de surfaces étudiées.

Le chapitre 4 présente l'ensemble des résultats concernant les propriétés anti bactériennes du film de nisine.

Chapitre 1

Chapitre 1 : Adsorption bactérienne

Cette thèse a pour but d'étudier l'influence de certains paramètres qui contrôlent l'adhésion de bactéries et de protéines sur des surfaces modèles supportées par des monocouches auto-assemblées. Ce manuscrit commence donc par une description du monde bactérien.

1. Diversité du monde bactérien

Les bactéries sont les formes de vie les plus anciennes, structurellement les plus simples et les plus abondantes sur Terre [1]. Elles sont également les seuls organismes ayant une organisation cellulaire procaryote, c'est-à-dire ne possédant pas de noyau (à la différence des cellules eucaryotes) [2]. Elles sont présentes dans les plus anciennes roches contenant des fossiles (de 3.5 à 3.8 milliards d'années). Les premières bactéries photosynthétiques (cyanobactéries) ont joué un rôle très important dans l'histoire de la Terre, modifiant la composition de l'atmosphère en produisant des quantités significatives d'oxygène, ce qui a permis à d'autres formes de vie de se développer (eucaryotes) [3]. Les bactéries jouent toujours un rôle essentiel pour les autres formes de vie terrestres, intervenant dans les cycles de régénération des substances nécessaires à la vie, en étroite symbiose avec, et dans, les organismes des animaux supérieurs, incluant les humains (par exemple dans le microbiote intestinal dont on découvre actuellement le rôle dans le développement des maladies, avec l'espoir de les prévenir en agissant sur sa composition).

Environ 5000 types différents de bactéries sont actuellement connus (*Figure 1*). Encore actuellement les microbiologistes découvrent de nouvelles espèces, et renouvellent notre compréhension du monde bactérien et de son rôle dans le vivant. Les bactéries sont classées en fonction principalement de leurs caractéristiques métaboliques et génétiques. Les bactéries ne peuvent être caractérisées correctement qu'en les cultivant sur un milieu bien défini, car leurs caractéristiques changent souvent selon leurs conditions de croissance [4].

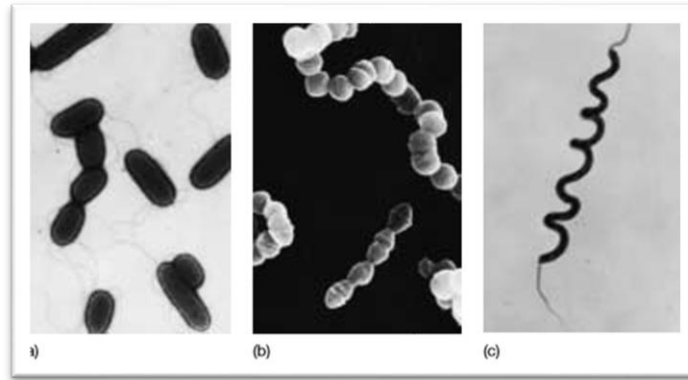


Figure 1 : trois types de bactéries de morphologies différentes : (a) « Pseudomonas aeruginosa », une bactérie flagellée en forme de tige. (b) « Streptococcus ». Les bactéries individuelles sont sphériques (« cocci »). (c) « Spirillum volutans », l'un des « spirilles » [3].

Certaines bactéries peuvent vivre dans des environnements hostiles à la plupart des autres organismes : sources très chaudes qui « cuiraient » d'autres organismes, environnements hypersalins qui déshydrateraient d'autres cellules, atmosphères riches en gaz toxiques comme le méthane ou le sulfure d'hydrogène. Ces environnements difficiles peuvent être semblables aux conditions présentes lorsque la vie a commencé sur Terre. Seules des bactéries ont pu évoluer dans ces conditions difficiles, faisant évoluer l'atmosphère, permettant ainsi aux autres formes de vie de se développer par la suite [5].

2. Propriétés des bactéries

Le monde bactérien fait preuve d'une grande diversité. Les bactéries diffèrent par :

- Leur forme : sphérique, en filament, ovale, etc... (**Figure 2A**)
- Leur taille : elle varie de quelques microns à quelques centaines de microns (**Figure 2A**)
- Leur paroi : deux types de paroi bactériennes existent, conférant à la bactérie sa morphologie et constituant son squelette externe (**Figure 2B**) [1].

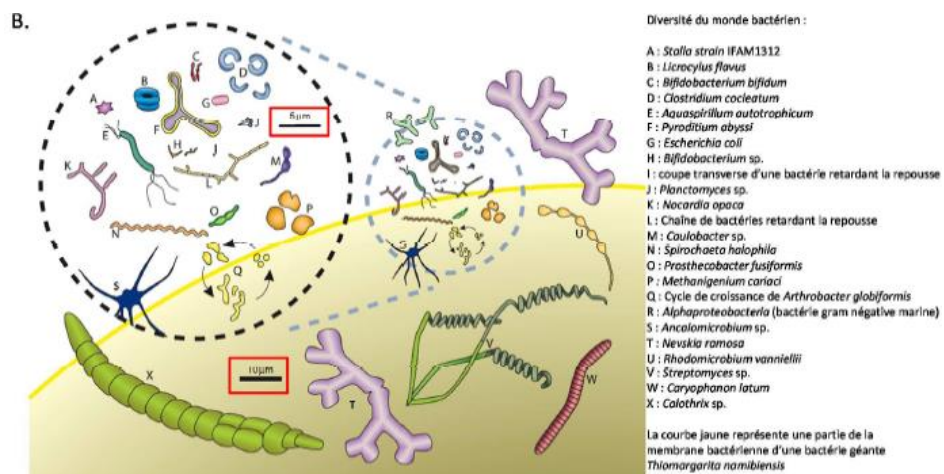
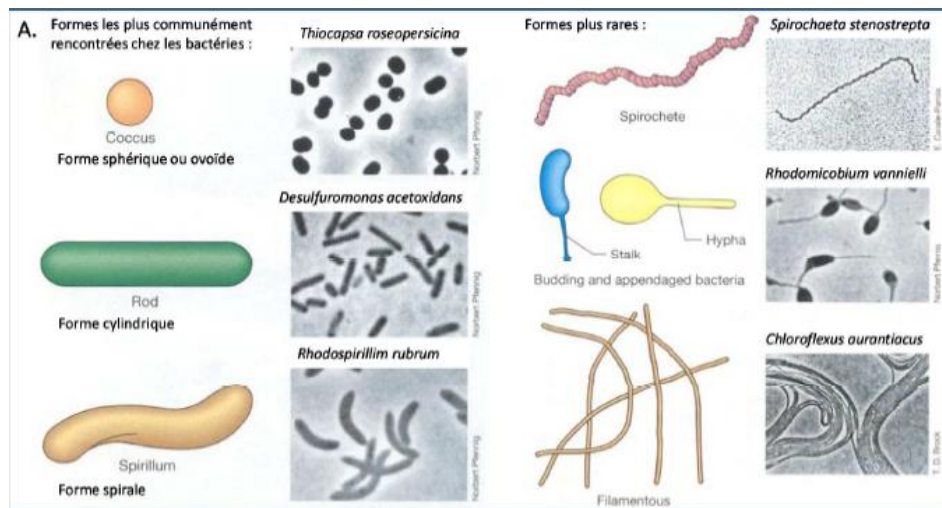


Figure 2 : A. Diversité morphologique des bactéries. B. Diversité de taille des bactéries [1]

Plus précisément, concernant les parois des bactéries, on distingue :

1. Les bactéries à paroi Gram positif : la paroi est constituée d'une membrane cytoplasmique et d'une couche épaisse de peptidoglycane qui représente 90 % des constituants de la paroi bactérienne (**Figures 3A, 3B**).

2. Les bactéries à paroi Gram négatif : la couche de peptidoglycane est beaucoup plus fine (ne représentant que 5 à 20 % des constituants de la paroi bactérienne) et elle est recouverte d'une membrane externe (*Figures 3A, 3B et Tableau 1*). Les bactéries à paroi Gram négatif ont un point isoélectrique correspondant à un pH moins acide que les bactéries à paroi Gram positif.

	Bactéries Gram+	Bactéries Gram-
Peptidoglycane	présent	présent
- épaisseur	~ 100 nm	~ 10 nm
- proportion de la paroi	50-90 %	10-20 %
- acides téichoïques et teichuroniques	généralement présents	absents
- lipopolysaccharides et lipoprotéines	absents	présents
Membrane externe	absente	présente
Membrane cytoplasmique	présente	présente
- épaisseur	~ 10 nm	~ 10 nm
- acides lipotéichoïques	présents	absents
Point isoélectrique	pH 2 à 3	pH 5 à 6

Tableau 1 : caractéristiques des bactéries Gram + et Gram - [2]

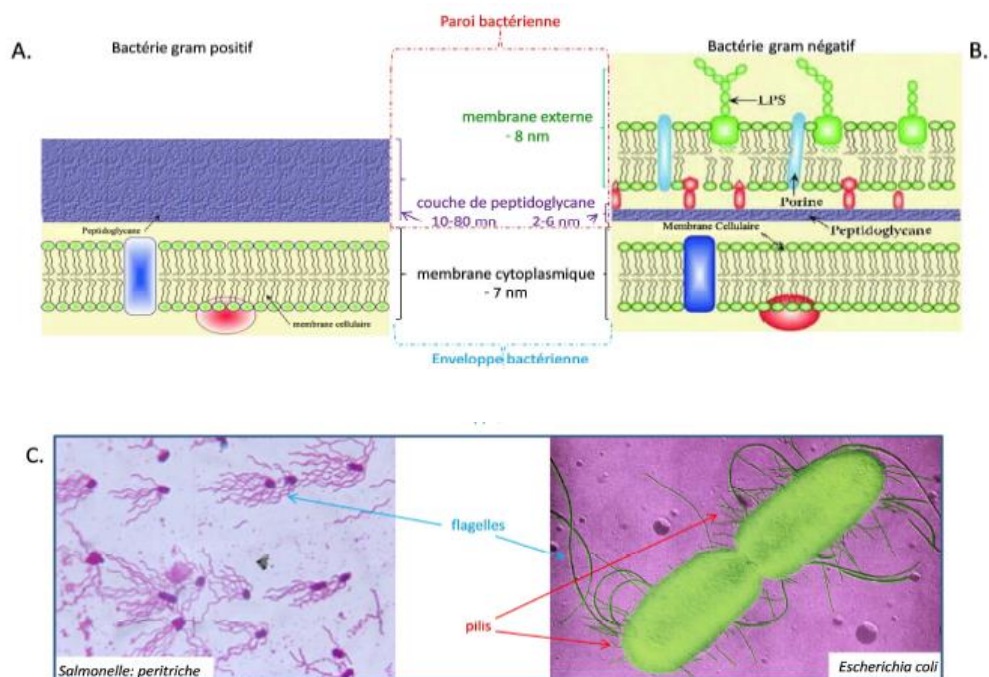


Figure 3: A, B : schéma d'une paroi bactérienne Gram+, Gram -, respectivement. C : image de microscope électronique de bactéries présentant des flagelles (à gauche) et des pilis (à droite) [1].

D'autres caractéristiques morphologiques aident les bactéries à s'immobiliser sur les surfaces, mais aussi à se déplacer :

- Flagelles et cils, appendices composés entièrement de protéines (**Figure 3C**).
- Pili : plus courts que les flagelles (**Figure 3C**).

3. Bactéries utilisées dans notre étude

Lactococcus lactis a été la première bactérie isolée en culture par Joseph Lister en 1873. Elle a été observée à nouveau par microscopie à partir de crème de lait et de lait caillé par Weigmann en 1899. Les bactéries lactococcus sont de forme coccoïde, à paroi Gram positif, leur surface ne présentant pas de poils ni de flagelles (**Figure 4**) [2]. Ces bactéries sont utilisées dans la fermentation des produits laitiers. Elles sont ingérées vivantes par l'être humain lorsqu'il boit du lait, et font partie du microbiote digestif humain [1]. De par leur forme et l'absence de poils et de flagelles, et leur innocuité pour la santé, elles constituent un modèle simple de bactérie, largement employé en laboratoire de recherche (**Figure 5**).

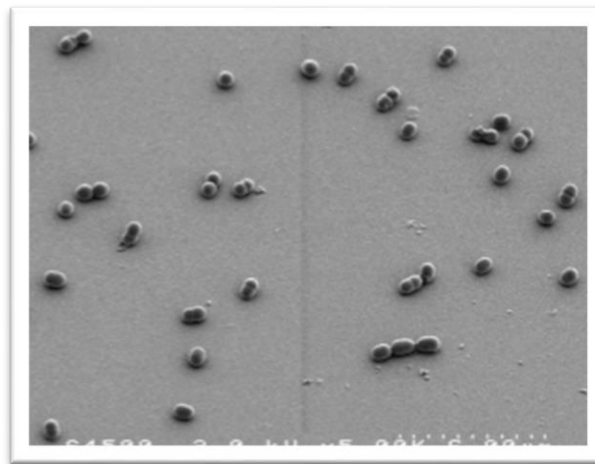


Figure 4: bactérie *L. lactis* observée par microscopie électronique [2]

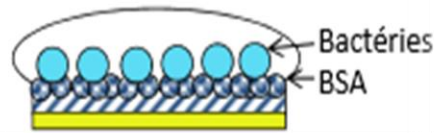


Figure 5 : Schéma de principe de l'adhésion bactérienne sur une couche auto-assemblée d'ODT, couverte ou non d'une couche mince protéique de BSA, réalisée par Emilie Bulard.

Staphylococcus aureus (S.aureus) est la souche de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. Elle se trouve au premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales (infections contractées à l'hôpital) et des intoxications alimentaires. C'est une bactérie en forme de coque dont le diamètre est d'environ 1 μm et à paroi Gram positif. Elle dispose donc d'une seule membrane, cytoplasmique, et d'un peptidoglycane de nature polymérique constituant sa paroi. De plus, une capsule polysaccharidique peut englober les bactéries de *S. aureus*, jouant un rôle important dans son pouvoir pathogène. Chez l'Homme, *S. aureus* fait partie de la flore cutanée et nasale naturelles et 30% des sujets sains en sont porteurs. En revanche, dès lors que ces bactéries omniprésentes dans l'environnement trouvent un point d'entrée dans l'organisme (barrière cutanée rompue à l'occasion d'une plaie par exemple), elles peuvent provoquer des infections au degré de gravité variable. En particulier, les bactéries peuvent coloniser les cellules et les entités de la matrice extracellulaire de l'hôte (tissus, protéines plasmatiques, ...) ou s'associer à des implants et ainsi former des biofilms à l'origine d'infections sévères (bactériémies, endocardites...). La prévalence de ces infections staphylococciques provient principalement de la persistance de cette espèce bactérienne chez l'hôte : en formant des biofilms, les bactéries perdurent en résistant non seulement à l'action du système immunitaire (phagocytose, défenses inflammatoires, ...) mais également à celle des antimicrobiens.

4. Adhésion bactérienne

L'adhésion des bactéries à différents substrats tels que les particules du sol, les implants médicaux et les cellules épithéliales humaines sont importantes pour de nombreuses raisons, tant environnementales que biomédicales. La force de l'adhésion bactérienne dépend de la nature des interactions possibles entre bactéries et surfaces, déjà mentionnées dans l'introduction : hydrophiles ou hydrophobes, électrostatiques, électro-chimiques, liaisons chimiques spécifiques, interactions liées à la morphologie : poils et piliers.

Les forces électrostatiques sont dues à des groupes chargés sur la bactérie et sur les substrats contenant des groupements chimiques tels que des phosphates ou des carboxylates. Le potentiel électrostatique résultant peut être mesuré par des méthodes électrochimiques telles que l'électrophorèse zêta. Les forces électrostatiques et les forces de van der Waals combinées conduisent à une énergie potentielle moyenne analogue à l'interaction d'atomes, molécules ou ions avec une surface, ou avec celle de colloïdes telle que décrite par Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO). L'énergie d'interaction varie en fonction de la distance de séparation selon la **Figure 6** [25-26].

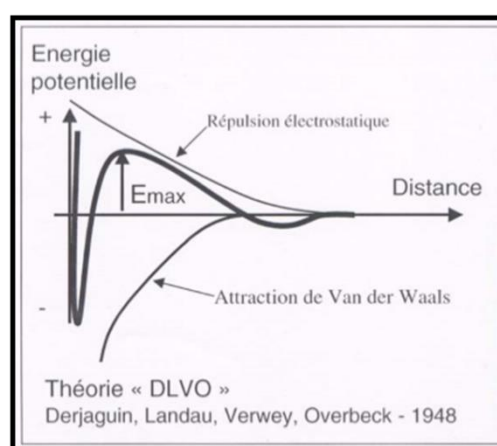


Figure 6 : Energie potentielle en fonction de la distance : cas d'interactions électrostatiques répulsives (modèle DLVO) [27]

La théorie DLVO a été étendue par inclusion des interactions acide-base (XDLVO) qui rendent compte de l'hydrophilie ou de l'hydrophobie des surfaces impliquées [28], à condition que d'autres interactions (notamment chimiques, en particulier dans le cas de surfaces de polymères) n'entrent pas en jeu. La rugosité de surface peut également affecter l'adhésion bactérienne. Ainsi, van Loosedrecht et al ont montré que le pourcentage de bactéries attachées à une surface solide telle que le verre était lié à l'hydrophobicité de la bactérie et à sa charge, mais ce résultat ne s'applique pas dans tous les cas [28].

L'angle de contact d'une gouttelette d'eau avec une surface permet de quantifier l'hydrophobicité de la surface. Dès 1804, Thomas Young avait décrit la relation entre l'adhérence et la tension superficielle d'un solide (γ_S) et d'un liquide (γ_L), et jeté les bases de l'interprétation quantitative de l'angle de contact.

5. Biofilm

Le biofilm est le stade de l'adhésion bactérienne où les bactéries changent de métabolisme, construisent une structure extracellulaire, et deviennent beaucoup plus résistantes et dangereuses. Le cycle de croissance du biofilm, modèle biologique générique d'adhésion bactérienne et de croissance de la population bactérienne, a été décrit et modifié plusieurs fois [6]. Il comprend l'adsorption liaison initiale de bactéries individuelles sur un substrat, la prolifération et la formation de la structure extracellulaire, et il se termine par la libération de grappes de cellules de la matrice du biofilm vers le milieu d'origine [7] (*Figure 7*). Dans ce travail, nous n'avons pas étudié ce stade d'évolution du film bactérien.

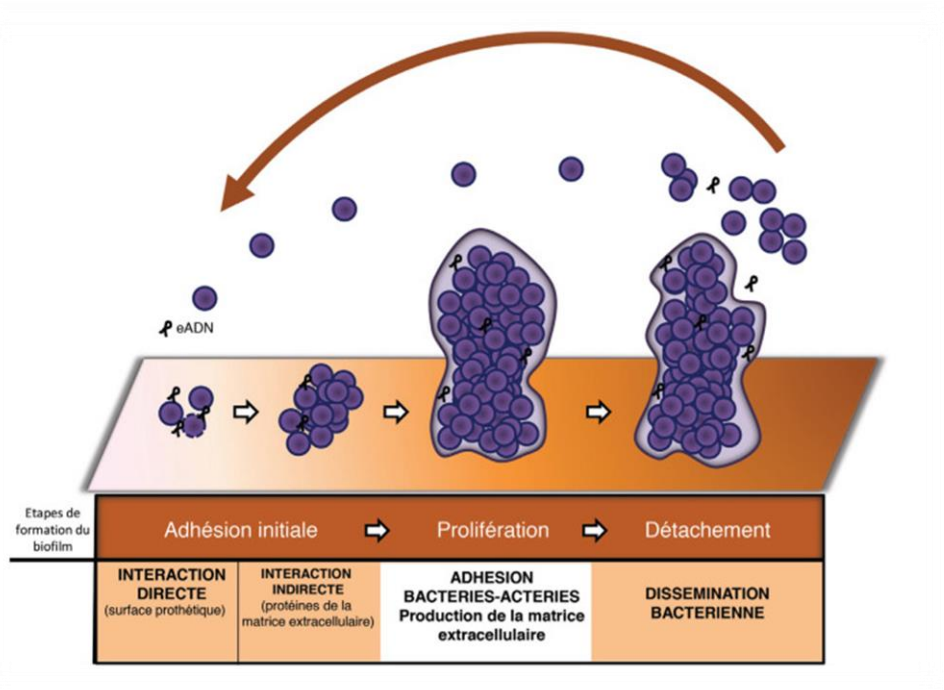
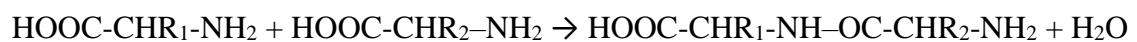


Figure 7 : Développement d'un biofilm bactérien [8]

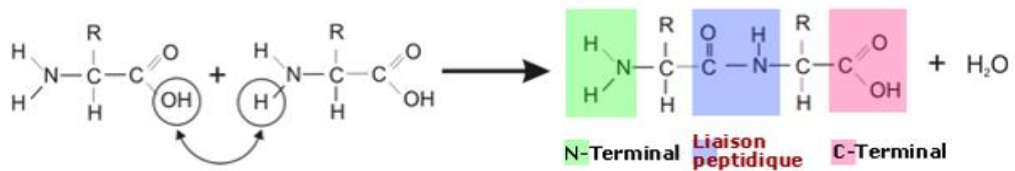
6. Acides aminés, peptides, protéines

6.1. Structure des acides aminés, peptides, et protéines

Les entités biologiques peptides et protéines sont des assemblages de structures élémentaires appelés acides aminés. Les protéines des êtres vivants contiennent 21 acides aminés différents, constitués chacun d'un atome de carbone central sur lequel un atome d'hydrogène, un groupe amine (NH_2), un groupe carboxyle ($\text{C}=\text{O}-\text{OH}$) et un groupement carboné R sont présents dans la **Figure 8**. Cet atome C central est donc asymétrique, et tous les acides aminés sont chiraux. Un seul énantiomère existe dans la nature, ce qui constitue une caractéristique de la vie, étonnante et toujours inexplicée. Les acides aminés se forment au travers de liaisons peptidiques - NH - CO - entre l'atome d'azote d'un acide aminé et le groupement $\text{C}=\text{O}$ de l'acide aminé suivant par élimination de H_2O (**Figure 8**) :



Ou encore :



Les peptides sont constitués d'une séquence caractéristique d'acides aminés. Les protéines sont composées à leur tour de peptides. Les peptides et les protéines adoptent une structure géométrique complexe en trois dimensions, et c'est cette structure qui leur confère leurs fonctions biologiques. La structure se définit séquentiellement : la structure « primaire » concerne l'ordre des liaisons, la structure « secondaire » l'agencement spatial local des peptides (hélices, feuilletts, et brins sans structure bien définie), la structure « tertiaire » concerne l'ensemble de l'agencement des hélices, feuilletts et brins de structure aléatoire (*Figure 9*).

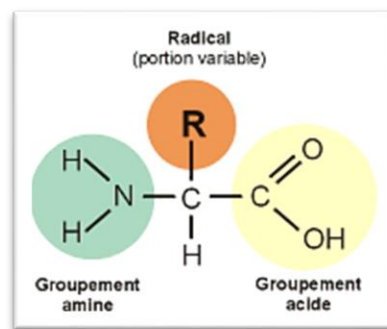


Figure 8 : Structure générale des acides aminés [9]

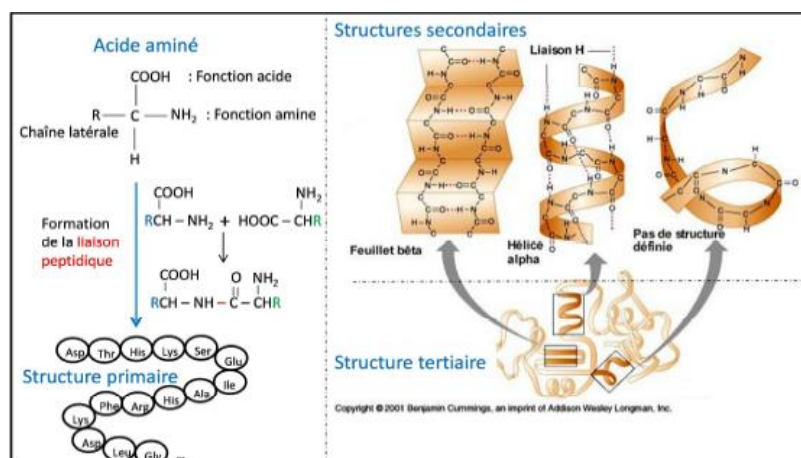


Figure 9 : Structure des protéines

Les interactions électrostatiques, les forces de van der Waals et les liaisons hydrogène jouent un rôle important pour la structure secondaire des entités biologiques, incluant les interactions avec le solvant (l'eau en milieu biologique). Les peptides et les protéines peuvent s'adsorber sur des surfaces de différents types lorsque celles-ci sont exposées à un fluide qui en contient [10]. La différence entre les interactions surface-entité-biologique et solvant-entité biologique peut provoquer un changement de conformation de l'entité biologique lorsqu'elle s'adsorbe (« dénaturation »).

6.2. Albumine de sérum bovine

L'Albumine de Sérum Humain (HSA) est l'une des protéines plasmatiques la plus étudiée car présente en abondance dans le plasma (concentration moyenne de 50 mg/ml) [14] donc facilement extractible et de structure tridimensionnelle connue [15]. La BSA s'adsorbe sur de nombreux biomatériaux (cathéters, dialyseurs rénaux, etc...) [11] mais aussi sur la surface de bactéries.

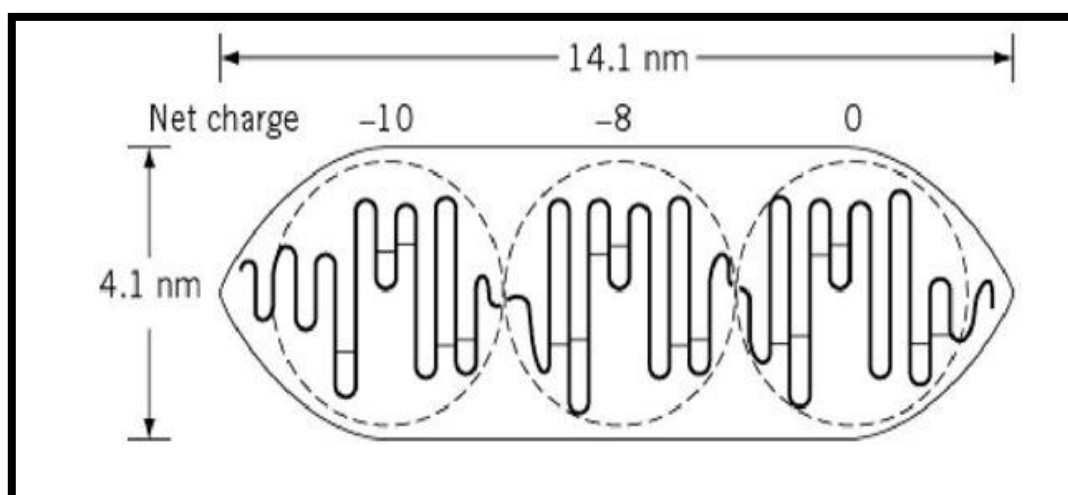


Figure 10 : structure 2D de l'albumine de sérum bovin [15]

Dans le cadre de nos études passées et présente, c'est l'analogue de l'HSA, l'albumine de serum bovin (BSA) que nous avons utilisé pour des raisons de sécurité biologique liée aux contaminations virales des produits du sang humain. Les séquences en acides aminés de la BSA et de l'HSA sont identiques à environ 80% (583 résidus d'acides aminés pour la BSA, 585 acides aminés pour l'HSA [16]), leurs poids moléculaires diffèrent de moins de 1% (66 KDa pour la BSA [18] et 65 KDa pour l'HSA[16]), leurs propriétés physico-chimiques telles que le point isoélectrique sont identiques [19][20]. D'un point de vue structural, ce sont des sphéroïdes allongés de dimensions 4x4x14 nm (**Figure 10**), constitués de trois domaines homologues divisés en neuf boucles par 17 ponts disulfure [16]. Les liaisons disulfure dans l'albumine sont protégées contre les agents réducteurs quand le pH a sa valeur physiologique normale [15]. Les trois domaines ont une densité de charges variable qui affecte la façon dont la BSA s'adsorbe sur les surfaces [17].

6.3. Adsorption des protéines

Comme les bactéries, les protéines en solution peuvent s'adsorber en monocouche ou multicouche sur des surfaces, via différents types d'interactions, qui dépendent de la nature chimique de la surface : hydrophobes, hydrophiles, électrostatiques, électro-chimiques, spécifiques (liaisons chimiques) (**Figure 11**). Suivant la nature de la surface, l'adsorption est plus ou moins forte et, comme indiqué ci-dessus, peut donner lieu à des changements conformationnels en perturbant les interactions de la protéine (par rapport au solvant) aux points de contact avec la surface [21] [22] [23]. Les changements conformationnels sont d'autant plus probables que le type d'interaction avec la surface est différent de celui avec le solvant (polarité, acido-basicité...). En cas d'interaction hydrophobe avec la surface, la protéine va tendre à maximaliser l'aire de contact avec la surface et pour cela changer de conformation.

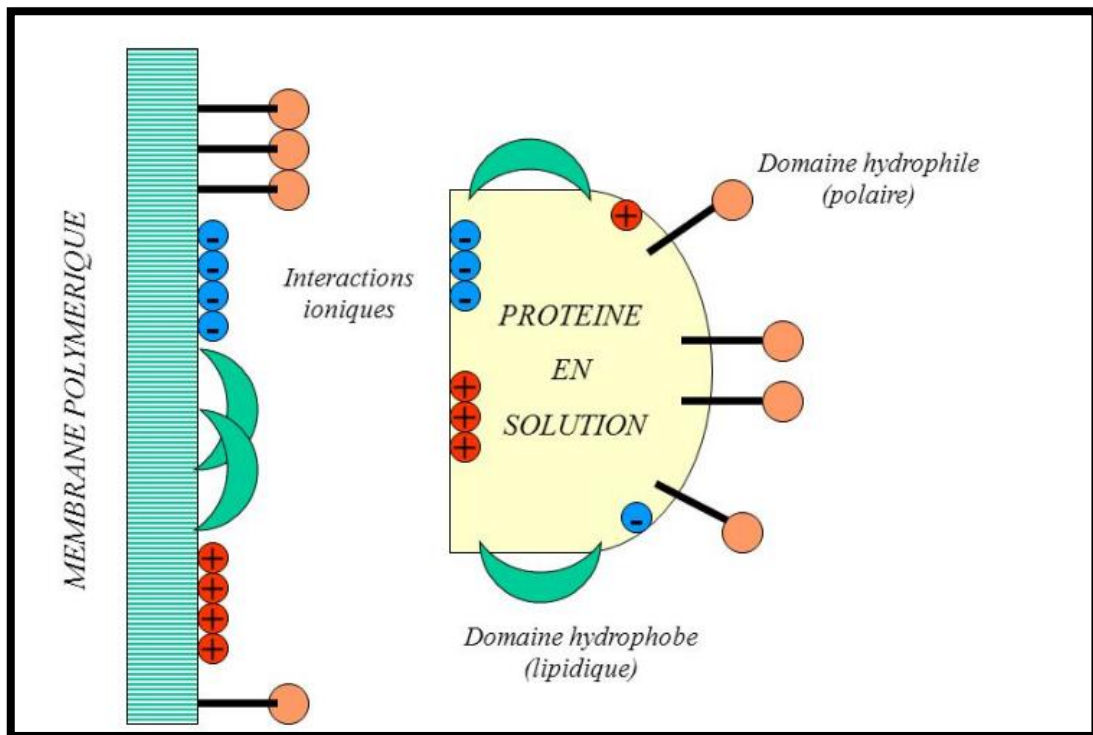


Figure 11: Mécanisme physico-chimiques d'adsorption membranaire [24]

6.4. Rôle des protéines dans l'adhésion bactérienne

La plupart des surfaces en présence d'un fluide sont recouvertes d'un film primaire de protéines, qui module l'adhésion bactérienne. Des protéines peuvent aussi être adsorbées sur la paroi bactérienne avant que celle-ci n'interagisse avec la surface. Ainsi, les protéines peuvent :

1. Consolider l'ancrage des bactéries sur la surface, grâce notamment aux interactions ligands-récepteurs ou acide/base de Lewis entre elles et les bactéries.
2. Servir de nutriments pour les bactéries. La métabolisation des protéines va modifier l'état de la surface, ce qui influencera la poursuite de l'adhésion bactérienne ainsi que la prolifération des bactéries sur la surface [29].
3. Limiter ou réguler l'adhésion bactérienne par des interactions répulsives, comme on va le voir plus loin dans ce travail.

7. Approches anti-bactériennes

On distingue les approches anti-adhésion et les approches bactéricides. Les approches anti-adhésion consistent à limiter les forces d'interaction entre les bactéries et les surfaces, ou à désinfecter la surface. Dans la première catégorie, on trouve :

- L'utilisation de polymères greffés inorganiques [30].
- L'utilisation d'un revêtement protéique de surface comme on vient de le voir [29].
- L'utilisation de surfaces soit super hydrophobes, soit super hydrophiles, selon que les bactéries dont on veut éviter l'adhésion sont hydrophiles ou hydrophobes [31] [32].

Dans la seconde catégorie :

- L'utilisation de polymères greffés comportant des antimicrobiens capables d'engendrer un effet létal sur les bactéries [30].
- L'utilisation de désinfectants
- L'utilisation de détergents, par exemple contenant du peroxyde d'hydrogène [33]. A noter que les détergents permettent d'obtenir un meilleur rendement de décrochage et/ou de destruction des bactéries sur des surfaces hydrophobes que sur des surfaces hydrophiles [34] [35]. En effet, les surfaces hydrophobes n'absorbant pas l'eau, un flux d'eau peut entraîner les particules présentes (saletés, bactéries...) dans son sillage et ainsi nettoyer la surface contaminée : c'est l'« effet lotus » : la pluie permet aux feuilles de cette plante de s'auto-nettoyer grâce leur propriété super hydrophobe.
- Le greffage de peptides anti-microbiens (acronyme anglais : AMP). Les bactéries adhèrent spécifiquement sur les peptides, mais ceux-ci sont létaux pour les elles. La nisine dont on étudie l'impact dans ce travail au chapitre 4 est un AMP. Le mécanisme de son effet bactéricide est connu en solution (non sur les surfaces) (*Figure 11-1*). Elle peut interagir avec l'ensemble de la paroi bactérienne par des interactions électrostatiques (nisine chargée positivement à pH 7 au niveau de trois de ses acides aminés lysine, avec des bactérie chargées négativement).

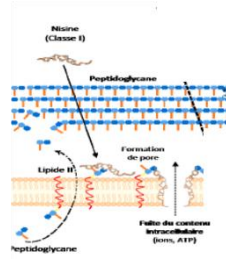


Figure 11-1. Mécanisme d'action anti-microbienne de la nisine en solution [Réf. : E. Taale et al, *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 10, 384-399 (2016)]

Après son accrochage, la nisine parvient à traverser la couche de peptidoglycane (20 à 40 nm) des bactéries Gram⁺ et à s'internaliser au sein de la membrane cytoplasmique. Puis elle se fixe sur les lipides II transmembranaires impliqués dans la synthèse des peptidoglycanes. Elle forme alors des pores dans la paroi bactérienne, empêchant la fonction des lipides II, ce qui finit par aboutir à la destruction de la couche externe de la bactérie et à sa mort.

8. Monocouches auto-assemblées (SAM)

L'auto-assemblage est un processus spontané par lequel des monocouches moléculaires très ordonnées et compactes parviennent à s'assembler sur un substrat approprié (**Figure 12**). Le processus d'auto-assemblage a été découvert par Nuzzo et Allara en 1983, qui ont décrit la fonctionnalisation des surfaces d'or par adsorption de disulfures [37, 38]. La liaison avec le substrat doit être forte (typiquement, par une fonction thiol sur l'or : la liaison thiolate covalente à la surface de l'or a une énergie de liaison de 170 kJ/mol [39]). Les interactions latérales entre molécules, en général, des interactions de van der Waals entre chaînes aliphatiques plus ou moins longues, sont localement faibles, mais, cumulées sur la longueur des chaînes, elles ne sont pas négligeables et confèrent une forte cohésion à l'auto-assemblage, qui est très stable, à l'air ou en phase liquide.

L'adsorption des molécules est rapide et ordonnée suivant la structure atomique du substrat, mais l'alignement des chaînes est beaucoup plus lent. La couche d'or sur substrat de quartz est polycristalline, la taille des cristallites étant de 1 à 2 μm et leur orientation étant (111). Sur le

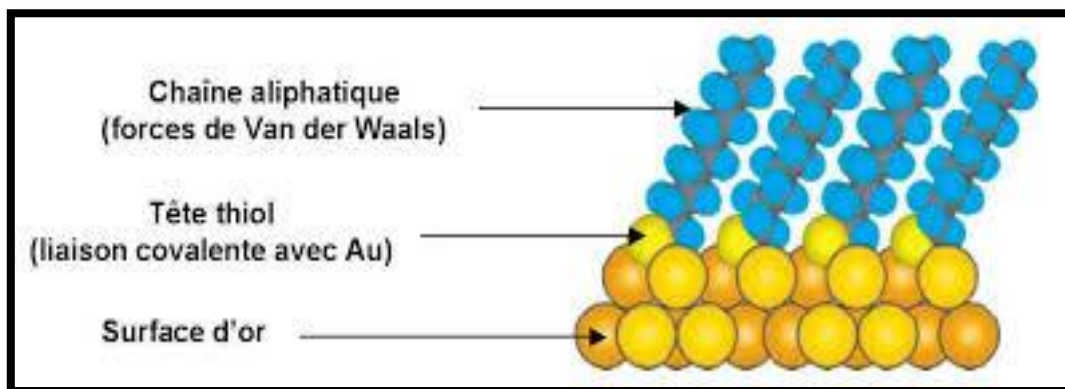


Figure 12 : Auto-assemblage d'une monocouche d'alcane-thiols sur une surface d'or [36]

réseau d' Au (111), les thiols forment un hexagone (**Figure 13**) suivant une maille $\sqrt{3} \times \sqrt{3} R30$. Les chaînes alkyle s'ordonnent selon une conformation « tout trans » légèrement inclinée (30°), l'inclinaison permettant d'ajuster la distance entre chaînes et de maximaliser les interactions latérales entre les molécules [40]. Le degré d'ordre dépend de la force d'interaction latérale, qui augmente avec la longueur des chaînes alkyle. Les chaînes de moins de 12 atomes de carbone sont moins ordonnées. Les chaînes de moins de huit atomes de carbone sont fortement désordonnées. La structure des SAM d'alcane thiols a fait l'objet d'études expérimentales très variées : STM (sensible aux fonctions terminales), XPS et diffraction X (sensible aux fonctions thiols et à leur ordre), FTIR (sensible aux fonctions CH_2 le long des chaînes et au groupement terminal), SFG (sensible exclusivement aux parties non centro-symétriques des chaînes et au groupement terminal, ultra-sensible à l'orientation du groupement terminal, permettant une étude détaillée de la conformation de l'ensemble de la chaîne [40]).

L'utilisation des SAM d'alcane thiols est devenue une approche standard pour la construction de surfaces modèles ayant des propriétés chimiques ajustables suivant la nature du groupement chimique en bout de chaîne. L'auto-assemblage est aussi un moyen très intéressant pour adapter la surface des matériaux à un environnement biologique et obtenir, par exemple, des propriétés antiadhésives contre les bactéries [39]. On peut obtenir des propriétés très différentes :

hydrophobie ou hydrophilie, capacité d'adsorber des entités chimiques ou biologiques spécifiques ou inertie chimique... Ainsi les SAM d'alcane thiols terminés par des groupements chimiques spécifiques sont largement utilisés pour des applications biochimiques (biocapteurs) et biophysiques (anti-adhésion bactérienne) [39].

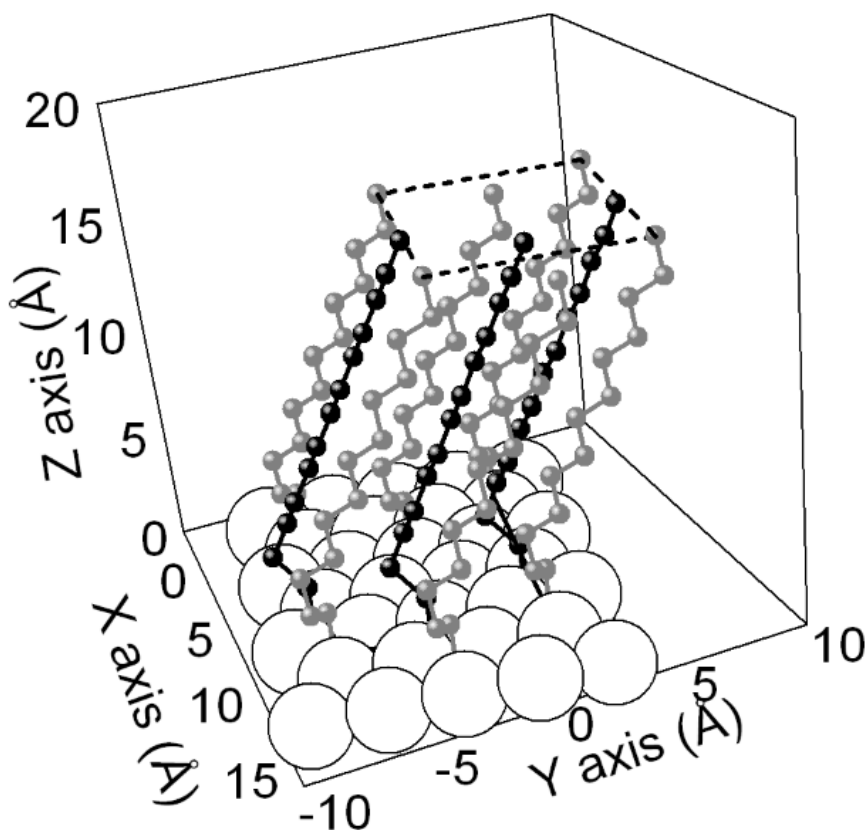
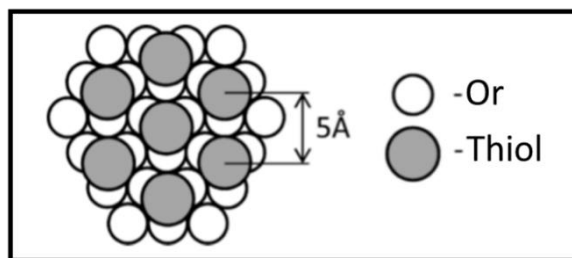


Figure 13 : (haut) Sur le réseau cristallin d' Au (111), les alcane thiols forment une structure hexagonale ($\sqrt{3} \times \sqrt{3} R30^\circ$) avec environ 5 \AA entre atomes de soufre voisins ; (bas) Conformation détaillée des chaînes d'octadécane-thiol obtenue par modélisation de spectres de SFG [40].

- D'autres types de SAM existent :

- SAM d'oligosaccharides, utilisées pour étudier les interactions existant entre les protéines à la surface des bactéries et des oligosaccharides présents sur la surface de cellules eucaryotes, ces interactions permettant la communication cellulaire, ainsi que la différenciation et le développement cellulaire.

- SAM hydrophiles.

- SAM de poly (éthylène glycol) (PEG), capables de limiter l'adhésion bactérienne et cellulaire.

- SAM présentant des groupes aminés en bout de chaîne tel que l'APTS (acide para toluène sulfonique)

- SAM composées de monocouche ou de bicouches lipidiques, modélisant la membrane cellulaire dans le but d'étudier l'adsorption des protéines. En effet, on trouve de nombreuses structures fonctionnelles analogues dans la nature, par exemple les membranes cellulaires (constituées le plus souvent de deux monocouches auto-assemblées ayant chacune une face hydrophyle et une face hydrophobe), les ribosomes et la grande variété de moteurs moléculaires.

- Différents types de surfaces se prêtent à l'auto-assemblage :

- Les oxydes de métaux (AgO ou Al₂O₃)

- L'oxyde de silicium pour des organo-silanes grâce à la formation de la liaison covalente Si-O-Si

- Les verres hydroxylés

- Les métaux nobles

- Les métaux (Au, Ag)

9. Références du chapitre 1

- [1] Emilie BULARD, "L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire", thèse de doctorat, Université Paris-Sud (2012).
- [2] Hélène Badouin, Thèse de doctorat, Université Paris-Sud - Paris Saclay (2016).
- [3] C. Outline, "Concept Outline 34.1," pp. 679–692. www.biocourse.com
- [4] K. D. Young, "The Selective Value of Bacterial Shape," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70, 660–703 (2006).
- [5] M. Katsikogianni, Y. F. Missirlis, L. Harris, and J. Douglas, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions," *Eur. Cells Mater.*, 8, 37–57 (2004).
- [6] D. Lindsay and A. von Holy, "Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know," *J. Hosp. Infect.*, 64, 313–325 (2006).
- [7] M. Medicine, N. Orleans, and S. L. City, "The role of the bio film matrix in structural development," *Math. Med. Biol.*, 21, 147–166 (2004).
- [8] D. Lindsay*, A. von Holy School, Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know.
- [9] <http://blog.teledynedalsa.com/wp-stuff/uploads/2013/02/3D-Triangulation.jpg> .
- [10] L. J. Mansur, H.S. Lobato, Z.P. Orefice, R.L. Vanconcelos, W.L. Olivera, C. Machado, "Surface functionalization of porous glass networks: Effects on bovine serum albumine and porcine insulin," *Biomacromolecules*, 1, 789–797 (2000).
- [11] P. E. Vaudaux, P. Francois, R. A. Proctor, D. McDevitt, T. J. Foster, R. M. Albrecht, D. P. Lew, H. Wabers, and S. L. Cooper, "Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts," *Infect. Immun.*, 63, 585–590 (1995).
- [12] R. Murga, J. M. Miller, and R. M. Donlan, "Biofilm Formation by Gram-Negative Bacteria on Central Venous Catheter Connectors : Effect of Conditioning Films in a Laboratory Model Biofilm Formation by

Gram-Negative Bacteria on Central Venous Catheter Connectors : Effect of Conditioning Films in a La," *J. Clin. Microbiol.*, 39, 2294–2297 (2001).

[13] M. Fabiano, D. Marrale, and C. Mistic, "Bacteria and organic matter dynamics during a bioremediation treatment of organic-rich harbour sediments," *Mar. Pollut. Bull.*, 46, 1164–1173 (2003).

[14] K. Wadu-Mesthrige, N. A. Amro, and G. Y. Liu, "Immobilization of proteins on self-assembled monolayers," *Scanning*, 22, 380–388 (2000).

[15] G. F. RIEDLI, INTERACTION OF DEAMIDATED SOLUBLE WHEAT PROTEIN (SWP) WITH OTHER FOOD PROTEINS AND METALS

[16] M. K. Cha and I. H. Kim, "Glutathione-linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: A possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 222, 619–625 (1996).

[17] S. J. McClellan and E. I. Franses, "Effect of concentration and denaturation on adsorption and surface tension of bovine serum albumin," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 28, 63–75 (2003).

[18] L. C. Xu and B. E. Logan, "Adhesion forces between functionalized latex microspheres and protein-coated surfaces evaluated using colloid probe atomic force microscopy," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 48, 84–94 (2006).

[19] Daniel C. Carter, Xiao-min He, Sibyl H. Munson, Pamela D. Twigg, Kim M. Gernert, M. Beth Broom and Teresa Y. Miller Source: Science, New Series, Vol. 244, No. 4909 (Jun. 9, 1989), pp. 1195-1198

[20] R. Kurrat, J. E. Prenosil, and J. J. Ramsden, "Kinetics of human and bovine serum albumin adsorption at silica-titania surfaces," *J. Colloid Interface Sci.*, 185, 1–8 (1997).

[21] S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, and N. Franks, "Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites," *Nat. Struct. Biol.*, 5, 827–835 (1998).

[22] J. Kim, "Protein adsorption on polymer particles," *J. Biomed. Mater. Res.*, 21, 4373–4381 (2002).

[23] Y. Liu, J. Strauss, and T. A. Camesano, "Adhesion forces between *Staphylococcus epidermidis* and surfaces bearing self-assembled monolayers in the presence of model proteins," *Biomaterials*, 29, 4374–4382 (2008).

- [24] J. Chanard, "Biocompatibilité des membranes de dialyse: le rôle de l'adsorption," 24, 359–365 (2003).
- [25] E. J. W. Verwey and J. T. G. Overbeek, "Stanford University , California We regret greatly to have overlooked these publications , and this note is published to recognize explicitly Derjaguin ' s and Landau ' s priority . Professor," *J. Colloid Interface Sci.*, 10, 224–225 (1955).
- [26] D. J. Müller and A. Engel, "The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions," *Biophys. J.*, 73, 1633–1644 (1997).
- [27] Profil énergétiques schématiques des interactions (DLVO) - Google Search.
- [28] M. Hermansson, "The DLVO theory in microbial adhesion," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 14, 105–119 (1999).
- [29] R. Müller, A. Eidt, K. A. Hiller, V. Katzur, M. Subat, H. Schweikl, S. Imazato, S. Ruhl, G. Schmalz, "Influences of protein films on antibacterial or bacteria-repellent surface coatings in a model system using silicon wafers," *Biomaterials*, 30, 4921–4929 (2009).
- [30] P. M. Sivakumar, G. Iyer, L. Natesan, and M. Doble, "3'-Hydroxy-4-methoxychalcone as a potential antibacterial coating on polymeric biomaterials," *Appl. Surf. Sci.*, 256, 6018–6024 (2010).
- [31] U. T. C. All, "Linked references are available on JSTOR for this article : Planta Purity of the sacred lotus , or escape from contamination in biological surfaces," 202, 1–8 (2017).
- [32] C. R. Crick, S. Ismail, J. Pratten, and I. P. Parkin, "An investigation into bacterial attachment to an elastomeric superhydrophobic surface prepared via aerosol assisted deposition," *Thin Solid Films*, 519, 3722–3727 (2011).
- [33] N. I. Abu-Lail and T. A. Camesano, "Role of lipopolysaccharides in the adhesion, retention, and transport of Escherichia coli JM109," *Environ. Sci. Technol.*, 37, 2173–2183 (2003).
- [34] E. Alt, F. Leipold, D. Milatovic, G. Lehmann, S. Heinz, and A. Schömig, "Hydrogen peroxide for prevention of bacterial growth on polymer biomaterials," *Ann. Thorac. Surg.*, 68, 2123–2128 (1999).
- [35] R. S. Dahiya and M. L. Speck, "Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus.*," *J. Dairy Sci.*, 51, 1568–1572 (1968).

- [36] Thèse par Alexandre Popoff. Importance des interactions faibles dans l'adsorption de molécules organiques fonctionnelles sur des surfaces atomiquement planes : approche expérimentale et théorique. Matériaux. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. tel-00351327
- [37] R. G. Nuzzo and D. L. Allara, "Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces," *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 4481–4483 (1983).
- [38] J. Zheng, L. Li, H. K. Tsao, Y. J. Sheng, S. Chen, and S. Jiang, "Strong repulsive forces between protein and oligo (ethylene glycol) self-assembled monolayers: A molecular simulation study," *Biophys. J.*, 89, 158–166 (2005).
- [39] E. Bulard, M.-P. Fontaine-Aupart, H. Dubost, W. Zheng, M.-N. Bellon-Fontaine, J.-M. HERRY, B. Bourguignon, competition of Bovine Serum Albumin Adsorption and Bacterial Adhesion onto Surface-Grafted ODT: In Situ Study by Vibrational SFG and Fluorescence Confocal Microscopy *Langmuir*, 28, 17001-17010 (2012).
- [40] B. Bourguignon, W. Zheng, S. Carrez, A. Ouvrard, F. Fournier, and H. Dubost, "Deriving the complete molecular conformation of self-assembled alkanethiol molecules from sum-frequency generation vibrational spectra," *Phys. Rev. B* 79, 125433-1 - 125433-12 (2009).

Chapitre 2

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Les propriétés de nos échantillons sont sondées par une combinaison de méthodes physiques, chimiques et biologiques, les unes globales (spectroscopiques, à une échelle spatiale impliquant de moyennner sur un grand nombre d'atomes et molécules de la surface), et les autres locales (microscopies). Nos techniques spectroscopiques incluent les spectroscopies vibrationnelles par génération de fréquence somme (SFG) et par absorption infrarouge (IR) par transformée de Fourier (FTIR) et la spectroscopie XPS. Nos techniques locales, par résolution spatiale croissante, incluent la mesure d'angle de contact de gouttelettes d'eau déposées sur la surface à l'aide d'un goniomètre, la microscopie de fluorescence, la microscopie à force atomique (AFM).

1. Méthodes de caractérisation des échantillons

1.1. XPS

La spectroscopie des photoélectrons émis suite à l'absorption de rayons X (XPS) est une technique (*Figure 14*) permettant d'obtenir des informations quantitatives sur la composition chimique d'un échantillon et sur l'environnement chimique des différents atomes (par exemple, leur état d'oxydation) [1]. L'échantillon est placé sous vide et irradié avec des rayons X qui excitent les électrons de cœur des atomes, provoquant la photoémission d'électrons, dont on mesure la distribution d'énergie. Sur la base de la conservation de l'énergie, l'énergie cinétique (KE) des photoélectrons émis est la différence entre l'énergie $h\nu$ connue des rayons X incidents et l'énergie de liaison (BE) de l'électron dans l'atome [2].

$$KE = h\nu - BE$$

Le nombre de photoélectrons émis par chaque niveau électronique de l'échantillon dépend de la concentration d'atomes dans ce niveau. L'énergie des niveaux de cœur étant peu perturbée par les liaisons chimiques, les niveaux des différents éléments apparaissent à une énergie caractéristique, tabulée, de l'élément. Par conséquent, nous pouvons identifier la présence d'un élément, et calculer sa concentration relative dans l'échantillon en détectant les photoélectrons dans les régions d'énergie appropriées. A haute résolution, on peut aussi observer que l'énergie précise des niveaux de cœur dépend de leur environnement, et donc déterminer par exemple si les atomes sont environnés d'atomes d'oxygène, et de combien d'atomes d'oxygène, et s'ils ont tous le même environnement. La spectroscopie XPS permet la détermination quantitative de la composition atomique pour tous les éléments sauf H et He, qui n'ont pas à proprement parler de niveaux de cœur, avec une marge d'erreur de moins de 10%. L'XPS peut être utilisée pour mesurer des isothermes d'adsorption de protéines [1] si le substrat ne contient pas d'azote : l'azote détecté par XPS provient alors des protéines adsorbées. On mesure la quantité d'azote à la surface à différentes concentrations de protéines en solution. En combinant l'XPS avec une autre technique qui mesure la quantité totale de protéines adsorbées, l'épaisseur de la couche et la couverture peuvent être calculées. Dans ce travail, l'XPS a été utilisée pour caractériser les échantillons de MUA et MUA25 aux différents stades d'adsorption de la nisine (voir le chapitre 4 pour plus de détails). Les mesures ont été effectuées avec un spectromètre Thermo Electron K-Alpha en utilisant une source de rayons X monochromatique Al-K-Alpha (1486,6 eV) focalisés sur un spot de 400 μm . Des spectres large bande de -10 à 1350 eV ont été collectés avec une énergie de passage de 200 eV. Les spectres haute résolution sur les régions C 1s, O 1s, S 2p, N 1s, Au 4f ont été acquis avec une énergie de passage de 50 eV. L'énergie de liaison a été référencée en fixant le pic maximum de C 1s à 285,0 eV. La déconvolution des pics et les proportions des composants à partir des aires des pics ont été obtenues à l'aide du logiciel CasaXPS.

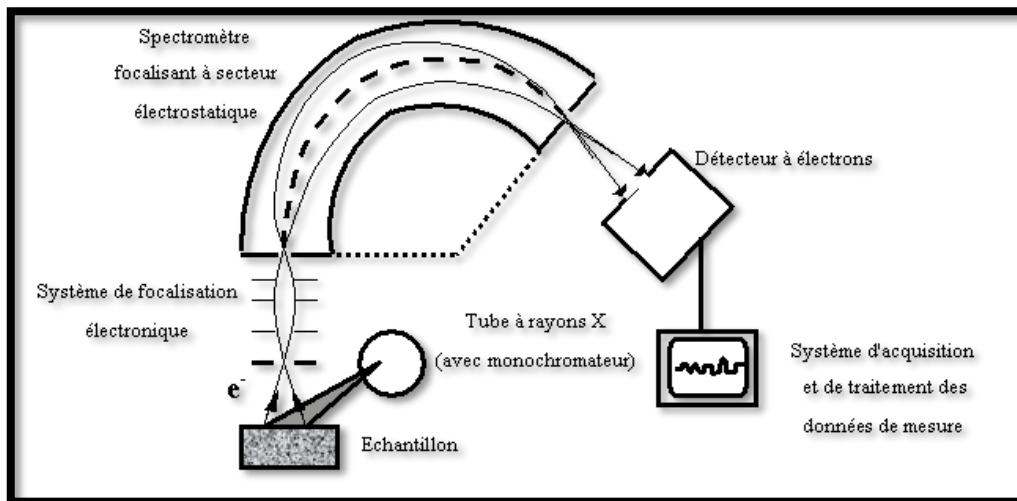


Figure 14 : Schéma de la méthode expérimentale d'XPS [3]. La source peut être avantageusement remplacée par le rayonnement synchrotron.

1.2. Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique est une technique permettant de visualiser avec une résolution nanométrique la topographie de la surface d'un matériau ou d'une entité immobilisée sur cette surface. Le principe de l'AFM est basé sur l'interaction entre la surface de l'échantillon à analyser et une pointe sonde nanométrique, fixée sous un micro-levier, dont on mesure optiquement les variations de hauteur sur l'échantillon au cours de scans XY par mesure de la position d'un faisceau laser réfléchi par le levier. Quand la pointe balaye la surface, elle suit la topographie de l'échantillon en fonction de la force d'interaction pointe-surface, donnant une image tridimensionnelle du matériau analysé. La figure 15 en décrit brièvement le principe.

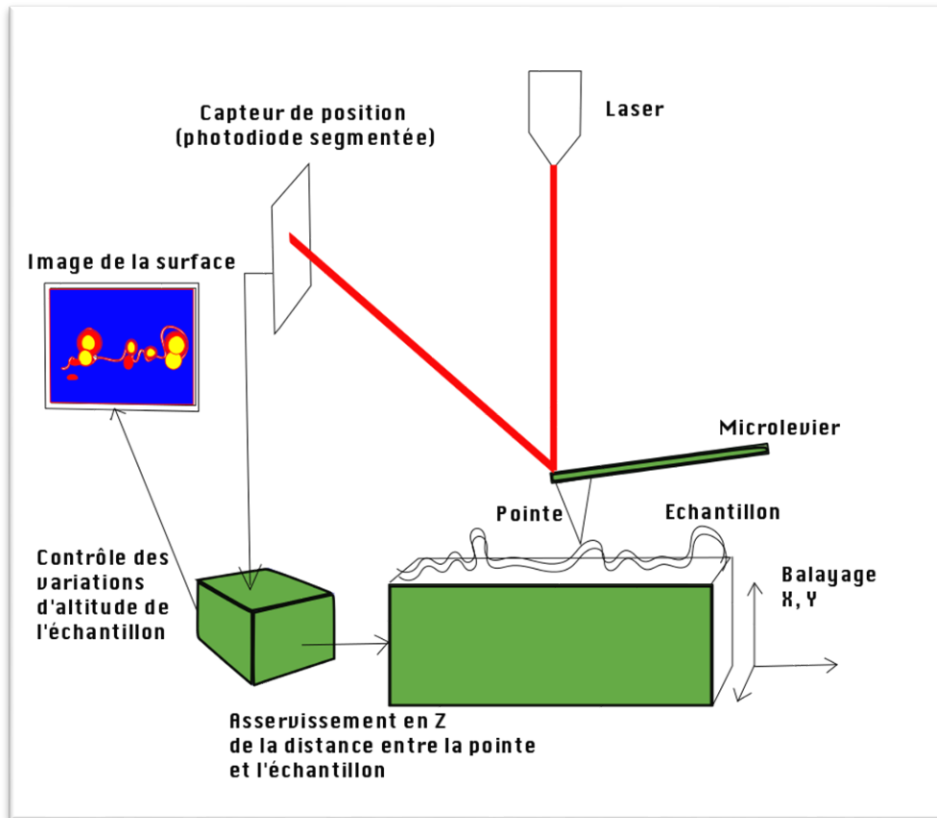


Figure 15 : principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique (AFM) [4]

Il existe différents modes d'imagerie, la mesure de force n'étant pas le seul mode possible :

- **Mode contact :** dans ce mode, le levier équipé de la pointe détectrice appuie légèrement sur l'échantillon. La force d'interaction entre l'échantillon et la pointe est maintenue constante au cours du scan XY en adaptant la hauteur de l'échantillon [5] (Figure 16).

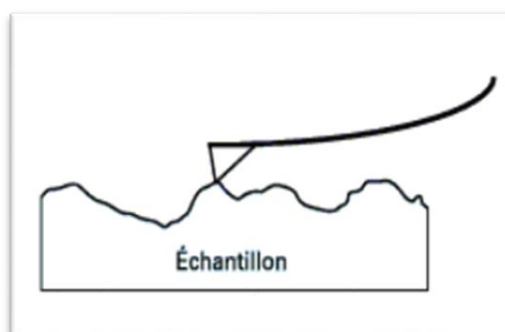


Figure 16 : principe de l'AFM en mode contact [5]

- **Mode contact intermittent (tapping)** : nous avons utilisé ce mode afin d'obtenir la topographie de nos surfaces. Dans ce mode, le levier est mis en oscillation (à 315 kHz dans notre cas), à une fréquence proche de sa résonance. L'échantillon subit alors une force variable entre l'attraction de type van der Waals à grande distance, et la répulsion entre les électrons de la surface et ceux de la pointe à courte distance, au cours des oscillations du levier. C'est l'amplitude de l'oscillation dont on mesure les changements en fonction de la position XY (*Figure 17*).

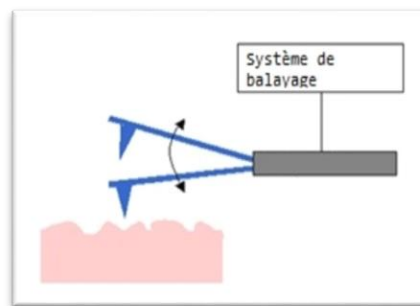


Figure 17 : principe de l'AFM en mode tapping [5]

- **Mode non-contact** : ce mode est analogue au mode contact, en maintenant une distance pointe-échantillon plus grande (de 55 à 150 Å) dans laquelle on reste en interaction attractive seulement. On mesure alors le gradient des forces attractives. Ce mode a l'avantage de ne pas présenter de risque d'endommagement de la surface.

Nous avons utilisé le microscope à force atomique d'Aimeric Ouvrard et Natalia Alyabyeva, équipé d'une pointe en silicium nitruré, dont le diamètre varie typiquement entre 10 et 50 nm, la pointe étant accrochée à un levier de faible constante de raideur $K = 25 \text{ N.m}^{-1}$ (Figure 18). Notre but était de vérifier que nous reproduisions correctement la méthode de préparation utilisée par Emilie Bulard dans sa thèse [6]. La surface présente quelques gros cristallites dont la taille peut aller jusqu'à une dizaine de micromètres, et des cristallites plus petits de l'ordre de 0.5 à 2 μm qui s'intercalent entre les gros cristallites. Il est connu que l'orientation de ces micro-

cristaux est [111], sans relation entre les directions des axes cristallographiques entre les micro-cristaux. Les *Figures 18 et 19* montrent les surfaces après l'auto-assemblage d'ODT et après un dépôt de BSA. Elles montrent que la surface des microcristaux est analogue dans les deux cas, sans possibilité d'identifier clairement la présence de BSA par AFM. Ce n'est pas étonnant compte tenu de la faible liaison entre le SAM d'ODT et la BSA, qui rend la surface très « molle ». Il semble y avoir un excès de BSA aux joints entre les micro-cristaux, où les défauts de la surface se prêtent a priori à un ancrage plus solide de la BSA. L'important est qu'on ait bien de la BSA adsorbée sur les micro-cristaux eux-mêmes, ce qui a été montré par d'autres méthodes dans la thèse d'Emilie Bulard, où elle avait également réalisé des images de microscopie électronique pour vérifier que les bactéries s'adsorbaient bien de manière homogène sur les micro-cristaux et non seulement aux joints de grains.

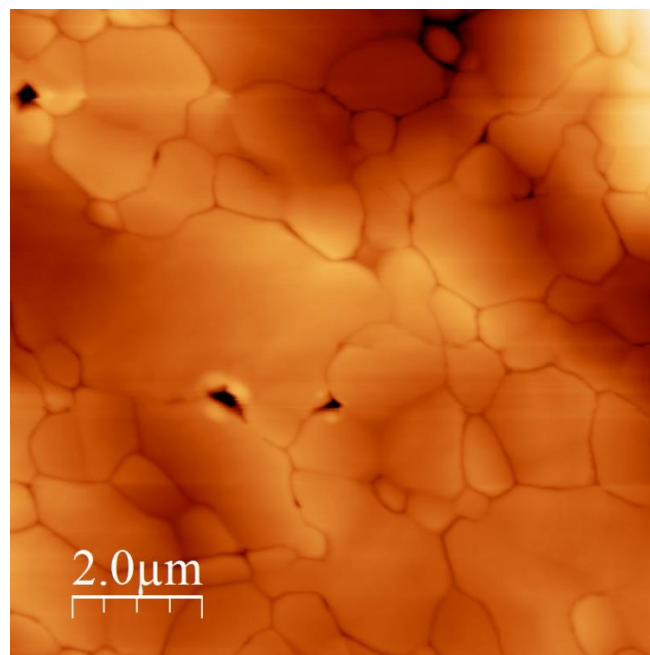


Figure 18 : image AFM d'une surface d'or couverte d'ODT, montrant les cristallites d'or.

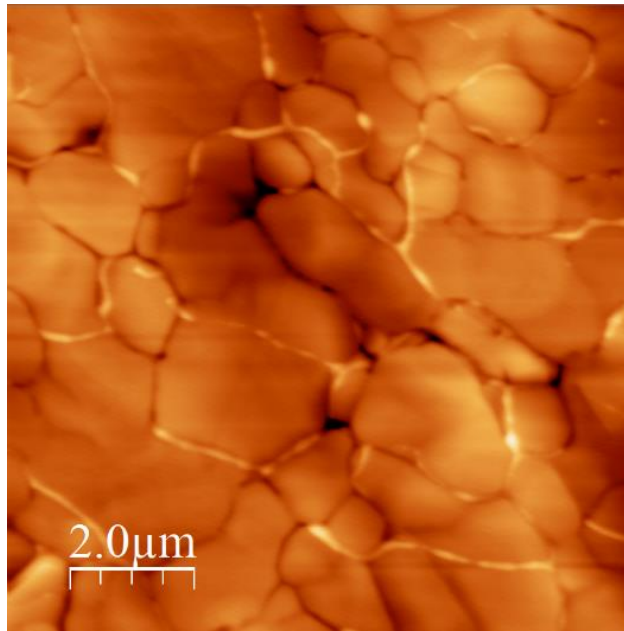
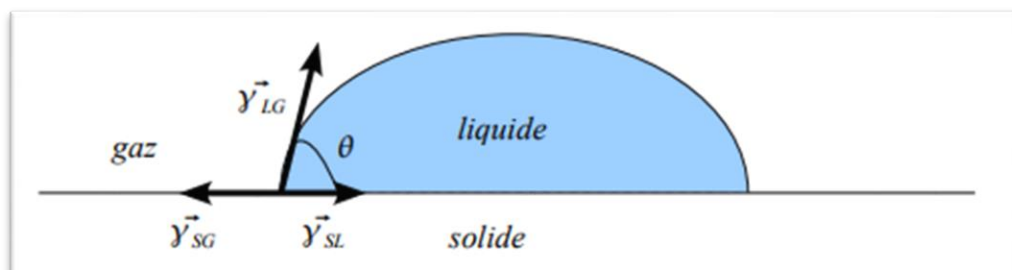


Figure 19 : image AFM d'une surface d'or couverte d'ODT, puis de BSA à partir d'une solution de 0.1 mg/ml.

1.3. Mouillabilité et angle de contact

L'angle de contact est une mesure quantitative rendant compte du mouillage d'un solide par un liquide, la mouillabilité indiquant la facilité avec laquelle ce liquide va s'étaler sur la surface [7]. Si le liquide est l'eau, il s'agit de l'hydrophobicité / hydrophilie de la surface. L'angle de contact est l'angle de la surface avec la tangente à une goutte du liquide au bord de la goutte (**Figure 20**). L'angle de contact est élevé pour une surface hydrophobe (supérieur à 90°), faible pour une surface hydrophile (**Figure 21**).



2

Figure 20 : définition de l'angle de contact θ [8]

- $\Theta > 90^\circ$: surface hydrophobe, la goutte ne s'étale pas sur la surface
- $\Theta < 90^\circ$: surface hydrophile, la goutte s'étale sur la surface

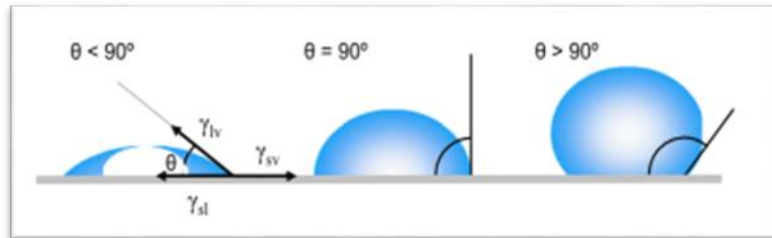


Figure 21 : passage d'une situation hydrophile à hydrophobe [6]

L'angle de contact est déterminé par les énergies libres de surface des phases solide, liquide et vapeur, selon la loi de Young-Dupré [8] :

$$\gamma_{LG} \cos\theta = \gamma_{SG} - \gamma_{SL}$$

dans laquelle :

- γ_{LG} : est l'énergie de surface liquide/gaz
- γ_{SG} : est l'énergie de surface solide/gaz
- γ_{SL} : est l'énergie de surface solide/liquide

La mesure est réalisée à l'aide d'un goniomètre (**Figure 22**). Les gouttes de liquide sont des micro- ou des nano-gouttes calibrées, photographiées à l'aide d'une caméra. La mesure doit être effectuée rapidement, avant l'évaporation, voire la modification éventuelle de la surface par la goutte. La méthode permet d'évaluer l'uniformité du substrat en mesurant l'angle de contact en des points multiples.

Nous avons utilisé un goniomètre macroscopique, déposant des gouttes d'eau désionisée de 5 μL sur la surface de l'échantillon, cette goutte étant imagée à l'aide d'une source de lumière blanche sur une caméra CCD [7]. Les substrats de MUA ont été caractérisés avec un goniomètre DSA 30S Krüss. Six mesures ont été acquises sur chaque échantillon (sur deux échantillons différents chacun) en déposant six gouttelettes de 2,5 μL d'eau milliQ à différents points de la surface.

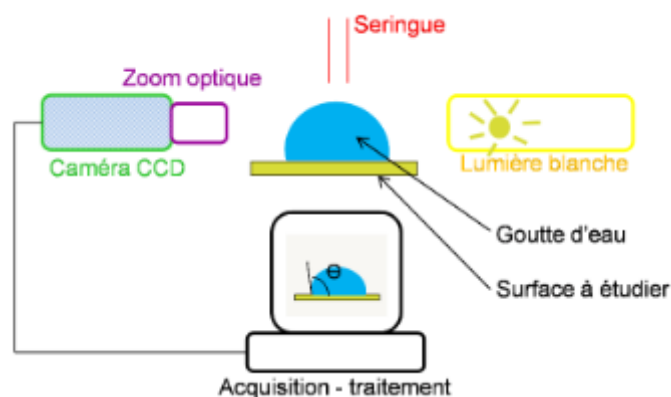


Figure 22 : Schéma de principe de la mesure d'angle de contact [6]

1.4. Spectroscopie infrarouge (FTIR - RAIRS)

En science des surfaces / interfaces, les méthodes optiques sont très attrayantes car elles peuvent être appliquées dans les conditions où la surface n'est accessible que par la lumière. La spectroscopie vibrationnelle est très utile pour sonder les fonctions chimiques des molécules dans leur environnement intra- et extra-moléculaire, à travers les modifications que ce dernier apporte aux modes de vibration (fréquences propres, processus de relaxation). Le spectre infrarouge représente une sorte d'empreinte digitale de l'échantillon, constituée des bandes d'absorption qui correspondent aux fréquences de vibration des fonctions chimiques des molécules présentes dans/sur le matériau : CH et amides dans ce travail. Nous l'avons mise en œuvre à travers deux techniques : la spectroscopie IR par Transformée de Fourier (FTIR) en réflexion (RAIRS : Reflection-absorption IR spectroscopy – or IRAS : IR absorption spectroscopy) et la spectroscopie de somme de fréquences IR + visible (SFG) décrite plus loin.

La spectroscopie FTIR-IRAS permet d'obtenir le spectre IR d'absorption par des échantillons liquides, ou de la surface d'échantillons solides en absorption-réflexion. La mesure du spectre d'un échantillon implique 6 éléments (*Figure 23*) :

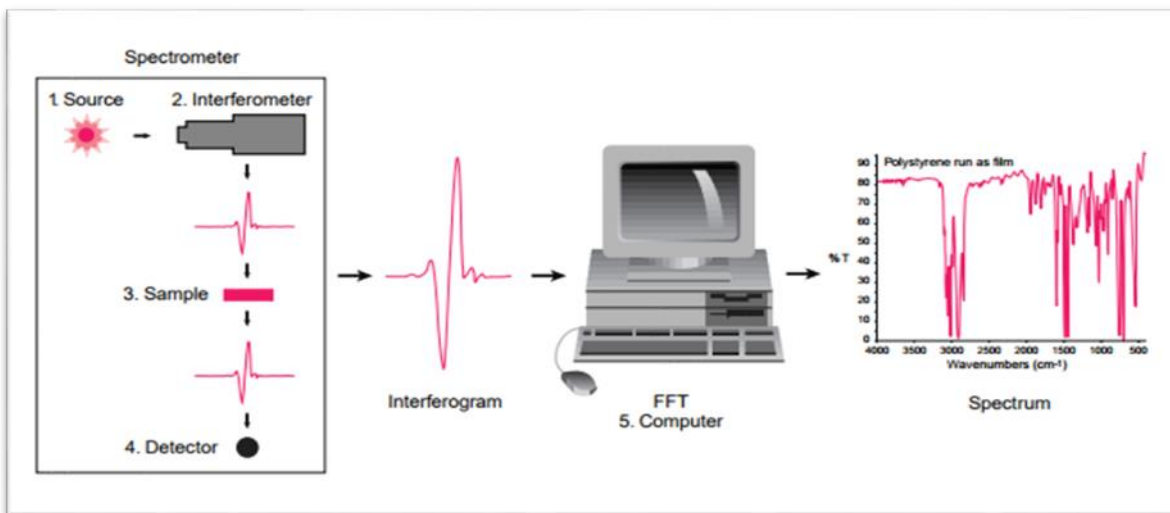


Figure 23 : Description schématique des éléments d'un appareillage de FTIR [9]. En réalité l'échantillon (3) est placé dans un bras de l'interféromètre (2).

1. Source : le rayonnement infrarouge est large et continu, émis par un corps noir. Il passe à travers une ouverture qui contrôle la quantité d'énergie envoyée sur l'échantillon et finalement sur le détecteur. Les fenêtres utilisées pour transmettre le faisceau restreignent en pratique la gamme spectrale à la plage du proche au moyen IR (1-20 μm typiquement).

2. Interféromètre de Michelson : il permet de mesurer un interférogramme en fonction de la longueur variable de l'un de ses bras, ce qui donne par transformée de Fourier tout le spectre infrarouge simultanément.

3. Echantillon : il est placé dans l'un des bras de l'interféromètre. Le faisceau est transmis à travers l'échantillon, ou réfléchi, suivant son type (liquide, solide), afin de sonder les molécules dissoutes ou adsorbées sur la surface.

4. Détecteur : l'intensité du faisceau, modifiée par son passage dans l'interféromètre et sur l'échantillon, est mesurée par un détecteur thermique en fonction du temps. Nous avons utilisé le DTGS (Deuterated TriGlycide Sulfate) et le MCT (tellure de mercury-cadmium), refroidis à l'azote liquide.

5. Ordinateur : le signal mesuré en fonction du temps est numérisé et envoyé à l'ordinateur qui calcule le spectre en fonction de la fréquence par transformation de Fourier. Le spectre infrarouge final est ensuite présenté par le programme « OPUS » spécifique qui permet de le traiter (ligne de base, gestion du bruit, extraction des zones spectrales d'intérêt...).

6. Background : pour obtenir une mesure d'absorbance, un spectre de référence, à soustraire du spectre de l'échantillon, doit également être mesuré. Le background est normalement une mesure sans échantillon dans le faisceau. L'obtention d'un background fiable est un problème en FTIR, car il fluctue fortement avec les conditions expérimentales (température, trajet optique, humidité de l'air et contenu en CO₂...). Une alternative (malheureusement très coûteuse) permet d'augmenter la sensibilité de détection sur les surfaces tout en s'affranchissant de la nécessité de réaliser un background préalable : c'est de moduler la polarisation de la lumière pendant l'acquisition de données : nous n'en disposons pas sur le montage que nous avons utilisé au laboratoire.

Nous avons utilisé un spectromètre FTIR Bruker « vertex 70 » pour caractériser les échantillons d'ODT, ODT+BSA, MUA et MUA 25 (activés ou non), en présence de nisine ou non, pour observer les bandes CH et les bandes amide dans les régions spectrales autour de 2900 et 1600 cm⁻¹, respectivement. Nous avons typiquement enregistré 100 balayages pour une résolution spectrale de 4 cm⁻¹.

Les échantillons de la dyade BODIPY – C₆₀ n'ont pas été caractérisés par nous. Le spectromètre était un Nicolet 5700. Les conditions d'acquisition étaient légèrement différentes des nôtres (résolution de 8 cm⁻¹, co-addition of 128 scans). Surtout, cet appareil était lui équipé d'un modulateur de la polarisation de la source IR synchrone avec la détection, donnant une sensibilité plus élevée, et surtout évitant d'avoir à soustraire un spectre de référence et même de purger le trajet du faisceau IR.

1.5. Spectroscopie vibrationnelle par Génération de Fréquence Somme (SFG) : aspects théoriques

L'apparition et le développement des techniques laser depuis 1960 ont permis un développement considérable de nouvelles techniques spectroscopiques, les lasers permettant d'inventer de nouvelles spectroscopies très sélectives et sensibles, grâce à la cohérence, l'intensité élevée, les processus à plusieurs faisceaux laser, la possibilité d'études pompe-sonde dans le domaine temporel (ultra-rapides), qui nous permettent de mieux caractériser les propriétés fondamentales des matériaux. Dans le domaine des surfaces, les spectroscopies optiques non linéaires d'ordre 2 font intervenir le tenseur de susceptibilité de second ordre $\chi^{(2)}$ qui s'annule dans un milieu centrosymétrique dans l'approximation dipolaire électrique. Elles sont ainsi sensibles exclusivement aux régions non-centrosymétriques, et donc sélectivement aux interfaces sur les substrats centrosymétriques. Ceci permet de s'affranchir totalement de la contribution du volume du matériau, qui pose problème en spectroscopie IR d'absorption (problème surmonté aujourd'hui par la modulation de polarisation, qui n'existait pas à l'époque où la SFG a été démontrée comme nouvelle technique d'analyse). Si la SFG est sensible en tant que technique de sonde d'une surface, son efficacité en termes de conversion de photons des fréquences incidentes vers la fréquence SFG est très faible, puisqu'un seul plan d'atomes ou de molécules contribue. Au contraire, les matériaux non centrosymétriques (par exemple, le béta-borate de baryum (BBO)) permettent de générer en volume avec une très grande efficacité la conversion d'une fréquence à une autre, mais on n'est alors plus dans le cadre d'exploiter la SFG comme technique d'analyse des surfaces.

Les techniques non linéaires ont en général une sensibilité de détection élevée. Par exemple, la limite de détection est l'équivalent de 10^{-5} monocouche sur des nanoparticules épitaxiées [10]. A côté de la Génération de Seconde Harmonique (SHG), plus simple car ne nécessitant qu'un seul

laser incident, la génération de fréquence de somme (SFG) IR + visible est utilisée comme spectroscopie vibrationnelle pour sonder les molécules adsorbées, afin d'étudier la présence des molécules, leur conformation et l'orientation moléculaire des fonctions chimiques sondées, en exploitant le fait que l'émission SFG est fortement anisotrope. La SFG permet également de suivre la dynamique des molécules à l'échelle de la centaine de femtosecondes en utilisant les modes de vibration comme témoins des processus moléculaires en général (en plus de la dynamique vibrationnelle proprement dite) [10] (**Figure 24**). L'ordre dans la couche adsorbée peut également être apprécié grâce à deux propriétés de la SFG : (1) les amplitudes, et non les intensités, s'ajoutent (de ce fait un arrangement isotrope de molécules donne une réponse SFG nulle) ; (2) la réponse SFG est fortement anisotrope (ce qui la rend plus sensible à l'arrangement spatial des molécules que la spectroscopie IR). La SFG a été appliquée avec succès à différents types d'interfaces, dont certaines ne peuvent être sondées par d'autres méthodes : interfaces liquide-gaz, liquide-liquide, solide-solide, liquide-solide (interfaces enfouies), dès lors que les couches intermédiaires sont transparentes aux trois longueurs d'onde utilisées (SFG, visible, IR). Rien n'empêche de mettre la SFG en œuvre à pression élevée si le milieu devant l'interface sondée est transparent. Elle permet donc d'étudier des processus tels que la catalyse hétérogène en conditions « in operando ».

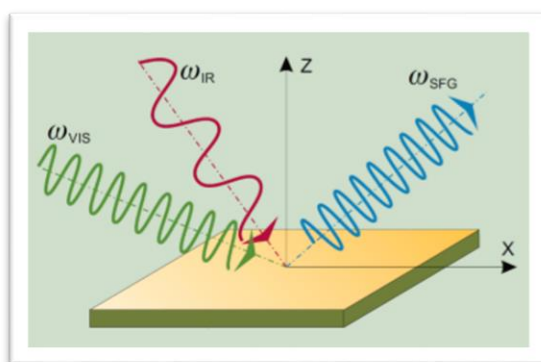


Figure 24 : principe de la spectroscopie de somme de fréquences (SFG)

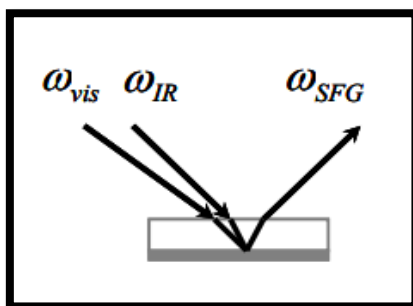


Figure 25 : Schéma de principe de la SFG, ici à travers une lame qui maintient un film liquide ultra-mince sur un échantillon hydrophobe (cas de Au-ODT) [6].

En SFG, deux faisceaux laser, visible et infrarouge, se chevauchent dans le temps et l'espace sur une surface. Le faisceau IR excite la cohérence des transitions vibrationnelles en résonance, tandis que le faisceau visible crée une réponse cohérente Raman anti-Stokes de l'état vibrationnel excité vers l'état fondamental. Des photons sont émis à la fréquence somme $\omega_{SFG} = \omega_{vis} + \omega_{vib}$ des deux photons incidents (**Figures 25, 26**). Le spectre vibrationnel est donc mesuré dans le visible, à l'aide de détecteurs plus sensibles que dans l'IR.

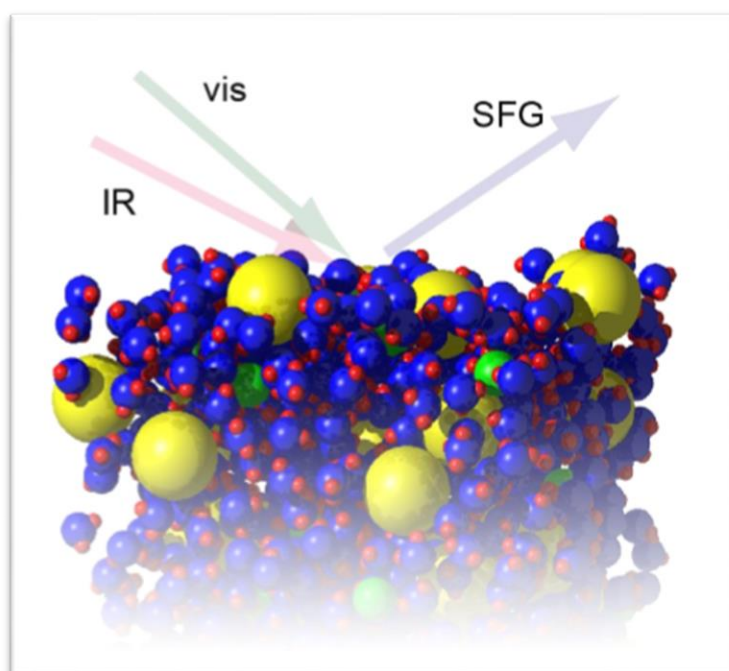


Figure 26 : la SFG détecte les modes de vibration localisés aux interfaces (ici, une solution dont on représente un instantané calculé par dynamique moléculaire) [13].

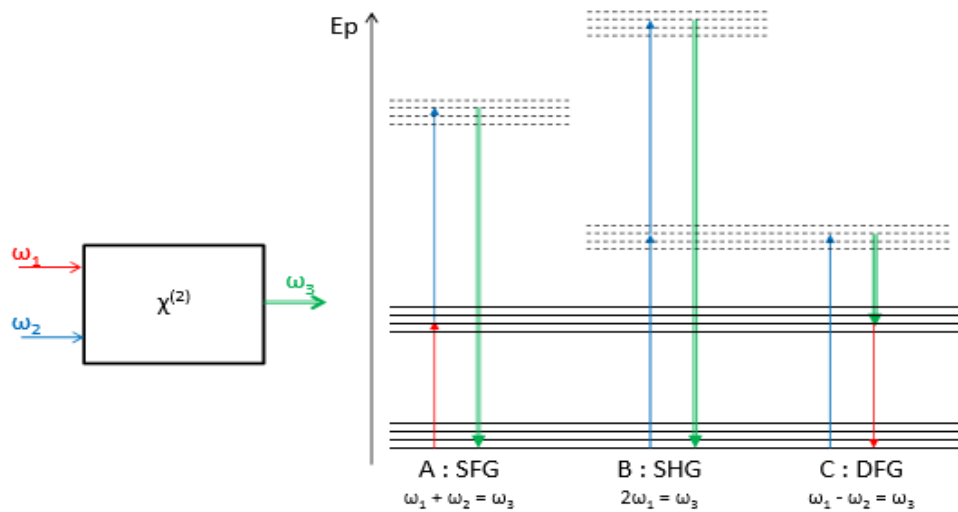


Figure 27 : Phénomènes optiques non-linéaire d'ordre 2 : SFG, SHG, DFG. Les niveaux d'énergie en traits pointillés peuvent être réels ou virtuels [14].

L'intensité du signal SFG est décrite par l'équation suivante [7] :

$$I(\omega) \propto |\chi^{(2)}|^2 I_1(\omega_1) I_2(\omega_2)$$

où I_i et ω_i sont les intensités et fréquences des deux faisceaux lumineux incidents à la surface de l'échantillon, c'est-à-dire *comportant les facteurs de Fresnel* dépendant de la polarisation et des indices complexes des milieux considérés. $|\chi^{(2)}|^2$ représente le produit tensoriel de la susceptibilité de second ordre de la surface par les vecteurs unitaires représentant les directions des champs incidents (**Figure 27**).

La SFG peut être utilisée pour étudier la dynamique des processus à l'aide d'un troisième faisceau :

1. SFG pompe-sonde. Elle permet la mesure de processus dynamiques aux interfaces à l'aide d'un faisceau supplémentaire (pompe) qui est envoyé sur l'échantillon avec un délai variable par rapport à l'impulsion IR pour exciter les molécules ou la surface, suite à quoi les faisceaux visible et infrarouge sondent l'état de la surface perturbée par la pompe. La pompe peut être un faisceau infrarouge (auquel cas nous obtenons des renseignements sur la dynamique de relaxation

vibrationnelle) ou visible (c'est alors le substrat qui est électroniquement excité, permettant d'observer l'effet de l'interaction des photoélectrons avec les molécules adsorbées et de mesurer la dynamique de relaxation) [9].

2. SFG à deux dimensions (2D-SFG) similaire à la spectroscopie infrarouge à deux dimensions. Nous obtenons une cartographie à deux dimensions de l'émission SFG révélant les couplages entre modes de vibration en enregistrant l'intensité SFG en fonction de deux longueurs d'onde IR [8].

Dans les phénomènes optiques linéaires (réflexion, réfraction), la fréquence des photons incidents est conservée. Par contre, les phénomènes non linéaires permettent la génération de nouvelles fréquences (harmonique, somme, différence), l'interaction d'une onde lumineuse avec un matériau crée, via son champ électrique E, une polarisation du milieu, dont la composante linéaire P_L s'écrit :

$$P_L = \epsilon_0 \chi^{(1)} E(\omega)$$

où $\chi^{(1)}$ est la susceptibilité diélectrique linéaire, tenseur d'ordre deux, et ϵ_0 est la permittivité du vide. Si le champ devient intense (cas des lasers impulsionsnels), une polarisation non linéaire P_{NL} apparaît, qui peut être décomposée en puissances du champ E (**Figure 28**) :

$$P = \epsilon_0 (\chi^{(1)} E(\omega) + \chi^{(2)} E(\omega) E(\omega) + \dots) = P_L + P_{NL}$$

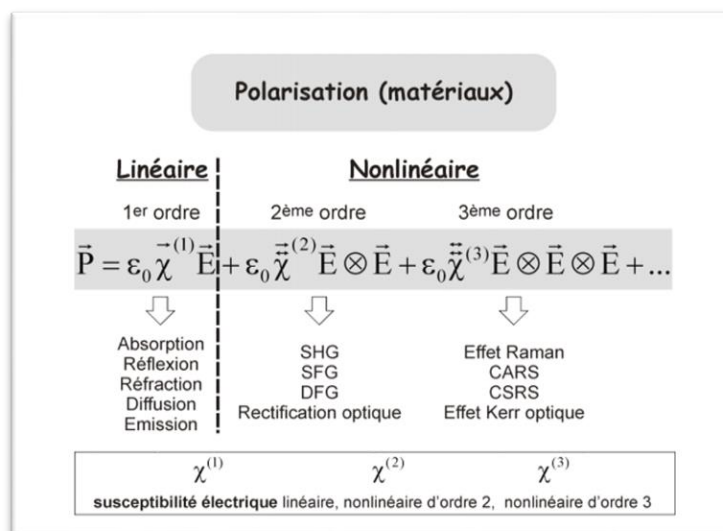


Figure 28 : Processus optiques suivant l'ordre de la polarisation P [18]

$\chi^{(n)}$: est la susceptibilité électrique d'ordre n. Dans cette relation le produit $\chi^{(n)} E^n$ est tensoriel, $\chi^{(n)}$ étant un tenseur de rang (n+1). Dans le cas du deuxième ordre, $\chi^{(2)}$ est composé de 27 éléments correspondant aux 3 composantes P_i x les 9 produits $E_j E_k$ (où i, j et k se réfèrent aux directions de l'espace x, y, z). **La Figure 29** suggère un mode de représentation des éléments du tenseur sur les faces d'un Rubik's cube.

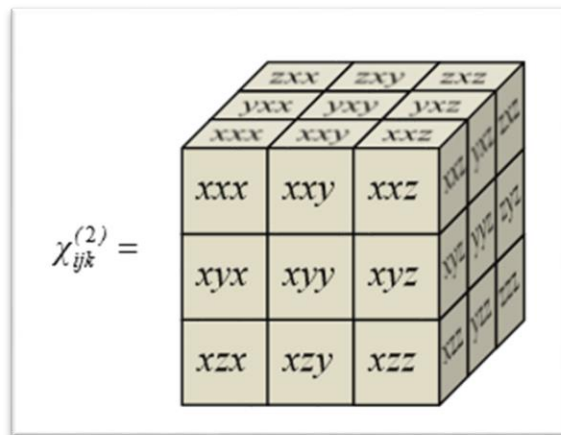


Figure 29 : représentation sur un Rubik's cube des 27 composantes d'un tenseur d'ordre trois comme $\chi^{(2)}$.

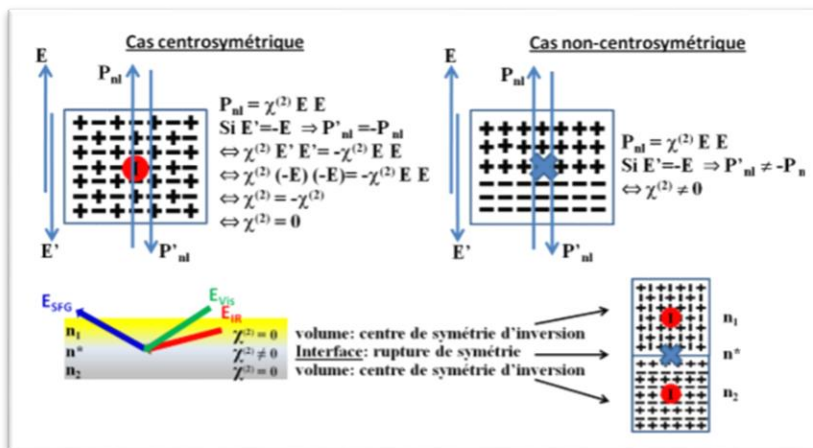


Figure 30 : illustration montrant les conséquences de la symétrie d'inversion pour la polarisation non linéaire de second ordre [18]

Le terme du deuxième ordre qui nous intéresse est donc :

$$P_{NL}^{(2)} = \varepsilon_0 \chi^{(2)} E(\omega) E(\omega)$$

L'annulation de $\chi^{(2)}$ dans un milieu centro-symétrique est démontrée dans la **Figure 30**. Le signal résultant (intensité de lumière) est proportionnel au module carré de la polarisation :

$$I(\omega) \propto |P(2\omega)|^2 = |P_{NL}^{(2)}(2\omega)|^2$$

Dans le cas où deux champs de fréquences différentes sont présents (cas de la SFG), la polarisation s'écrit :

$$P_{NL}^{(2)} = \chi^{(2)} E_1(\omega_1) E_2(\omega_2)$$

On souhaite sonder les molécules adsorbées via leurs fréquences de vibration interne. Il faut donc accorder la fréquence du faisceau infrarouge sur le(s) mode(s) que l'on souhaite sonder : lorsque l'infrarouge est en résonance avec une transition vibrationnelle, il apparaîtra une réponse SFG qui portera une information concernant le(s) mode(s) de vibration concerné(s).

En dehors de la réponse résonnante des molécules adsorbées, une contribution dite non-résonnante, correspondant à des états électroniques de la surface, peut également exister. Elle est plus ou moins importante selon la nature de substrat, la longueur d'onde du laser visible, et peut varier selon la couverture en adsorbats si les états concernés sont hybridés avec les orbitales des adsorbats. Elle peut être quasi nulle (par exemple Pt(111) quand le visible est à 800 nm), ou plus grande que l'intensité vibrationnelle (Au(111)). Comme les bandes électroniques sont très larges par rapport à la largeur du faisceau IR (150 cm^{-1}), la contribution électronique est constante dans le domaine spectral considéré et est donc dite abusivement « non-résonnante ».

La susceptibilité du second ordre s'écrit donc comme suit :

$$\chi^{(2)} = \chi_{NR}^{(2)} + \chi_R^{(2)}$$

$\chi_{NR}^{(2)}$ et $\chi_R^{(2)}$ étant les susceptibilités non-résonnante (d'origine électronique) et résonnante (d'origine vibrationnelle).

L'interférence des deux contributions nécessite une déconvolution des spectres. Ces contributions sont exprimées classiquement sous la forme d'un terme constant et d'une somme de lorentziennes (6) :

$$\chi^{(2)} = \chi_{NR}^{(2)} + \chi_R^{(2)} = A_{NR} e^{-i\varphi_{nr}} + \sum_n \frac{A_n}{\omega_n - \omega - i\Gamma_n}$$

- A_{NR} : amplitude de la susceptibilité non résonante, qui peut dépendre de la densité de molécules adsorbées lorsque l'adsorption modifie la structure de bandes de la surface à l'une des longueurs d'onde intervenant dans le processus SFG
- φ_{nr} : déphasage entre les parties résonante et non résonante (la susceptibilité étant une grandeur complexe)
- A_n : amplitude du mode de vibration n, égale à $N \times \beta_n$, où N est la densité de molécules et β_n la susceptibilité moléculaire
- ω_n : fréquence de résonance
- Γ_n : largeur de la résonance

Un spectre SFG peut être obtenu à l'aide d'impulsions IR de largeur spectrale adaptée, dont on balaie la fréquence. Dans le cas de la spectroscopie de molécules adsorbées sur les métaux et semiconducteurs, la largeur des bandes de vibration est typiquement de 10 cm^{-1} (de quelques cm^{-1} à $\approx 30 \text{ cm}^{-1}$) suivant les molécules et substrats, la température, la couverture et l'ordre de la couche adsorbée). Il faut donc des impulsions ayant une largeur de quelques cm^{-1} , c'est à dire des impulsions picoseconde, chaque point du spectre étant proportionnel à $\chi^{(2)}(\omega)$. Une autre possibilité est d'utiliser une impulsion IR femtoseconde combinée à une impulsion visible picoseconde (« BB SFG » pour Broad Band SFG). Dans ce cas on obtient un spectre par dispersion de l'impulsion SFG dans un spectrographe, dont la résolution est limitée par la largeur de l'impulsion visible, car c'est l'étape Raman du processus cohérent de SFG qui détermine la résolution. L'intensité de BB SFG s'écrit :

$$I_{SFG}(\omega) \propto g(\omega) | A_{NR} e^{-i\phi_{nr}} + \sum_n \frac{A_n}{\omega_n - \omega - i\Gamma_n} |^2$$

où $g(\omega)$ est le profil spectral du laser IR, et où la nature tensorielle et anisotrope de la SFG, ainsi que les facteurs de Fresnel, sont contenus dans A_n . Suivant les polarisations choisies pour les lasers et la détection, A_{NR} et surtout les A_n sont susceptibles de varier fortement, parce qu'elles modifient les contributions relatives des différents éléments du tenseur. Il faut noter que cette formule de l'intensité de BB SFG ne serait exacte que si l'impulsion IR était de largeur temporelle nulle, et l'impulsion visible infiniment longue. La formule exacte fait intervenir la convolution des lorentziennes avec l'impulsion IR (et non le produit simple). D'autre part, le fait que l'impulsion visible ait une durée finie implique que le profil temporel de SFG (pour chaque bande, un déclin exponentiel de temps T_2 , caractéristique de la molécule adsorbée, correspondant à la décohérence de l'excitation vibrationnelle) est légèrement déformé, ce qui a une incidence quantitativement mesurable dans le cas où plusieurs bandes de vibration interfèrent. La quasi-totalité des études de BB SFG est basée sur l'analyse spectrale donnée par la formule approchée.

➤ Trois cas peuvent se présenter :

A. Le cas où il y a uniquement une réponse résonnante (**Figure 31(a)**). Ici, seules les fréquences IR en résonance avec des transitions vibrationnelles produisent de la SFG. C'est le cas de CO sur Pt(111).

B. le cas où il n'y a qu'une réponse non-résonnante du substrat (**Figure 31 (b)**). Toutes les composantes spectrales de l'infrarouge vont induire la même réponse SFG, modulée par la densité spectrale du laser : le spectre SFG représente alors directement le spectre du laser infrarouge, auquel on a ainsi accès directement. C'est ainsi qu'un échantillon de GaAs, qui est non-centrosymétrique et donne donc une réponse intense de volume en réflexion, fournit facilement une mesure du spectre du laser IR.

C. le cas où l'on a à la fois une réponse non-résonnante et une ou plusieurs réponses résonnantes provenant de transitions vibrationnelles des molécules adsorbées (**Figure 31(c)**). En plus du signal non-résonnant il apparaît un signal aux fréquences IR des transitions vibrationnelles

des molécules. Toutes les contributions interfèrent entre elles. Les bandes de vibration apparaissent en général en négatif dans le spectre non-résonant. C'est le cas par exemple de la SAM d'ODT sur Au(111).

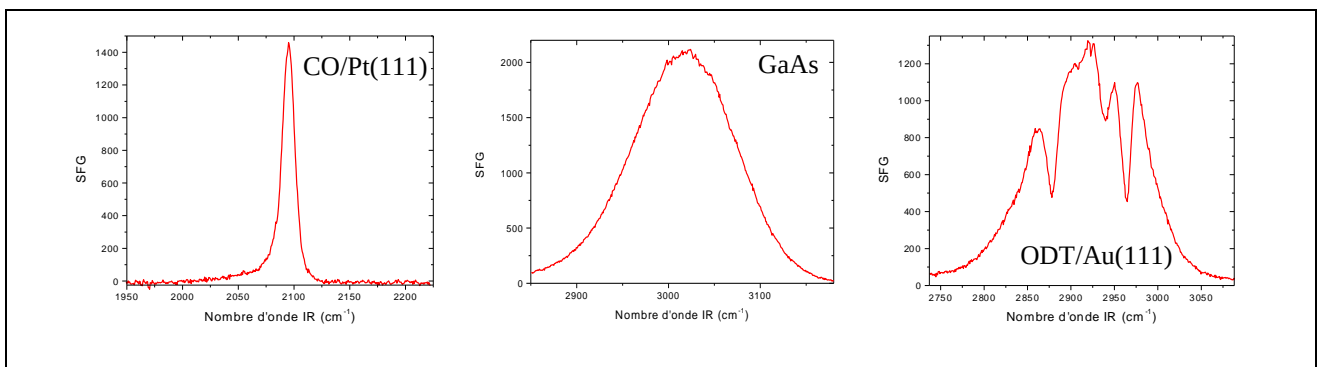
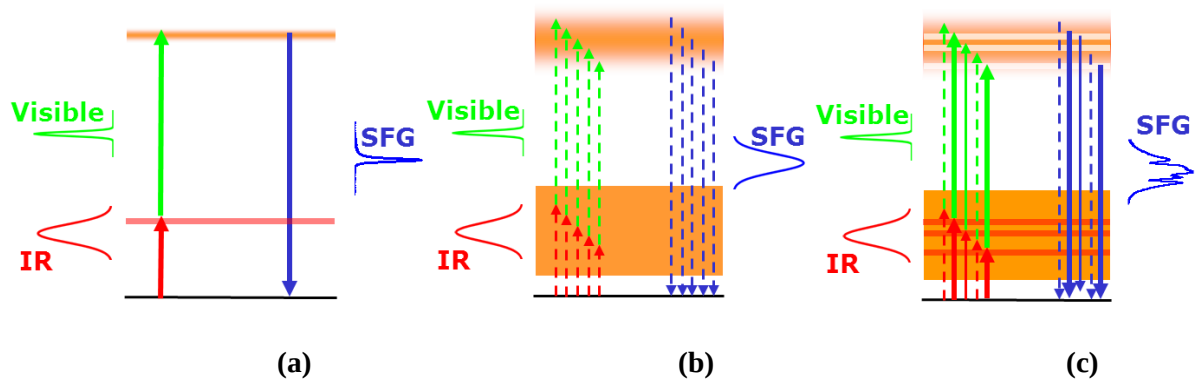


Figure 31 : 3 cas possibles de SFG avec des impulsions femtoseconde (d'après [14]). Les pointillés désignent les transitions non résonantes.

En pratique, nous utilisons des impulsions IR d'une durée de l'ordre d'une centaine de femtosecondes ($\approx 150 \text{ cm}^{-1}$ de largeur spectrale à mi-hauteur) et des impulsions visibles à 800 nm dont la durée est de l'ordre de quelques picosecondes (ajustable), afin d'acquérir ce type de spectre. L'avantage d'un faisceau infrarouge femtoseconde réside dans le fait qu'il est en pratique possible de recouvrir plusieurs transitions vibrationnelles et acquérir des spectres sans avoir à balayer la longueur d'onde, ce qui élimine une source de bruit spectral. De plus, une telle durée d'impulsion donne accès à la dynamique sur les surfaces à une échelle de temps plus courte ($\approx 100 \text{ fs}$) que la relaxation électron-phonon ($> \approx 1 \text{ ps}$ sur les substrats métalliques).

Quatre types d'expérience SFG peuvent être réalisées avec notre montage SFG actuel [16] :

1. **SFG « normale »** : visible d'une durée de 2 à 4 picosecondes – IR d'une durée de 140 femtosecondes (**Figure (32)**).

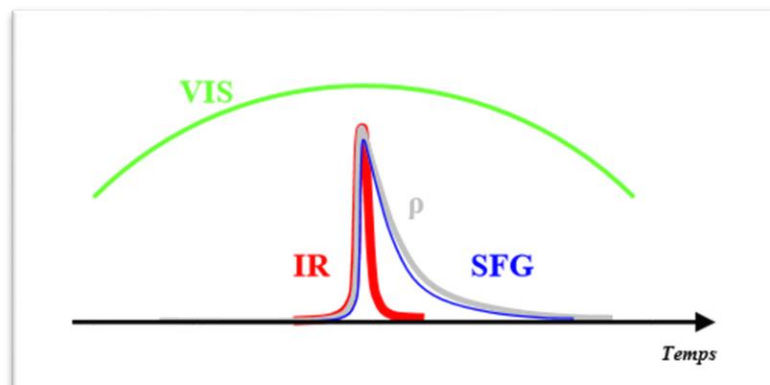


Figure 32 : BB SFG fs (IR) – ps (visible) représentée dans le domaine temporel. L'impulsion IR induit une polarisation ρ qui décline avec le temps de relaxation T_2 caractéristique de l'adsorbat. L'impulsion visible, qu'on superpose temporellement à la polarisation pour générer la SFG, est beaucoup plus longue : pour obtenir un spectre rendant compte fidèlement des propriétés de la vibration moléculaire, il faut que le profil temporel de la SFG ne soit pas déformé par rapport à la polarisation [16].

Le processus SFG montré à la **Figure 32** permet d'obtenir un spectre ayant la résolution spectrale voulue. Si l'impulsion visible est trop courte, le processus de SFG n'échantillonne qu'une partie de la polarisation ρ , ce qui se traduit dans le spectre par une perte de résolution, et dans le cas de plusieurs bandes de vibration, par des intensités relatives fausses. Dans notre montage de SFG, le faisceau visible traverse un « pulse shaper » qui permet d'ajuster ses largeurs spectrale / temporelle.

2. **SFG « fs-fs »**, où les 2 impulsions ont une durée de ≈ 140 fs (**Figure 33**) :

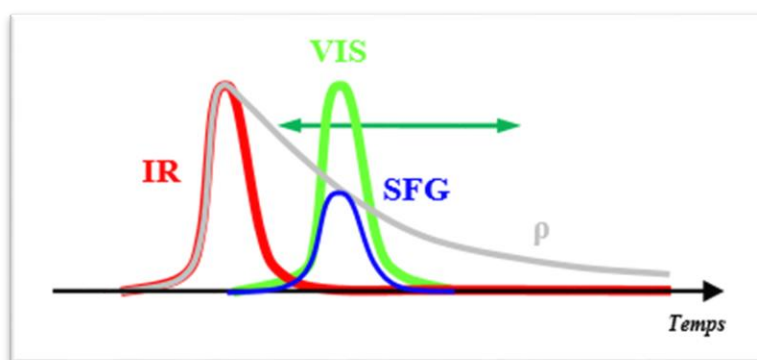


Figure 33 : schéma temporel de SFG pour mesurer le temps de relaxation T_2 d'une bande vibrationnelle. Le retard VIS-IR est balayé pour que le processus SFG échantillonne la polarisation ρ . L'intensité intégrée du spectre SFG est mesurée en fonction du retard [16].

3. **Pompe-Sonde**, où la pompe est un faisceau visible de 140 fs et la sonde est la SFG visible (ps) – IR (fs) (*Figure 34*) :

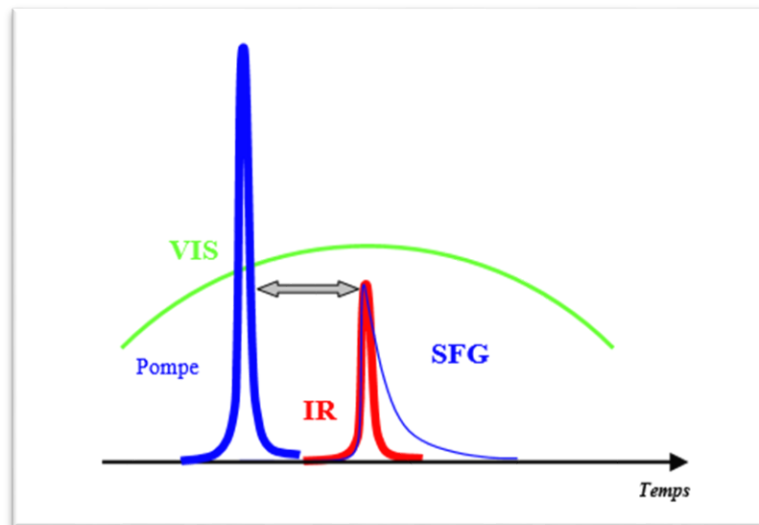


Figure 34 : Expérience pompe avec sonde SFG, afin de mesurer la dynamique induite à la surface par l'impulsion de pompe. Le spectre SFG est enregistré en fonction du délai entre pompe et sonde [16].

La pompe produit une excitation intense d'électrons dans le substrat. La sonde permet de mesurer l'évolution du spectre SFG en fonction du retard entre les deux impulsions fs (pompe et sonde IR). C'est pourquoi on peut mesurer l'évolution de la surface et la dynamique moléculaire induite avec une résolution de l'ordre de 100 fs [11]. Expérimentalement, la superposition spatiale et temporelle est obtenue par optimisation de la SFG fs-fs. Une seconde ligne à retard est utilisée pour ajuster le retard entre la pompe et la sonde IR. Le retard IR / visible ps reste constant.

4. **IR fs + visible mis en forme avec un étalon de Fabry-Perrot** (*Figure 35*) :

L'impulsion visible obtenue par passage dans un étalon de Fabry Perrot a une forme temporelle asymétrique, dont le temps de montée est celui de l'impulsion incidente, et dont le temps de descente est déterminé par le temps de trajet des interférences multiples dans le Fabry-Perrot..On peut alors échantillonner la polarisation ρ (P_{IR} sur la figure) en balayant le retard IR-visible. C'est intéressant pour éliminer du spectre la contribution non résonante (réponse électronique qui relaxe

très rapidement), et, dans le cas de plusieurs bandes, pour mesurer avec exactitude leurs caractéristiques (T_2 , intensité relative). En effet, l'impulsion SFG a un déclin plus rapide que la polarisation vibrationnelle car l'impulsion visible est courte (≈ 500 fs). Le spectre dépend alors du retard. C'est la déconvolution des spectres en fonction du retard visible – IR par une simulation spectro-temporelle exacte qui permet de remonter aux intensités et largeurs exactes.

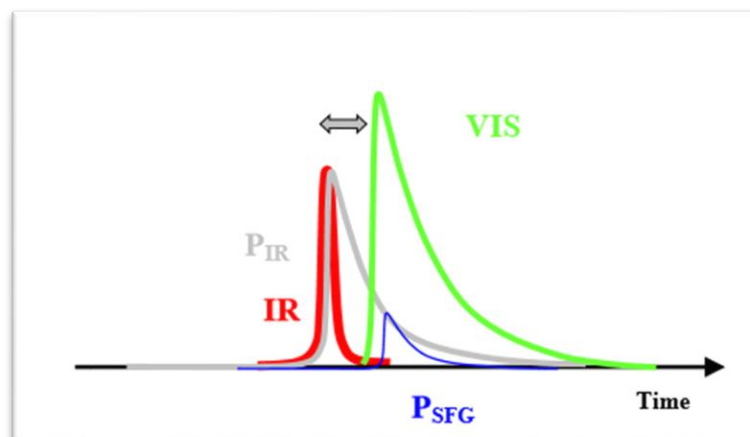


Figure 35 : spectroscopie SFG lorsque l'impulsion visible est façonnée par transmission à travers un étalon de Fabry Perrot [16].

1.6 Spectroscopie vibrationnelle par Génération de Fréquence Somme (SFG) : aspects expérimentaux

En 1987, le premier spectre SFG issu de molécules adsorbées (méthanol et acide pentadécanoïque sur une surface de verre) a été obtenu par Shen *et al* avec des [17]. Deux lasers nanoseconde. Peu après, la technique a été appliquée à des molécules de coumarine sur la silice fondue [18]. L'intensité était amplifiée par la résonance du faisceau laser visible avec un état électronique des molécules. Puis la technique SFG a été appliquée à l'étude de l'orientation moléculaire de molécules adsorbées avec des lasers picoseconde [19]. Par la suite, l'étude de la dynamique vibrationnelle, notamment de Si-H sur des surfaces de silicium, a été étudiée à l'aide de lasers picoseconde [20]. La « Broadband SFG » (BBSFG), réalisée avec une impulsion IR femtoseconde (donc

spectralement large), a été introduite en 1998 [21], permettant d'éviter le balayage de la fréquence du laser IR dans la région spectrale couverte par l'impulsion IR. Les effets spectro-temporels doivent être pris en compte pour obtenir les intensités relatives exactes des bandes de vibration [22-24]. La BBSFG a permis de sonder la dynamique des molécules adsorbées à l'échelle de 100 fs [11-12].

Le type de laser utilisé dans mes expériences est une chaîne laser femtoseconde qui comprend un amplificateur paramétrique optique (OPA) permettant d'obtenir des impulsions accordables dans le domaine infrarouge (3-8 μm). Ce dispositif expérimental est placé dans une salle « grise » (comportant un sas d'entrée, le port obligatoire de sur-chaussures, le nettoyage périodique de la salle, un flux laminaire au-dessus de la chaîne laser, une climatisation précise ($T = 23 \pm 1$ °C)). La chaîne laser femtoseconde est un dispositif optique permettant de générer et d'amplifier un train d'impulsions laser à 800 nm d'une durée de 120 fs et cadencé à 1 kHz. Comme le montre la **Figure 36**, il est composé de quatre étages :

- Oscillateur optique « Mira »
- Amplificateur régénératif (« REGEN ») (comprenant un étireur Multipassages)
- Compresseur multipassages
- OPA IR

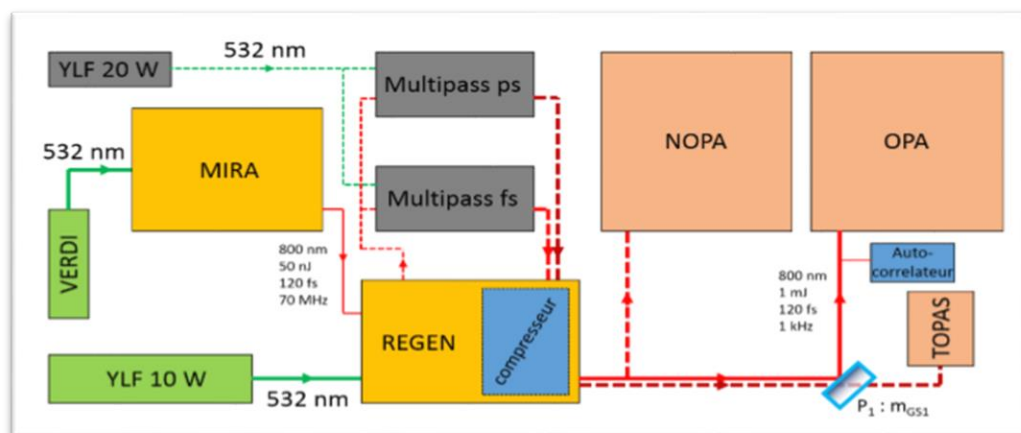


Figure 36 : schéma de la chaîne laser femtoseconde

L'oscillateur Mira utilisant un cristal de Ti-Saphir comme milieu amplificateur, pompé à 532 nm par un laser continu Nd :YVO₄ réglé à ≈ 4.5 W ((ortho vanadate d'yttrium, Coherent Verdi), permet de délivrer des impulsions de 80 fs à 800 nm, à une cadence de 78 MHz, avec un spectre de 15 nm de largeur et une puissance de 550 mW en continu. L'énergie par impulsion étant trop faible pour pomper l'OPA qui produit l'infrarouge, il faut amplifier les impulsions de l'oscillateur Ti-Saphir afin de pomper l'OPA. On utilise un amplificateur régénératif (REGEN) constitué d'un étireur, d'un amplificateur et d'un compresseur (*Figure 37*).



Figure 37 : schéma de principe de l'amplification par amplificateur régénératif des impulsions issues du laser Mira.

Les impulsions issues du Mira sont d'abord étirées à une durée de plusieurs ns par passages multiples sur un réseau de diffraction au sein de l'étireur, afin d'éviter d'endommager le cristal amplificateur (Ti :Saphir) du REGEN pendant l'amplification, la puissance crête atteinte par les impulsions amplifiées non étirées étant supérieures au seuil de dommage du cristal titane-saphir. On obtient des impulsions environ 6000 fois plus longues que les impulsions initiales. Les impulsions sont amplifiées à une cadence de 1 kHz dans une cavité amplificatrice comprenant un second cristal Ti:Saphir pompé par un laser YLF 10 W émettant à 532 nm. Ensuite, les impulsions amplifiées sont éjectées de la cavité puis recomprimées à 120 fs dans un compresseur à réseau. Nous disposons alors d'un train d'impulsions cadencé à 1kHz, à 800 nm, de durée 120 fs, d'une puissance moyenne de 800 mW (soit 0.8 mJ/ pulse). Ce dispositif nous permet donc d'obtenir des impulsions de durée un peu plus longue que celles de Mira mais avec une énergie 100 000 fois plus importante. Cette énergie est suffisante pour pomper nos amplificateurs paramétriques

optiques (OPA), visible ou IR. Pour certaines applications, il nous est possible de dédoubler l'impulsion visible, l'une restant femtoseconde et la seconde étant façonnée pour devenir picoseconde, et de les réamplifier.

Le principe de l'amplificateur paramétrique optique (OPA) consiste à convertir les photons du laser à 800 nm en deux photons dans l'infrarouge proche, puis par différence de fréquences, à générer des photons accordables entre 3400 cm^{-1} ($3 \mu\text{m}$) et 1250 cm^{-1} ($8 \mu\text{m}$) par effet paramétrique. Deux cristaux non linéaires sont utilisés :

- Un cristal biréfringent de beta borate de baryum (BBO), qui permet de convertir par effet paramétrique des photons de fréquence ω_1 (appelé « pompe ») en 2 photons de fréquences ω_2 et ω_3 dans le proche IR, appelées « signal » et « idler » (**Figure 38**). Les 3 fréquences sont reliées par la relation $\omega_1 = \omega_2 + \omega_3$ (qui traduit la conservation de l'énergie) et par une relation de phase qui dépend des indices du matériau bi-réfringent. Le couple de fréquences ω_2, ω_3 qui satisfait à ces relations dépend de la configuration géométrique du faisceau par rapport aux axes cristallographiques du matériau : en pratique le cristal doit être taillé en fonction de la longueur d'onde ω_1 , et sa rotation permet de sélectionner les fréquences (ω_2, ω_3). Il est nécessaire que deux longueurs d'onde soient présentes à l'entrée du cristal pour que le processus paramétrique s'enclenche. L'effet paramétrique est distinct du pompage optique : le cristal ne joue pas le rôle de milieu amplificateur, il n'est pas excité par la pompe, et ne subit donc pas d'échauffement dans ce processus. Les photons ω_1 sont convertis en un couple de photons (ω_2, ω_3).

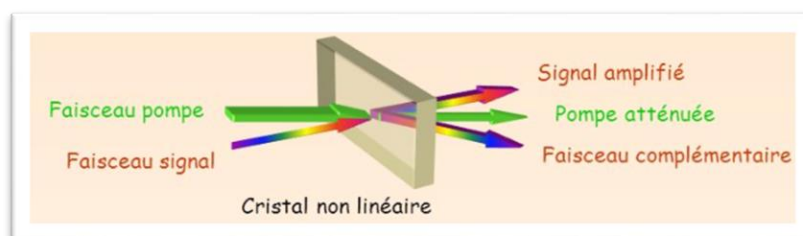


Figure 38 : Principe de L'OPA

- Un cristal de thiogallate d'argent (AgGaS_2) : par le même processus paramétrique optique du 2^{ème} ordre (la différence de fréquences), le cristal permet de générer des fréquences IR ($\omega_2 - \omega_3$) encore plus petites que ω_2 et ω_3 . Dans le cristal d' AgGaS_2 , le signal issu du BBO joue le rôle de pompe, l'idler issu du BBO joue le rôle de signal, le nouveau faisceau généré étant l'idler pour le processus de AgGaS_2 . Comme dans le cas du BBO, il faut régler un angle du cristal d' AgGaS_2 (**Tableau 2**) pour obtenir l'accord de phase à la longueur d'onde désirée.

Angle du cristal de BBO (°)	Angle de l' AgGaS_2 (°)	Gamme spectrale du faisceau infrarouge (cm^{-1})
38	163	2750 - 3100
39	130	2000 - 2300
39	126	1800 - 2000
37,5	118	1600 - 1800

Tableau 2 : valeurs des angles des 2 cristaux correspondant à la gamme spectrale du faisceau IR

En entrée de l'OPA (**Figure 39**), une faible proportion (2-3 %) du faisceau à 800 nm est prélevée pour générer un continuum qui servira à démarrer le processus d'amplification paramétrique. Le reste du faisceau à 800 nm (faisceau rouge) est divisé en deux (pompe 1, pompe 2) pour réaliser l'amplification paramétrique en deux passages successifs dans le cristal BBO (**Figure 40**). L'alignement consiste à superposer spatialement et temporellement dans une configuration colinéaire le faisceau pompe 1 et le continuum dans le BBO (premier passage), puis l'idler généré au premier passage qui est réinjecté dans le cristal avec la pompe 2. La superposition temporelle est assurée par 2 lignes à retard motorisées, l'une sur le chemin du continuum et l'autre sur celui de la pompe 2. Les moteurs sont pilotables sans ouvrir le boîtier de l'OPA grâce à un boîtier de contrôle réalisé au laboratoire, placé au-dessus de l'OPA. Pour corriger l'alignement des 2 pompes dans le cristal BBO, une paire de miroirs a été motorisée pour chaque pompe.

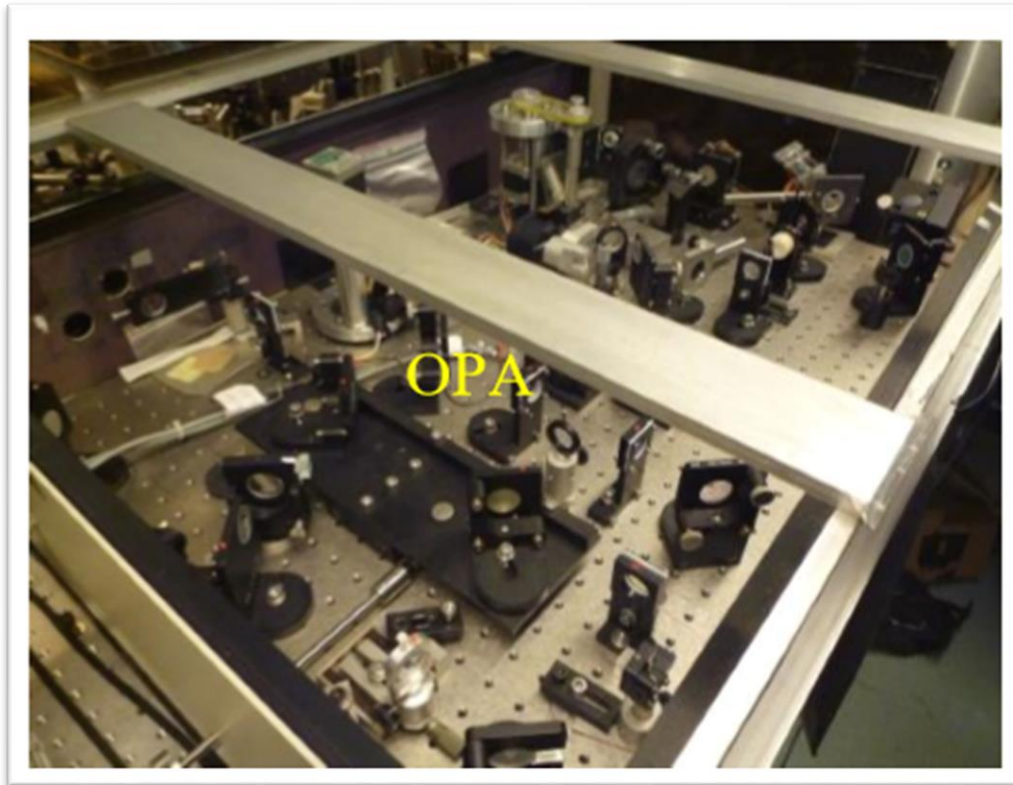


Figure 39 : Photo de l'OPA

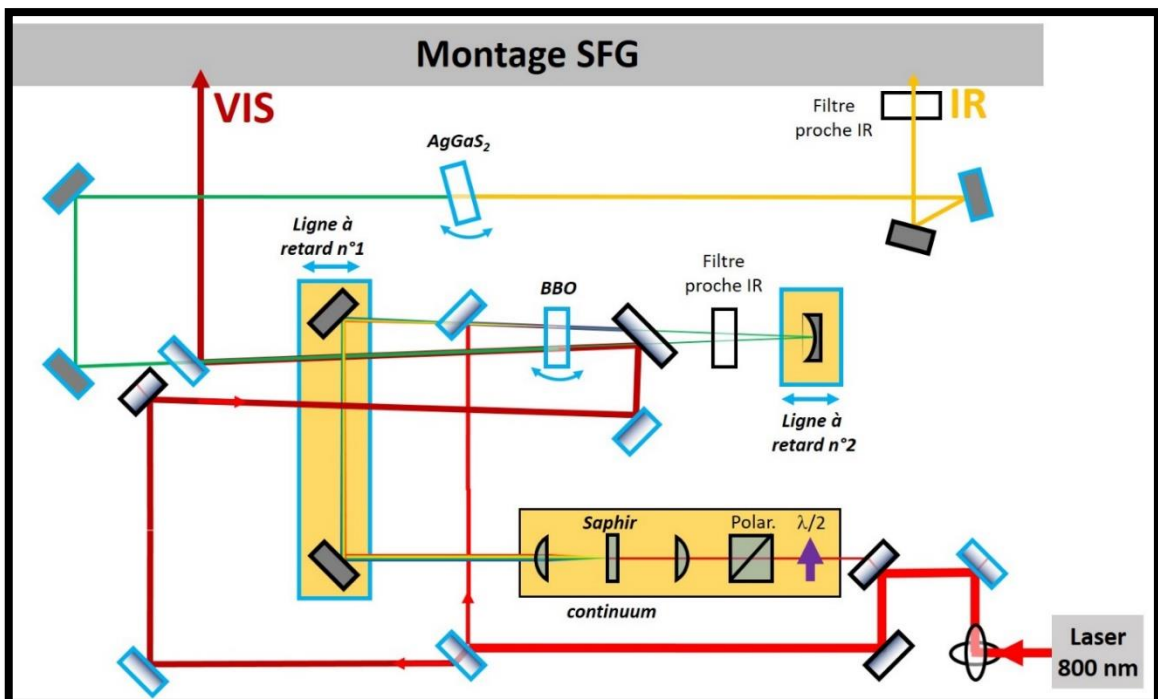


Figure 40 : schéma de principe de l'OPA.

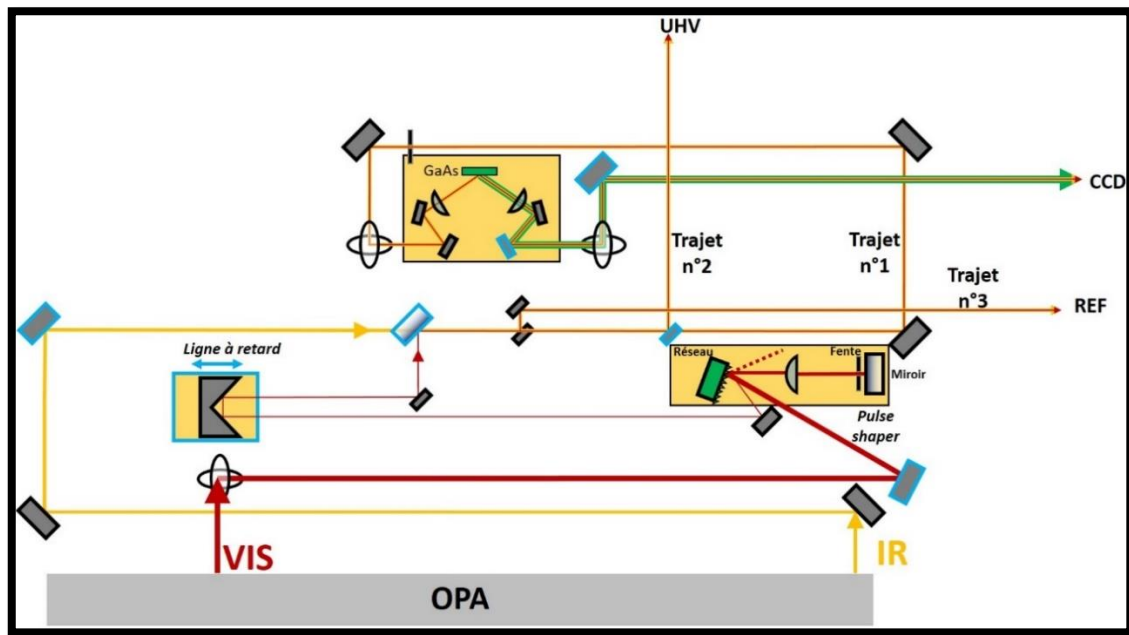


Figure 41 : schéma du montage de SFG. « UHV » désigne le trajet des faisceaux dans le cas où l'échantillon étudié est sous ultra-vide. En rouge le trajet optique du faisceau VIS, en jaune celui de l'IR et en vert celui de SFG. Les optiques entourées en bleu sont manipulées couramment et motorisées. « GaAs » indique la position de l'échantillon [25]

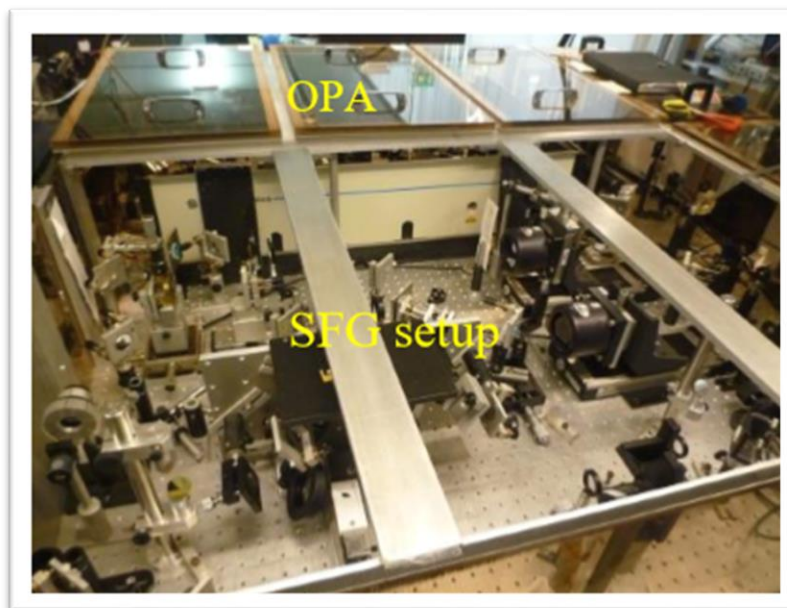


Figure 42 : photo de la partie SFG

Comme il a été dit précédemment, la SFG nécessite aussi un faisceau visible picoseconde : c'est la pompe 2 de l'OPA qui est mise en forme spectro-temporellement dans un pulse shaper

après son passage dans le BBO. Les 2 faisceaux IR et visible doivent être temporellement et spatialement superposés sur l'échantillon. Les *Figures 41 et 42* présentent l'ensemble du montage SFG permettant l'étude d'échantillons à l'air et en présence d'un film d'eau.

1. **Aligner le VIS jusqu'à l'échantillon :** il faut d'abord s'assurer que le VIS traverse correctement le pulse shaper (*Figure 43*). Pour cela, utiliser le miroir VIS0 dans l'OPA pour obtenir le VIS au centre de l'iris dVIS1. Normalement, le faisceau devrait aussi être centré sur Dvis2. Avant le pulse shaper, se trouvent une lame $\lambda/2$ et un polariseur. Ils servent à atténuer le VIS lors des expériences de SFG fs-fs, et/ou à tourner sa polarisation de 90° . Ensuite vérifier sur Dsfg1 que le VIS traverse bien la ligne à retard et le pulse shaper (*figure 44*). Le VIS doit être centré sur Dsfg. Si c'est le cas, utiliser le miroir VIS2 pour aligner le faisceau sur le centre de Dsfg2. Normalement, le VIS doit traverser la lentille de focalisation avant l'échantillon en son centre et bien dans l'axe de la lentille. Vérifier que le VIS est au centre de l'échantillon. Si ce n'est pas le cas, changer sa hauteur et sa position latérale avec les moteurs qui contrôlent la position de l'échantillon.

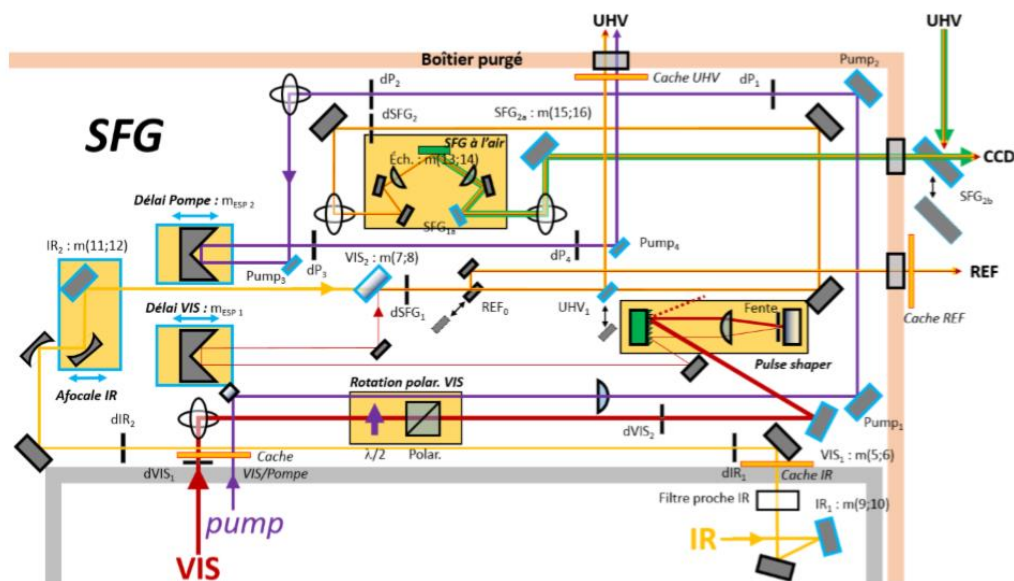


Figure 43 : montage de SFG, incluant le faisceau de pompe pour les expériences pompe-sonde (non utilisé dans ce travail). Il s'agit du faisceau « pompe 1 » résiduel après son passage dans le BBO [25].

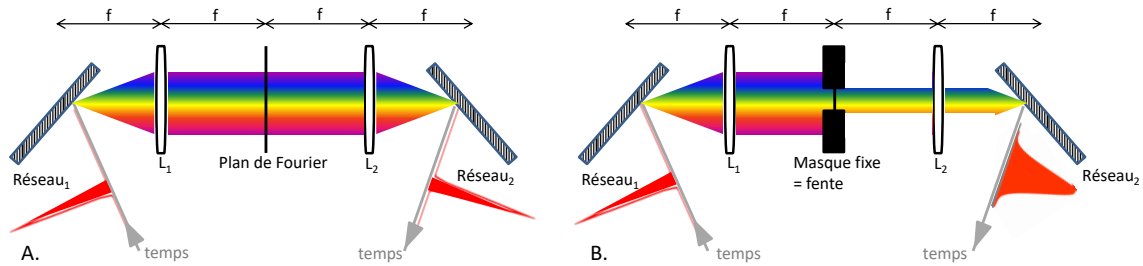


Figure 44 : Principe du montage 4f du pulse shaper. Le spectre est angulairement dispersé et focalisé sur une ligne dans le plan focal de la première lentille (dit aussi plan de Fourier), où on en sélectionne une partie à l'aide d'une fente. Le spectre est recollimaté en suivant un trajet symétrique dans une seconde lentille et un second réseau. Nous utilisons un « demi » pulse-shaper (trajet optique replié sur lui-même par l'ajout d'un miroir plan derrière la fente, ce qui permet de limiter l'encombrement et de diviser par deux le nombre d'éléments optiques, au prix d'un léger dérèglement, l'entrée et le retour étant légèrement décalés en hauteur l'un par rapport à l'autre). A : sans filtrage spectral, B : avec filtrage spectral (d'après [6]).

2. **Aligner l'IR jusqu'à l'échantillon :** il faut d'abord s'assurer que l'IR traverse correctement les 2 diaphragmes (iris) Dir1 et dir2. Pour cela, utiliser les miroirs ir1 dans l'OPA et celui juste en sortie de l'OPA. Le parfait alignement de l'IR sur ces 2 iris doit permettre un bon alignement sur dsfg1. Si ce n'est pas le cas, utiliser le miroir amovible pour positionner l'IR sur dsfg1. Ensuite, utiliser IR2 pour aligner l'IR sur Dsfg2.

3. **Aligner le VIS jusqu'au spectromètre :** à ce moment du réglage, le VIS et l'IR sont parfaitement colinéaires, ce qui permet de générer le faisceau SFG à la surface de l'échantillon par simple ajustement de la ligne à retard. Le reste de l'alignement sur la référence et jusqu'au spectromètre se fait à l'aide du VIS uniquement. Utiliser les miroirs SFG1a et SFG2a pour aligner le VIS sur dsp1 et dsp2 respectivement (**Figure 45**).

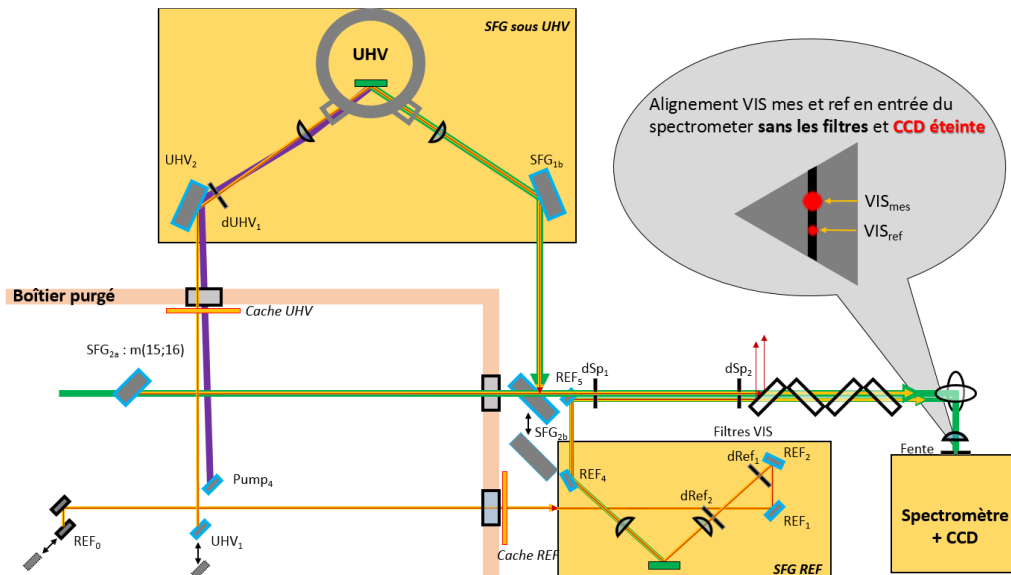


Figure 45 : Montage SFG de référence sur GaAs et de l'injection des faisceaux dans le spectromètre

4. **Trouver et optimiser le signal SFG sur la référence et l'échantillon :** Si la colinéarité IR/VIS est bonne, que ces faisceaux traversent les lentilles perpendiculairement en leur centre et que l'injection du spectromètre est bonne, il ne reste plus qu'à ajuster le retard VIS-IR. Normalement celui-ci ne change pas ou très peu d'un jour à l'autre. Il est fortement recommandé de noter la valeur du retard en mm chaque soir.

5. **Détection signal SFG :** l'émission SFG est détectée par la caméra CCD (ROPER PIXIS) refroidie à -70°C qui remplace la fente de sortie du spectromètre, réglé à la longueur d'onde SFG attendue. Pour trouver et optimiser le signal SFG, on règle la CCD dans le logiciel Winspec en mode focus avec 0.5 s de temps d'intégration et un groupement de pixels par 10 [25]. Pour commencer, on détecte le signal SFG sur un échantillon GaAs, qui produit un signal fort et proportionnel à la forme spectrale de l'IR. Cela permet d'affiner les alignements, de trouver le retard avec précision et d'optimiser la forme du spectre IR. La forme spectrale de l'infrarouge doit être parfaitement symétrique (en principe, gaussienne) afin de garantir que la procédure de fit spectral

soit adéquate. En effet, si les angles du BBO et de l'AgGaS₂ ne sont pas parfaitement adaptés, on peut obtenir une forme spectrale « bimodale » comportant une gaussienne principale flanquée d'un rebond. Dans ce cas les propriétés spectro-temporelles du faisceau IR risquent de conduire à une forme spectrale de SFG s'écartant de la forme lorentzienne postulée dans le fit. Si aucun signal SFG initial n'est observé sur GaAs, il faut reprendre les étapes (1 à 3) pour affiner la colinéarité puis chercher le bon retard. Ensuite, on affine les différents alignements et retards afin d'optimiser au mieux le signal SFG. Pour enregistrer un spectre, on passe en mode ACQUIRE avec un temps d'intégration de 1 à 30 sec sur GaAs et d'au moins 60 sec sur les échantillons. L'expérience montre que les spectres comportant ≥ 1000 coups sont suffisamment peu bruités. On essaie donc de rester dans cette limite, mais un compromis est parfois nécessaire pour garder un temps d'acquisition compatible avec le nombre de spectres à enregistrer.

6. En ce qui concerne la référence, il faut positionner REF0 de telle sorte que les faisceaux passent vers le montage de référence. Ensuite, il faut utiliser les miroirs REF1 et REF2 sur les iris dref1 et dref2 pour assurer le bon alignement et recouvrement IR/VIS sur l'échantillon de référence (GaAs). Enfin utiliser REF4 et REF5 à travers dsp1 et dsp2 pour l'injection sur une plage différente de la caméra CCD du spectromètre. Optimiser les alignements sur la référence en mode FOCUS. Sur la fente d'entrée du spectromètre (**Figure 46**), le VIS issu de la référence est placé plus bas que celui venant de l'échantillon. Ceci permet de les séparer sur la CCD. Le logiciel Winspec peut faire l'acquisition des 2 zones de la caméra (échantillon et référence) en même temps. Les « régions d'intérêt » (« ROI ») sur la CCD doivent être ajustées. Il s'agit des régions du détecteur dans laquelle se trouvent les faisceaux SFG. On intègre les signaux dans toute la ROI dans la dimension verticale (perpendiculaire au spectre). Les ROI changent très peu d'une expérience à l'autre. Elles sont réglables dans « experimental setup » du programme d'acquisition « Winspec ». Lorsque les voies de mesure et de référence produisent toutes les deux un signal SFG, on réalise successivement l'acquisition des spectres de l'échantillon et de la référence.



Figure 46 : Affichage des deux signaux SFG sur le détecteur (échantillon et référence) ainsi que leur ROI sur la CCD. L'axe horizontal correspond à la longueur d'onde du spectre SFG.

Adaptation du montage optique pour l'expérience sur l'adhésion bactérienne sur une monocouche protéique :

Nous nous intéressons à la détection des protéines et des bactéries par SFG des bandes amide. Or la région spectrale correspondante ($\approx 1500-1700 \text{ cm}^{-1}$) contient de nombreuses transitions ro-vibrationnelles intenses de l'eau atmosphérique. Après ≈ 1 mètre de propagation dans l'air, le spectre du faisceau IR se trouve ainsi fortement atténué et modifié. Il comporte de nombreux « trous » très profonds correspondant aux raies de l'eau (**Figure 47**). Ceci l'affecte également temporellement, de sorte qu'il est inapproprié pour enregistrer des spectres SFG.

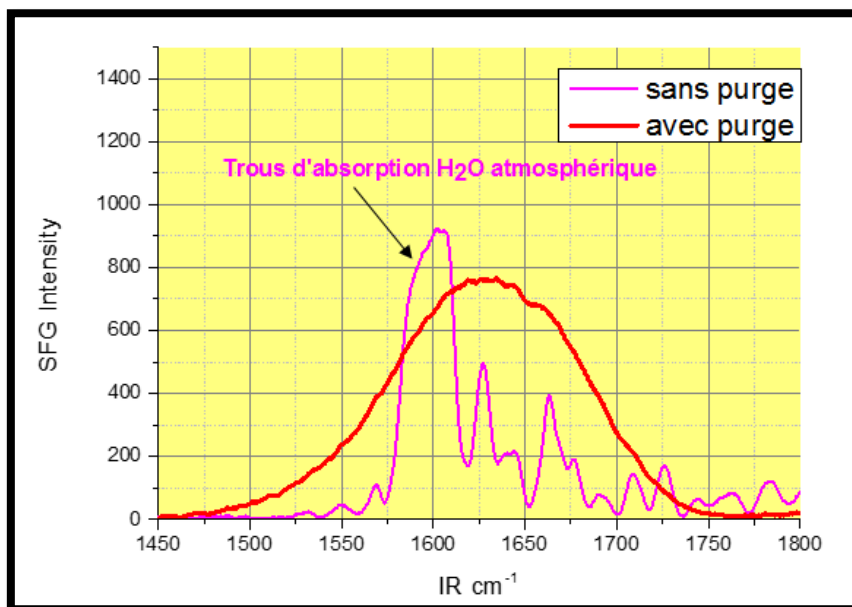


Figure 47 : deux spectres SFG obtenus sur GaAs, montrant l'évolution du spectre IR sous l'effet d'une purge de 8 heures.

Il faut donc purger le trajet du faisceau IR. Un capot étanche recouvrant l'OPA et le montage de SFG a été installé. Il permet de purger le trajet par de l'air sec et sans CO₂ issu d'un dispositif commercial de marque Balston, alimenté par de l'air comprimé. La **Figure 47** montre que la purge est efficace. Toutefois, elle prend trop de temps pour être réalisée après chaque changement d'échantillon. Or plusieurs échantillons sont mesurés lors de chaque expérience. Pour réduire

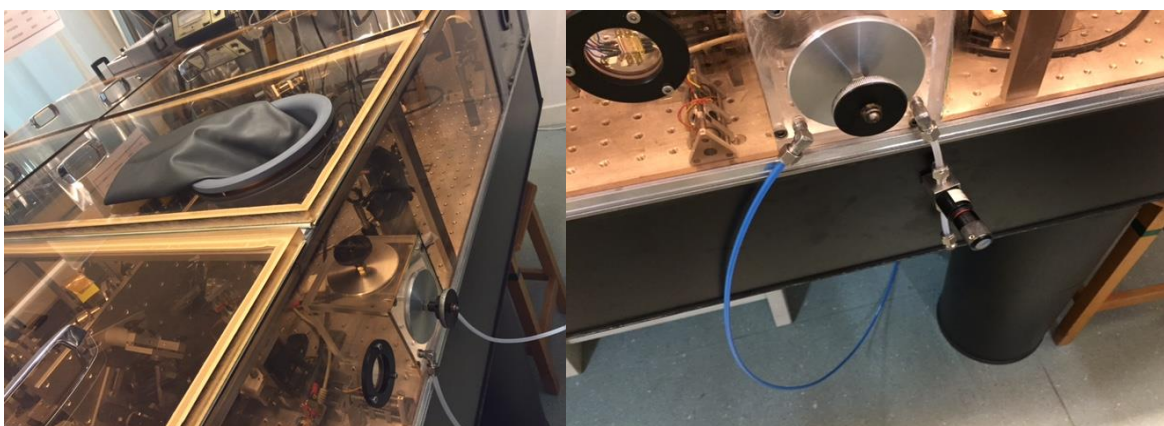


Figure 48 : sas d'introduction d'échantillons permettant de conserver le bénéfice de la purge du dispositif SFG lors du changement d'échantillons.

l'impact des changements d'échantillon sur la qualité de la purge, j'ai installé un sas d'introduction de petit volume, purgé séparément, et une boîte à gants permettant de déplacer l'échantillon du sas au porte échantillon SFG (*Figures 48 - 49*).

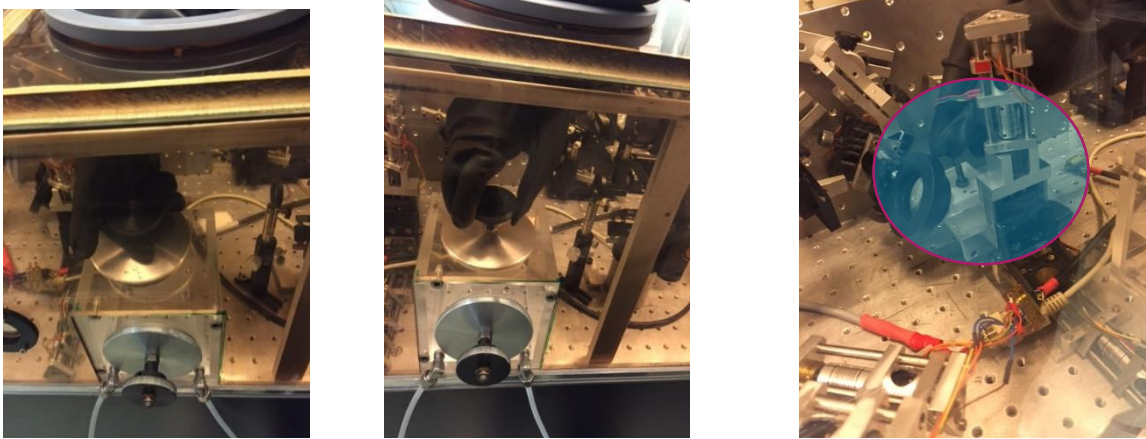


Figure 49 : photos du sas et de la boîte à gants.

1.7 Traitement des données issues des expériences SFG

Après une expérience de spectroscopie SFG, il faut traiter les données obtenues. Plusieurs étapes sont nécessaires afin d'obtenir des spectres vibrationnels :

- Convertir la fréquence SFG en fréquence IR : il s'agit d'une simple soustraction de la fréquence VIS
- Calibrer la fréquence IR
- Soustraire des spectres la contribution lissée de la lumière ambiante mesurée en début d'expérience sans laser IR, en présence du laser VIS
- Soustraire le cas échéant la contribution résiduelle des raies d'absorption de la vapeur d'eau
- Normaliser les spectres SFG en intensité en utilisant le spectre de référence mesuré en alternance sur GaAs
- Déconvoluer le spectre obtenu pour obtenir les lorentziennes correspondant aux bandes vibrationnelles des molécules adsorbées et la contribution non-résonante

Ces opérations sont effectuées à l'aide d'un logiciel développé au laboratoire par Aimeric Ouvrard. Dans la gamme spectrale de la vibration des bandes amides (1500-1700 cm^{-1}), on utilise le spectre d'absorption de l'eau atmosphérique pour calibrer très précisément l'échelle de longueur d'onde des spectres SFG (Figure 50, 51).

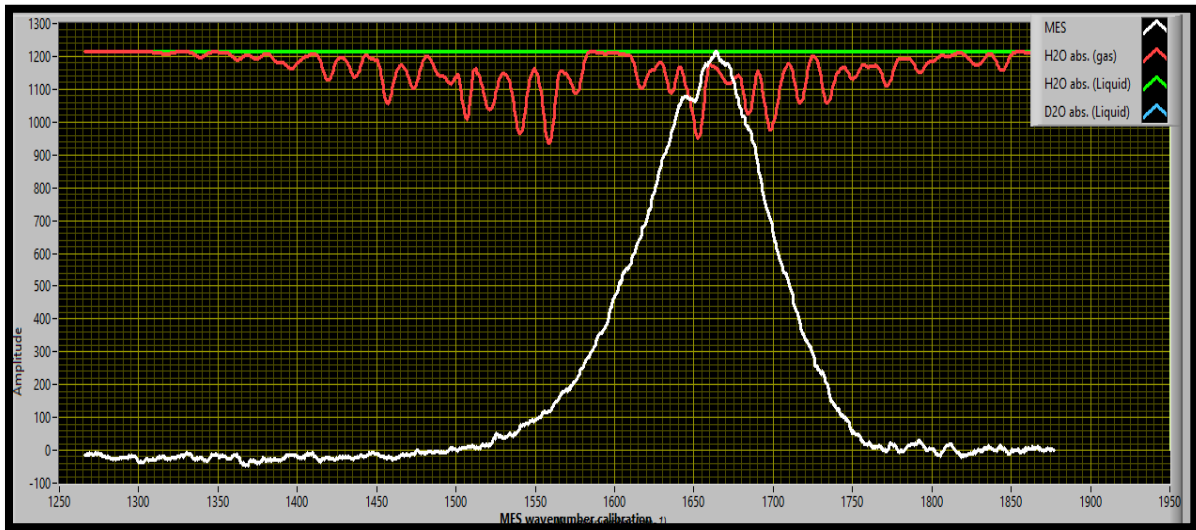


Figure 50 : Le spectre en rouge représente le spectre d'absorption de l'eau atmosphérique à la résolution du spectromètre SFG. Le spectre en blanc représente le spectre SFG d'un échantillon sans molécules après soustraction de la contribution de la lumière ambiante. La comparaison des deux spectres permet de distinguer deux bandes résiduelles de l'eau atmosphérique, qui permettent de calibrer la longueur d'onde du spectre avant leur soustraction.

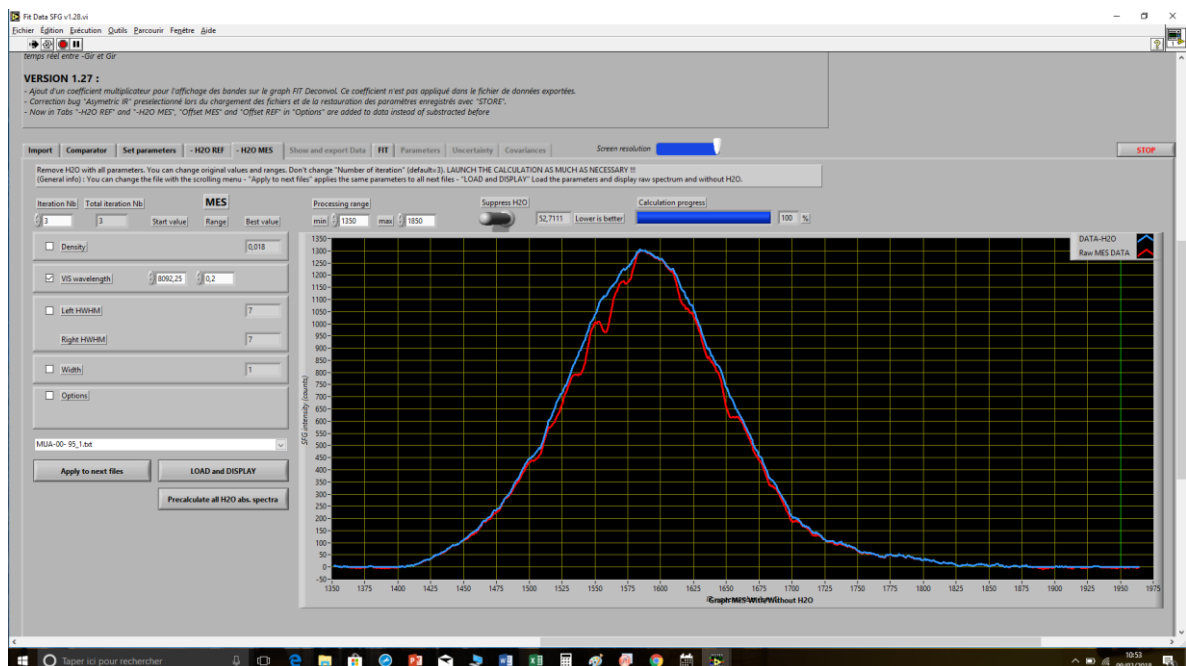


Figure 51 : Spectre SFG non résonant avant (rouge) et après (bleu) suppression de l'absorption résiduelle par l'eau atmosphérique

2. Préparation des substrats

2.1 Dyade BODIPY – C₆₀

Présentation de la dyade et de son étude photophysique

Une dyade donneur-accepteur composée d'un donneur BODIPY (BDP) et d'un accepteur fullerène (C₆₀) a été synthétisée et caractérisée par une équipe de collègues.¹ La dyade est adsorbée grâce à une chaîne peptidique. Nous avons saisi l'opportunité de l'étude au laboratoire d'échantillons pour effectuer des mesures préliminaires et élargir la gamme des échantillons que nous étudions par SFG de la fonction amide pour servir de base de comparaison par rapport aux substrats de SAM ODT et de MUA[25]-nisine. Un schéma décrivant la composition et la stratégie partielle de synthèse de la molécule est présenté ci-dessous (*Figure 52*).

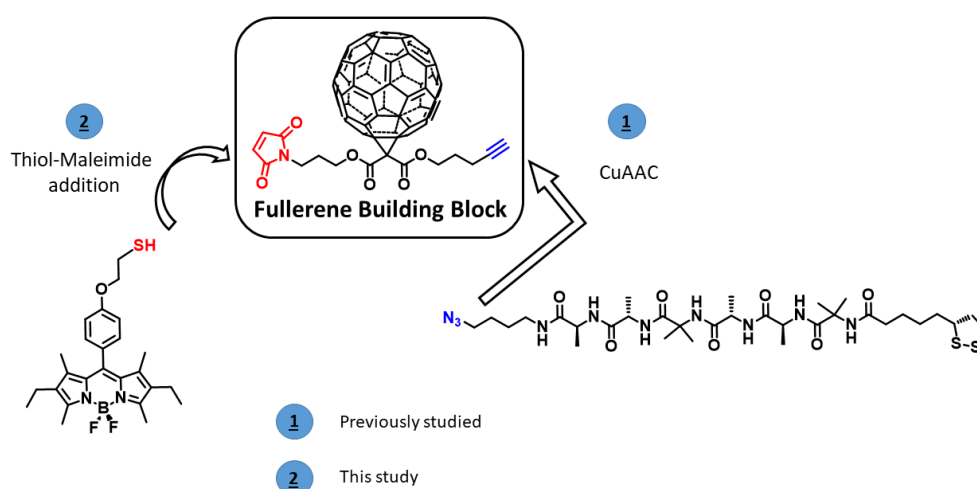


Figure 52 : composants et principe d'assemblage de la dyade BODIPY – C₆₀

¹ Thu-Trang Tran^{1,6}, Jad Rabah², Minh-Huong Ha-Thi¹, Emmanuel Allard², Stanislaw Nizinski³, Gotard Burdzinski³, Stéphane Aloïse⁵, Hélène Fensterbank², Krystyna Baczko², Anne Vallée², Gilles Clavier⁴, Fabien Miomandre⁴, Thomas Pino¹, et Rachel Méallet-Renault¹, des laboratoires ¹ISMO, ²Institut Lavoisier (UVSQ), ³Quantum Elect Lab (Poznan, Poland), ⁴PPSM, ⁵Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (Lille), ⁶Faculty of Physics and Technology (Thai Nguyen University of Science, Vietnam)

Ce dérivé a été préparé en utilisant un bloc de construction de fullerène cliquable qui porte une fonction alcyne et une unité maléimide. La post-fonctionnalisation du groupe maléimide par un thiol BDP conduit à une dyade BDP-C₆₀, laissant le fragment alcyne pour un autre arrangement fonctionnel : il permet d'adsorber la dyade sur une surface fonctionnalisée par une chaîne peptidique composée de 7 peptides.

L'étude globale comporte de nombreux volets auxquels nous n'avons pas participé. Sur la base de la combinaison de calculs semi-empiriques et de théorie fonctionnelle de la densité (DFT), d'expériences spectro-électrochimiques, de spectroscopies en régime permanent et résolues en temps, les propriétés photophysiques de cette nouvelle Dyade BDP-C₆₀ ont été étudiées en profondeur. Les calculs semi-empiriques ont permis de montrer que trois conformations de la dyade BDP-C₆₀ sont en équilibre, deux « étendues » et une pliée. Leurs structures et leurs orbitales moléculaires ont été analysées à l'aide de calculs DFT. Les deux courtes durées de fluorescence observées ont été attribuées aux deux conformères étendus affichant des distances variables donneur-accepteur (17,5 et 20,0 Å). La force motrice pour le transfert d'électrons photo-induits (PET) de l'état excité singulet du BDP au fragment C₆₀ a été calculée en utilisant des potentiels redox déterminés par des études électrochimiques. Les mesures spectro-électrochimiques ont eu pour but d'étudier les profils d'absorption des radicaux dans la dyade BDP-C₆₀, afin d'identifier les espèces transitoires dans les expériences pompe-sonde. Sous photoexcitation sélective de la fraction BDP, l'occurrence de transferts d'énergie et d'électrons a été démontrée par spectroscopies d'absorption transitoire (TA) femtoseconde et nanoseconde. Le transfert d'électrons photoinduit se produit dans le conformère plié tandis que le transfert d'énergie est observé dans les conformères étendus.

Nous n'avons pas élaboré nous-même les échantillons. Nous les avons directement installés dans notre montage de SFG. Nous avons travaillé sur des échantillons sur lesquels le BDP n'avait pas été greffé. Le mode de préparation est le suivant :

Une solution de dérivés de fullerène a été préparée à 10⁻⁴ M dans du CH₂Cl₂ dégazé sec. Les surfaces d'or, constituées de substrats en verre (11 mm x 11 mm), successivement revêtus d'une

couche de chrome de 50 Å d'épaisseur et d'une couche d'or de 200 nm d'épaisseur, ont été achetés auprès d'Arrandee (Werther, Allemagne). Ils ont été recuits dans une flamme de butane pour assurer une bonne cristallinité des couches supérieures et rincés dans un bain d'éthanol absolu pendant 15 min avant adsorption. L'état des échantillons d'or a été vérifié par spectroscopie IR d'absorption en réflexion par modulation de polarisation (PM-IRAS) et mesure d'angle de contact avec l'eau (WCA). Les échantillons d'or ont été recouverts par 24 h d'immersion dans des solutions 10^{-4} M dans CH_2Cl_2 , rincés successivement avec CH_2Cl_2 (10 min), l'eau MilliQ (5 min), CH_2Cl_2 (5 min) et séchés sous flux d'azote.

2.2. SAM ODT

L'obtention de substrats d'or couverts d'une monocouche auto-assemblée (SAM) d'octadécane-thiol (ODT) « quasi-parfaits » est obtenue spontanément en solution. La procédure de préparation est simple, mais la qualité et la propreté des surfaces d'or est critique. Les échantillons, fournis par Arrandee, sont constitués d'une couche mince d'or poly-cristallin de 250 ± 50 nm déposée sur une couche d'accrochage en chrome d'épaisseur 2.5 ± 1.5 nm, elle-même déposée sur un verre à base de borosilicate ($1.1 \times 1.1 \text{ cm}^2$). Pour une raison non éclaircie malgré les différentes méthodes d'investigation à notre disposition, certains lots de substrats ne permettent pas d'obtenir un auto-assemblage satisfaisant. Les échantillons sont nettoyés à la flamme (combustion de gaz de butane) jusqu'à l'observation d'une couleur rouge qui correspond à une température suffisamment élevée pour brûler les impuretés et pour reconstruire la surface polycristalline. Un flux d'azote permet de limiter l'oxydation de la surface par l'oxygène de l'air lors du refroidissement. Les échantillons sont rapidement déposés dans une solution d'éthanol absolu pendant 10 minutes [6, 26-27], puis ils sont immergés dans un bécher contenant une solution de thiol de concentration 0.1 mM dans l'éthanol ultra pur, qui est approprié pour des chaînes allant jusqu'à 18 unités de méthylène (pour les thiols plus longs, un solvant organique, par exemple l'hexane, doit être utilisé). La température de recuit et son homogénéité peuvent être jugées par l'émission de lumière par la

surface, qui doit être tout juste visible (correspondant à une température d'environ 600°C). Le temps d'immersion dans la solution d'alkanethiol est variable suivant les auteurs, de toute la nuit à quelques heures) (**figure 53**) [27-28]. Dans cette étude nous avons utilisé un temps de 3 heures. La dernière étape consiste à rincer les échantillons avec de l'éthanol absolu et à les sécher sous flux d'azote. Nous avons préparé les échantillons par lots. Les diverses caractérisations sont faites sur le même échantillon quand c'est possible, ou sur des échantillons du même lot.

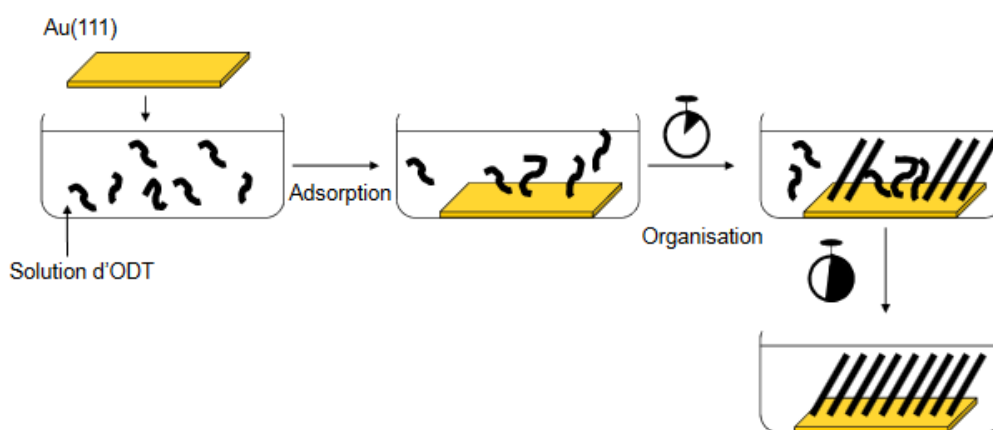
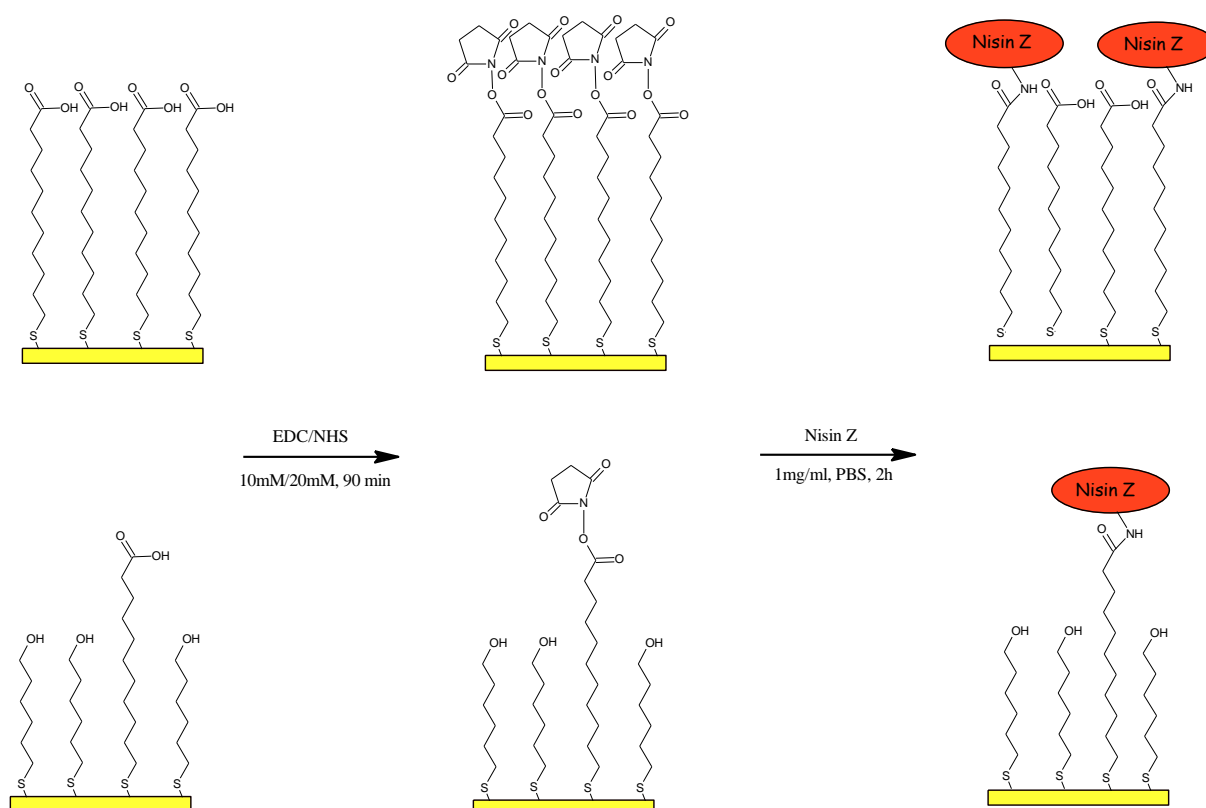


Figure 53 : Principe de fonctionnalisation des substrats d'or par les molécules ODT [6]

Des études antérieures ont montré que l'angle de contact de microgouttes déposées sur la surface dans un goniomètre est un critère parfaitement fiable de la qualité de l'auto-assemblage (angle de 110°). En particulier il est très bien corrélé aux intensités relatives des bandes symétrique, antisymétrique, et de résonance de Fermi dans les spectres SFG [26-27] qui dépendent de manière très sensible de l'orientation des groupements méthyle [28].

2.3. MUA[25] et nisine

Les substrats utilisés pour greffer la nisine sont analogues à ceux utilisés pour la BSA. Leur préparation est identique, à l'exception de l'ODT qui est remplacé soit par l'acide mercapto-1-décanoïque (MUA, $C_{11}H_{22}O_2S$), soit par un mélange dénommé « MUA25 » de MUA à 25% et de mercapto-hexanol ($HS-(CH_2)_6OH$) à 75%, celui-ci s'intercalant sur la surface d'or entre les molécules de MUA pour limiter l'encombrement stérique entre les fonctions acide terminales de MUA. Le rinçage à l'éthanol absolu est de 3 heures avec agitation orbitale, suivi d'un second rinçage dans l'eau de qualité milliQ (10 mn), puis d'un séchage sous azote sec.



*Figure 54 : en haut : greffage de nisine en 2 étapes sur une surface or-MUA.
En bas : greffage sur une surface or-MUA25.*

Les fonctions acide sont ensuite transformées (**figure 54**) en fonctions ester succinimidyl pour se prêter ensuite à l'accrochage de la nisine par l'intermédiaire d'une fonction amide – CO –

NH -. Les entités succinimidyl sont obtenues en plongeant les échantillons dans un mélange d'hydrochlorure de 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et de N-hydrosuccinimide (NHS) en concentrations de 10 / 20 mM, respectivement, dans l'eau milliQ pendant 90 minutes. Ces concentrations minimisent l'obtention d'autres produits par une réaction concurrente.

Enfin, la troisième étape consiste en l'immobilisation covalente de la nisine Z (1 mg / ml dans le PBS, pH 7,4) sur les surfaces activées (figure 11). Elle est réalisée en déposant une goutte de 150 μ l de solution de nisine Z / PBS à température ambiante pendant 2h. Ensuite, les substrats Au-MUA-Nis et AU-MUA25-Nis sont successivement rincés dans des bains-marie de PBS puis d'eau milliQ sur un agitateur orbital pendant 10 min, et séchés sous un courant d'azote sec. Le pH est maintenu à 7.4 pour que les fonctions amine présentes sur la nisine autres que celle de la fonction amide terminale restent protonées et que la nisine ne s'attache pas par leur intermédiaire à la surface.

Les références des produits sont indiquées dans le chapitre 4 (p. 125-127). L'encombrement des molécules de nisine par rapport aux molécules de MUA, et de la BSA par rapport aux molécules d'ODT, est illustré par la figure 54-1.

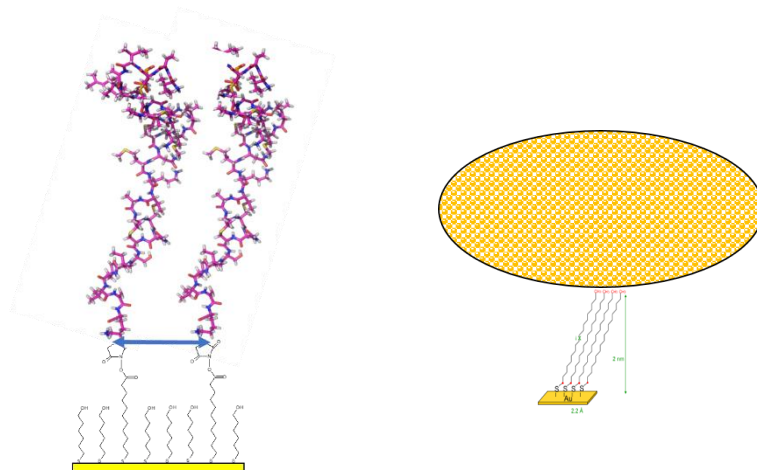


Figure 54-1 : tailles respectives de la nisine (à gauche) et de la BSA (à droite) par rapport au MUA et à l'ODT, illustrées de manière très schématique (dans le cas de la nisine, il ne s'agit pas de sa structure secondaire, mais d'un simple modèle moléculaire).

3. Références du chapitre 2

- [1] B. D. Ratner, T. A. Horbett, D. Shuttleworth, and H. R. Thomas, "Analysis of the organization of protein films on solid surface by ESCA," *J. Colloid Interface Sci.* 83, 630–642 (1981).
- [2] J. H. Scofield, "Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV", *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena* 8, 129–137 (1976).
- [3] F. Soto, Thèse de Doctorat, Université de Provence (1998). <http://sotofab.free.fr>
- [4] A. Bérut, D. Lopez Cardozo, D. Chapeyron, <http://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/ressource/instrumentation-nanomonde.xml>.
- [5] Y. Shimizu, Y. Peng, J. Kaneko, T. Azuma, "Design and construction of the motion mechanism of an XY micro-stage for precision positioning," *Sensors and Actuators A Physical* 201, 395–406 (2013).
- [6] E. Bulard, "L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire", Thèse de Doctorat, Université de Paris-Sud (2012).
- [7] H. Modaressi and G. Garnier, "Mechanism of Wetting and Absorption of Water Droplets on Sized Paper: Effects of chemical and Physical Heterogeneity" *Langmuir* 18, 642–649 (2002).
- [8] P. G. Petrov and J. G. Petrov, "Comparison of the static and dynamic contact angle hysteresis at low velocities of the three-phase contact line," *Colloids and Surfaces* 61, 227–240 (1991).
- [9] A. El Hajji and S. Zaydoun, *Cours de Spectroscopie Infrarouge*, Ch. III, Master Sci. Anal. Fac. des Sci. Rabat, Univ. Mohammed V-Adgal, pp. 1–27 (2009).
- [10] N. Alyabyeva, A. Ouvrard, A.-M. Zakaria, B. Bourguignon, "Probing Nanoparticle Geometry down to Sub-Nanometer Size: the Benefits of Vibrational Spectroscopy", *J. Phys. Chem. Lett.* 10, 624 (2019). DOI: 10.1021/acs.jpcclett.8b03830
- [11] F. Fournier, W. Zheng, S. Carrez, H. Dubost, B. Bourguignon, « Vibrational dynamics of adsorbed molecules in the conditions of photodesorption : pump-probe SFG spectra of CO / Pt(111) ». *J. Chem. Phys.* 121, 4839 (2004).
- [12] H. Arnolds and M. Bonn, "Ultrafast surface vibrational dynamics," *Surf. Sci. Rep.* 65, 45–66 (2010).
- [13] S. Wagner, F. Leyssner, C. Kördel, S. Zarwell, R. Schmidt, M. Weinelt, K. Rück-Braun, M. Wolf, and P. Tegeder, "Reversible photoisomerization of an azobenzene-functionalized self-assembled monolayer probed by sum-frequency generation vibrational spectroscopy," *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 6242 (2009).
- [14] A. Ghalgaoui, "Adsorption et dynamique femtoseconde de molécules de CO adsorbées sur des nanoparticules épitaxiées : sonde optique non linéaire , effet de taille et de support", Thèse de Doctorat, Université Paris-Sud (2012).
- [15] Q. Li and K. C. Chou, "Two-dimensional IR-visible sum frequency generation spectroscopy: a unique probe of surface electronic states at buried interfaces," *SPIE proceedings 7396*, *Phys. Chem. Interfaces and Nanomaterials VIII*, 73960Q (2009). <https://doi.org/10.1117/12.825666>
- [16] J. Wang. "Sum frequency generation study of CO adsorbed on palladium single crystal and nanoparticles : adsorption and catalytic oxidation as a function of size". Université Paris Sud (2013).

- [17] X. D. Zhu, H. Suhr, and Y. R. Shen, "Surface vibrational spectroscopy by infrared-visible sum frequency generation," *Phys. Rev. B* 35, 3047–3050 (1987).
- [18] H. Hunt, P. Guyot-Sionnest, Y. R. Shen, "Observation of CH stretch vibrations of monolayers of molecules by optical sum-frequency generation", *Chem. Phys. Lett.* 133, 189 (1987)
- [19] P. Guyot-Sionnest, H. Hunt, Y. R. Shen, "Sum-frequency vibrational spectroscopy of a Langmuir film: Study of molecular orientation of a two-dimensional system", *Phys. Rev. Lett.* 59, 1597 (1987).
- [20] P. Guyot-Sionnest, P. H. Lin, and E. M. Hiller, "Vibrational dynamics of the Si–H stretching modes of the Si(100)/H:2×1 surface", *J. Chem. Phys.* 102, 4269 (1995). <https://doi.org/10.1063/1.469474>.
- [21] L. J. Richter, T. P. Petrali-Mallow, J. C. Stephenson, "Vibrationally resolved sum-frequency generation with broad-bandwidth infrared pulses", *Opt. Lett.* 23, 1594-1596 (1998).
- [22] I. V. Stiopkin, H. D. Jayathilake, C. Weeraman, and A. V. Benderskii, "Temporal effects on spectroscopic line shapes, resolution, and sensitivity of the broad-band sum frequency generation," *J. Chem. Phys.* 132, 234503 (2010). <https://doi.org/10.1063/1.3432776>.
- [23] J. Wang, H. Dubost, A. Ghalgaoui, W. Zheng, S. Carrez, A. Ouvrard, B. Bourguignon, « Effect of visible pulse shaping on the accuracy of relative intensity measurements in BBSFG vibrational spectroscopy », *Surf. Sci.* 626, 23-39 (2014).
- [24] B. Bourguignon, « Pulse shaping in surface science » in: Wandelt, K., (Ed.) *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, vol. 2, 604–610. Elsevier (2018). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13280-9>
- [25] A.-M. Zakaria, "Réseaux ordonnés de nanoparticules étudiés par la combinaison de microscopie STM et spectroscopie SFG", Thèse de Doctorat, Université Paris-Sud (2018).
- [26] E. Bulard, Z. Guo, W. Zheng, H. Dubost, M.-P. Fontaine-Aupart, M.-N. Bellon-Fontaine, J.-M. Herry, R. Briandet, B. Bourguignon, "Non-Invasive Vibrational SFG Spectroscopy Reveals That Bacterial Adhesion Can Alter the Conformation of Grafted 'Brush' Chains on SAM" *Langmuir* 27 (2011) 4928–4935. [dx.doi.org/10.1021/la200205e](https://doi.org/10.1021/la200205e).
- [27] E. Bulard, M.-P. Fontaine-Aupart, H. Dubost, W. Zheng, M.-N. Bellon-Fontaine, J.-M. Herry, B. Bourguignon, "Competition of Bovine Serum Albumin Adsorption and Bacterial Adhesion onto Surface-Grafted ODT: In Situ Study by Vibrational SFG and Fluorescence Confocal Microscopy", *Langmuir* 28, 17001-17010 (2012). [dx.doi.org/10.1021/la302976u](https://doi.org/10.1021/la302976u).
- [28] B. Bourguignon, W. Zheng, S. Carrez, A. Ouvrard, F. Fournier, H. Dubost, "Deriving the complete molecular conformation of self-assembled alkanethiol molecules from sum-frequency generation vibrational spectra", *Phys. Rev. B* 79, 125433 (2009). DOI: 10.1103/PhysRevB.79.125433).

Chapitre 3

Chapitre 3 : spectroscopie SFG des bandes amide

Nous présentons dans ce chapitre les spectres de SFG obtenus dans les domaines spectraux des bandes d'élongation CH et des bandes amide pour les trois types d'échantillons élaborés sur des substrats d'or poly-cristallin, dont on a présenté au chapitre 2 la composition chimique et le mode de préparation. Les molécules sont :

1 - des molécules auto-assemblées comportant une dyade donneur-accepteur et une chaîne peptidique d'ancrage, élaborées pour étudier l'efficacité de la séparation de charges induites par la lumière. Des molécules sans chaîne peptidique, comportant une unique fonction amide, ont aussi été synthétisées pour comparaison.

2 - des molécules d'ODT auto-assemblées sur substrat d'or, servant de support à des protéines de BSA, puis de bactéries sur la BSA, pour poursuivre une étude antérieure de notre groupe dans laquelle les bandes CH de l'ODT auto-assemblé avaient été sondées.

3 - des molécules de MUA / MUA25 auto-assemblées et activées pour le greffage de nisine, peptide antimicrobien.

Dans le chapitre 4 nous rapporterons sous forme d'article l'étude complète concernant l'effet anti-microbien de la nisine vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, qui a été effectuée en utilisant un large ensemble de techniques expérimentales en plus de la SFG. Auparavant, nous présentons des généralités concernant la spectroscopie vibrationnelle des bandes amide.

1. Revue de spectroscopie SFG des bandes amide

Les fréquences de vibration correspondant à CO s'étalent de 1550 cm^{-1} (dans la fonction amide II) à 2163 cm^{-1} (en phase gazeuse), selon l'environnement de CO (table I). Sa fréquence révèle dans quel site d'adsorption il se trouve quand il est adsorbé sur un métal, ou au sein de quelle fonction chimique il se trouve dans une molécule, d'où l'intérêt de la spectroscopie IR.

	Formule chimique	Fréquence (cm ⁻¹)
CO en phase gazeuse	CO	2163
CO adsorbé sur métal, site linéaire	- M - CO	≈ 2100
CO adsorbé sur métal, site ponté	- M ₂ - CO	≈ 1930-1980
CO adsorbé sur métal, site ternaire	- M ₃ - CO	≈ 1880-1910
Acide	R - CO - OH	1740-1800
Ester	R - CO - OR'	1730-1750
Aldéhyde	R - CO - H	1720-1740
Cétone	R - CO - R'	1705-1725
Acide dimérisé ou α insaturé		1700-1725
Amide I « random coil »	R - CO - NH - R'	1645 , 1650, 1665
Amide I dans une hélice α		1645, 1650 , 1656
Amide I dans une hélice 3 ₁₀		1635
Amide I dans un feuillet β		1620, 1624, 1633 , 1642, 1688
Amide I à un repliement de feuillets		1660, 1664 , 1675, 1690-1696
Amide II		1550

Table I : fréquences typiques de CO suivant son environnement chimique. En noir : tabulées dans un cours de spectroscopie (Réf [9] du Ch. 2). En gris : réf. [8]. En gras : valeurs obtenues par SFG [9].

Comme rappelé dans le chapitre 1, la fonction amide – (C=O) – NH - joue un rôle très important pour les molécules biologiques, en tant que liaison entre les acides aminés constituant des peptides et des protéines, et en tant que responsable de leur structure secondaire. Dans une chaîne peptidique, chaque fonction amide est de la forme R – NH – CO – R' dans laquelle R et R' varient tout au long de la chaîne peptidique en fonction des acides aminés qui entrent dans sa composition. Dans l'approximation où l'on considérerait R et R' comme des atomes très lourds, on dénombrerait 6 atomes donnant lieu à 12 modes de vibration. Les modes locaux sont les vibrations d'élongation RC, CO, CN, NH, NR', ainsi que la déformation RCN, le pliage dans le plan (CO)-N de NH et CO, et 4 autres modes hors du plan. Dans les modes normaux, les modes locaux sont fortement couplés, non seulement au niveau de chaque groupe amide mais aussi entre groupes amide, à l'exception de la bande d'élongation NH, appelée « bande amide A » dans le cas de la liaison peptidique, qui apparaît à 3340 cm⁻¹. Sa fréquence est donc peu sensible à la conformation de la chaîne

peptidique, excepté qu'elle entre dans des liaisons hydrogène avec des CO d'autres fonctions amide de la chaîne peptidique, responsable d'un décalage spectral. Les autres modes ont des fréquences très proches, regroupées en trois bandes. La bande dite amide I ($\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$) regroupe principalement la vibration d'élongation CO (dominante), l'élongation CN, la déformation RCN, et le pliage de NH dans le plan. La bande amide II regroupe principalement le pliage de NH (dominante) et l'élongation NR' ainsi que le pliage de CO dans le plan et l'élongation CR. Les autres vibrations se retrouvent à plus basse fréquence (non accessibles avec notre appareillage de SFG) sous la dénomination « amide III » : la combinaison en phase du pliage de NH et de l'élongation CN, avec des contributions de pliage de CO dans le plan et de l'élongation RC [1].

La bande amide I est donc principalement due à l'élongation de la liaison C=O, couplée à l'élongation C-R, et induisant une déformation dans le plan R-C=O des angles RCN et CNH. Les divers modes de vibration associés ont a priori des moments de transition différents en intensité et orientation, et leurs intensités dépendent des règles de sélection, ce qui laisse penser que tirer des conclusions simples de l'analyse des spectres risque d'être beaucoup plus difficile que dans le cas de CO adsorbé, par exemple, où la vibration de CO est faiblement couplée, et où l'orientation du moment de transition est identique à l'axe CO, ce qui permet de remonter assez aisément des propriétés d'anisotropie à l'orientation des molécules, ou dans le cas de CH₂ et CH₃, dont l'orientation peut être déduite des intensités relatives des modes symétriques et antisymétriques [2]. Il en est de même pour la bande des amides II qui recouvre plusieurs modes couplés.

Une autre difficulté vient de la taille des peptides et des protéines. La région spectrale des bandes amide ne se superpose pas à celles des autres fonctions chimiques présentes dans les groupements latéraux du squelette peptidique. On pourrait donc en principe identifier les acides aminés entrant dans la composition du peptide par ces autres bandes, et utiliser les bandes amide pour obtenir des informations sur la « colonne vertébrale » peptidique. Mais une même fonction chimique entre en général plusieurs fois (voire un grand nombre de fois) dans la composition d'un peptide, les bandes de vibration correspondantes se recouvrent, ce qui fait qu'un spectre IR peut

difficilement suffire à reconnaître la structure d'un peptide. C'est par l'intermédiaire de la modification du spectre induite par une transformation chimique, telle qu'une protonation ou une réaction redox, que l'absorption IR se révèle très utile en permettant d'identifier l'acide aminé où la transformation a eu lieu [1].

La même difficulté se présente pour la chaîne peptidique. Un peptide peut contenir des dizaines de liaisons peptidiques, et les protéines beaucoup plus. La chaîne peptidique peut être constituée d'une « simple » hélice α , mais peut aussi très bien avoir une structure plus complexe. En général, les protéines contiennent des hélices (figure 55) [6], des feuillets « β », des repliements de feuillets β , et des portions de géométrie « aléatoire » (« random coils »). Les bandes amide risquent alors d'être très larges et non interprétables.

Cependant, dans le cas de petits peptides on voit dans la table I qu'on peut relier la fréquence de la bande amide I à la structure secondaire de la chaîne peptidique : la bande amide I des hélices α a une fréquence supérieure à 1650 cm^{-1} (jusqu'à 1675 cm^{-1}) [3] tandis que les feuillets β ont une fréquence inférieure à 1650 cm^{-1} , la largeur des bandes étant de l'ordre de 20 à 25 cm^{-1} typiquement. Maran et al. [3] ont étudié le cas d'une série de petits peptides en hélice α , constitués de 5, 6 et 7 peptides, en solution et autoassemblés sur une surface d'or : ils ont pu conclure que les hélices α des peptides n'étaient pas modifiées par l'auto-assemblage, et que celui-ci était très ordonné, d'autant plus que les peptides étaient longs. Ils ont pu identifier la présence des liaisons hydrogène intra-peptide (figure 55)). Enfin, une analyse quantitative comparative des intensités relatives des bandes amide I et amide II en milieu isotrope et en phase adsorbée permet de déduire l'orientation moyenne des hélices auto-assemblées, à partir d'une estimation du moment de transition de la principale bande amide I et amide II, et de leur angle avec l'axe de l'hélice [4]. Dans ce cas (peptide Aib6 (Aib étant l'acide aminé R-aminoisobutyrique), cet angle était de 39° pour l'amide I et 75° pour l'amide II [5]. Une telle approche quantitative ne peut malheureusement pas être reproduite dans le cadre de cette étude pour de grands peptides tels que la nisine, car les calculs de structure et des modes de vibration associés seraient trop lourds.

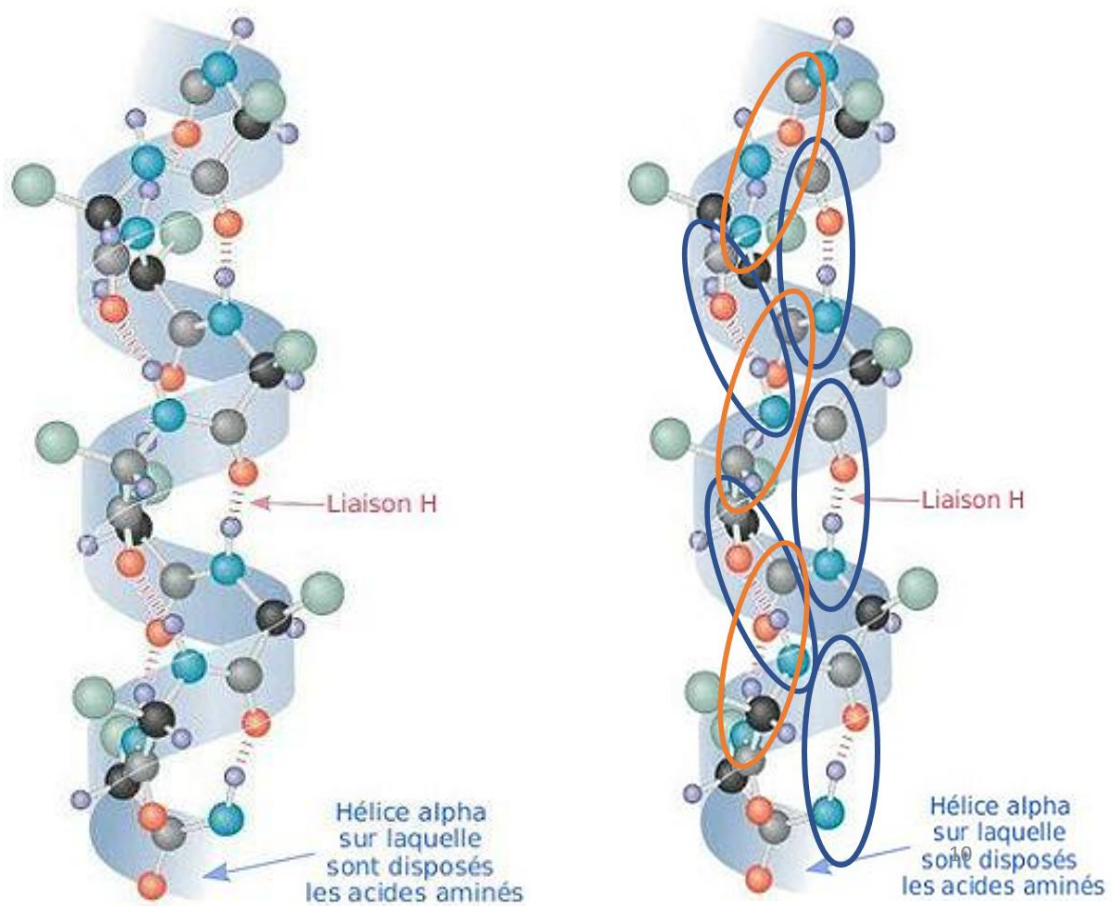


Figure 55 : schéma d'un fragment d'hélice α montrant les liaisons hydrogène CO --- HN entre le CO de l'amide $n^{\circ}n$ et le NH de l'amide $n^{\circ}(n+4)$, qui stabilisent l'hélice entre deux pas de l'hélice [6]. La direction des liaisons CO et NH est ainsi proche de l'axe de l'hélice. Dans le cas des hélices « 3_{10} », la liaison hydrogène a lieu entre le CO n et le NH $n+3$. La figure de droite montre plus explicitement l'ensemble des liaisons hydrogène.

Cependant, le cas des protéines n'est pas rédhibitoire malgré sa complexité [7, 8]. Par exemple, dans le cas des glycoprotéines, l'analyse des composantes spectrales correspondant aux hélices, feuillets, et repliements du profil très large de la bande amide I a pu être menée à bien quantitativement, permettant d'apporter des informations sur la structure secondaire [7].

La SFG a déjà été utilisée pour étudier l'adsorption de molécules biologiques, dont des peptides [8, 9]. Le groupe de Davies a étudié la formation et la structure de bicouches lipidiques sur une monocouche de MUA auto-assemblé par l'intermédiaire des bandes CH en comparant SFG et RAIRS [10, 11].

Le groupe de Chen a étudié intensivement la structure et l'orientation des peptides à l'interface solide-liquide par SFG en réflexion interne sur un prisme [12-19]. Il a mis en évidence la

présence d'hélices α et de feuillets β , et observé la disparition induite chimiquement de feuillets β , grâce aux fréquences des bandes amide I [12] (table I). Dans cette configuration expérimentale en réflexion totale, on peut obtenir un signal SFG avec les polarisations ppp et ssp (alors qu'en réflexion sur l'or, on ne peut obtenir un signal qu'en polarisation ppp). L'analyse du rapport de polarisation ppp/ssp est alors possible. Chen et al ont développé une analyse des modes normaux et montré que pour une hélice α , deux modes amide I seulement, parmi les 4 modes évoqués plus haut, contribuent en SFG. Le rapport ppp/ssp peut alors être calculé analytiquement en fonction de l'orientation des hélices par rapport à la normale à la surface, à l'aide des dérivées du moment de transition IR et de la polarisabilité Raman, calculés par chimie quantique : on peut ainsi remonter à l'orientation des hélices à la surface. Une complication réside dans la distribution angulaire, a priori inconnue, des moments de transition (qui est directement liée à l'ordre de la couche auto-assemblée). Chen et al ont pris en compte des distributions δ , gaussienne, « à entropie maximale », et montré que 2 orientations préférées, « couchée » et « debout », étaient présentes simultanément dans une bicouche lipidique [13]. Grâce à cette approche, le groupe de Chen a également comparé l'orientation de molécules biologiques sur des surfaces de polymères, selon qu'elles sont physisorbées, ou liées chimiquement [14], ainsi que la structure secondaire de peptides (cecropine P1) selon qu'ils sont adsorbés par le côté C (\rightarrow hélices α ordonnées verticalement) ou N (\rightarrow molécules « random coil » et couchées sur la surface) du squelette peptidique, et selon la longueur des chaînes de la monocouche autoassemblée de polyéthylène-glycol qui servait de support (les longues chaînes favorisant la conformation en « random coils » lors de l'adsorption) [15]. Il a développé des calculs de dynamique moléculaire pour interpréter l'effet d'environnement (par le solvant) sur la conformation de molécules biologiques immobilisées sur des surfaces [16].

Enfin, le groupe de Chen a étudié l'effet antimicrobien de peptides selon qu'ils sont attachés par la terminaison N ou C de la chaîne peptidique [17]. Dans le cas du peptide MSI-78, mis au point par la société Genaera Corporation, la structure est une hélice α (ce qui a été établi par dichroïsme circulaire en plus de la SFG) quelle que soit la terminaison par laquelle est attaché le

peptide. Il est debout (à 12° près) s'il est attaché par le côté N, et couché dans le cas C. Dans ce cas couché, aucun signal n'est observé, ni en polarisation ssp, ni ppp. L'orientation des chaînes suivant qu'elles sont attachées par la terminaison N ou C est donc opposée au cas de la cécropine P1. Les chaînes de MSI78 verticales (attachées par la terminaison N) ont une activité antimicrobienne nettement supérieure à celles qui sont horizontales [17]. Chen et al ont également observé par SFG que des peptides antimicrobiens ayant une structure aléatoire en solution adoptaient une structure en hélice α par adsorption sur des membranes modèles de cellules [18]. Récemment, ils ont combiné SFG et microscopie optique pour suivre simultanément l'évolution du spectre de peptides antimicrobiens (MSI-78) et de la fluorescence de bactéries (*E. coli*) à la surface du film de peptides, à l'échelle d'une heure [19], montrant que les peptides initialement orientés presque perpendiculairement à la surface se couchent au contact des bactéries, provoquant leur mort.

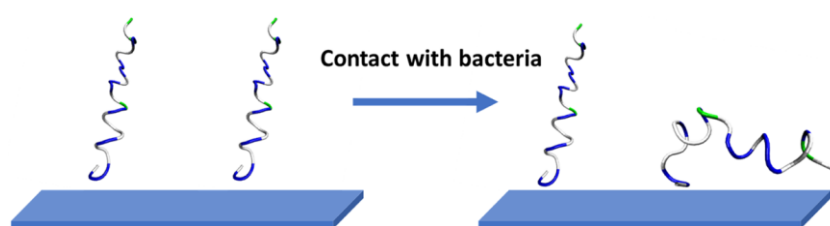


Figure 56 : *Le peptide « MSI-78 » adopte une structure en hélice quand il est immobilisé sur une surface. L'étude par SFG à l'interface verre-liquide montre que l'interaction bactérie-peptide affecte l'orientation des hélices du peptide qui se couchent sur la surface (issu de réf. [19]).*

En conclusion, la spectroscopie vibrationnelle peut apporter des informations très précises sur la structure et la conformation de petits peptides, en complément d'autres techniques, telles que XPS, dichroïsme circulaire, électrochimie, microscopie optique. La comparaison des spectres d'absorption IR sur une surface et en milieu isotrope (solution ou solide isotrope) permet de déduire l'orientation moyenne d'hélices auto-assemblées sur une surface, tandis que les spectres SFG permettent, au moins à l'interface solide liquide, de suivre l'orientation moléculaire d'hélices α en fonction de l'environnement des peptides (solvant, mode d'adsorption, présence de bactéries...)

La fréquence des bandes amide I à elle seule permet dans certains cas de distinguer les hélices α , feuillets β , coudes entre feuillets β , et structure aléatoire (table I, réf. [8, 9]). Toutefois, sur

les surfaces, la fréquence peut varier, notamment en fonction des interactions latérales entre chaînes lorsque celles-ci sont bien ordonnées (par exemple, par liaisons hydrogène intermoléculaires). Ceci ne se produit pas en solution.

Nous n'avons pas trouvé d'études exploitant la bande amide II de manière approfondie contrairement au cas de la bande amide I, excepté le cas notable où le rapport d'intensité entre bandes amide I / amide II est utilisé en RAIRS pour déduire l'orientation moyenne des molécules à la surface. L'intensité de la bande amide II d'hélices α est assez souvent nulle en SFG dans la littérature ; il se peut que ses caractéristiques (hyperpolarisabilité, orientation du moment de transition...) font qu'elle est souvent peu intense. Nous allons y revenir plus loin.

La polarisation en SFG s'est révélée être un outil essentiel dans le travail du groupe de Chen pour apporter des informations sur l'orientation des hélices α à l'interface solide - liquide. Malheureusement, une seule polarisation (ppp) donne du signal sur les métaux. Le substrat d'or, commun à nos trois types d'échantillons, ne nous permet donc pas d'exploiter la comparaison de plusieurs polarisations. Cependant, la forte sensibilité de la SFG à l'anisotropie de la surface, sa sélectivité exclusive aux régions non-centrosymétriques, sa sensibilité au degré d'ordre de la couche auto-assemblée, et, nous l'espérons, le rapport d'intensité amide I / amide II, devraient permettre d'obtenir une information complémentaire par rapport à l'absorption IR.

2. Spectres SFG de la chaîne peptidique portant la dyade BODIPY – C₆₀

Le principe d'élaboration des échantillons à partir des trois composants : le BODIPY (donneur d'électron) – l'entité contenant C₆₀ (accepteur d'électron) – la chaîne peptidique intercalée entre la dyade et le pont di-sulfure d'ancrage à la surface, a été indiqué dans le chapitre II (figures 53, 54). Les spectres SFG ont été réalisés sans le BODIPY, car ils ont pour but de sonder l'auto-assemblage des molécules sur la surface, qui a priori ne dépend pas de leur terminaison BODIPY. Trois molécules ont été mesurées par SFG : « C₆₀ – peptide » (figure 57) et « N₃ – peptide », qui

diffèrent par la présence ou l'absence de C_{60} (la comparaison de leurs spectres ayant pour but de s'assurer si l'encombrement stérique de C_{60} ne perturbe pas la conformation de la chaîne), et « C_{60} – alkyle » qui ne comporte pas la chaîne peptidique (figure 58) : dans ce cas, la dyade est séparée du pont di-sulfure d'ancrage à la surface par deux chaînes alkyle courtes (chacune longue de 4 CH_2) séparées par une seule fonction amide intercalée. La structure secondaire de la chaîne peptidique est connue (figure 59) [3].

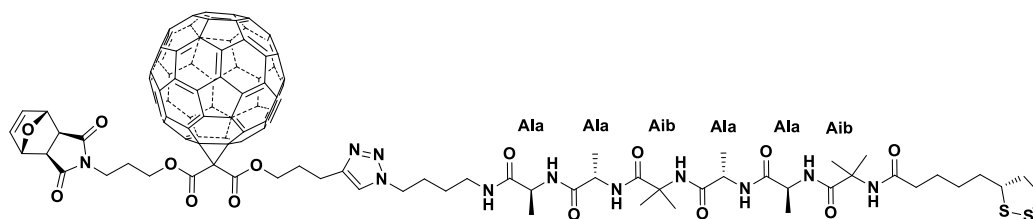


Figure 57 : molécule « C_{60} – peptide » (ne comportant pas le BODIPY, partie donneur de la dyade). Elle est attachée à la surface par l'intermédiaire d'une chaîne peptidique comportant 7 fonctions amide, terminée par une chaîne alkyle de 4 CH_2 portant le pont di-sulfure qui assure un ancrage fort avec la surface d'or. La molécule ne comportant pas non plus C_{60} (« N_3 – peptide ») a été également sondée pour voir si un effet stérique lié à la présence de C_{60} ne modifie pas la conformation de la chaîne peptidique.

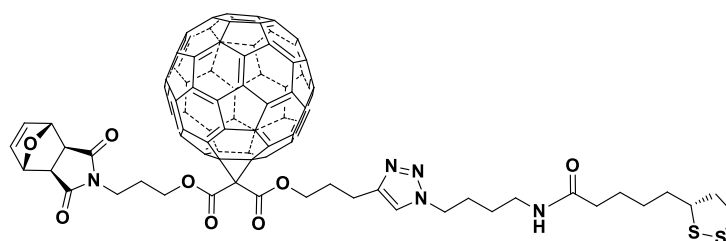


Figure 58 : molécule « C_{60} – alkyle » (ne comportant pas le BODIPY, partie donneur de la dyade), dans laquelle la chaîne peptidique n'a pas été insérée : la liaison avec la surface est assurée par les deux petites chaînes alkyle de 4 CH_2 chacune, séparées par un groupe amide unique, qui portent le pont di-sulfure.

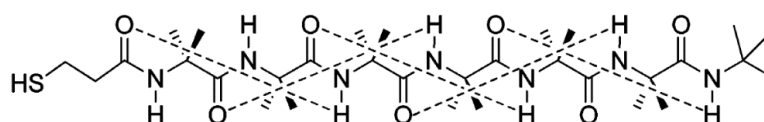


Figure 59 : la chaîne peptidique des molécules « C_{60} – peptide » et « N_3 – peptide », avec l'indication des liaisons hydrogène qui déterminent la forme « 3_{10} » de l'hélice : le CO d'une fonction amide est lié par liaison hydrogène à l'atome H du NH de la seconde plus proche fonction amide [3].

2.1 Spectres FTIR – RAIRS

Les spectres FTIR – RAIRS des molécules ont été publiés (figure 60) [20]. Ils mettent en évidence la présence de bandes CH_2 autour de 2900 cm^{-1} et amide autour de 1600 cm^{-1} . Les bandes amide sont beaucoup moins intenses dans le cas de la molécule « C_{60} – alkyl », ce qui est attendu, puisqu'elle ne comporte qu'un seul groupe amide. D'autre part, les bandes entre 1700 et 1770 cm^{-1} des fonctions ester et cétone du groupe qui contient C_{60} ne sont logiquement pas présentes pour la molécule « N_3 – peptide ». Enfin, on retrouve des bandes CH_2 s et CH_2 as intenses, et CH_3 as faible, dans les 3 molécules. Il est probable que la bande CH_3 s et la résonance de Fermi de CH_2 sont cachées par les bandes de CH_2 qui sont beaucoup plus intenses qu'elles.

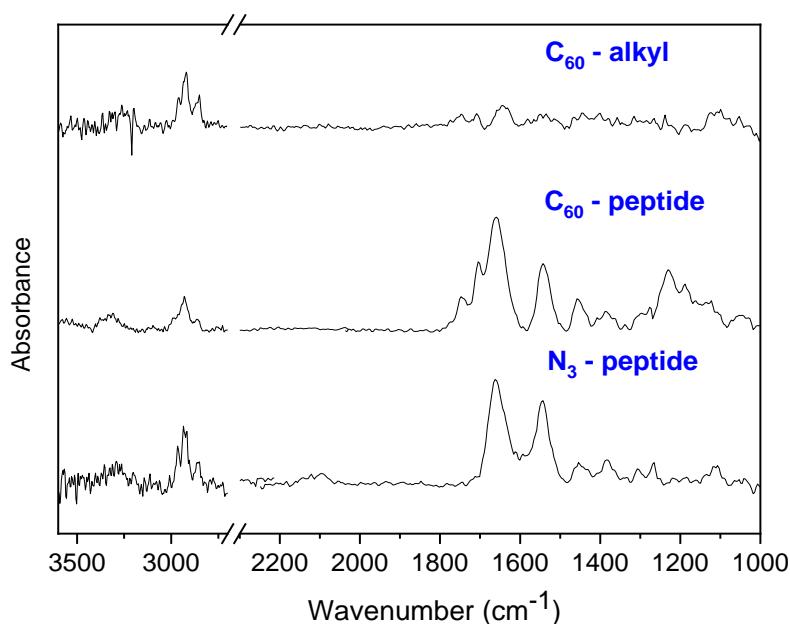


Figure 60 : spectres de PM-RAIRS des monocouches auto-assemblées (SAM) de C_{60} -alkyl, C_{60} -peptide et N_3 -peptide (de haut en bas).

Les rapports d'intensité amide I / amide II, de 1,74 et 1,54 pour N_3 - peptide et C_{60} - peptide, respectivement, comparé à ceux obtenus en phase solide, en faisant l'hypothèse que toutes les

molécules ont la même inclinaison, ont permis d'extraire les angles d'inclinaison moyens de l'hélice suivant l'analyse indiquée plus haut [4, 5] (table II). Comme il a été dit, ces angles dépendent de la distribution d'orientation (dépendante du degré de désordre dans la couche moléculaire) qui n'est pas connue et peut même dans certains cas être bi-modale [13]. Selon cette analyse, les hélices sont inclinées de 49° et 37° par rapport à la normale à la surface pour N₃ - peptide et C₆₀ - peptide, respectivement. On aurait pu s'attendre à ce qu'il n'y ait pas de différence d'inclinaison entre les terminaisons « N₃ » et « C₆₀ », ce qui n'est pas vérifié, mais cette différence peut être due aux imprécisions sur la mesure des intensités et sur les approximations du modèle, notamment concernant la distribution d'orientation. En l'absence de plus de détails, il semble sage de conclure que l'orientation est de l'ordre de 43±10° dans les deux cas.

	N ₃ – peptide	C ₆₀ – peptide
Inclinaison de l'axe hélicoïdal par rapport à la normale à la surface	49°	37°
Angle entre le moment de transition amide I et l'axe de l'hélice	39°	
Angle entre le moment de transition amide II et l'axe de l'hélice	75° ou 83° suivant la géométrie de l'hélice	

Table II : angles déduits du rapport d'intensité des bandes amide I / amide II mesurées en FTIR à la surface et dans un solide isotrope.

2.2 Spectres SFG

Les spectres SFG des trois molécules sont montrés dans la figure 61. La première remarque que l'on peut faire est que l'intensité des bandes amide est faible, au point que la précision sur les intensités et fréquences est faible. Fréquemment, par exemple dans le cas des bandes CH de chaînes alkyle, ou de CO adsorbé sur une surface métallique, l'amplitude des bandes de vibration

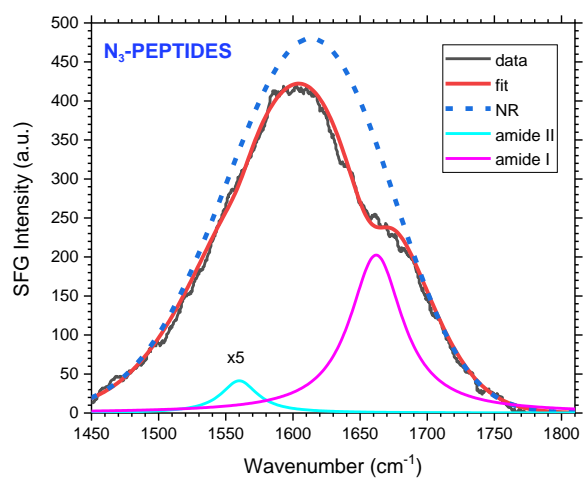
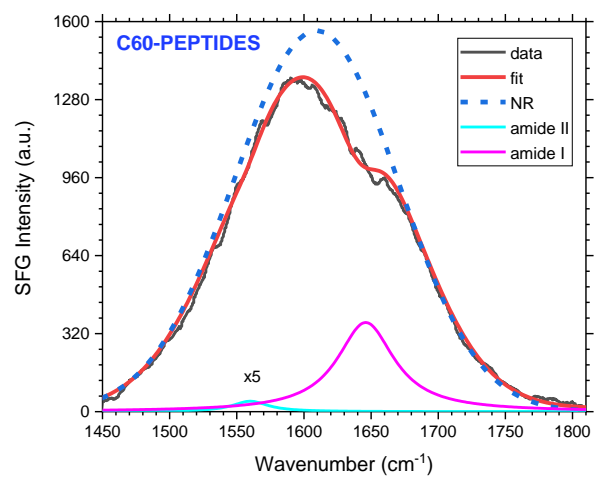
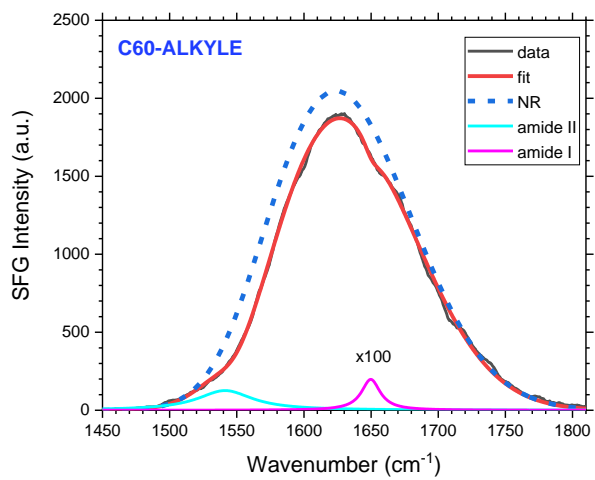


Figure 61 : spectres SFG dans la région des bandes amide (voir les paramètres fittings des lorentziennes p. 115)

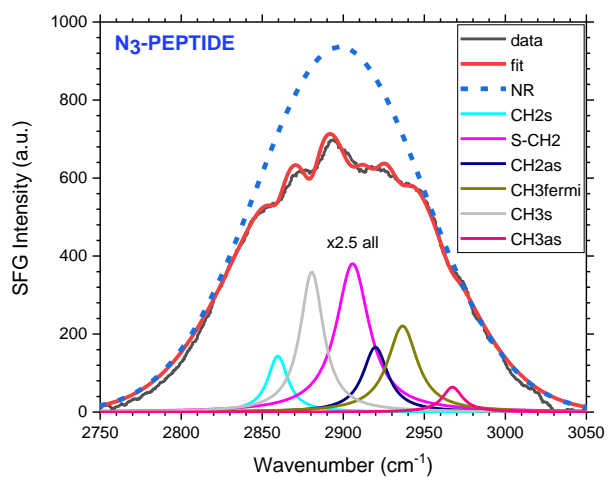
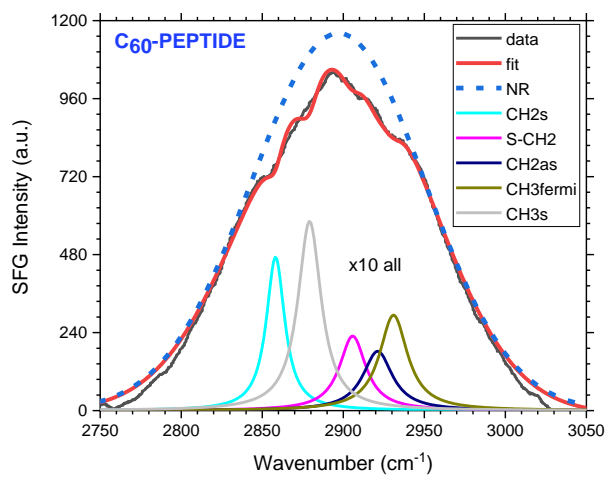
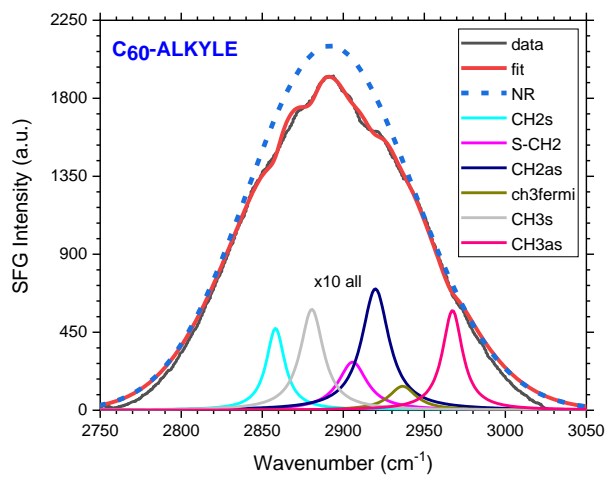


Figure 61 (suite) : spectres SFG dans la région des bandes CH. Pour comparer les intensités des bandes entre les spectres SFG, il ne faut pas se référer à l'échelle d'intensité, mais à la contribution non résonante (en pointillé bleu), due aux états électroniques de la surface de l'or, qui ne varie pas d'un échantillon à l'autre. En outre, dans certains cas, un facteur d'échelle a été utilisé pour que les bandes déconvoluées soient visibles.

d'une monocouche a un ordre de grandeur comparable au signal non résonant correspondant à la réponse électronique de la surface, ce qui n'est pas le cas ici. Or, les bandes amide sont intenses en RAIRS. Il y a deux différences entre SFG et RAIRS qui peuvent expliquer des différences d'intensité : (i) la SFG est une combinaison cohérente d'absorption IR et de diffusion Raman : des modes ayant un fort moment de transition IR peuvent avoir une polarisabilité Raman faible ; (ii) la nature cohérente de la SFG fait que les amplitudes, non les intensités, s'ajoutent : les contributions de groupes en relation centrosymétrique, comme les CH₂ dans une chaîne alkyle tout trans, s'annulent (situation très ordonnée) ; à l'opposé, les contributions de groupes ayant une distribution isotrope de leurs moments de transition s'annulent (situation très désordonnée). Nous allons voir ci-dessous que dans le cas des hélices α , des effets d'interférence destructive inhérents à la structure particulière des hélices peuvent expliquer la faible hyperpolarisabilité de la bande amide II.

2.3 Ratio amide II / amide I en SFG

La bande amide II est 22 et 45 fois plus faible que la bande amide I dans nos spectres SFG de C₆₀ - peptide et N₃ - peptide, respectivement. On retrouve ainsi des résultats comparables à ceux de Chen, qui n'indique pas de valeurs pour le ratio, mais dont les spectres montrent des intensités de la bande amide II souvent très faibles à nulles dans le cas des hélices α . On peut voir dans cette comparaison la confirmation de la bonne conformation de nos hélices α , et du fait qu'en première approximation elles sont bien orientées et ordonnées sur la surface.

Cela ne dit pas pourquoi la bande amide II des peptides est très faible en SFG. Nous n'avons pas trouvé d'explication dans la littérature. L'intensité amide II / amide I reflète le rapport entre les hyper-polarisabilités des deux modes, modulée par l'orientation de leurs moments de transition respectifs par rapport à la surface, les moments de transition parallèles à la surface conduisant à

une intensité nulle sur les surfaces métalliques. Si donc l'hyperpolarisabilité peut être faible, l'orientation des moments de transition peut également être défavorable. Nous allons voir que les deux facteurs semblent qualitativement défavorables à l'amide II. Dans le cas de la chaîne peptidique, les orientations approximatives des moments de transition des deux bandes amide auxquelles on peut s'attendre sont indiquées dans la figure 62, sur la base des angles de la table II. On voit dans la figure que l'orientation semble plus favorable pour l'amide I que pour l'amide II dans le cas de la chaîne peptidique. Dans le cas de C_{60} - alkyle, il n'y a pas d'hélice puisqu'il y a une unique fonction alkyle. L'orientation des moments de transition μ_I et μ_{II} des bandes amide I et II par rapport à la surface, respectivement, dépend de la conformation de la chaîne des 4 groupes CH_2 auxquels le groupe amide est lié, et de l'orientation de μ_I et μ_{II} par rapport aux atomes de la fonction amide. Nous admettons que la direction de μ_I est proche de celle de $C=O$, quoique pas identique puisque différents autres modes sont couplés à l'élongation de CO . De même la direction de μ_{II} est probablement proche du plan $CO - N$ et approximativement perpendiculaire à la liaison NH puisque la vibration prédominante est le pliage de NH . Un schéma approximatif raisonnable de la molécule, supposant que la chaîne alkyle est proche de tout-trans comme dans le cas des alcanethiols autoassemblés, et que le plan CON est le même que celui de la chaîne alkyle, est représenté dans la figure 62. Selon ce schéma, on peut s'attendre à ce que l'intensité de la bande amide II soit plus grande que celle de l'amide I dans le cas C_{60} - alkyle, comme observé expérimentalement.

L'autre facteur possible pouvant expliquer la faible intensité de la bande amide II des hélices est une hyperpolarisabilité intrinsèquement faible de la bande amide II. Or la direction des liaisons NH est nécessairement peu inclinée par rapport à l'axe de la chaîne peptidique, puisque ces liaisons entrent dans les liaisons hydrogène qui stabilisent l'hélice (figure 55). Les moments de transition de chaque vibration de pliage NH sont donc approximativement dans le plan perpendiculaire à l'axe de l'hélice, et tournent d'un NH à l'autre autour de l'axe de l'hélice. Cette situation suggère fortement que l'interférence entre les différents modes locaux des NH est plutôt destructive.

Au contraire, les CO ont leur moment de transition orienté plutôt parallèlement à l'axe de l'hélice, vers un NH (figure 55). Ils sont donc tous orientés à peu près de la même manière et leur interférence devrait être constructive. Pour confirmer ces interprétations qualitatives, il faudrait calculer par chimie quantique la conformation des molécules adsorbées, les modes de

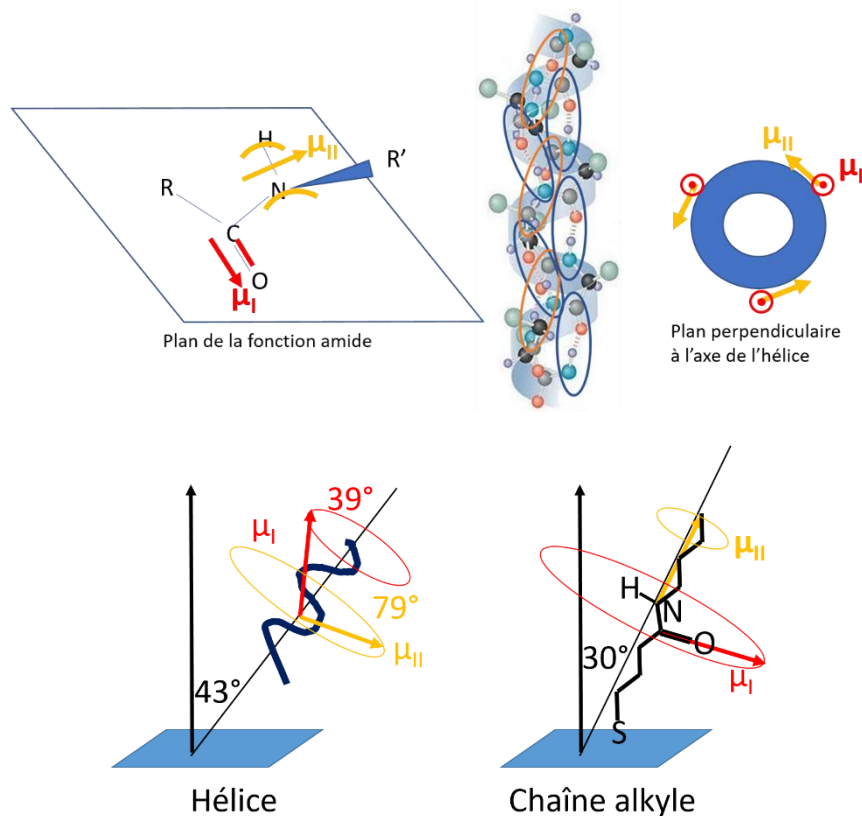


Figure 62 : éléments qualitatifs permettant de déduire l'orientation approximative des moments de transition μ_I et μ_{II} des bandes amide I et II.

En haut à gauche : orientation des moments de transition dans le plan de la fonction amide.

En haut au milieu : rappel des liaisons hydrogène dans une hélice.

En haut à droite : projection, dans un plan perpendiculaire à l'axe de l'hélice, des moments de transition amide I et II. Les moments de transition des différents modes amide I interfèrent constructivement, ceux des modes amide II interfèrent destructivement.

En bas à gauche : dans le cas de la chaîne peptidique, prenant en compte les angles de la table II, mais sans prendre en compte l'angle diédral entre μ_I et μ_{II} qui n'est pas connu (μ_I et μ_{II} ne sont pas nécessairement dans le plan de la figure). Le degré de liberté de rotation de l'hélice autour de son axe (qui dépend de la liaison avec le substrat, non représentée) serait aussi un facteur à prendre en compte pour une approche quantitative. Les flèches correspondant à μ_I et μ_{II} peuvent ainsi pointer vers n'importe quel point des cercles correspondants. Avec la géométrie représentée, la bande amide I aurait une intensité plus grande que l'amide II, dont le moment de transition est proche du plan de la surface. De plus, l'hyperpolarisabilité de l'amide II serait plus faible que celle de l'amide I (selon la figure du haut à droite, voir aussi le texte).

En bas à droite, on a représenté la situation dans le cas de C_{60} -alkyle. Le plan de la figure est celui de la chaîne alkyle supposée tout-trans et identique au plan CON. NH est représenté dans ce plan, mais il peut être hors du plan (N étant au centre d'un tétraèdre). On a représenté μ_I dans la direction de CO, et μ_{II} perpendiculaire à NH, dans le plan du squelette carboné. Avec ces hypothèses, l'orientation de μ_{II} serait plus favorable que celle de μ_I dans ce cas « alkyle ».

vibration normaux, les moments de transition et les hyperpolarisabilités. Ceci dépasse le cadre de cette thèse. On peut aussi remarquer que nos interprétations reposent sur l'orientation des moments de transition, sans tenir compte de la polarisabilité Raman. Dans le cas des alcanethiols autoassemblés, les calculs détaillés ont confirmé les interprétations qualitatives basés sur les moments de transition [2].

2.4 Comparaison des spectres SFG de C₆₀ – peptide et N₃ peptide.

On s'attend, si C₆₀ ne perturbe pas les chaînes peptidiques, à une différence faible entre C₆₀ – peptide et N₃ peptide : c'est bien de ce qui est observé.

2.5 Comparaison des intensités entre C₆₀ - alkyle et C₆₀ - peptide

Il résulte de notre discussion que les intensités relatives des deux bandes amide en SFG sont très différentes suivant qu'elles sont isolées dans une chaîne alkyle ou incluses dans une chaîne peptidique. La bande amide I est peu intense dans le cas de C₆₀ – alkyle, avec un rapport d'intensité de 1/1500 et 1/830 par rapport à N₃ – peptide et C₆₀ – peptide, respectivement (figure 61). A l'inverse, la bande amide II est 3.9 et 11 fois plus grande pour C₆₀ – alkyle que pour N₃ – peptide et C₆₀ – peptide, respectivement. En RAIRS, en première approximation, les intensités sont proportionnelles à la densité de molécules. On voit qu'en SFG ce n'est pas le cas du tout, tant l'ordre et l'orientation jouent un grand rôle.

2.6 Spectres SFG dans le domaine des bandes CH

Rappelons que dans une chaîne alkyle tout-trans bien ordonnée, les bandes de CH₂ ont une intensité quasiment nulle en SFG [2]. Ce n'est pas le cas ici. On observe avec une faible

intensité tous les modes CH₂ et CH₃. Il y a 1 groupement méthyle pour ala (alanine) et 2 pour aib (acide β indolbutyrique), soit 9 au total, et on retrouve, en plus des groupes CH₂ de la chaîne alkyle déjà évoqués, 2 x 3 groupes CH₂ autour de C₆₀ (figure 57). Sur la base des simulations numériques antérieures réalisées par notre équipe sur les chaînes alkyle auto-assemblées [2], dans l'hypothèse d'une couche moléculaire bien ordonnée comportant des liaisons CH₂ - CH₂ non-trans, on obtiendrait une intensité des bandes CH₂ bien plus grande que celle qui est observée. Une faible intensité des bandes CH₂ peut signifier soit une faible distorsion par rapport à la conformation tout-trans, soit une couche auto-assemblée vraiment très désordonnée, conduisant à une très large distribution d'orientation des CH₂. La seconde solution paraît improbable dans la mesure où l'ensemble des spectres s'interprète de manière cohérente en supposant que les molécules sont correctement auto-assemblées, sans parler des expériences complémentaires réalisées (qui sont détaillées dans le chapitre 4).

2.7 Conclusion sur les spectres SFG de la dyade

Les bandes de vibration amide et CH sont toutes de faible intensité, au point que la précision sur les intensités relatives est faible à très faible. Dans certains cas, on peut juste affirmer qu'une bande est bien présente. Cependant, les différences entre les spectres sont interprétables à un niveau qualitatif, et sont cohérents entre eux. Ils seraient pleinement exploitables à condition d'être confrontés à des simulations basées sur des calculs de chimie quantique complets (structure atomique, modes de vibration, hyperpolarisabilité, orientation à la surface). Notre interprétation concernant la spectroscopie SFG de la bande amide II des hélices, qui n'est pas discutée dans la littérature à notre connaissance, mériterait d'être ainsi confirmée. Cependant, on peut conclure que l'interprétation des spectres SFG indiquée plus haut est compatible avec un auto-assemblage bien ordonné des molécules.

3. Spectres SFG de SAM ODT

3.1 FTIR - IRAS

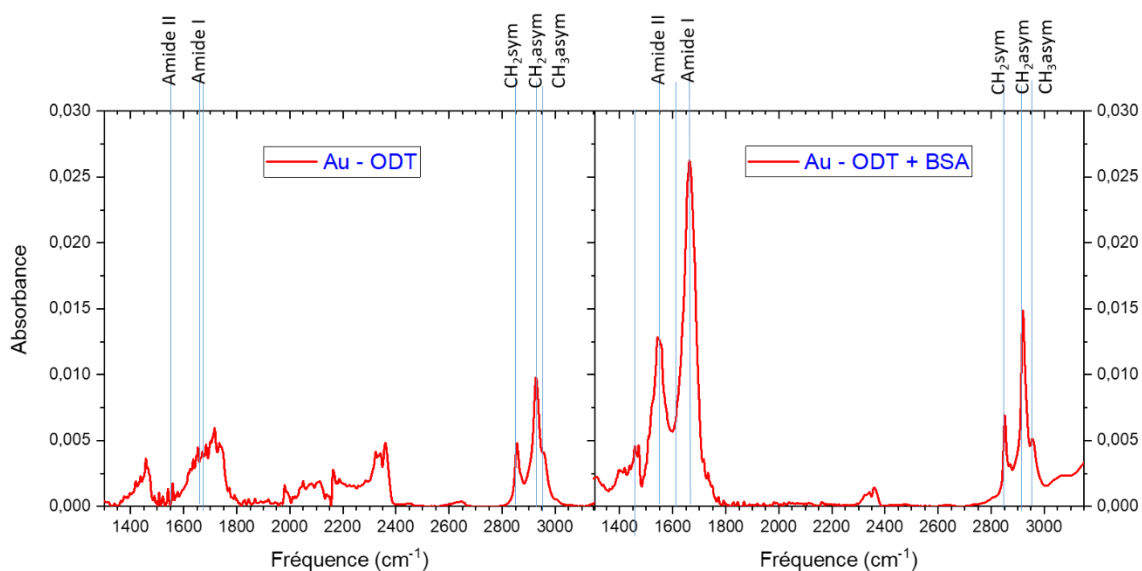


Figure 63 : spectres FTIR-RAIRS d'une monocouche auto-assemblée d'ODT, avant (à gauche) et après (à droite) adsorption de BSA. Les bandes de CH₃ sont difficiles à observer sous celles de CH₂, qui sont beaucoup plus intenses (1 CH₃ pour 17 CH₂). L'adsorption de BSA se manifeste avant tout par l'apparition des bandes amide qui dominent le spectre, mais aussi par l'augmentation de l'intensité des bandes CH.

Les spectres FTIR-RAIRS (figure 63) montrent que l'adsorption de BSA sur une monocouche auto-assemblée d'ODT se traduit par l'apparition de bandes amide II et amide I intenses aux fréquences 1549 et 1664 cm⁻¹, respectivement. L'intensité de l'amide I est environ deux fois plus grande que celle de l'amide II, et que celle des bandes CH₂. Pour une protéine comme la BSA, on ne peut pas appliquer le modèle utilisé dans le cas de la dyade pour des hélices α pour déduire des informations sur l'orientation moyenne de la BSA, qu'il ne serait pas possible de définir pour une molécule aussi complexe. L'intensité des bandes CH, déjà forte sans BSA, est augmentée par l'adsorption de BSA. On distingue essentiellement les bandes de CH₂ symétrique et asymétrique, qui dominent le spectre, mais aussi un épaulement

correspondant à CH₃ asymétrique, les autres modes CH₃ étant probablement présents, mais cachés par les bandes CH₂ [2].

3.2 Spectres SFG dans la région des bandes CH

Les spectres dans la région des CH sont très semblables à ceux déjà publiés par notre groupe de recherche [21, 22] (figures 63 (ODT auto-assemblé sur l'or) et 64 (BSA adsorbée sur la SAM d'ODT - Au)). Les bandes de CH₃ sont fortes, tandis que celles de CH₂, très intenses dans les spectres RAIRS, sont quasiment indétectables en SFG, ce qui est quantitativement expliqué par la conformation et l'orientation des molécules [2]. On remarque que les bandes de CH₃, symétrique et résonance de Fermi, sont légèrement plus intenses en présence de BSA, ce qui a été interprété comme une légère rotation des groupements méthyle permettant d'optimiser les interactions hydrophobes avec la BSA [21, 22], plutôt que comme la signature des CH₃ présents dans la BSA, qui ne donnent probablement lieu à aucun signal SFG en raison de leur distribution spatiale non ordonnée (le fait qu'il n'y ait aucun signal des modes CH₂ va dans ce

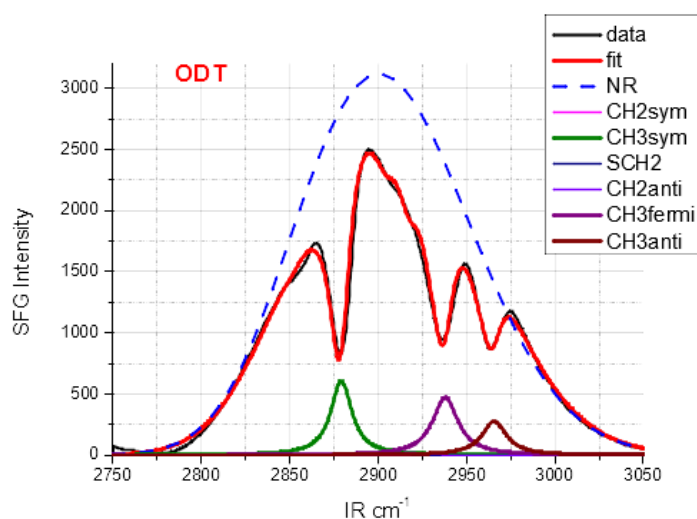


Figure 63 : spectre SFG de l'ODT auto-assemblé sur l'or dans la région des CH, montrant l'absence des bandes correspondant aux 17 CH₂ et la présence exclusive de la bande de l'unique groupement CH₃.

sens). Il faut noter que ces bandes du groupe CH₃ de l'ODT fournissent un point de comparaison important avec les autres molécules étudiées dans ce travail, montrant qu'un méthyle par site de la surface d'or, bien orienté et avec un degré d'ordre quasi parfait de la monocouche auto-assemblée, conduit à des bandes intenses.

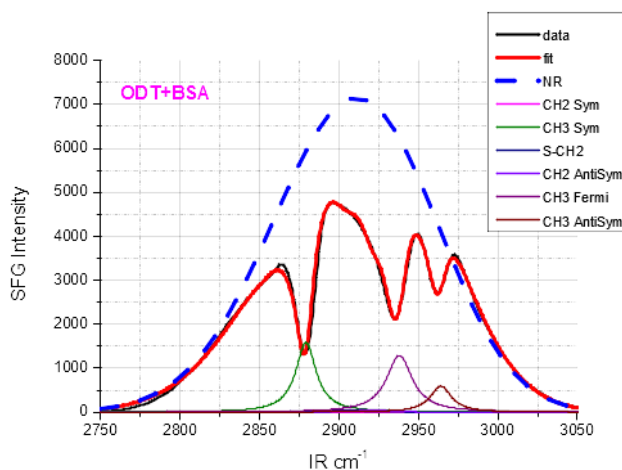


Figure 64 : même spectre que sur la figure 63, en présence de BSA. Seules les intensités relatives des bandes varient très légèrement par adsorption de BSA (bande asymétrique comparativement moins intense – ce changement des intensités relatives a été analysé dans la thèse d'Emilie Bulard [21, 22]).

3.3 Spectres SFG dans la région des bandes amide

Les bandes amide sont clairement présentes dans le spectre SFG de BSA sur SAM d'ODT – Au (figure 65). Les fréquences sont en accord avec celles des spectres IR. Contrairement au cas de la dyade, les intensités relatives amide I / amide II (rapport de 0.9) sont assez proches des intensités observées par absorption IR. Leur faible intensité est sans doute liée à des effets d'interférence destructive entre les contributions des différentes parties de la BSA qui contribuent au spectre. La BSA est constituée majoritairement d'hélices α (figure 66). La grande différence avec la dyade est que ces hélices ne sont pas ordonnées par la surface comme le sont les chaînes peptidiques dans le cas de la dyade.

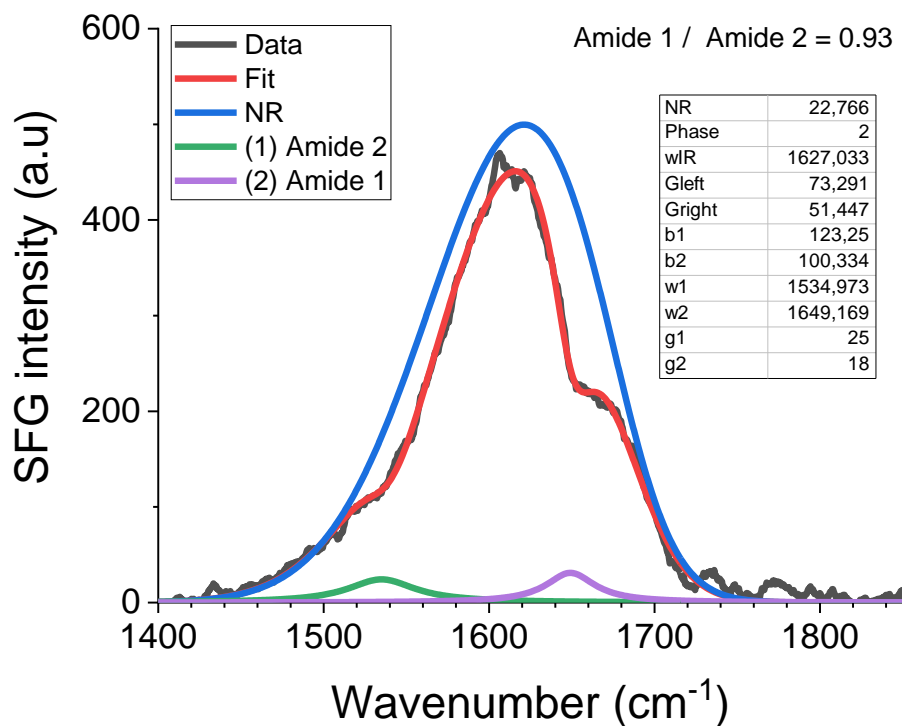


Figure 65 : spectre SFG de BSA adsorbée sur ODT / Au. Le rapport amide I / amide II est de 0.93.

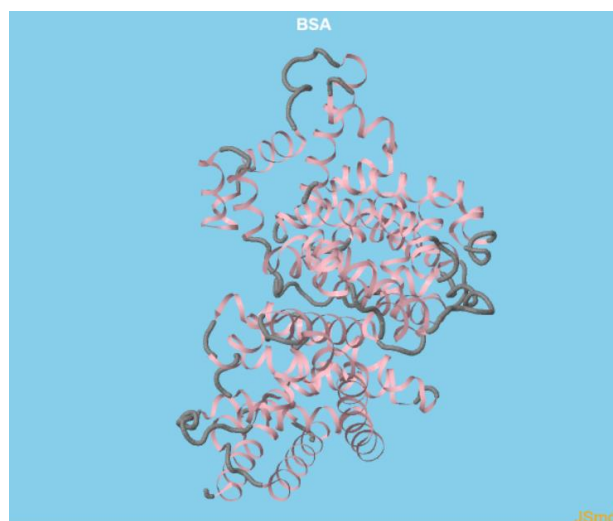


Figure 66 : structure tridimensionnelle de la BSA. En rose : les hélices α . En gris : les brins de structure aléatoire [<http://biochimej.univ-angers.fr/> puis Travaux dirigés > 1. Structure des macromolécules > 11. Albumine de sérum bovin]

ou : [<https://www.rcsb.org/3d-view/3V03?preset=validationReport>].

Dimensions : ellipsoïde de $140 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$.

3.4 Adhésion de bactéries sur BSA – ODT-Au

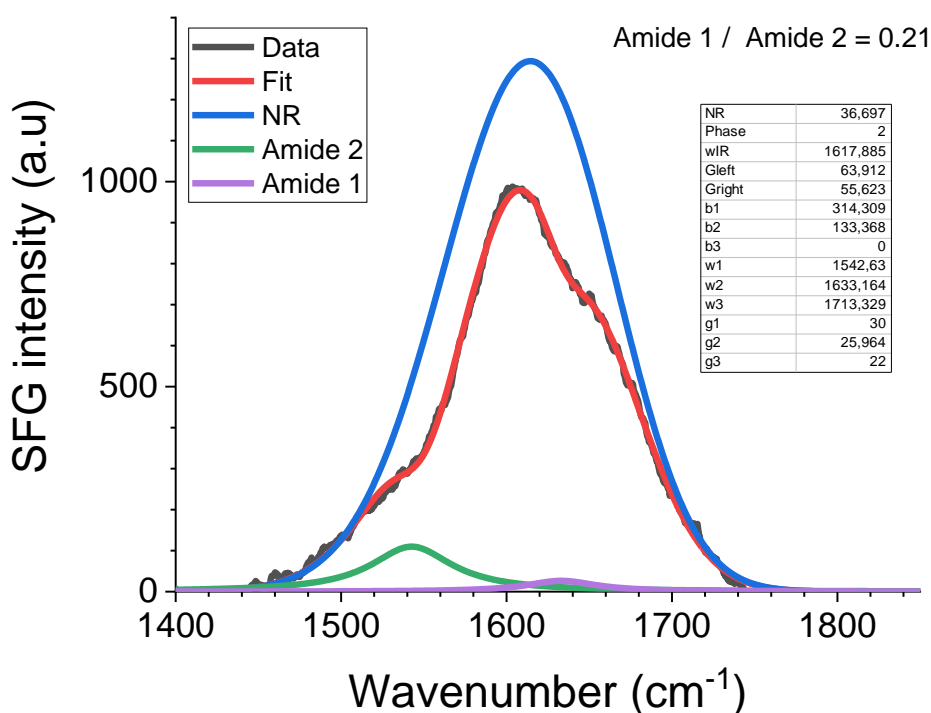


Figure 67 : spectre SFG de BSA adsorbée sur ODT / Au en présence de bactéries. Le rapport amide I / amide II est de 0.21 seulement.

Dans l'étude déjà réalisée par notre groupe de recherche sur l'adsorption de bactéries sur ODT et ODT+BSA, seule la région des bandes CH avait été sondée par SFG. De même que la couche d'ODT est légèrement et mesurablement affectée par la présence de BSA [21], elle l'est également lorsque des bactéries adhèrent à l'ODT [21], ainsi qu'à une couche de BSA pré-adsorbée [22]. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de voir si les bandes amide de la BSA, en interaction plus directe avec les bactéries que la couche d'ODT, seraient sensibles à la présence des bactéries. La réponse expérimentale est que l'intensité de la bande amide I diminue très fortement en présence des bactéries. Le ratio amide I / amide II est très nettement plus faible en présence des bactéries, au point que l'intensité de la bande amide II devient environ 5 fois plus intense que celle de l'amide I (figure 67). Le fait que l'adhésion des bactéries modifie à ce

point le spectre montre que l'ensemble des fonctions amide sondées par SFG est impliqué dans l'interaction avec les bactéries. Cette observation renvoie à celle faite par le groupe de Chen que des peptides anti-microbiens se couchent au contact des bactéries, ce qui semble déclencher leur activité bactéricide [19]. Dans le cas présent, la BSA n'est pas une simple hélice α , mais sa structure tridimensionnelle est constituée majoritairement d'hélices α (figure 66). On est ainsi amené à interpréter l'évolution du spectre SFG consécutif à l'adhésion des bactéries comme indiquant que l'effet observé par Chen sur les peptides se produit aussi dans le cas de la BSA, à savoir que les hélices α se coucheraient sur la surface sous l'effet de l'interaction avec les bactéries, dénaturant la structure tertiaire de la BSA. Cela permet aussi de comprendre pourquoi la couche d'ODT est sensible à l'adhésion bactérienne sur la BSA [22] : si les hélices de la BSA se couchent, alors l'interaction avec l'ODT sous-jacent est aussi affectée.

4. Spectres SFG de MUA[25]-[nisine]

La nisine Z est un peptide ayant des propriétés antibiotiques, constitué d'un squelette de 32 groupes amide (figure 68). Comme tous les peptides, elle est terminée d'un côté par un groupe NH_2 et de l'autre par un groupe acide COOH (figures 69). Les propriétés antibiotiques de la nisine adsorbée se manifestent quand il est ancré sur la surface par le groupement NH , laissant les bactéries s'ancrer sur la fonction acide. Le squelette peptidique de la nisine forme deux cycles. C'est au niveau de l'un de ces cycles que se situe l'effet anti-bactérien. La nisine ne contient pas d'hélice. L'auto-assemblage de molécules de MUA (acide mercapto 1 décanoïque) après « activation » permet l'ancrage du peptide sur les groupements terminaux des molécules auto-assemblées. L'une des motivations de ce travail est d'obtenir une couche d'ancrage mieux ordonnée par dilution par un facteur surfacique 4 (linéaire 2) des molécules de MUA par des molécules plus courtes de thio-hexanol, permettant de limiter la gêne stérique

au niveau des groupements terminaux et de la nisine. Le but des expériences de SFG est donc de comparer le degré d'ordre des couches de MUA et de MUA activé pour le greffage de la nisine, en comparaison des couches diluées « MUA 25 » et « MUA 25 activé ». Par contre, la bactérie

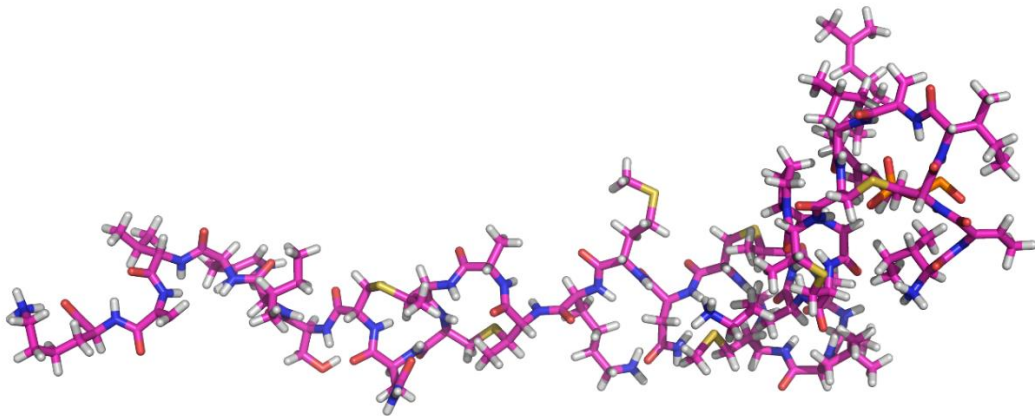


Figure 68 : structure 3D de la nisine Z

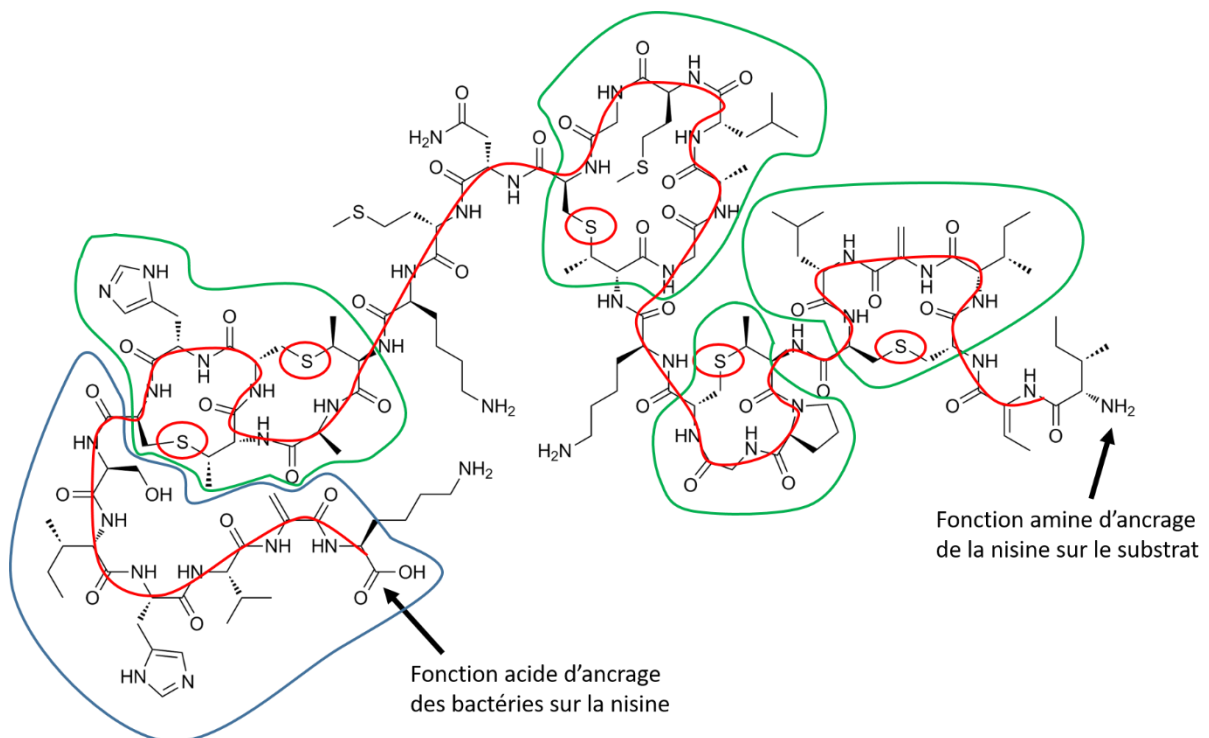


Figure 69 : structure dépliée de la nisine Z : en rouge la chaîne peptidique, en vert les cycles, en rouge les ponts sulfure, en bleu la région d'interaction (bactéricide) avec la membrane des bactéries.

étudiée (*staphylococcus aureus*) est trop dangereuse pour être introduite dans notre montage SFG, et nous n'avons donc pas pu enregistrer de spectre SFG analogue à celui de *lactococcus lactis* sur film de BSA.

Nos expériences sur les propriétés anti-adhésion et anti-bactériennes de la nisine greffée sur des substrats sont détaillées dans le chapitre 4. Dans ce chapitre, nous nous concentrons uniquement sur les spectres SFG. La figure 70 montre les spectres de SFG dans la région des CH, de MUA [26] avant et après activation, et après greffage de la nisine. MUA est une chaîne alkyle qui ne comporte pas de groupement CH₃, donc, si les chaînes étaient parfaitement ordonnées par l'auto-assemblage, elle ne devrait donner lieu à aucun signal SFG dans cette région. En fait on observe exactement l'inverse de l'octadécane-thiol (figures 63, 64) : les bandes CH₃, seules présentes dans le spectre de l'ODT, sont bien absentes, alors que les bandes CH₂, absentes du spectre de l'ODT, sont présentes, ce qui indique un certain degré de désordre. La comparaison de MUA [activé] avec MUA 25 [activé] montre que l'intensité des bandes est plus faible pour MUA 25 [activé], indiquant que le degré d'ordre est meilleur pour MUA 25 [activé], ce qui montre que la démarche d'améliorer l'ordre de l'auto-assemblage a atteint son but, sans toutefois permettre d'atteindre une couche aussi ordonnée que celle de l'ODT. Il est connu que l'ordre est en général meilleur lorsque la chaîne alkyle est plus longue, car le gain énergétique permis par l'auto-assemblage est proportionnel aux interactions de van der Waals tout au long de la chaîne, et donc à la longueur de la chaîne : il est donc possible que la dilution d'un quart soit optimale, car même optimale, un degré de désordre peut subsister dans la couche de MUA du fait de la longueur relativement courte des chaînes (10 CH₂ contre 17 pour l'ODT).

Le greffage de la nisine provoque l'apparition des bandes de CH₃ dans le spectre SFG. La nisine comporte une vingtaine de groupes CH₂ et à peu près autant de groupes CH₃, qui peuvent contribuer au spectre SFG. La distribution spatiale des moments de transition est

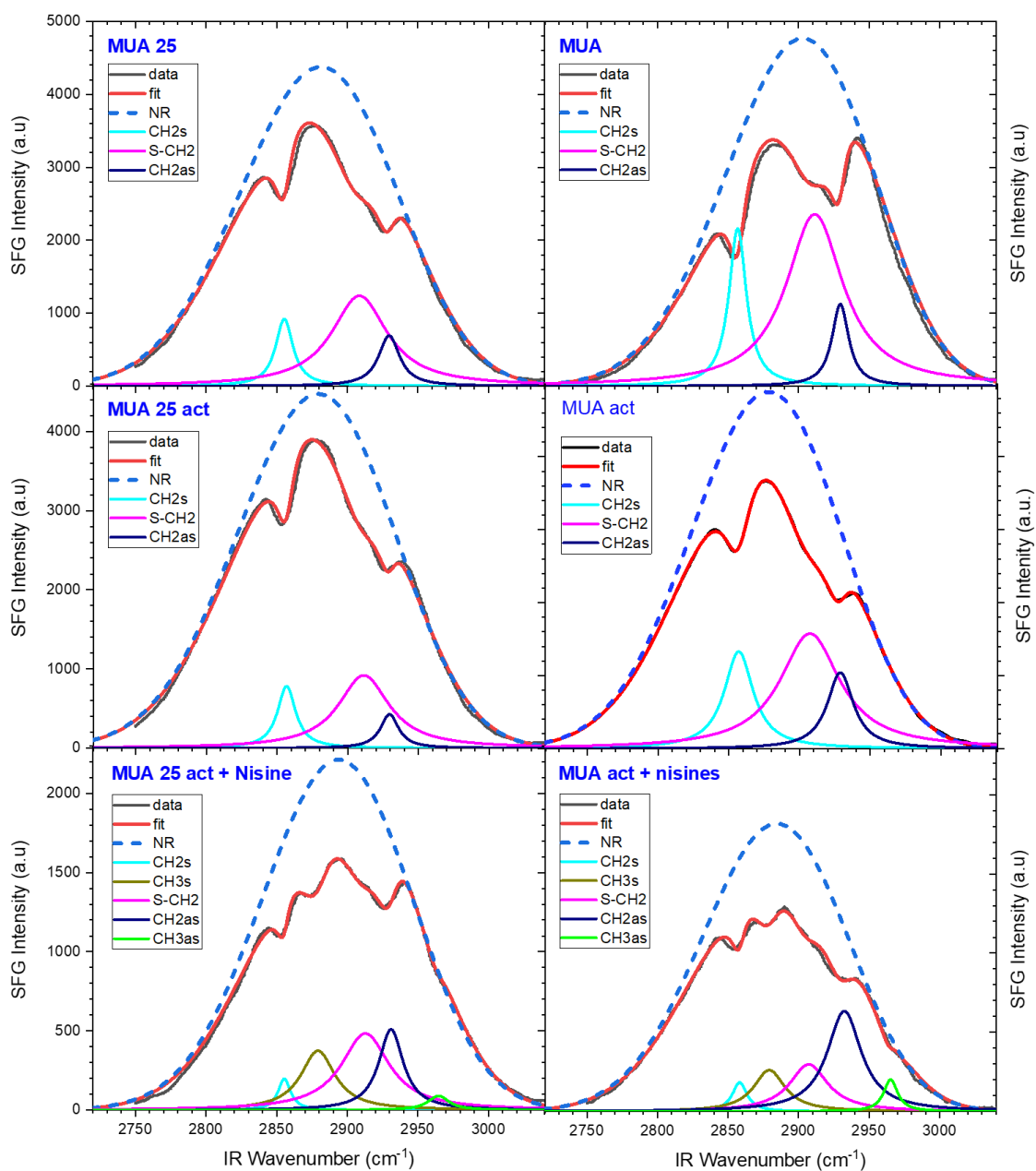


Figure 70 : spectres de SFG dans la région des CH de MUA[25] après auto-assemblage, après activation en vue du greffage, et après greffage de la nisine.

certainement très large au vu de la structure 3D complexe de la nisine (figure 68). Cependant, comme la nisine est nettement plus petite que la BSA, il n'y a pas assez de groupes CH₃ et CH₂ pour atteindre une distribution d'orientation complètement isotrope, et on observe donc leurs

bandes de vibration avec une faible intensité. On peut noter aussi que la bande de vibration de CH₂ asymétrique, plus faible que celle de CH₂ symétrique pour MUA [25], activé ou non, devient plus intense après adsorption de la nisine : ceci indique que les CH₂ se trouvent préférentiellement inclinés par rapport au plan de la surface par rotation autour de l'axe de symétrie de CH₂ (avec les liaisons CH au-dessus l'une de l'autre), mais la complexité de la molécule ne nous permet pas d'en tirer de conclusion.

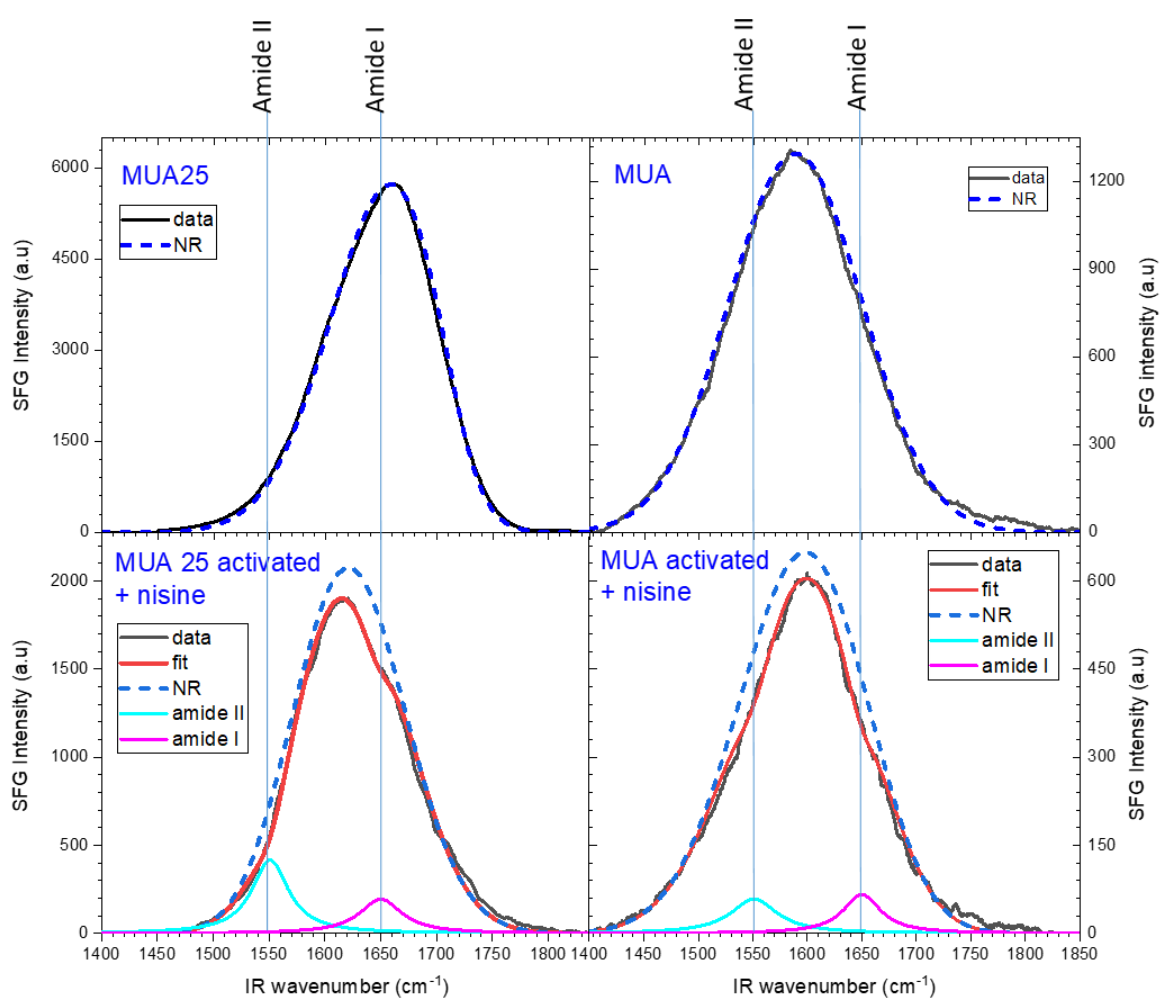


Figure 71 : spectres de SFG dans la région des bandes amide de MUA[25] après auto-assemblage et après greffage de la nisine. Voir page 115 les paramètres fittés des lorentziennes.

Dans la région des bandes amide, le point essentiel est la très faible intensité des bandes (figure 71). Elles sont bien présentes, et plus intenses dans le cas de MUA 25, ce qui va dans le sens espéré, que l'amélioration de l'ordre de la couche de MUA activé par dilution permette d'adsorber davantage de molécules. Le ratio amide I / amide II est voisin de 1 dans le cas non dilué, voisin de 0.5 dans le cas dilué à 25%, mais avec une grande incertitude. En tout cas, on est loin du cas du groupement amide isolé dans une chaîne alkyle (C_{60} – alkyle), ou de la BSA couverte de bactéries, où le ratio est très faible, et du cas des hélices auto-assemblées (C_{60} – peptide et N_3 peptide), où le ratio est très grand. On rejoint le cas de la BSA, dans lequel l'adsorption de la molécule biologique ne dénature pas complètement la structure ternaire, la nisine n'étant pas liée directement à la surface, mais à la couche d'assemblage par une liaison covalente, et les cycles présents dans la chaîne peptidique l'empêchant certainement de s'auto-assembler, contrairement aux petites chaînes peptidiques C_{60} – peptide et N_3 peptide. Dans ces conditions, le ratio amide I / amide II est régi par la distribution d'orientation « naturelle » de leurs moments de transition dans la nisine, comme pour la BSA.

5. Conclusions au chapitre 3

Nous avons étudié par SFG plusieurs types de molécules auto-assemblées sur une surface d'or :

- une molécule comportant une fonction amide unique insérée dans une chaîne alkyle (C_{60} – alkyle).
- deux molécules comportant une courte chaîne de 7 peptides (C_{60} – peptide et N_3 peptide).

- un peptide, la nisine, greffée sur un film de MUA préalablement activé pour adsorber spécifiquement la nisine par son extrémité « azote » afin d'exposer son extrémité « carbone » à des bactéries.
- une protéine, la BSA, adsorbée sur un film très ordonné hydrophobe.
- la BSA a été exposée à *Lactococcus lactis* et la nisine à *Staphylococcus aureus* (mais, pour des raisons de sécurité, le spectre SFG en présence de *Staphylococcus aureus* n'a pas pu être mesuré).

Dans tous les cas, la spectroscopie SFG des bandes amide permet de tirer des conclusions que la spectroscopie RAIRS ne permet pas d'obtenir concernant l'ordre, la conformation et l'orientation des molécules.

L'une des questions posées au début de cette étude concernait l'exploitation de la bande amide II en SFG. Nous avons observé que les intensités relatives des bandes amide I et amide II sont différentes de celles obtenues par RAIRS et sont très sensibles à la nature des molécules biologiques et à leur degré d'ordre et d'orientation par rapport à la surface. Une interprétation qualitative de la conformation et de l'orientation peut être obtenue dans tous les cas. La bande amide I est de loin la plus intense dans le cas des peptides auto-assemblés, à la fois pour une question d'orientation des chaînes et du fait d'une faible hyperpolarisabilité intrinsèque de la bande amide II dans le cas des hélices α (due à la distribution d'orientation des moments de transition de la bande amide II autour de l'axe de l'hélice). La bande amide II est la plus intense dans le cas où une unique fonction amide est insérée dans une chaîne alkyle auto-assemblée (l'explication étant la conformation bien étirée de la chaîne), et dans celui où la BSA exposée à des bactéries, qui semble dénaturée par l'interaction avec les bactéries, ses hélices α se couchant sur la surface, conduisant à une intensité très faible de la bande amide I. Enfin, lorsque la conformation des molécules biologiques n'est pas trop fortement contrainte (par l'auto-assemblage, l'interaction avec des bactéries, etc) le rapport d'intensité amide I / amide II est

voisin de 1 (cas de la BSA adsorbée sans interagir avec des bactéries ou de la nisine greffée).

Les tables III et IV résument ces résultats.

	Page	Amide I					Amide II			
		A_{NR}	ω_1	Γ_1	A_1	$A_1^2/\Gamma_1/A_{NR}^2$	ω_2	Γ_2	A_2	$A_2^2/\Gamma_2/A_{NR}^2$
C60-alkyle	96	46.1	1650	8.5	11.9	0.0078	1541	25	281	1.49
C60-peptide	96	40	1646	26	156	0.59	1560	16	15	0.0088
N3-peptides	96	22.4	1662	24	108	0.97	1560	17	15	0.026
BSA	106	22.8	1649	25	123	1.16	1535	18	100	1.07
BSA + bactéries	107	36.7	1633	26	133	0.51	1543	30	314	2.44
MUA	112				0				0	
MUA25	112				0				0	
MUA + nisine	112	26	1650	21	55	0.21	1552	26	63	0.23
MUA25 + nisine	112	48	1653	22	102	0.21	1552	21	129	0.34

*Paramètres ajustés avec la formule de la page 55 : fréquence ω_i , largeur Γ_i , amplitude de la lorentzienne A_i , amplitude de la contribution non-résonnante A_{NR} , aire de la lorentzienne normalisée à la réponse non résonnante $A_i^2/\Gamma_i/A_{NR}^2$
Phase de la contribution non-résonnante (identique pour tous les spectres, déterminée par un fit exploratoire de plusieurs spectres simultanément) : 2.0 rad*

Table III : paramètres des lorentziennes décrivant les bandes amide I et II des différents échantillons

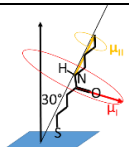
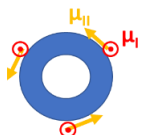
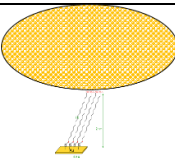
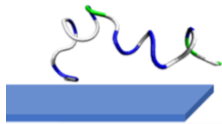
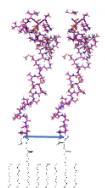
	Molécule	Spécificité	Rapport amide I / amide II	Interprétation
	« C ₆₀ – alkyle »	Auto-assemblage de chaînes alkyle	0.006	Effet d'orientation d'une chaîne étirée dans le plan vertical
	« C ₆₀ – peptide » et « N ₃ peptide »	Auto-assemblage d'hélices	45 et 22	Effet de géométrie de l'hélice
	Protéine BSA sur SAM d'ODT	Adsorption par interaction hydrophobe	0.93	Protéine en interaction faible avec la surface
	Bactéries sur BSA sur SAM d'ODT	Interaction forte avec les bactéries, faible avec la surface	0.21	Dénaturation de la protéine par la bactérie : les hélices se couchent
	Nisine sur MUA[25] activé	Ancreage spécifique Peptide polycyclique sans hélice	1 [0.5]	Peptide en interaction faible avec la surface

Table IV : rapport des intensités SFG amide I / amide II observées pour les différents types de molécules étudiées

Perspectives

Il serait possible d'exploiter plus quantitativement les spectres, à condition de réaliser des simulations basées sur des calculs de chimie quantique complets (structure atomique, modes de vibration, hyperpolarisabilité, orientation à la surface). C'est ce que notre groupe de recherche a réalisé dans le cas beaucoup plus simple de chaînes de thio-alcanes auto-assemblées, avec une approche de modes de vibration locaux [2]. Dans le cas des amides, une approche de modes propres est nécessaire en raison des très forts couplages entre modes locaux, notamment le long des hélices α . Les calculs nécessaires sont donc très lourds.

Nous avons obtenu des intensités SFG faibles dans tous les cas, conduisant à des barres d'erreur importantes sur les intensités. Il est probable qu'on peut améliorer l'intensité du signal et le rapport signal sur bruit, car notre OPA, en bout de course à 1550 cm^{-1} , a limité notre agilité spectrale dans les expériences. Une nouvelle chaîne laser en cours d'achat donnera plus d'intensité aux fréquences des bandes amide, ainsi qu'une amélioration du rapport signal sur bruit par une stabilité pulse à pulse améliorée et grâce à un taux de répétition des impulsions laser plus grand. La mise en forme des impulsions visibles par Fabry-Perot, que nous n'avons pas pu utiliser à cause du signal vibrationnel trop faible, qui permet de s'affranchir du fond non résonnant, trop grand dans le cas présent, sera possible avec le signal plus intense qui est attendu avec notre nouvelle chaîne laser.

Malgré ces difficultés instrumentales (auxquelles s'ajoute la très forte contrainte de devoir purger toute l'installation optique), ce travail exploratoire met en évidence le potentiel de la SFG en spectroscopie des bandes amide pour comprendre la conformation et l'orientation de systèmes (bio)moléculaires très complexes, notamment en donnant du sens à la comparaison des intensités des bandes amide I et II.

REFERENCES AU CHAPITRE 3

- [1] A. Barth, « Infrared spectroscopy of proteins », *Biochimica et Biophysica Acta* 1767 (2007) 1073–1101.
- [2] B. Bourguignon, W. Zheng, S. Carrez, A. Ouvrard, F. Fournier, and H. Dubost, “Deriving the complete molecular conformation of self-assembled alkanethiol molecules from sum-frequency generation vibrational spectra,” *Phys. Rev. B* 79, 1–12 (2009).
- [3] J. M. Kaplan, J. Shang, P. Gobbo, S. Antonello, L. Armelao, V. Chatare, D. M. Ratner, R. B. Andrade, and F. Maran, “Conformationally Constrained Functional Peptide Monolayers for the Controlled Display of Bioactive Carbohydrate Ligands”, *Langmuir* 29, 8187–8192 (2013) et références incluses.
- [4] Wen, X.; Linton, R.W.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Samulski, E. T., “Self-Assembled Monolayers of Hexapeptides on Gold: Surface Characterization and Orientation Distribution Analysis”, *J. Phys. Chem. A* 108, 9673-9681 (2004),
- [5] M. J. Tsuboi, *Polym. Sci.* 59, 139 (1965).
- [6] https://fr.wikipedia.org/wiki/Hélice_alpha
- [7] P. Lewis, A.T. Lewis, P.D. Lewis, “Prediction of glycoprotein secondary structure using ATR-FTIR”, *Vibrational Spectroscopy* 69, 21-29 (2013).
- [8] Y. N. Chirgadze et coll. *Biopolymers* 14, 679-694 (1975).
- [9] S. Hosseinpour, S. J. Roeters, M. Bonn, W. Peukert, S. Woutersen, T. Weidner, “Structure and Dynamics of Interfacial Peptides and Proteins from Vibrational Sum-Frequency Generation Spectroscopy”, *Chem. Rev.* 120, 3420–3465 (2020).
- [10] Michael T. L. Casford,[‡] Aimin Ge,[†] Peter J. N. Kett,[‡] Shen Ye,^{*,†} and Paul B. Davies, “The structure of Lipid Bilayers Adsorbed on Activated Carboxy-Terminated Monolayers

Investigated by Sum Frequency Generation Spectroscopy”, *J. Phys. Chem. B* 118, 3335–3345 (2014).

[11] P. J. N. Kett, M. T. L. Casford, P. B. Davies, “Sum frequency generation vibrational spectroscopy of cholesterol in hybrid bilayer membranes”, *J. Phys. Chem. B* 117, 6455-6465 (2013).

[12] Xiaoyun Chen, Jie Wang, Jason J. Sniadecki, Mark A. Even, and Zhan Chen, “Probing α -Helical and β -Sheet Structures of Peptides at Solid/Liquid Interfaces with SFG”, *Langmuir* 21, 2662-2664 (2005).

[13] Xiaoyun Chen, Jie Wang, Andrew P. Boughton, Cornelius B. Kristalyn, Zhan Chen, “Multiple Orientation of Melittin inside a Single Lipid Bilayer Determined by Combined Vibrational Spectroscopic Studies”, *JACS* 129, 1420-1427 (2007).

[14] S. Ye, K. T. Nguyen, A. P. Boughton, C. M. Mello, Z. Chen, “Orientation Difference of Chemically Immobilized and Physically Adsorbed Biological Molecules on Polymers Detected at the Solid/Liquid Interfaces in Situ”, *Langmuir* 26, 6471–6477 (2010).

[15] X. Han, Y. Liu, F.-G. Wu, J. Jansensky, T. Kim, Z Wang, C. L. Brooks, III, J. Wu, C. Xi, C. M. Mello, Z. Chen, “Different Interfacial Behaviors of Peptides Chemically Immobilized on Surfaces with Different Linker Lengths and via Different Termini”, *J. Phys. Chem. B* 118, 2904 – 2912 (2014).

[16] Z. Wang, X. Han, N. He, Z. Chen, C. L. Brooks, III, “Environmental Effect on Surface Immobilized Biological Molecules”, *J. Phys. Chem. B* 118, 12176 – 12185 (2014).

[17] Y. Li, S. Wei, J. Wu, J. Jasensky, C. Xi, H. Li, Y. Xu, Q. Wang, E. Neil, G. Marsh, C. L. Brooks, III, Z. Chen, “Effects of Peptide Immobilization Sites on the Structure and Activity of Surface-Tethered Antimicrobial Peptides”, *J. Phys. Chem. C* 119, 7146 – 7155 (2015).

- [18] X. Han, J. Zheng, F. Lin, K. Kuroda, Z. Chen, “Interactions between Surface-Immobilized Antimicrobial Peptides and Model Bacterial Cell Membranes”, *Langmuir* 34, 512 – 520 (2018).
- [19] M. Xiao, J. Jasensky, L. Foster, K. Kuroda, Z. Chen, “Monitoring Antimicrobial Mechanisms of Surface-Immobilized Peptides in Situ”, *Langmuir* 34, 2057 – 2062 (2018).
- [20] H. Nasrallah, J. Rabah, V. Bui-Thi-Tuyet, K. Baczko, H. Fensterbank, F. Bourdreux, A.-M. Goncalves, V. Declerck, S. Boujday, V. Humblot, K. Wright, A. Vallée, E. Allard, “A fullerene helical peptide: synthesis, characterization and formation of self-assembled monolayers on gold surfaces”, *New J. Chem.* 42 (2018) 19423—19432. DOI: 10.1039/c8nj04599b.
- [21] E. Bulard, Z. Guo, W. Zheng, H. Dubost, M.-P. Fontaine-Aupart, M.-N. Bellon-Fontaine, J.-M. Herry, R. Briandet, B. Bourguignon, “Non-Invasive Vibrational SFG Spectroscopy Reveals That Bacterial Adhesion Can Alter the Conformation of Grafted ‘Brush’ Chains on SAM” *Langmuir* 27 (2011) 4928–4935. dx.doi.org/10.1021/la200205e.
- [22] E. Bulard, M.-P. Fontaine-Aupart, H. Dubost, W. Zheng, M.-N. Bellon-Fontaine, J.-M. Herry, B. Bourguignon, “Competition of Bovine Serum Albumin Adsorption and Bacterial Adhesion onto Surface-Grafted ODT: In Situ Study by Vibrational SFG and Fluorescence Confocal Microscopy”, *Langmuir* 28, 17001-17010 (2012). dx.doi.org/10.1021/la302976u.

Chapitre 4

Antibacterial activity of nisin Z covalently linked to functionalized surfaces: a multimodal spectroscopy study.

Pascal Thébault^{*1}, Mohamad Ammoun², Rym Boudjema², Aimeric Ouvrard², Karine Steenkeste², Bernard Bourguignon², Marie-Pierre Fontaine-Aupart²

¹ Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, PBS, 76000, Rouen, France

² Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, 91405, Orsay, France

KEYWORDS: Antimicrobial peptides, antibacterial surfaces, XPS, SHG, confocal microscopy

ABSTRACT: One of the main challenges when building antibacterial surfaces with antimicrobial peptides (AMPs) is to preserve their antimicrobial activity after stable immobilization of the peptides. Herein we report the covalent immobilization of the Nisin Z peptide on a gold surface functionalized with a self-assembled monolayer of 11-mercaptopundecanoic acid (MUA) alone or mixed with 6-mercaptohexanol, used as a spacer between MUA molecules. The MUA acid is activated by treatment with carbodiimide/N-hydroxysuccinimidine and then reacts with Nisin Z to form amide bonds via the N terminal part of the peptide. We have characterized each step of the surface modification using X-ray photoelectron spectroscopy, FITR-ATR spectroscopy, vibrational spectroscopy by sum frequency generation (SFG) and contact angle measurements. The combined results show the success of each functionalization step. Additionally, SFG brings information on the orientation and conformational ordering of the grafted Nisin Z peptides. The antibacterial activity of the immobilized AMPs against *Staphylococcus aureus* is evaluated using confocal microscopy and bacterial counting: it increases with a better order of the surface rather than a greater peptide concentration. This study provides fundamental insights on how to engineer AMPs and substrate to produce efficient biocidal surfaces.

1. INTRODUCTION

The colonization of the surface of materials by bacteria (microbial contamination) is a real plague for public health (nosocomial infections, chronic wounds, rejection of implants ...), food industry (alterations and poisoning of foodstuffs), cosmetics (product degradation causing skin problems for the consumer) or industrial sector (biocorrosion phenomena, occlusions of cooling circuits ...) (1).

It is now accepted that for any microorganism, life in a fixed form (called sessile) is favored over a suspended lifestyle (called planktonic). In most cases, this results in the formation of a biofilm that allows the bacteria to persist and even to resist in an unfavorable environment (2). This "way of life" (sessile state) has been shown to make bacteria up to 1000 times less sensitive to antibiotic or other bactericidal treatments than their planktonic counterparts (3), making the

fight against bacterial contamination of surfaces very problematic. In this context, prevention seems preferable to any treatment. The best approach may rely on new surface coatings that resist or prevent adhesion of bacteria and/or their growth to form biofilms.

Bacterial adhesion on surfaces strongly depends on the physico-chemical properties of both the microorganisms and the substrate. The surface of bacteria are amphiphilic while they are globally negatively charged. Therefore a common approach relies on the development of highly hydrophobic or negatively charged surfaces to preclude the adhesion of bacteria and /or their growth (4–6). However, microorganisms will inevitably adhere to some extent to these coatings due in particular to the micro-heterogeneity of positive charges on the bacteria surface (7) and surprisingly, despite a slower initial adhesion, surface growth of the adhering bacteria may be higher (8). Another strategy is the immobilization of active biocides (quaternary ammoniums, antibiotics, metal salts, metallic nanoparticles...) on the surfaces to promote bacterial killing (9,10). This approach also presents some drawbacks, especially because antibacterial agents with high potential toxicity can be released and contribute to environmental pollution and to the emergence of multi-resistant bacterial strains. Such a situation has required to consider new biocidal candidates displaying anti-adhesive and/or antibacterial properties with low toxicity as well as surface coating strategies for long term biocidal stability.

In this sense, developing surfaces using a covalent binding process of antimicrobial peptides (AMPs) appears very attractive (11–17). Compared to antibiotics, some AMPs offer the advantages of having a broad spectrum of activity, of not promoting bacterial resistance and of being active at very low concentrations (10,18). Otherwise, covalent immobilization of AMPs is reported to limit their release, which avoids the drawbacks mentioned above. However, the antimicrobial activity of covalently immobilized AMPs onto surfaces is generally lower than that of their soluble counterparts (10). Reported studies have highlighted that it depends on peptide surface concentration, length and flexibility of the spacer that binds the AMP to the surface, peptide orientation, etc.. These parameters must be mastered to obtain reproducible and effective surface coatings.

We are interested in developing such biocidal surfaces against *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), one of the most frequent agents of biofilm-related infections in medical and food environments and one of the most critical multidrug-resistant bacteria (19). In this context, the covalent immobilization of the AMP nisin Z onto surfaces may be a promising strategy to create materials with friendly environmental and health impact. Nisin Z, produced by Lactic acid bacteria, is the only one peptide recognized as safe by the U.S. Food and Drug Administration (20). Its antimicrobial activity in the nanomolar-range, its lack of toxicity for humans and its

resistance to thermal treatments lead to its massive use in food industry as a preservative against Gram-positive bacteria including *S. aureus* (10,21). However, the antibacterial activity of the immobilized AMP on surfaces was not fully understood.

In this study, we used two different self-assembled monolayers (SAMs) as spacer to immobilize the nisin Z peptide on a gold model surface in order to study the role of the density and orientation of the grafted AMPs on their antibacterial activity. For this purpose, we combined various characterization techniques, e.g., X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) to obtain chemical information on the surfaces, contact angle measurements to control the uniformity of the surfaces and their hydrophobicity, sum frequency generation (SFG) vibrational spectroscopy supplemented by Fourier Transform Infra-Red attenuated total reflection spectroscopy (FTIR-ATR), to obtain information on the orientation and conformational ordering of the grafted peptides. Then the antibacterial efficiency of these AMP surfaces against *S. aureus* was evaluated through fluorescence confocal microscopy and bacteria count and discussed on the basis of the physicochemical properties of nisinZ and informations from surface characterization techniques. Overall, we can propose a nanometric view of the interaction between grafted peptides and bacteria and a subsequent mode of action different from that in solution.

2. Materials and Methods

Materials

Mercaptoundecanoic acid (MUA, $C_{11}H_{22}O_2S$), mercaptohexanol (C_6OH), N-hydroxysuccinimide (NHS), absolute ethanol, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), Hydrochloric acid (HCl) and Phosphate buffer saline (PBS) tablets were purchased from Sigma-Aldrich. nisin Z was purchased from Anhui mimetals development (China). It was chosen because it is the only AMP authorized by the FDA and the WHO. nisin Z is a cyclic antibiotic of 34 amino acids (20,22–24), largely randomly coiled in aqueous solution (25). It differs from nisin A by the replacement of a histidine by an asparagine residue at position 27. , Because nisin Z contains only one histidine residue, it has a higher solubility at physiological pH (the pKa of His being ~6.5 in water). The stock solutions were prepared at 10 mg/ml in HCl 0,0001N. The gold surfaces (11x11 mm size, purchased from Arrandee (Germany)) are borosilicate glass substrates coated with layers of chromium and gold of thicknesses 2.5 ± 1.5 nm and 250 ± 50 nm respectively.

Surface preparation

The gold substrates were annealed in a butane flame to ensure a good crystallinity of the topmost layers and rinsed in a bath of absolute ethanol during 10 min. They were then dried under a flow of dry nitrogen before adsorption.

A schematic representation of the three steps followed to construct the AMP-functionalized surface is depicted in Figure 1. This process is specific for the AMP immobilization via an amine function, which is more efficient than via a carboxylic acid function (ref these Jean Baptiste). The first step is to immerse cleaned gold surfaces in absolute ethanol containing MUA (10 mM) or a binary mixture (25/75) of MUA (2.5 mM) and 6-mercaptohexanol (HS(CH₂)₆ OH) (7.5 mM). The latter is expected to insert between the MUA chains thus limiting the steric hindrance between their terminal acid functions. These substrates named Au-MUA and Au-MUA25 respectively were then (i) stirred on an orbital shaker during 3 h in order to ensure optimal homogeneity of the adlayer, (ii) thoroughly rinsed successively in an absolute ethanol and milliQ water baths on an orbital shaker during 10 min before (iii) drying under a flow of dry nitrogen.

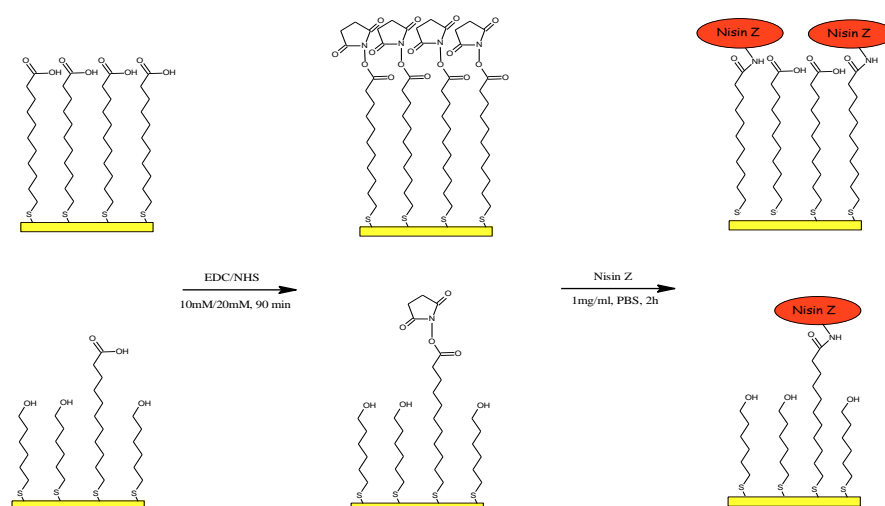


Figure 1: Schematic representation of the 3-steps adsorption process of nisin Z on Au-MUA or Au-MUA25 surfaces

The second step of activation of these surfaces was performed by immersion in a solution of EDC/NHS (10/20 mM) in milliQ water for 90 min at room temperature to convert the MUA carboxylic acid functions into NHS esters (Au-MUA_{act} and Au-MUA25_{act} surfaces), allowing the AMP attachment through an amide function. The EDC and NHS concentrations were chosen in order to prevent the formation of byproducts (26). The resulting succinimidyl ester-terminated surface was copiously rinsed in milliQ water baths on an orbital shaker during 10 min and dried under a flow of dry nitrogen. Finally, the third step of covalent immobilization of nisin Z (1 mg/ml in PBS, pH 7.4) on activated surfaces was carried out by depositing a 150

μl drop of nisin Z/PBS solution at room temperature during 2h. Then, Au-MUA-Nis and Au-MUA25-Nis substrates were successively rinsed in PBS and milliQ water baths on an orbital shaker during 10 min and dried under a flow of dry nitrogen. The pH was maintained at 7.4 so that the amine functions of the nisin Z, other than the terminal amide function, remained protonated. This prevents the AMP attachment to the surface via these amide functions and also allows maintaining reproducible conditions for the nisin Z grafting on the surfaces.

Surface characterization

XPS measurements

XPS measurements were carried out with a Thermo Electron K-Alpha Spectrometer using a monochromatic Al-K-Alpha X-ray source (1486.6 eV) with a spot size of 400 μm . The survey spectra were collected over a range of -10 to 1350 eV with a pass energy of 200 eV. The high resolution spectra over the C 1s, O 1s, S 2p, N 1s, Au 4f regions were acquired with a pass energy of 50 eV. The binding energy was referenced by setting the maximum C 1s peak at 285.0 eV. The deconvolution of peaks and the proportion of component composition from peak areas were performed using the CasaXPS software system.

FTIR-ATR measurements

FTIR-ATR measurements were obtained using a Brüker Vertex 70 FTIR spectrometer, equipped with an attenuated total reflection (ATR) accessory (PIKE MIRacle crystal plate diamond/ZnSe) and a mercury cadmium telluride (MCT) detector cooled down by liquid nitrogen. 100 spectra were accumulated over the spectral region 3100 to 1400 cm^{-1} with a spectral resolution of 4 cm^{-1} . The background was recorded (average of 100 scans) on the ATR unit without any substrate pressed against the crystal.

Sum Frequency generation (SFG) experiments

Our home-made “BB”-SFG setup (for Broad Band) was described in details previously (27). It uses tunable IR pulses (4 μJ /pulse, 120 fs pulse duration, and 150 cm^{-1} bandwidth) and “visible” pulses (806 nm, 2 μJ , adjustable duration and bandwidth 1-6 ps \equiv 15-2.5 cm^{-1} , the spectral resolution being determined by the visible laser bandwidth). The two laser beams were superimposed onto the substrates in a collinear co-propagating configuration at the incident angle of $\sim 66^\circ$ in p polarization for all SFG, visible and IR beams. The laser spot size on the sample surface was $\sim 100 \mu\text{m}$. After thorough rejection of light from the visible beam by dichroic filters, the beam emitted at the sum frequency was focused on the entrance slit of a spectrometer of resolution 0.4 cm^{-1} centered at $\approx 650 \text{ nm}$ or $\approx 714 \text{ nm}$ for detection of the CH and amide bands respectively, equipped with a cooled CCD camera. The SFG spectra were collected during 30 to 150 seconds to obtain an acceptable signal to noise ratio. SFG vibrational

spectra in ppp-polarizations were collected for all substrates in the air. Attempts to obtain SFG signal using other polarizations failed.

SFG vibrational spectra were recorded in two different spectral ranges: the 2800-3000 cm^{-1} range for analyzing CH_3 and CH_2 vibrational bands (in this case the IR pulse frequency was set at 3.45 μm) and the range 1500-1700 cm^{-1} for analyzing amide bands (in this case the IR pulse was set at $\approx 6.25 \mu\text{m}$). In this 1500-1700 cm^{-1} range, absorption by gas-phase water molecules is so strong that the IR laser is almost completely absorbed at the frequencies of the strongest absorption lines. Therefore, the set-up (IR laser cavity and all the optical path to the sample) was purged by dry air one night in advance and the key optical mounts were motorized for last minute adjustments. In addition, an airlock was used for sample introduction allowing to install samples with minimal penetration of gas phase water. The residual small imprint of the water spectrum on the spectral profile of the IR laser was then easily removed before deconvolution of the vibrational bands against the non-resonant background of the SFG spectrum. The rest of spectral analysis was as described in earlier papers (27).

Contact angle measurements

Static contact angle measurements of all samples were performed using a sessile drop technique with deionized water as a probe liquid. The instrument used was DSA 30S Krüss contact angle system goniometer. To check surface uniformity and reproducibility, six measurements were acquired on each of two different samples by depositing six droplets (2.5 μl milliQ water) at different points of the surface (11mm x 11mm).

Antibacterial surface activity tests

Bacterial strain

Staphylococcus aureus ATCC 27217 strain was used in the present study. The strain was kept at -80°C in tryptic soy broth (TSB) (BioMérieux, France) containing 20% (vol/vol) glycerol. The frozen cells were sub-cultured once in TSB (overnight culture) to constitute the stock cultures from which aliquots were kept at -20°C . Bacterial growth and experiments were both conducted at 37°C .

Bacterial adhesion on the peptide-functionalized surfaces.

After two subcultures in TSB (one 8-h culture followed by an overnight culture of a cryotube kept at -20°C), cells were harvested by centrifugation, washed twice in sterile NaCl (150 mM) and suspended in TBS. Optical density was measured at 600 nm to control the initial bacterial concentration ($\sim 10^8$ UFC/ml). The cleaned substrates (Au substrates, Au-MUA and Au-

MUA25-without and with nisine Z) were incubated with 500 μ l of the bacterial suspension in a static mode over 1h30 at 37°C (in this condition, the *S.aureus* cells could adhere but not grow on the surface). It must be noted that only the functionalized side of the gold-coated surface was accessible for the bacteria to adhere. Before observation, the samples were carefully rinsed to eliminate non-adherent cells and further recovered with sterile NaCl (150 mM).

Confocal laser scanning microscopy.

Visualization of antibacterial activity of Nisin Z functionalized substrates against *S. aureus* was performed using a Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, France) at the Centre de Photonique pour la Biologie et les Matériaux (CPBM) (Orsay, France). Bacteria were stained with 2.5 μ M Syto9® (Life Technologies, France), a green cell permeant nucleic acid dye, and 30 μ M propidium iodide (PI) (Life Technologies, France), a red nucleic acid dye that can easily penetrate cells with compromised plasma membranes. Syto9® and PI were sequentially excited at 488 nm and 543 nm, respectively, and their fluorescence emissions were collected between 500 and 600 nm for Syto9® and between 640 and 750 nm for PI. Images were acquired using a 63x oil immersion objective with a 1.4 numerical aperture. The size of the confocal images was 512 by 512 pixels corresponding to image sizes of 246 x 246 μ m² for zoom 1 and 82 x 82 μ m² for zoom 3. For each sample, 5 different areas were analyzed. The reproducibility of the results was checked by using three different sets of functionalized substrates and bacterial culture batches. Each fluorescence intensity image corresponds to an average of 4 frames.

Image treatment and quantification

A total of 15-20 images per zoom were analyzed. On each image, the bacterial counting was performed using ImageJ image processing software. Due to the satisfying correspondence between cell countings on images obtained using zoom 1 and zoom 3 the data are pooled together. Analyses of variance (ANOVA) were performed using Statgraphics software (Manugistic, Rockville, MD). Evaluated factors were considered statistically significant when P values associated with the Fischer test were below 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Surface characterization

XPS results

XPS measurements of gold surface after MUA and MUA/(CH₂)₆ OH immobilization and after nisin Z binding are summarized in Table 1. On XPS spectra of unmodified gold surfaces, C1s and O1s peaks are observed, as expected when Au surface are not prepared in ultra-high vacuum

conditions (13). They are mainly due to hydrocarbon impurities (C1s peak) and to -OH from water molecules (O1s peak). XPS spectra of the gold surfaces before and after MUA functionalization revealed the appearance of a sulfur peak and the decrease of Au4f intensity both on Au-MUA and Au-MUA25 surfaces (Table 1), confirming immobilization of thiols on the gold surfaces (13,28,29). The attenuation of the Au4f peak by the adlayer was more important for Au-MUA corresponding to a higher thickness of MUA layer compared to MUA25 (11 carbons for MUA chain vs 6 carbons for mercaptohexanol). The high resolution analysis of the S2p peaks (table 2, Figure 2) reveals the presence of two sulfur components, one at 162.1 eV (S2p_{3/2}) and 163.4 eV (S2p_{1/2}) attributed to sulfur atoms bound to the gold surface (in red on Figure 2) and the second one at 163.7 eV (S2p_{3/2}) and 164.9 eV (S2p_{1/2}) corresponding to free thiol functions (in blue on Figure 2) (30). The free thiols content was larger for Au-MUA (45%) compared to Au-MUA 25 (30%). The presence of free sulfur is probably due to the formation of a partial bilayer through hydrogen bonds between the carboxylic terminal groups of thiols bonded to the surface and free thiols from the solution (in this case, the S atom outwards from the surface). This was further confirmed by IR spectra analyses (see FTIR-ATR section). The high resolution XPS spectra of the C1s region for Au-MUA and Au-MUA25 substrates (Figure 2), were best fitted with four components corresponding to C-C/C-H bonds at 285 eV, carbon in α position of heteroatom (S and O atoms) at 286.2 eV, carboxylate functions at 288 eV and carboxylic acid functions at 289.5 eV (table 2) (30,31). Percentages of the four components were different between MUA and MUA-25. A lower C-S/C-O component at 286.5 eV and higher C-C/C-H and COOH contributions at 285eV and 289.5 eV, were observed for the MUA layer. These differences can be explained by the longer alkyl chain average length for MUA and the lower carboxyl group concentration for Au-MUA25.

The success of nisin Z grafting on the two types of surfaces was confirmed by (i) the significant decrease of Au4f peak intensity, (ii) the appearance of a nitrogen peak (N1s) centered at 400.2 ± 0.1 eV (Table 1, Figure 2) assigned to the amide functions of the peptide (29) and (iii) an approximatively twice larger free sulfur peak after nisin Z immobilization (Figure 2) due to the presence of sulfur atoms from thioether functions in the peptide (16,17). These effects were more pronounced for Au-MUA-Nis surface by comparison to Au-MUA25-Nis, which was in favor of a higher peptide immobilization on Au-MUA (if we consider that all the NHS ester groups are converted). However, we never observe a four times larger effect for Au-MUA compared to Au-MUA25 substrates, suggesting that the nisin peptides could dimerize on the surface as reported (32).

Surfaces	Atomic composition (%)				
	Au 4f	C 1s	O 1s	S 2p	N 1s
Gold	60.4	29.4	10.2	-	-
Au-MUA	46.8	38.1	13	2.1	-
Au-MUA25	57.8	27.3	12.3	2.6	-
Au-MUA-Nis	19.8	54.2	14.3	2.2	9.5
Au-MUA25-Nis	32.2	41.8	15.5	2.5	8

Table 1: Surface atomic composition of gold and modified gold surfaces determined by XPS

Surfaces	Carbon components (%)				Sulfur components (%)	
	C-C/C-H (285 eV)	C-S/C-O (286.5 eV)	COO /N-C=O (288 eV)	COOH (289.5 eV)	S-Au (162.1 eV)	Free S (163.7 eV)
Au-MUA	72.7	13.4	6.1	7.8	55.2	44.8
Au-MUA25	64.7	22.8	6.4	6.1	69.6	30.4
AU-MUA-Nis	59.1	23.7	15.6	1.6	28	72
Au-MUA25-Nis	56.5	26.7	15.3	1.5	45	55

Table 2: C1s and S2p chemical composition (%) of modified surfaces

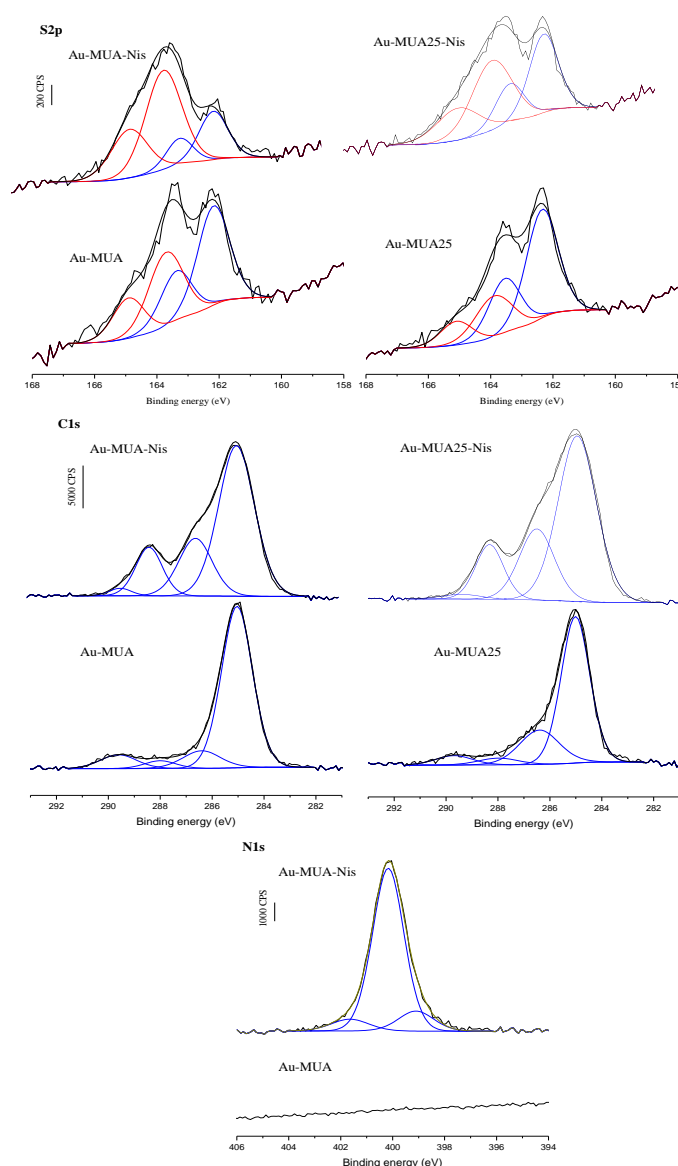


Figure 2: High resolution XPS spectra of S2p, C1s and N1s regions before and after Nisin Z immobilization.

FTIR-ATR measurements

Infrared spectroscopy measurements further confirm the chemical composition of the surfaces at each step. The FTIR-ATR spectra for Au-MUA and Au-MUA25 showed similar peak positions in the C-H stretching region, corresponding to asymmetric (2928 cm^{-1}) and symmetric (2856 cm^{-1}) stretching modes of the CH_2 alkyl chains of MUA and 6-mercaptohexanol (Figure 3). The unexpected shoulder at 2960 cm^{-1} corresponds to the asymmetric band of the methyl group. It was due to impurities related to MUA conditioning as revealed by the spectrum of a KBr pellet of MUA, where it is present (28). The corresponding symmetric band of this methyl group is expected at $\approx 2880\text{ cm}^{-1}$. It is not clearly visible. Presumably it is weaker than its asymmetric counterpart and is hidden in the wings of other bands. The frequency of the asymmetric methylene stretching is reported to be sensitive to conformational ordering: the more ordered the alkyl chain, the lower the frequency (2918 cm^{-1} for a well-ordered alkyl chain) (33). Therefore, the position of the asymmetric band of Au-MUA and Au-MUA25 before and after activation at 2928 cm^{-1} suggests a certain disorder of the thiol layers. This was supported by the IR spectra measured in the frequency range 1800 cm^{-1} - 1500 cm^{-1} . Figure 3). The two bands at 1742 cm^{-1} and 1714 cm^{-1} were attributed to the CO stretching mode of non-hydrogen-bonded and hydrogen-bonded carboxylic acid groups, respectively (29,34). The band at 1714 cm^{-1} is consistent with the ability of carboxylic acids to undergo strong intermolecular hydrogen bonding interaction. This can occur from head to head MUA chain dimers forming a partial bilayer of MUA chains, as already suggested from XPS data. Nevertheless, dimerization of carboxylic groups of neighboring MUA chains may also exist, which would imply disorder within the layer. Elsewhere, the large absorption signals in the range 1570 - 1540 cm^{-1} and the band at 1463 cm^{-1} are ascribed to the asymmetric and symmetric stretching modes of COO^- respectively. It reveals that some deprotonated COO^- groups are present. They are able to induce electrostatic repulsion and presumably a relative disorder of the surface layer (35). SFG measurements further support this disorder of the Au-MUA and Au-MUA25 layers (see below).

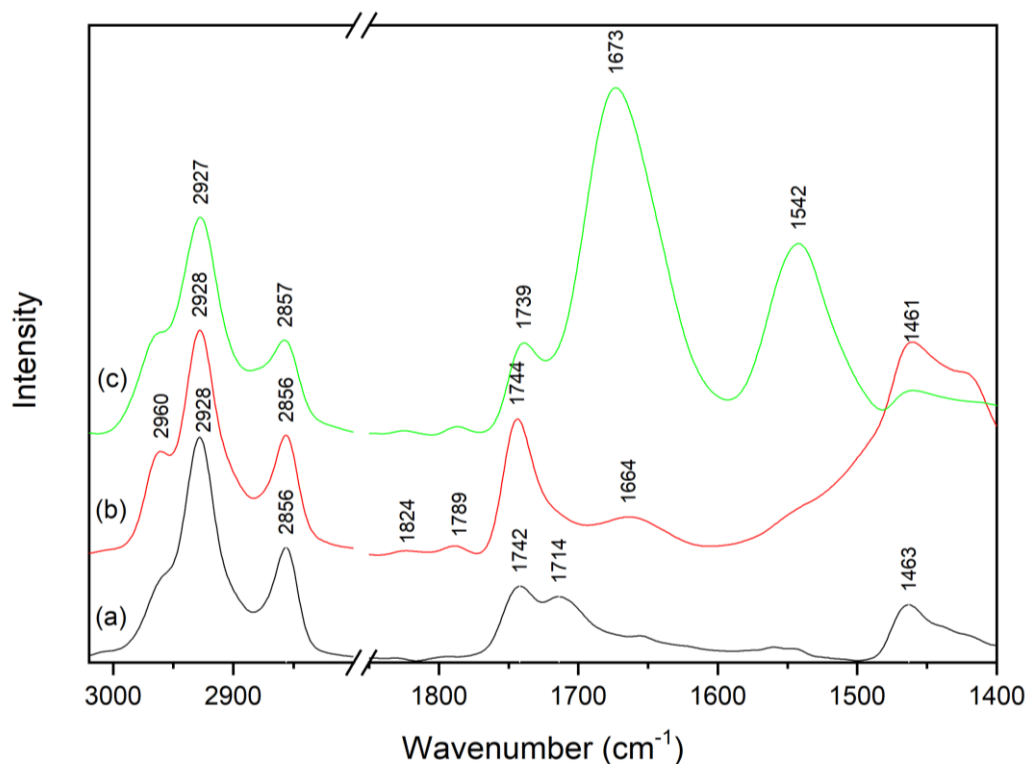


Figure 3: FTIR-ATR spectra of the three consecutive steps leading to the Nisin Z immobilization: (a) Au-MUA or Au-MUA25, (b) Au-MUA_{act} or Au-MUA25_{act} by NHS/EDC, (c) covalent binding of Nisin Z, Au-MUA-Nis or Au-MUA25-Nis.

At the second step of surface preparation (termination by the succinimidyl ester), two more CH₂ groups (present in the succinimidyl cycle) are added on each MUA chain. However, their contribution to the CH₂ symmetric and asymmetric bands does not produce a quantitative change of relative intensities (Figure 3). By contrast, this attachment of the succinimidyl ester termination is evidenced by the triplet in the spectral range of the C=O stretching vibrations: (i) the persistence of the prominent peak at 1744 cm⁻¹ corresponding to the transformation of the acid terminal group into ester, (ii) the appearance of two weak bands at 1788 cm⁻¹ and 1820 cm⁻¹, the signature of the ester groups of the imide ring (26,29,36) (Figure 3). The disappearance of the 1714 cm⁻¹ absorption band highlights that the activation leads to the disruption of intermolecular hydrogen bonds between carboxylic groups. Smaller broad bands observed in some experiments at 1656 cm⁻¹ and ~1550 cm⁻¹ (not visible in the spectra of Figure 3), evocative of amide I and amide II bands, respectively, can be ascribed to the limited formation of the stable N-acyl urea byproduct due to defects in the activated layer (26). Finally, the broad band extending between 1500 cm⁻¹ and 1400 cm⁻¹ corresponds to bending modes of the different CH bonds. It cannot be exploited because it shows no structure.

Although the nisin Z peptide has an appreciable number of CH, CH₂ and CH₃ groups in various positions with respect to amide groups, the CH stretching spectrum does not show any significant change (Figure 3). However, the nisin Z grafting is ascertained by the appearance of the two strong bands at 1673 cm⁻¹ and 1542 cm⁻¹ that can be ascribed to the amide I and amide II bands of the peptidic backbone. In addition, a band centered at ~1739 cm⁻¹ is still present. It may correspond to the free carboxylic group of the C-terminated part of Nisin and/or from remaining non-activated carboxylic groups.

SFG measurements further confirm the chemical composition of the surfaces at each step but also give more insight into the conformational change in the SAMs.

SFG results

It must be recalled that there are two major specificities of SFG vibrational spectroscopy with respect to FTIR-ATR spectroscopy (37): (i) the vibrational bands of molecules adsorbed on gold interfere with a non-resonant (NR) background. In BB-SFG configuration, this background has the spectral shape of the IR femtosecond laser (SFG reference spectra in Figure 4). It provides a reference for comparison of intensities from one sample to the other (while absolute intensities of different spectra are difficult to compare because they are strongly dependent on optical alignment). (ii) Due to the coherent nature of SFG emission, the amplitudes of identical chemical groups sum up instead of intensities, with two possible consequences (both arising in this study): (i) if the orientation distribution of the transition moments of the contributing chemical groups is isotropic, then the intensity vanishes. In such a case, a low intensity means “disorder” in the sense of an isotropic distribution of the different chemical groups. (ii) in the case where the sample is highly ordered with a centrosymmetric arrangement of the contributing chemical groups, then the SFG intensity also vanishes. This is typically the case of CH₂ bands of all-trans alkyl chains in SAMs, for which zero intensity means “order”(27).

The SFG spectra of the different Au-MUA and Au-MUA25 surfaces were measured both in the C-H stretching region (2700-3100 cm⁻¹) (Figure 4A) and in the amide band region (1400-1700 cm⁻¹) (Figure 4B). In this latter domain, no SFG signal was expected before and after EDC/NHS activation. It was the case for Au-MUA and Au-MUA25 samples but upon surface activation, a weak signal arised. It was ascribed to the side-reaction product N-acyl urea (identified from IR spectroscopy), which contains amide bonds. In the C-H stretching region the SFG spectra exhibit three vibrational bands centred at 2929 cm⁻¹, 2907 cm⁻¹ and 2856 cm⁻¹ (Figure 4A). These frequencies are in good agreement with previous reported data (34). The 2856 and 2929

cm^{-1} bands are assigned to the symmetric and asymmetric methylene stretching modes of MUA, respectively. Several assignments of the band at 2907 cm^{-1} were reported in the literature: either to a Fermi resonance or to the symmetric stretching mode of the CH_2 groups at the bottom or the top of the alkyl chain, which have different local environments than the other CH_2 groups. At the bottom of the MUA chain the CH_2 group is adjacent to the sulphur atom (S-CH_2), while at the top of the chain the methylene group is adjacent to the carboxylic acid head group ($\text{CH}_2\text{-C=O}$). After activation of the surface by EDC/NHS, this band is still present but it is significantly weakened: this can be ascribed to the transformation of the acid group into the ester group of the activated surface, since the activation is not expected to change the environment of S-CH_2 . The band centred at 2907 cm^{-1} is thus likely mainly due to the contribution of $\text{CH}_2\text{-C=O}$, which would have a lesser intensity when the ester group replaces the carboxylic group. The contribution of S-CH_2 which was observed for octadecanethiol on Au (27), cannot be excluded but it is weaker. It must be noted that this 2907 cm^{-1} band is too weak to be observed in FTIR-ATR spectra, where the strong bands of the numerous CH_2 groups dominate the spectrum. We expect alkyl chains to be rather ordered on Au surfaces. In such case, as mentioned above, the contribution of the CH_2 groups to the SFG spectra should vanish. However, it is not the case. This confirms what has been already noticed from FTIR-ATR measurements, that alkyl chains of Au-MUA and Au-MUA25 surfaces before and after activation are not perfectly ordered. This is presumably due to steric hindrance and/or to the presence of H-bonds among terminal acid groups, and/or to electrostatic repulsion in the case of elimination of protons during sample preparation, which all are expected to distort alkyl chain conformation from all-trans. Interestingly, the dilution of MUA into mercaptohexanol results in a clear weakening of CH_2 bands, both from Au-MUA to Au-MUA25 and from Au-MUA_{act} to Au-MUA25_{act}. This highlights the success of the strategy to increase the order of the MUA layer by relaxation of steric hindrance among COOH groups on top of the layer. The attachment of the succinimidyl ester termination also results in an intensity decrease of the symmetric and asymmetric CH_2 bands (from Au-MUA to Au-MUA_{act} and from Au-MUA25 to Au-MUA25_{act}), which can be ascribed to a conformation of the alkyl chains closer to all trans thanks to the elimination of hydrogen bonds between COOH groups.

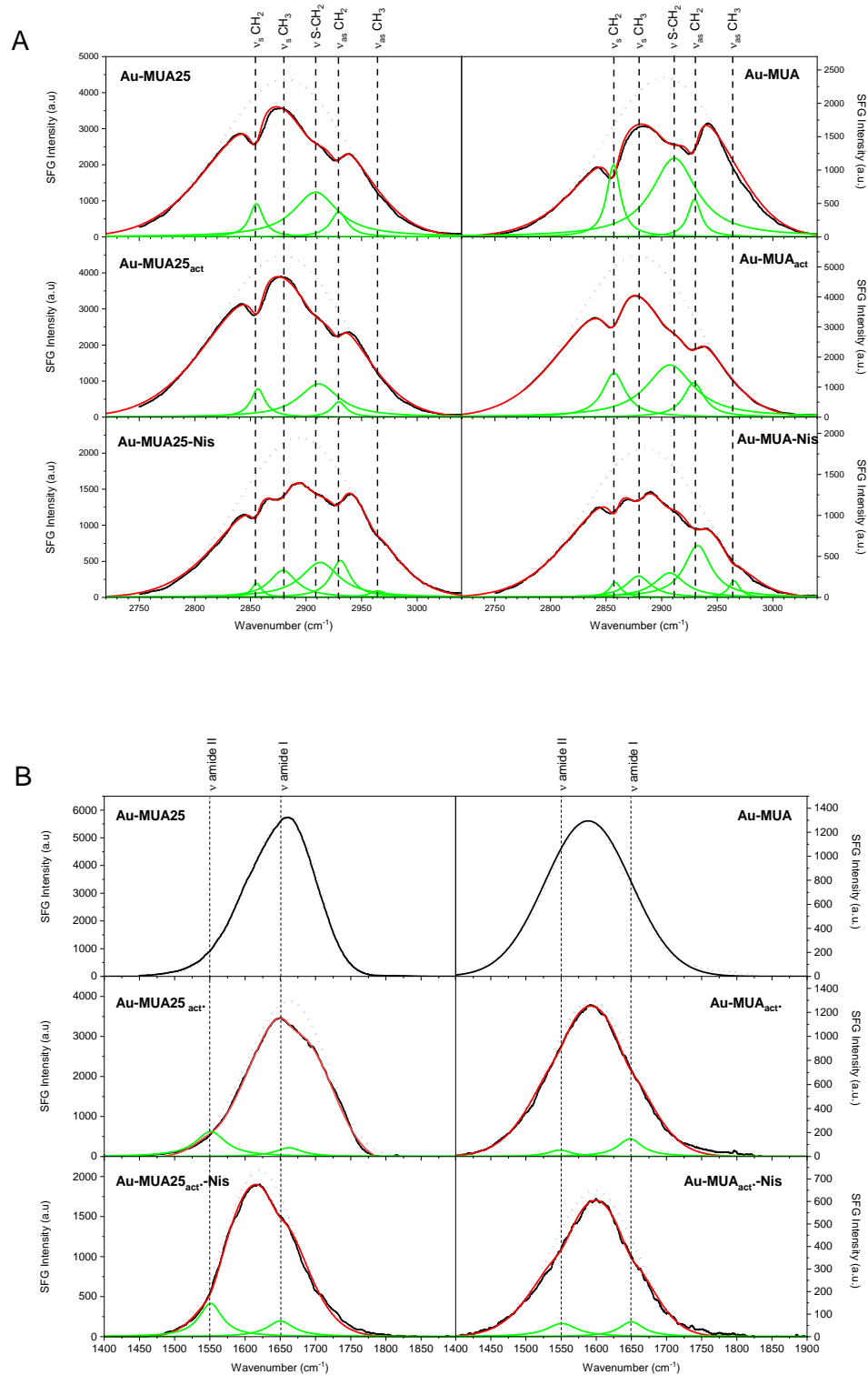


Figure 4: SFG spectra of Au-MUA and Au-MUA25 surfaces in (A) the C-H stretching region and (B) the amide bands region. Experimental (black lines), fitted (red lines) SFG spectra, and deconvoluted vibrational bands (green lines). The SFG reference spectrum (black dashed line) is also presented.

The binding of nisin Z results in three changes in the SFG spectra:

(i) as expected, the appearance of the bands corresponding to the methyl groups (19 methyl groups are present in nisin Z) at 2876 cm^{-1} and 2930 cm^{-1} corresponding the symmetric and asymmetric stretching modes, respectively. What is striking is their weak intensity relative to their large number, but it is not unexpected considering their presumably large orientation distribution in such a complex molecule (23): if it was completely isotropic, the bands would vanish completely.

(ii) the reversed intensities of symmetric and asymmetric CH_2 bands. On metallic surfaces, dipole moments parallel to the surface plane do not contribute to SFG. In the case of CH_2 , the asymmetric dipole moment is along the H H direction, so it is perpendicular to the surface when the CH_2 plane is itself perpendicular and the H H direction is normal to the surface. This configuration hardly occurs in the case of an alkyl chain in a well ordered SAM, so it must be related to a specific group inside nisin Z, or to a specific modification of the alkyl chain conformation imposed by the bonding of AMP. It can be also noted that despite the presence of additional CH_2 groups in nisin Z, no significant change of the intensity of the CH_2 bands is observed. Interpreting in more details the relative intensities of the CH bands would require in-depth density functional theory (DFT) calculations of SAM-Nis conformation on the surface, which is beyond reach of the present study.

(iii) The appearance of two bands with weak intensities at $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, and $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$, corresponding to amide I and amide II vibrational modes, respectively. It ascertains qualitatively the presence of amide groups on the surface. However, in this case also, quantitative analysis is impossible. Nisin Z has a polycyclic structure (24) and contains 33 amide groups, so the situation is comparable with that of CH_3 modes: if the orientation distribution of the amide groups is close to being isotropic, then their SFG signature is expected to be very weak, which is the case. Additionally, the formation of nisin Z dimers on the surface, as still suggested from XPS data, may also be responsible of this low SFG signal. Interestingly, we observe the presence of both amide I and amide II bands. Previous studies (38) have investigated by SFG the orientation of the R-helical peptide cecropin P1 (containing 31 amino acids) deposited on polymer surfaces. The selective presence of the amide I band was explained by the fact that the peptide structure contains only α helices. The selective presence of amide I was also observed for peptides with a β -sheet structure (39). By contrast, nisin Z has a polycyclic structure (24) and contains no helix. Therefore, our results suggest that the presence of both amide I and II bands is related to the polycyclic structure of nisin Z.

Surface wettability

Table 3 summarizes the changes in the contact angles for water droplets when moving from Au to functionalized substrates. In each case, the contact angle values were constant over the entire sample surface demonstrating that the successive functionalizations of the gold surfaces were homogeneous.

Surface	Contact angle ($\pm 1.5^\circ$)
Gold	86
Au-MUA	52
Au-MUA25	45
Au-MUA _{act}	61
Au-MUA25 _{act}	51
Au-MUA-Nis	62
Au-MUA25-Nis	60

Table 3: contact angle measurements

When the gold surface was modified by MUA, an increase of the surface hydrophilicity was observed due to the introduction of polar head groups (COOH), which is consistent with the literature (12,30). Furthermore, the hydrophilic character is slightly higher for Au-MUA25 than for Au-MUA, a result consistent with the length of the OH hydrocarbon chain which is shorter than that of the MUA chain, and thus less hydrophobic. It was also previously reported that the hydrophilicity of a mixed OH/COOH terminated surface is higher than that of a COOH terminated surface, confirming the FITR results. Upon EDC/NHS activation, the contact angle increased by $\sim 7-10^\circ$, indicating lower hydrophobicity of the surface due to the formation of the succinimide ester intermediate (13,36). The nisin Z immobilization rendered the surfaces slightly less hydrophilic, as expected considering the amphiphilic nature of the peptide. No difference between Au-MUA and Au-MUA25 substrates was observed.

2. *S. aureus* adhesion

The combined results of XPS, FITR-ATR, SFG spectroscopy and surface wettability attest to the binding of MUA chains to gold surfaces and further to the immobilization of the nisinZ peptides. We now take advantage of fluorescence confocal microscopy to characterize the antibacterial activity of these surfaces against *S.aureus* bacteria and relate it to the above physicochemical observations.

We have first observed *S.aureus* cell distribution on the different surfaces to give insights on the bacteria adhesion. As observed on Figure 5a, (zoom 1 and 3), the adhered cells appeared homogeneously distributed, isolated or in some groupings (a well-known behavior for *S.aureus* cells). It was previously reported that the surface topography of Au deposited on glass substrates

presents platens of $1\text{-}2\mu\text{m}^2$ separated by grooves of 20-30 nm depth (27). The *S.aureus* cells seem to adhere on the platens of the Au surface and not on the grooves due to their small thickness with respect to size and form of bacteria (cocci structure of $\sim 1\mu\text{m}$).

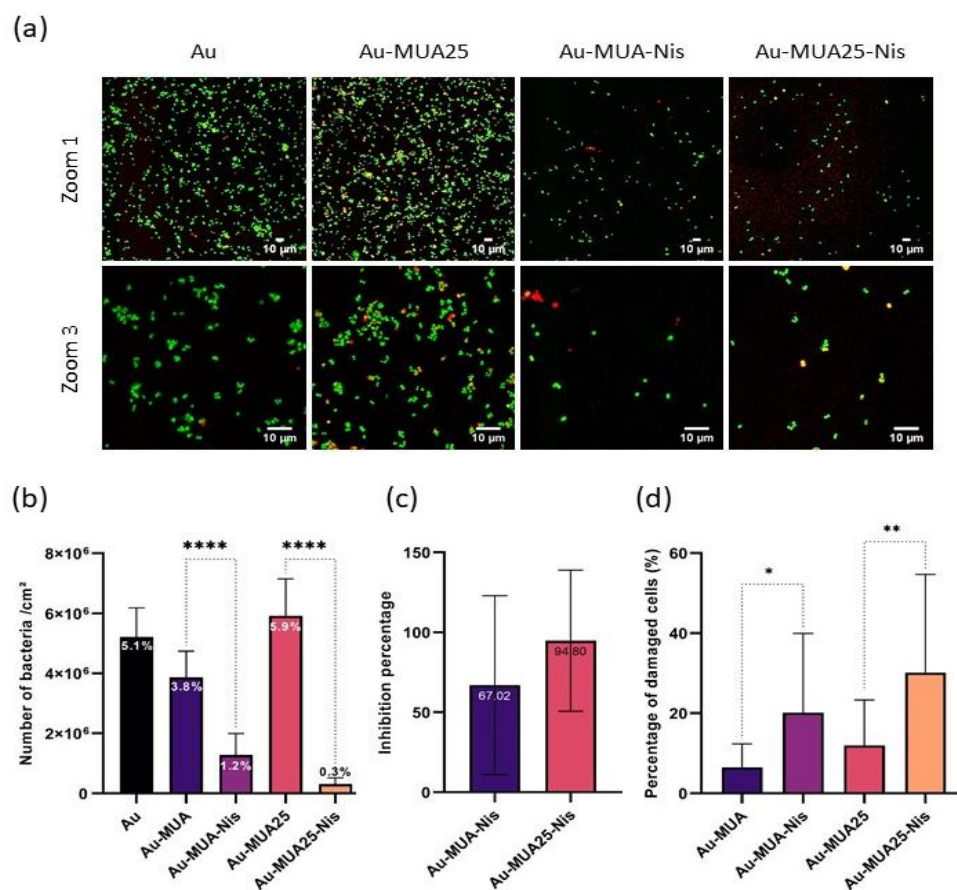


Figure 5 (a) Representative confocal fluorescence images with zooms 1 and 3, highlighting both live (green) and dead or damaged (red) S.aureus cells immobilized on different surfaces for 1h30. Bacteria were stained with Syto9/IP LIVE/DEAD staining dyes. (b) Average concentrations of adhered bacteria on the different surfaces and the corresponding average percentages of coverage (%) of the surfaces. The presented data are the average of measurements in three spots of the same surface (c) inhibition of adhesion of S.aureus on Au-MUA-Nis and Au-MUA25-Nis surfaces as compared to Au-MUA and Au-MUA25 substrates respectively. (d) average percentages of dead or damaged cells on each surfaces

If we now consider the quantification of the adhered *S.aureus* bacteria, no statistical valid difference in surface coverage was obtained for Au, Au-MUA and Au-MUA25 (Figure 5b). Neither the higher hydrophilicity of the surfaces grafted with MUA chains by comparison with a gold surface (Table 3), nor the higher charge of the Au-MUA than the Au-MUA25 surfaces via the carboxylic groups of the MUA chains have significant effect on the cell adhesion. Thus, the interactions between bacteria and the surface are rather short-distance (covalent) interactions in agreement with the low number of adhered bacteria ($\sim 5 \times 10^6$ UFC) (Figure 5b)

with respect to the deposited bacterial concentration ($\sim 10^8$ UFC). It is also interesting to note the low coverage of cells with damaged membrane and /or dead cells (in red on Figure 5a) on Au, Au-MUA and Au-MUA25 surfaces. Their quantification ($\sim 10\%$, Figure 5d) is comparable to what is commonly encountered in the process of bacterial adhesion. This reveals that neither the adlayer of MUA chains nor the alcohol function of 6-mercaptophexanol chains have any damaging effect on the cell membrane.

Interestingly, the covalent attachment of nisin Z to the Au-MUA and Au-MUA25 surfaces leads to a strong decrease in the number of *S. aureus* still adhered after 1h30 ($\sim 70\%$ for Au-MUA-Nis substrates and 95% for Au-MUA25-Nis substrates) by comparison to the corresponding surfaces without peptides (Figure 5 b, c). Furthermore, the percentages of dead or damaged cells on the surfaces with nisin Z are higher ($\sim 20\%$) by comparison with Au-MUA and Au-MUA25 substrates ($\sim 10\%$) (Figure 5d).

Undoubtedly, the nisin Z peptide although being immobilized on a surface has a biocidal activity against *S.aureus* bacteria. Now the questions arise how can this effect occur and why is it more efficient for Au-MUA25-Nis than for Au-MUA-Nis surfaces?

The mode of action of nisin Z in its free form in solution has been extensively studied. Its role as a “bacteria killer” is through a multi-step process leading to the cell lysis: first AMPs cover the surface of the target bacteria. Then they destabilize the phospholipid bilayer of the bacterial inner cell membrane creating transient or permanent pores and /or interferes with the cell wall peptidoglycan synthesis (24,40). However, this mode of action cannot be considered to interpret surface immobilized-peptide-bacteria interaction. First, the AMPs cannot cover the surface of the target bacteria and have no possibility of multiple interactions with the bacteria cell wall surface. Secondly, the length of the immobilized peptide standing up on the surface is $\sim 40\text{-}50$ Å (33 peptidic bonds), ten times too short to allow the peptide to penetrate the cell wall of *S.Aureus* bacteria (of thickness ~ 40 nm). Therefore the mode of action of immobilized nisin Z to kill bacteria cannot be through the “pore model”. Instead, the mode of action might be through charge interaction. A detailed study of antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhered Gram positive bacteria similar to *S.aureus* has shown that while bacteria are strongly attracted by the surface charges, they cannot grow (8). The interpretation is that the cell division cannot occur because the required elongation is prevented by the strong electrostatic interactions. Such a process can interpret our results. It is consistent with the increase of dead and damaged bacteria in the presence of nisin Z (Figure 5d). It tends to show that the bacteria first adhere to the surface but are then permeabilized by the grafted peptide, modifying their cell wall surface and allowing the entry of PI as observed for Magainin I on

Gram positive bacteria (31). This is in agreement with the better efficiency of covalent grafting of nisin Z via its N terminal part, leaving available its terminal C part, identified as the one that allows to permeabilize the target membrane (24). The bacterial killing effect of the immobilized nisin Z peptide appears therefore simpler than in solution: the interaction with the C terminal part of the peptide is essential in both cases, but at nisin Z grafted surfaces, the bacteria die "naturally" being unable to divide on the surface.

It should be noted that in our system of immobilized nisin Z, a limited antibacterial activity is observed (maximum decrease of ~ 1 log of the adhered bacteria) (Figure 5b). Possibly the arrangement of nisin Z at the surface is not optimal, perhaps due to nisin Z dimer formation at the surface as suggested by XPS and SFG results, or more probably because the peptide grafted surface topography remains to be improved. Our results highlight that the better order of the Au-MUA25-Nis substrate as revealed by SFG analysis results in a higher antibacterial effect. But in addition to the surface order, the flexible side chain of the grafted peptide may also play a role through several possible orientations that may impact the antibacterial activity (10). In particular, in addition to the positively charged lysine of the C terminal part of the peptide, two amino acids along the lateral chain are auspicious to electrostatic interactions with bacteria but do not allow the cell wall to be permeabilized.

Conclusion

We have developed a model of AMP surfaces by the covalent immobilization of the nisin Z peptides via its N terminal part on carboxyl functionalized gold substrate using carbodiimide coupling, the active C terminal part of the peptide being available to interact with the bacteria. The antibacterial activity of the so-immobilized nisin Z can achieve (95%) against *S.aureus*, depending on the surface order of the attachment centers of the peptides and on the peptide orientation. Additionally, a mechanism of action of nisin Z fixed on surfaces is proposed, which appears different and less complex than in solution. These two findings provide essential information for the development of antibacterial surfaces based on covalently immobilized peptides.

The whole procedure for constructing such AMP surfaces is simple, reproducible and efficient. Furthermore, the safety of antimicrobial peptides for human health has been demonstrated. Therefore, such biocidal surfaces present great potential in packaging and industrial production surfaces (cosmetic, food, medical devices...) to avoid product contamination.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* E-mail address: pascal.thebault@univ-rouen.fr

Funding Sources

MA acknowledges support from the Lebanese Association for Scientific Research (LASer).

ACKNOWLEDGMENT

We thank Farah Savina (ISMO, Université Paris Saclay), Ariane Deniset (ICP, Université Paris Saclay) and Julien Deschamp () for their helpful technical advice during contact angle, FTIR-ATR measurements and bacterial preparation respectively.

REFERENCES

1. Alvarez-Ordóñez A, Coughlan LM, Briandet R, Cotter PD. Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities. *Annu Rev Food Sci Technol*. 25 mars 2019;10(1):173-95.
2. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol*. janv 2016;198(1):1-15.
3. Levin-Reisman I, Ronin I, Gefen O, Braniss I, Shoresh N, Balaban NQ. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*. 24 févr 2017;355(6327):826-30.
4. Zhang X, Wang L, Levänen E. Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion. *RSC Adv*. 2013;3(30):12003.
5. Roy S, Das PK. Antibacterial hydrogels of amino acid-based cationic amphiphiles. *Biotechnol Bioeng*. 1 juill 2008;100(4):756-64.
6. Morán G, Ramos-Chagas G, Hugelier S, Xie X, Boudjema R, Ruckebusch C, et al. Superhydrophobic polypyrene films to prevent *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm adhesion on surfaces: high efficiency deciphered by fluorescence microscopy. *Photochem Photobiol Sci*. 2018;17(8):1023-35.
7. Chappaz B. Imagerie moléculaire corrélative de nanosondes fonctionnalisées pour l'étude de l'hétérogénéité physico-chimique spatiale de microorganismes associés aux surfaces. :175.
8. Gottenbos B. Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 1 juill 2001;48(1):7-13.
9. Tischer M, Pradel G, Ohlsen K, Holzgrabe U. Quaternary Ammonium Salts and Their Antimicrobial Potential: Targets or Nonspecific Interactions? *ChemMedChem*. 2 janv 2012;7(1):22-31.
10. Alves D, Olívia Pereira M. Mini-review: Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. *Biofouling*. 21 avr 2014;30(4):483-99.
11. Onaizi SA, Leong SSJ. Tethering antimicrobial peptides: Current status and potential challenges. *Biotechnol Adv*. janv 2011;29(1):67-74.
12. Costa F, Carvalho IF, Montelaro RC, Gomes P, Martins MCL. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater*. avr 2011;7(4):1431-40.
13. Kamra T, Chaudhary S, Xu C, Montelius L, Schnadt J, Ye L. Covalent immobilization of molecularly imprinted polymer nanoparticles on a gold surface using carbodiimide coupling for chemical sensing. *J Colloid Interface Sci*. janv 2016;461:1-8.

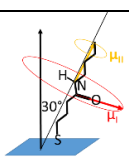

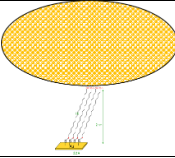
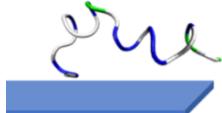
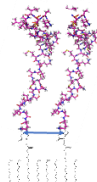
14. Vreuls C, Zocchi G, Thierry B, Garitte G, Griesser SS, Archambeau C, et al. Prevention of bacterial biofilms by covalent immobilization of peptides onto plasma polymer functionalized substrates. *J Mater Chem*. 2010;20(37):8092.
15. Mularski A, Wilksch JJ, Wang H, Hossain MA, Wade JD, Separovic F, et al. Atomic Force Microscopy Reveals the Mechanobiology of Lytic Peptide Action on Bacteria. *Langmuir*. 9 juin 2015;31(22):6164-71.
16. 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 Surf B Biointerfaces*. août 2017;156:186-93.
17. Héquet A, Humblot V, Berjeaud J-M, Pradier C-M. Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests. *Colloids Surf B Biointerfaces*. juin 2011;84(2):301-9.
18. Yala J-F, Thebault P, Héquet A, Humblot V, Pradier C-M, Berjeaud J-M. Elaboration of antibiofilm materials by chemical grafting of an antimicrobial peptide. *Appl Microbiol Biotechnol*. févr 2011;89(3):623-34.
19. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. sept 2011;2(5):445-59.
20. Guiotto A, Pozzobon M, Canevari M, Manganelli R, Scarin M, Veronese FM. PEGylation of the antimicrobial peptide nisin A: problems and perspectives. *Il Farm*. janv 2003;58(1):45-50.
21. Joshi PR, McGuire J, Neff JA. Synthesis and antibacterial activity of nisin-containing block copolymers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. oct 2009;91B(1):128-34.
22. Schneider N, Werkmeister K, Pischetsrieder M. Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. *Food Chem*. juill 2011;127(2):847-54.
23. van den Hooven HW, Fogolari F, Rollema HS, Konings RNH, Hilbers CW, van de Ven FJM. NMR and circular dichroism studies of the lantibiotic nisin in non-aqueous environments. *FEBS Lett*. 15 mars 1993;319(1-2):189-94.
24. Rink R, Wierenga J, Kuipers A, Kluskens LD, Driessen AJM, Kuipers OP, et al. Dissection and Modulation of the Four Distinct Activities of Nisin by Mutagenesis of Rings A and B and by C-Terminal Truncation. *Appl Environ Microbiol*. 15 sept 2007;73(18):5809-16.
25. Dykes GA, Hancock REW, Hastings JW. Structural Variations in Nisin Associated with Different Membrane Mimicking and pH Environments. *Biochem Biophys Res Commun*. juin 1998;247(3):723-7.
26. Sam S, Touahir L, Salvador Andresa J, Allongue P, Chazalviel J-N, Gouget-Laemmel AC, et al. Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces. *Langmuir*. 19 janv 2010;26(2):809-14.
27. Bulard E, Guo Z, Zheng W, Dubost H, Fontaine-Aupart M-P, Bellon-Fontaine M-N, et al. Non-Invasive Vibrational SFG Spectroscopy Reveals That Bacterial Adhesion Can Alter the Conformation of Grafted "Brush" Chains on SAM. *Langmuir*. 19 avr 2011;27(8):4928-35.
28. de la Llave E, Herrera SE, Adam C, Méndez De Leo LP, Calvo EJ, Williams FJ. Molecular and electronic structure of osmium complexes confined to Au(111) surfaces using a self-assembled molecular bridge. *J Chem Phys*. 14 nov 2015;143(18):184703.

29. Humblot V, Yala J-F, Thebault P, Boukerma K, Héquet A, Berjeaud J-M, et al. The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials*. juill 2009;30(21):3503-12.
30. Mendoza SM, Arfaoui I, Zanarini S, Paolucci F, Rudolf P. Improvements in the Characterization of the Crystalline Structure of Acid-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111). *Langmuir*. janv 2007;23(2):582-8.
31. Humblot V, Yala J-F, Thebault P, Boukerma K, Héquet A, Berjeaud J-M, et al. The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials*. juill 2009;30(21):3503-12.
32. Piard J-C, Muriana PM, Desmazeaud MJ, Klaenhammer TR. Purification and Partial Characterization of Lacticin 481, a Lanthionine-Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58(1):279-84.
33. Nuzzo RG, Dubois LH, Allara DL. Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 1. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers. *J Am Chem Soc*. janv 1990;112(2):558-69.
34. Casford MTL, Ge A, Kett PJN, Ye S, Davies PB. The Structure of Lipid Bilayers Adsorbed on Activated Carboxy-Terminated Monolayers Investigated by Sum Frequency Generation Spectroscopy. *J Phys Chem B*. 27 mars 2014;118(12):3335-45.
35. Methivier C, Beccard B, Pradier CM. In Situ Analysis of a Mercaptoundecanoic Acid Layer on Gold in Liquid Phase, by PM-IRAS. Evidence for Chemical Changes with the Solvent. :6.
36. Afara N, Omanovic S, Asghari-Khiavi M. Functionalization of a gold surface with fibronectin (FN) covalently bound to mixed alkanethiol self-assembled monolayers (SAMs): The influence of SAM composition on its physicochemical properties and FN surface secondary structure. *Thin Solid Films*. nov 2012;522:381-9.
37. Chen X, Chen Z. SFG studies on interactions between antimicrobial peptides and supported lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. sept 2006;1758(9):1257-73.
38. Ye S, Nguyen KT, Boughton AP, Mello CM, Chen Z. Orientation Difference of Chemically Immobilized and Physically Adsorbed Biological Molecules on Polymers Detected at the Solid/Liquid Interfaces in Situ. *Langmuir*. 4 mai 2010;26(9):6471-7.
39. Chen X, Wang J, Sniadecki JJ, Even MA, Chen Z. Probing α -Helical and β -Sheet Structures of Peptides at Solid/Liquid Interfaces with SFG. *Langmuir*. mars 2005;21(7):2662-4.
40. Wiedemann I. Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity*. :8.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail avait pour but d'étudier des surfaces modèles conçues pour limiter l'adhésion bactérienne, notamment avec l'apport de la spectroscopie SFG des fonctions amide. La SFG d'autres types de molécules biologiques a été également étudiée, permettant d'enrichir la compréhension de la spectroscopie des bandes amide. Dans la littérature, la SFG a déjà été utilisée pour sonder des peptides en hélice α à l'interface liquide-solide par l'intermédiaire de la bande amide I en exploitant la polarisation des impulsions laser. Ce n'est pas possible ici où nos systèmes modèles sont élaborés sur des surfaces d'or, qui ne permettent d'exploiter qu'une seule polarisation, perpendiculaire à la surface d'or. Nous avons donc étudié plus particulièrement le rapport d'intensité entre les modes amide I et amide II. Une variété de types de molécules et de situations a pu être prise en compte : une fonction amide unique insérée dans une chaîne alkyle, une chaîne peptidique courte (7 peptides), un peptide plus important (la nisine, environ 40 liaisons peptidiques), des protéines (la BSA), et des protéines en interaction avec des bactéries. Dans tous les cas, le rapport d'intensité, et/ou la variation d'intensité de l'une des bandes en fonction des changements d'environnement (greffage, présence de bactéries) ont pu être interprétés qualitativement, donnant des informations sur l'ordre, la conformation et l'orientation moléculaire, que la spectroscopie d'absorption IR en réflexion par transformée de Fourier ne peut pas donner. Ces renseignements sont rappelés dans la table ci-dessous. La spectroscopie SFG des bandes amide, ainsi étendue aux bandes amide II, s'avère ainsi être un outil de caractérisation très intéressant, complémentaire des autres techniques telles que RAIRS, XPS, microscopies optiques, dichroïsme circulaire, angle de contact... qui restent indispensables pour élaborer, caractériser et suivre l'évolution de systèmes (bio)moléculaires aussi complexes.

	Molécule	Spécificité	Rapport amide I / amide II	Interprétation
	« C ₆₀ – alkyle »	Auto-assemblage de chaînes alkyle	0.006	Effet d'orientation d'une chaîne étirée dans le plan vertical
	« C ₆₀ – peptide » et « N ₃ peptide »	Auto-assemblage d'hélices	45 et 22	Effet de géométrie de l'hélice
	Protéine BSA sur SAM d'ODT	Adsorption par interaction hydrophobe	0.93	Protéine en interaction faible avec la surface
	Bactéries sur BSA sur SAM d'ODT	Interaction forte avec les bactéries, faible avec la surface	0.21	Dénaturation de la protéine par la bactérie : les hélices se couchent
	Nisine sur MUA[25] activé	Ancrage spécifique Peptide polycyclique sans hélice	1 [0.5]	Peptide en interaction faible avec la surface

Rapport des intensités SFG amide I / amide II observées pour les différents types de molécules étudiées

L'étude complète de l'activité antimicrobienne de la nisine greffée sur des couches auto-assemblées d'acide mercapto-undécanoïque activées a été réalisée en combinant la SFG des bandes amide et CH avec la FTIR-RAIRS, l'XPS, la microscopie confocale, et la mesure d'angle de contact. Les propriétés anti-microbiennes de la nisine ont été améliorées en diluant les sites de greffage pour diminuer l'encombrement stérique. Bien que cela diminue la densité de nisine greffée, l'efficacité de l'interaction de la nisine avec les bactéries s'en trouve augmentée. Le mécanisme d'action anti-microbienne de la nisine est discuté. Il est connu en solution, où la nisine pénètre profondément jusqu'à la membrane interne de la bactérie où elle est capable d'ouvrir des pores qui conduisent à la mort de la bactérie. Ce mécanisme ne peut pas se produire si la nisine est fixée solidement à la surface, car elle est 10 fois trop petite pour

interagir avec la membrane interne de la bactérie. Le mécanisme proposé repose sur l'interaction électrostatique bactérie-nisine qui serait suffisamment forte pour bloquer le processus de division de la bactérie, l'empêchant de se reproduire et conduisant ainsi à sa fin.

Titre : Méthodes physiques avancées pour caractériser et minimiser la bio-contamination

Mots clés : Adhésion bactérienne. Peptides. Nisine. SFG. Amide

Résumé : Différentes méthodes de caractérisation physique de molécules auto-assemblées et d'entités biologiques adsorbées sont mises en œuvre afin de contrôler l'élaboration de surfaces par auto-assemblage et greffage de molécules présentant des fonctions amide, l'un des buts étant d'exploiter la spectroscopie vibrationnelle des bandes amide par génération de somme de fréquences (SFG) sur substrat d'or. Cinq types de molécules ont été étudiées : (1) une fonction amide unique insérée dans une chaîne alkyle auto-assemblée ; (2) des hélices α auto-assemblées ; (3) un peptide (la nisine) greffé sur une couche auto-assemblée fonctionnalisée ; (4) une protéine (la BSA) adsorbée sur une surface hydrophobe ; (5) des bactéries adhérentes sur des

protéines de BSA. L'apport de la spectroscopie SFG des fonctions amide s'avère complémentaire de celui de la spectroscopie d'absorption IR. La polarisation des lasers ne pouvant pas être exploitée sur nos substrats d'or, le rapport d'intensité entre les bandes amide I et amide II a été spécialement étudié. Il varie très fortement en fonction des différentes molécules biologiques étudiées et de leur environnement.

Les propriétés anti-microbiennes de la nisine ont été améliorées en diluant les sites de greffage pour diminuer l'encombrement stérique. Bien que cela diminue la densité de nisine greffée, l'efficacité de l'interaction de la nisine avec les bactéries s'en trouve augmentée.

Title : Advanced physical methods to characterize and minimize bio-contamination

Keywords : Bacterial adhesion. Peptides. Nisin. SFG. Amide

Abstract : Different methods of physical characterization of self-assembled molecules and biological entities are implemented in order to control the development of different surfaces by self-assembly and grafting, in particular of molecules with amide functions, one of the aims being to exploit the vibrational spectroscopy of the amide bands by sum frequency generation (SFG) on gold substrates. Five types of molecules have been studied: (1) a single amide function inserted in a self-assembled alkyl chain; (2) self-assembled α -helices ; (3) a peptide (nisin) grafted onto a functionalized self-assembled monolayer; (4) a protein (BSA) adsorbed to a hydrophobic surface; (5) bacteria adhered to BSA proteins.

The contribution of SFG spectroscopy of amide functions is complementary to that of IR absorption spectroscopy. Since laser polarization cannot be exploited on our gold substrates, the intensity ratio between the amide I and amide II bands has been specially studied. It varies greatly depending on the different biological molecules studied and their environment.

The anti-microbial properties of nisin were enhanced by diluting the grafting sites to decrease steric hindrance. Although this decreases the density of grafted nisin, the efficiency of the interaction of nisin with bacteria is increased.