

Sorbonne Université

ED 397

*Laboratoire de Réactivité de Surface
Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques*

Synthèse et caractérisation de revêtements N-halamine à base de polydopamine pour des applications antibactériennes

Présentée par Nadia Nazi

Soutenue le 14 décembre 2020

Devant le jury composé de :

Mme **Lydie Ploux**, Directrice de Recherche, Université de Strasbourg, Rapporteur

M. **Yann Chevotot**, Directeur de Recherche, Institut de Nanotechnologie de Lyon, Rapporteur

Mme **Claude Jolivald**, Professeur, Sorbonne Université, Examinatrice

M. **Loïc Jerry**, Professeur, Institut Charles Sadron de Strasbourg, Examineur

Mme **Catherine Debiemme-Chouvy**, Directrice de Recherche, Sorbonne Université, Co-directrice de thèse

M. **Vincent Humblot**, Chargé de Recherche, Sorbonne Université, Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite en premier lieu remercier chaleureusement mon directeur de thèse, M. Vincent Humblot, Chargé de recherche au laboratoire de réactivité de surface (LRS) ainsi que ma co-encadrante de thèse, Mme Catherine Debiemme-Chouvy, Directrice de recherche au Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (LISE) de Sorbonne Université pour m'avoir choisie sur ce projet et pour m'avoir fait confiance tout au long de ces trois années. Je leur suis reconnaissante du temps conséquent qu'ils m'ont accordé, leurs qualités pédagogiques et scientifiques, leurs conseils avisés, leur écoute, leur franchise, leur bonne humeur, leur sympathie et leur soutien durant des moments plus difficiles. Leur énergie et leur confiance ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec eux. J'ai beaucoup appris à leur côté et je leur adresse ma sincère gratitude pour tout cela.

J'exprime ma gratitude à la présidente du jury, Mme Claude Jolival, aux rapporteurs, les directeurs de recherches Mme Lydie Ploux et M. Yann Chevelot, ainsi qu'à M. Loïc Jierry, d'avoir accepté de juger mes travaux et d'avoir dégagé du temps pour s'y consacrer.

Je tiens à remercier profondément les membres du Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS) et du Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (LISE) pour leurs précieuses aides scientifiques, je pense notamment à Leatitia Valentin pour son soutien durant les expériences de microbiologie, Antoine Miche pour les nombreuses analyses XPS menées et à Françoise Pillier pour son aide en analyse MEB.

Mon travail étant le résultat de la rencontre des personnes, des personnalités et des compétences diverses, je ne peux oublier de saluer mes collègues qui sont devenus des amis et toutes les personnes qui ont rendu ce travail possible par leur aide ou les échanges que nous avons eus qui ont indirectement participé à ce résultat.

Je ne saurai conclure ces remerciements sans reconnaître le rôle important de ma famille. Ils m'ont apporté un appui et des encouragements sans faille.

Résumé

La lutte contre l'adhérence et la prolifération de bactéries sur les surfaces constitue une préoccupation constante et un enjeu médical et socio-économique majeur de notre société. Dans le domaine médical et agroalimentaire, la contamination bactérienne des surfaces est responsable de nombreuses infections nosocomiales et alimentaires. En outre, cette biocontamination des surfaces risque d'entraîner également une détérioration des propriétés structurales et fonctionnelles des matériaux. Ces biodégradations pouvant en effet conduire à des phénomènes de corrosion que l'on peut retrouver dans le domaine maritime. Ainsi, la prévention de l'adhérence bactérienne paraît indispensable et se traduit par le développement de revêtements antibactériens.

Ce projet de thèse a pour ambition de développer un nouveau revêtement antibactérien régénérable dans la lutte contre la formation des biofilms bactériens. Deux systèmes ont été pour cela étudiés, un système composé d'un revêtement polydopamine (PDA-O₂) et un deuxième système qui présentera un composite Polydopamine-Polyéthylénimine (PDA-PEI) tous deux renfermant des fonctions haloamine, liaisons amine-chlore (N-Cl). Ces dernières jouent en effet le rôle d'agent antibactérien grâce au degré d'oxydation +I de l'halogène leur conférant un fort pouvoir oxydant. L'enjeu majeur de ce projet consiste donc à fonctionnaliser une surface d'un revêtement PDA-O₂ et PDA-PEI suivi d'une halogénéation de ce dernier afin de créer les fonctions haloamine à une concentration assez suffisante pour garantir l'effet antibactérien tout en maintenant l'intégrité du revêtement. Les propriétés antibactériennes ont été enfin évaluées par des tests microbiologiques.

Nous montrons que ces systèmes peuvent être utilisés pour développer des revêtements biocides contre *Escherichia coli*, une bactérie Gram-négative et contre une souche Gram-positive, *Staphylocoque epidermidis* mettant ainsi en évidence le large spectre d'activité de ces revêtements. En effet, après exposition à des revêtements *N*-chloramine, toutes ces souches bactériennes montrent une réduction significative de l'adhérence et la viabilité mais exhibent également un effet bactériostatique à savoir une réduction de la croissance bactérienne. Le présent travail souligne également une activité antibactérienne des revêtements non chlorés dû à la PDA. Au vu des résultats, il apparaît que le revêtement PDA-O₂-Cl présente la meilleure réponse antibactérienne vis-à-vis des deux types de souche bactérienne testés en termes d'anti-adhérence, de propriétés bactéricides et bactériostatiques.

Abstract

The fight against the adhesion and proliferation of bacteria on surfaces is a constant concern and a major medical and socio-economic issue for our society. In the medical and food industry, bacterial contamination of surfaces is responsible for many nosocomial and food infections. In addition, this biocontamination of the surfaces may also lead to deterioration of the structural and functional properties of the materials. These biodegradations can indeed lead to corrosion phenomena that can be found in the maritime sector. Thus, preventing bacterial adhesion appears essential and results in the development of antibacterial coatings.

This thesis project aims to develop a new regenerable antibacterial coating in the fight against the formation of bacterial biofilms. Two systems have been studied for this, a system composed of a polydopamine coating (PDA-O₂) and a second system which will present a Polydopamine-Polyethylenimine (PDA-PEI) composite, both containing haloamine functions, amine-chlorine bonds (N-Cl). The latter indeed act as an antibacterial agent thanks to the + I degree of oxidation of halogen, giving them a strong oxidizing power. The major stake of this project therefore consists in functionalizing a surface of a PDA and PDA-PEI coating followed by halogenation of the latter in order to create the haloamine functions at a concentration sufficient enough to guarantee the antibacterial effect, while maintaining the integrity of the coating. The antibacterial properties were finally evaluated by microbiological tests.

We show that these systems can be used to develop biocidal coatings against *Escherichia coli*, a Gram-negative bacterium and against a Gram-positive strain, *Staphylococcus epidermidis*, thus demonstrating the broad spectrum of activity of these coatings. Indeed, after exposure to N-chloramine coatings, all these bacterial strains show a significant reduction in adhesion and viability but also exhibit a bacteriostatic effect, namely a reduction in bacterial growth. The present work also highlights an antibacterial activity of non-chlorinated coatings due to PDA. In view of the results, it appears that the PDA-O₂-Cl coating exhibits the best antibacterial response to the two types of bacterial strain tested in terms of anti-adhesion, bactericidal and bacteriostatic properties.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

CHAPITRE I : Etude bibliographique	7
---	----------

1- Introduction	8
2- Les biofilms bactériens.....	9
2.1 La bactérie	9
2.2 Les biofilms : la vie communautaire des bactéries	10
2.3 Le cycle de vie d'un biofilm	14
2.4 Tolérance/résistance du biofilm aux antibiotiques	17
2.5 Les stratégies mises en place pour la lutte contre les biofilms.....	17
3- Les revêtements <i>N</i> -halamine : Nouvelle génération de revêtements antibactériens	31
3.1 La fonction haloamine.....	32
3.2 Génération des fonctions haloamine.....	34
3.3 L'action antibactérienne des <i>N</i> -halamines.....	35
3.4 Identification des fonctions haloamine.....	39
3.1.1 Méthode chimique	39
3.1.2 Méthode physique.....	41
4- La polydopamine : un polymère biomimétique	46
4.1 De l'observation de l'adhérence des moules au revêtement de polydopamine.....	46
4.2 Voies de synthèse de la polydopamine (PDA).....	48
4.2.1 Voie chimique	49
4.2.1.1 Le dioxygène comme agent oxydant.....	49
4.2.1.2 Les autres oxydants	51
4.2.1.3 Les paramètres physico-chimiques influençant le dépôt.....	54
4.2.2 Voie électrochimique.....	58
4.2.3 Voie enzymatique	58

4.3	Etude de la structure de la PDA.....	59
4.4	Propriétés du dépôt de polydopamine	61
4.5	Les applications de la polydopamine	64
4.6	Enrichissement du revêtement PDA en fonction amines : Les copolymères PDA-PEI .	65
	Références.....	67

CHAPITRE II : Matériels & Méthodes..... 83

1.	Protocole de fonctionnalisation de la PDA et de chloration/bromation.....	86
1.1.	Préparation des surfaces d'or	86
1.2.	Fonctionnalisation des surfaces	86
1.2.1.	Dépôt du revêtement PDA	87
1.2.1.1.	Dépôt sous O ₂	87
1.2.1.2.	Dépôt sous périodate de sodium (NaIO ₄).....	87
1.2.2.	Dépôt du revêtement composite Polydopamine- Polyéthyléimine (PDA-PEI)	88
1.3.	Greffage des fonctions chloramine/bromamine	89
1.3.1.	Préparation de la solution de NaOCl	89
1.3.2.	Préparation de la solution de NaOCl	89
1.3.3.	Protocole de greffage	90
2.	Caractérisations physico-chimiques	91
2.1.	Techniques de caractérisation de surface.....	91
2.1.1.	Spectroscopie infrarouge : Spectroscopie infrarouge en mode réflexion absorption avec polarisation de modulation.....	92
	(Polarisation Modulation InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy - PM-IRRAS)	92
2.1.1.1.	Rappel du principe	92
2.1.1.2.	Montage expérimental et protocole d'utilisation	94
2.1.2.	Spectroscopie de photoélectrons X :.....	95
	X-ray Photoelectron Spectroscopy – XPS).....	95
2.1.2.1.	Rappel du principe	95
2.1.2.2.	Instrumentation et protocole d'utilisation	96
2.1.3.	Microbalance à cristal de quartz	98
	(Quartz Crystal Microbalance – QCM)	98
2.1.3.1.	Rappel du principe	98

2.1.3.2.	Dispositif expérimental	98
2.1.4.	Ellispométrie	99
2.1.5.	Angle de contact	100
2.2.	La Spectroscopie Electronique à Balayage (MEB)	100
2.3.	Quantification de la fonction chloramine	101
3.	Test microbiologiques	102
3.1.	Souches et cultures bactériennes	102
3.2.	Tests d'adhérence des bactéries sur les surfaces	103
3.3.	Tests de cultivabilité des bactéries	104
	Références.....	106

CHAPITRE III : Synthèse et caractérisations physico-chimiques des revêtements PDA et PDA-PEI 107

	Introduction.....	110
1-	Etude du dépôt de PDA.....	111
1.1	En milieu basique en présence d'O ₂ atmosphérique dissous	111
1.1.1	Suivi cinétique du dépôt de polydopamine	112
1.1.1.1	Etude sur Or	112
1.1.1.1.1	Influence de l'étape lavage par sonication	114
1.1.1.1.2	Influence de la concentration en dopamine sur la cinétique et la qualité du dépôt 116	
1.1.1.2	Etude sur silicium : influence du substrat	119
1.1.2	Caractérisations physico-chimiques du dépôt	121
1.1.2.1	Analyse PM-IRRAS et IR-ATR.....	121
1.1.2.2	Caractérisation XPS.....	122
1.1.2.3	Caractérisation par mesures d'angle de contact.....	124
1.1.3	Dépôt <i>Grafting from versus Grafting to</i>	125
1.1.4	Revêtement multicouche	127
1.2	Etude du dépôt de PDA en milieu acide en présence de périodate comme oxydant	128
1.2.1	Suivi cinétique du dépôt	130
1.2.2	Caractérisation PM-IRRAS	131
1.2.3	Caractérisation XPS.....	132

1.2.4	Caractérisation par angle de contact	134
2-	Etude du dépôt du revêtement composite PDA-PEI	135
2.1	Suivi cinétique du dépôt du film composite PDA-PEI	136
2.2	Caractérisation physico-chimique par PM-IRRAS	139
2.3	Caractérisation par XPS	140
2.4	Caractérisation par mesure d'angle de contact	141
	Conclusion	143
	Références.....	144

CHAPITRE IV : Génération des fonctions haloamine 147

	Introduction.....	150
1	Etude de la génération des fonctions haloamine à partir du revêtement PDA	152
1.1	A partir du revêtement PDA-O ₂	152
1.1.1	Génération des fonctions chloramine (N-Cl).....	152
1.1.1.1	Suivi cinétique de la chloration	152
1.1.1.1.1	Suivi <i>in situ</i>	152
1.1.1.1.2	Suivi <i>ex situ</i>	155
1.1.1.2	Caractérisations physico-chimiques	157
-	Analyse PM-IRRAS.....	157
-	Caractérisation XPS et XPS résolu en angle	158
-	Mise en évidence des fonctions N-Cl par un test à la méthionine	160
-	Observation MEB	161
-	Caractérisation par mesure de l'angle de contact.....	162
-	Quantification des fonctions N-Cl par titrage au TNB	163
1.1.1.3	Etude de la stabilité des fonctions N-Cl.....	164
1.1.2	Génération de fonctions bromamine (N-Br)	165
1.2	A partir du dépôt <i>Grafting from</i> versus <i>Grafting to</i>	169
1.3	A partir d'un revêtement multicouche	172
1.4	A partir du dépôt de PDA-IO ₄ ⁻	174
1.4.1	Suivi cinétique de chloration	174
1.4.2	Caractérisation PM-IRRAS	175
1.4.3	Caractérisation XPS.....	176

1.4.4	Quantification des fonctions N-Cl par titrage au TNB	178
2	Etude de la chloration du revêtement composite PDA-PEI.....	179
2.5	Suivi cinétique de chloration du film composite PDA-PEI	179
2.6	Caractérisation physico-chimique par PM-IRRAS du film PDA-PEI-Cl.....	181
2.7	Caractérisation par XPS du film PDA-PEI-Cl.....	182
2.8	Quantification des fonctions N-Cl par titrage au TNB.....	183
	Conclusion	185
	Références.....	186

CHAPITRE V : Evaluation des propriétés antibactériennes des revêtements PDA et PDA-PEI après un traitement d'halogénéation des fonctions amine 188

	Introduction.....	191
1.	Evaluation des propriétés antiadhésives	192
2.	Evaluation des propriétés bactéricides.....	194
2.1	Le test du relargage ou halo d'inhibition	194
2.2	Le test de <i>Killing</i>	196
2.1.1	Souche bactérienne <i>E. coli</i>	196
2.1.1.1	Revêtement PDA-O ₂ -Cl	196
2.1.1.2	Revêtement PDA-IO ₄ ⁻ -Cl	198
2.1.1.3	Revêtement PDA-PEI-Cl	200
2.1.2	Souches bactériennes <i>S. epidermidis</i>	201
2.1.2.1	Revêtement PDA-O ₂ -Cl	202
2.1.2.1.1	Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 104777.....	202
2.1.2.1.2	Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 6821.....	203
2.1.2.2	Revêtement PDA-IO ₄ ⁻ -Cl	204
2.1.2.3	Revêtement PDA-PEI-Cl	205
2.1.2.3.1	Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 104777.....	205
2.1.2.3.2	Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 6821.....	207
2.3	Conclusion	208
3.	Evaluation des propriétés bactériostatiques	210
3.1	Revêtement PDA-O ₂ -Cl.....	210

3.1.1	Souche bactérienne <i>E. coli</i>	210
3.1.2	Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 6821	211
3.2	Revêtement PDA-IO ₄ ⁻ -Cl.....	213
3.3	Revêtement PDA-PEI-Cl.....	214
3.3.1	Souche bactérienne <i>E. coli</i>	214
3.3.2	Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 6821	215
3.4	Conclusion	217
	Conclusion	218
	Références.....	220

Conclusion générale et perspectives 222

ANNEXE	229
--------------	-----

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

BSA : Albumine de sérum bovin (BSA)

CAQ : Composés d'ammonium quaternaire

CIP : Collection Institut Pasteur

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DA : Dopamine

DHI : 5,6-indolequinone

DLVO : Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek

DSC : Calorimétrie différentielle à balayage

DTNB : 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)

E. coli : *Escherichia coli*

EN : Energie de liaison

Gram – : Gram-négatif

Gram + : Gram-positif

Haloamine : fonction formée de la liaison entre un azote N et un halogène X (N-X)

LB : Milieu Luria-Bertani

L-DOPA : 3,4-dihydroxy-L-phénylalanine

MEB : Microscopie électronique à balayage

MH : Milieu Mueller-Hinton

N-halamine : composé contenant des fonctions haloamine

PAM : Peptides antimicrobiens

PBS : Tampon phosphate salin

PEG : Polyéthylène glycol

PEI : Polyéthylèneimine

PM-IRRAS : Spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de polarisation

PDA : Polydopamine

PDA-IO₄⁻ : Revêtement polydopamine synthétisé en présence de périodate de sodium comme oxydant

PDA-IO₄⁻-Cl : Revêtement polydopamine synthétisé en présence de périodate de sodium comme oxydant et chloré

PDA-O₂ : Revêtement polydopamine synthétisé en présence d'oxygène comme oxydant

PDA-O₂-3h : Revêtement polydopamine synthétisé en présence d'oxygène comme oxydant durant 3 h

PDA-O₂-3h-Cl : Revêtement polydopamine synthétisé en présence d'oxygène comme oxydant durant 3 h et chloré

PDA-O₂-6h : Revêtement polydopamine synthétisé en présence d'oxygène comme oxydant durant 6 h

PDA-O₂-6h-Cl : Revêtement polydopamine synthétisé en présence d'oxygène comme oxydant durant 6 h et chloré

PDA-O₂-24h : Revêtement polydopamine synthétisé en présence d'oxygène comme oxydant durant 24 h

PDA-O₂-24h-Cl : Revêtement polydopamine synthétisé en présence d'oxygène comme oxydant durant 24 h et chloré

PDA-PEI : Revêtement composite formé de la polydopamine et de la polyéthylénimine

PDA-PEI-Cl : Revêtement composite formé de la polydopamine et de la polyéthylénimine et chloré

PQ : Rhosphoniums quaternaires

PVP : Poly(vinylpyridine) quaternisées

QCM : Microbalance à cristal de quartz (Quartz Crystal Microbalance)

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

S. epidermidis : *Staphylocoque epidermidis*

TGA : Analyse thermogravimétrique

TNB: 5,5'-thiobis-(2-nitrobenzoic acid)

Tris : 2-amino-2-(hydroxyméthyl) propane-1,3-diol

UFC : Unité formant colonie

XPS : Spectrométrie de photoélectrons X

Introduction générale

La colonisation bactérienne de surfaces pouvant conduire au développement de biofilms, communautés multicellulaires adhérentes à une surface et enrobées d'une matrice extracellulaire, est cruciale pour le maintien de la plupart des écosystèmes de notre planète mais peut représenter une menace pour la santé humaine et avoir un impact économique important.

En effet, la lutte contre l'adhérence et la prolifération de bactéries sur les surfaces constitue une préoccupation constante et un enjeu médical et socio-économique majeur de notre société. Dans le domaine médical et agroalimentaire, la contamination bactérienne des surfaces est responsable de nombreuses infections nosocomiales et alimentaires à travers entre autres les prothèses, dans les blocs opératoires, dans les circuits de canalisations d'eau ou encore dans les installations de l'industrie agroalimentaire. En outre, cette biocontamination des surfaces risque d'entraîner également une détérioration des propriétés structurales et fonctionnelles des matériaux affectant aussi bien les coques des navires que les ouvrages de génie civil ou encore le patrimoine culturel. Ces biodégradations pouvant en effet conduire à des phénomènes de corrosion comme dans les réseaux d'assainissement où la biocontamination est à l'origine de dégagement de H_2S^{1-3} participant à la corrosion des conduites d'eau usées. On rencontre également des pertes d'aérodynamisme dues à l'accumulation de matière organique. Les traitements de lutte contre cette biocontamination des matériaux engendrent un impact économique important et sont parfois peu efficaces, le mode de vie en biofilms conférant en effet une grande résistance aux microorganismes, se révélant être un véritable défi pour la microbiologie moderne.

Ainsi, la prévention de l'adhérence bactérienne paraît indispensable et se traduit par le développement de revêtements antibactériens comme en témoignent les nombreuses recherches visant au développement de ces systèmes. Trois grandes classes de revêtements antibactériens peuvent être conçues de façon : soit à limiter l'adhérence bactérienne que l'on nomme revêtements antiadhésifs et/ou soit à inhiber le développement des bactéries ce sont

des films dits bactériostatiques, voire à les tuer revêtements que l'on qualifie de revêtements biocides. Ces derniers peuvent agir par contact et/ou par relargage de substances antibactériennes. Pour ce dernier mode d'action, des sels d'ammoniums quaternaires, des ions argent ou des antibiotiques, sont les plus souvent retrouvés dans la littérature comme substances biocides incorporées ou déposées sur des matrices, souvent polymériques, ou encore greffées chimiquement sur les surfaces dans ce but. Néanmoins, la résistance accrue des microorganismes à ces substances, la toxicité environnante de ces produits et la complexité de greffage ou de dépôt sont des obstacles à une utilisation industrielle à grande échelle. Des composés biosourcés tels que des enzymes ou des peptides antimicrobiens ont été envisagés comme des voies alternatives mais leur coût élevé de production et de purification, ainsi que leur relative instabilité face à des variations de pH ou de température restreint leur utilisation.

En alternatives à ces composés, une classe de composés antibactériens, les *N*-halamines, a suscité un grand intérêt ces dernières années. Ces composés contenant une ou plusieurs liaisons covalentes azote-halogène, qui sont formées par halogénéation de groupes imide, amide ou amine. Les propriétés antimicrobiennes des *N*-halamines sont dues à l'halogène qui se trouve à un degré d'oxydation (+I) et qui donc a des propriétés oxydantes, il peut réagir avec des récepteurs biologiques appropriés tels que les groupes thiol d'acides aminés au sein des bactéries. Cette réaction peut entraver le métabolisme des cellules telles que la respiration, en particulier les processus liés aux protéines, entraînant la mort des bactéries. L'efficacité désinfectante des *N*-halamines est similaire à celle de l'eau de Javel (l'hypochlorite de sodium), mais ces composés sont plus stables, moins corrosifs et relativement faciles à générer. En effet, après une immobilisation des précurseurs (contenant des groupements N-H : fonctions amine primaire ou secondaire, amide ou imide) de *N*-halamine sur une surface, ces derniers sont convertis en fonctions haloamine par un processus d'halogénéation (réaction de substitution de H par Cl(+I) ou Br(+I)), grâce à une solution d'hypochlorite de sodium si l'on souhaite des fonctions chloramine ou une solution d'hypobromite de sodium si l'on souhaite générer des fonctions bromamine.

Diverses méthodes pour lier des *N*-halamines à des surfaces de substrats ont été décrites, cependant, ces procédés demandent souvent soit un prétraitement de surface complexe, soit de longues procédures de formation du revêtement et manque souvent d'universalité, les

stratégies employées étant spécifiques à la physico-chimie de surfaces des matériaux. Dans ce contexte, la polydopamine (PDA), un biopolymère insoluble en milieu aqueux produit par auto-oxydation d'un neurotransmetteur catécholamine, la dopamine (DA), est devenue un polymère très étudié en sciences des matériaux en tant que système fonctionnel bio-inspiré polyvalent employé dans une très large gamme d'applications. La PDA fournit des propriétés d'adhérence exceptionnelles produisant un revêtement universel et offrant la possibilité d'un grand répertoire de post-fonctionnalisation, ce qui a ouvert la voie à de nombreuses applications, aussi bien dans le domaine des sciences biomédicales, que des processus de conversion d'énergie ou encore de dispositifs de traitement de l'eau.

Le projet de thèse s'inscrit dans la thématique de recherche de lutte contre le développement de biofilms et plus particulièrement contre la colonisation bactérienne de surfaces. Il a pour objectif ambitieux de concevoir des revêtements *N*-halamine à base de PDA offrant des propriétés antibactériennes à large spectre. Pour la conception et l'étude de tels systèmes, les revêtements *N*-halamine ont été formés sur des surfaces « modèles » d'or et des tests antimicrobiens ont été réalisés.

La dopamine, dont l'emploi a été inspiré de la composition protéinique du byssus de la moule, s'auto polymérise spontanément en milieu alcalin en présence d'oxygène dissous qui agit comme oxydant. Cela conduit à la formation d'un film mince de polydopamine sur pratiquement toutes les surfaces de matériaux par une simple immersion du substrat dans une solution aqueuse alcaline de dopamine. Cependant, les matériaux ou molécules sensibles aux pHs basiques, tels que la cellulose, le polyester ne peuvent pas être fonctionnalisés avec la PDA. De plus, l'épaisseur maximale obtenue pour un dépôt de PDA en condition alcaline et en présence de dioxygène est inférieure à 50 nm freinant une éventuelle optimisation de l'effet antibactérien du revêtement par augmentation de l'épaisseur du dépôt afin de maximiser le nombre de fonctions amine disponibles. Pour répondre à cette problématique, 2 grandes voies d'optimisation du revêtement ont été envisagées dans ce projet. La première a été d'augmenter l'épaisseur du film de PDA en modifiant l'oxydant, O₂ par le périodate de sodium qui permet (i) un dépôt dans un milieu acide avec une cinétique plus importante et (ii) d'obtenir des films plus épais. La deuxième voie explorée a reposé sur l'introduction de davantage de fonctions amine par l'intermédiaire de la polyéthyléimine (PEI), en formant ainsi un composite PDA-PEI.

Les fonctions antibactériennes haloamine ont été obtenues par un post-traitement du revêtement à base de PDA et de PDA-PEI par simple immersion dans une solution d'hypochlorite ou d'hypobromite de sodium, à pH basique. Il est connu dans la littérature que la stabilité de la PDA dépend en grande partie du pH de la solution, donnant des taux de détachement des films de 66% et 80% pour, respectivement, des pHs extrêmes de 1 et 14. Aussi, pour répondre à cette problématique, un suivi cinétique de la chloration/bromation a été mené afin de définir les paramètres optimaux à savoir la concentration en NaOCl ou NaBr, le pH de la solution et le temps de chloration afin, tout en préservant l'intégrité du revêtement, de maximiser la densité de fonction haloamine présente au sein du film. Enfin, l'évaluation antibactérienne et l'étude du mode d'action de ces revêtements *N*-halamine sur différentes souches bactériennes à Gram positif et négatif ont été menées.

Ce travail, qui a fait l'objet d'une première publication dans 'ACS Applied Materials and Interfaces'⁴ (Annexe 1), s'appuie sur l'expérience du Laboratoire de Réactivité de Surface, au sein duquel plusieurs projets relatifs à la création de surfaces antimicrobiennes ont été menés, et sur l'expertise en matière de revêtements *N*-halamine du Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques.

Le manuscrit de thèse est organisé en cinq chapitres. Il débute par un état de l'art qui permet de présenter le contexte et les enjeux propres au développement des surfaces antimicrobiennes. Il rappelle les différentes stratégies existantes, leurs avantages et leurs inconvénients, et donne un aperçu des différents modes d'action antibactériens connus. Il décrit également les propriétés antibactériennes et caractéristiques physicochimique des fonctions haloamine étudiées dans la suite de ce travail. La physicochimie du polymère PDA et du copolymère PDA-PEI sera aussi largement détaillée en raison de l'importance expérimentale qui leur a été accordée puisqu'ils étaient la base des nouveaux revêtements *N*-halamine développés au cours de ce travail.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit présente les protocoles de formation des films à base de PDA, de fonctionnalisation de ces films pour obtenir des revêtements *N*-halamine et les techniques d'analyse utilisées pour caractériser les surfaces créées. Les différents tests microbiologiques mis en place y sont également décrits.

Le troisième chapitre porte sur la formation du revêtement à base de PDA sur des surfaces d'or et de silicium « modèles ». Une méthodologie scientifique de suivi cinétique du dépôt pour mettre en évidence les différentes étapes et vitesse de dépôt du revêtement à la surface des substrats d'or et silicium y est présentée. L'étude des différents paramètres (substrat, concentration en dopamine et choix de l'oxydant) et voies de dépôt du film - *Grafting from*, *Grafting to*, multicouche - ont été également abordées dans un but d'optimisation de ces films.

Le quatrième chapitre est quant à lui dédié à l'étude de la génération des fonctions haloamine (chloramine et bromamine) au sein de ces revêtements à base de PDA et de PDA-PEI. Un suivi cinétique de la chloration a été mené afin d'optimiser les paramètres tels que la concentration en NaOCl ou NaOBr, le pH de la solution et le temps de chloration de façon à, tout en préservant l'intégrité du revêtement, maximiser la densité de fonction haloamine formée au sein du film de PDA ou de PDA-PEI.

Enfin, le cinquième chapitre est consacré à la présentation des propriétés antimicrobiennes, qui ont fait l'objet de diverses expériences avec 3 souches bactériennes : 1 souche *Gram- Escherichia coli* et deux souches *Gram +* de type *Staphylocoque epidermidis*. La confrontation des caractérisations physico-chimiques et des observations microbiologiques soulève différentes questions auxquelles les chapitres suivants tentent de répondre.

CHAPITRE I
Etude bibliographique

CHAPITRE I :

Etude bibliographique

1-Introduction

Ce projet de thèse a pour ambition de développer un nouveau revêtement antibactérien régénérable permettant de lutter contre la formation des biofilms bactériens. Deux systèmes seront pour cela étudiés, un système composé d'un revêtement polydopamine (PDA) et un deuxième système qui présentera un composite PDA-polyéthylénimine (PDA-PEI), tous deux renfermeront des fonctions haloamine, liaisons azote-halogène (Cl(+I) ou Br(+I) ou I(+I)) qui seront générées après formation du revêtement. Ces dernières jouent en effet le rôle d'agent antibactérien grâce au degré d'oxydation +I de l'halogène leur conférant un fort pouvoir oxydant. L'avantage majeur de ces composés, outre leur fort pouvoir biocide face à une large gamme de microorganismes, repose sur la régénération possible de ces fonctions donnant lieu à la possibilité d'une réutilisation multiple de ces systèmes *N*-halamine.

L'enjeu majeur de ce projet consiste donc à déposer sur une surface un film de PDA ou d'un composite PDA-PEI suivi d'une halogénéation de ce dernier afin de créer les liaisons haloamine à une concentration suffisante pour garantir un effet antibactérien tout en maintenant l'intégrité du revêtement. Les propriétés antibactériennes seront évaluées par des tests microbiologiques qui seront présentés à la fin du manuscrit.

La première partie de cette étude bibliographique concernera la présentation des biofilms bactériens. L'objectif est d'aborder les aspects principaux de ces systèmes tels que leur processus de formation, leur impact sociétal mais aussi économique ainsi que les stratégies et techniques mises en œuvre dans la lutte contre ces derniers.

La deuxième partie présentera les fonctions haloamine à travers leurs propriétés antibactériennes et leurs interactions avec les microorganismes. Cette partie abordera également les systèmes actuellement développés en présentant les différentes stratégies mises en œuvre d'immobilisation de ces fonctions antibactériennes ainsi que les caractérisations physicochimiques employées dans la mise en évidence de ces fonctions.

Enfin, la dernière partie sera consacrée à la présentation des deux systèmes de revêtement PDA et PDA-PEI qui ont été étudiés au cours de ce travail. Il sera entre autres évoqué les différentes voies de synthèse et de dépôt de ces revêtements ainsi que leurs propriétés physicochimiques et leurs applications.

2-Les biofilms bactériens

Nous aurons pour objectif dans cette partie de présenter et de comprendre le concept général de biofilm, la manière dont il se développe, les différents enjeux et impacts de ces biofilms ainsi que les différentes méthodes et stratégies mises en place dans la lutte contre ces derniers.

2.1 La bactérie

Les bactéries sont des organismes procaryotes unicellulaires. Dotés d'une membrane cellulaire et d'un matériel génétique (ADN), les bactéries sont capables d'assurer les fonctions élémentaires propres au vivant : se reproduire, transmettre l'information génétique, mais aussi tirer matière et énergie de l'environnement. Elles possèdent une certaine autonomie et un métabolisme propre.

Selon la composition de leur paroi cellulaire, les bactéries peuvent être divisées en deux grandes catégories : Gram négatif et Gram positif (Figure 1)⁵. Un composant majeur des parois cellulaires bactériennes que l'on retrouve à la fois chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif est un polymère de la famille des peptidoglycanes. Les bactéries Gram positif ont des parois cellulaires épaisses composées d'une multicouche de peptidoglycane qui représente jusqu'à 90% des constituants de la paroi bactérienne. Celle-ci contient également des acides téichoïques et lipotéichoïques associés au peptidoglycane pour le premier et à la membrane cellulaire interne pour le second.

En revanche, pour les bactéries Gram négatif, il n'y a qu'une seule ou aux plus deux couches de peptidoglycanes mais 3 polymères situés en dehors du peptidoglycane complètent la paroi constituant la membrane externe. On retrouve également un compartiment appelé espace périplasmique ou périplasme et situé entre la membrane interne et le peptidoglycane caractéristique spécifique des bactéries Gram négatif. Cette espace représente 20 à 40% du volume cellulaire⁶ et forme une sorte de gel visqueux⁷ contenant 2 types de glucanes caractéristiques des bactéries Gram négatif : la couche de peptidoglycane vue précédemment et les glucanes périplasmiques osmorégulés. On retrouve également de nombreuses protéines. La membrane externe est constituée d'une double couche de phospholipides dans

laquelle tout ou une partie des phospholipides de la couche la plus externe sont remplacés par des molécules de lipopolysaccharide⁸.

La membrane cellulaire des bactéries joue un rôle crucial dans leur protection contre les agressions externes ; en effet les bactéries Gram positif sont en général plus résistantes aux agents antibactériens de par la structure en double enveloppe de leur paroi cellulaire. En plus de cette fonction vitale, les parois cellulaires des bactéries permettent l'adhérence à un grand nombre de surface grâce à la présence d'adhésines, c'est-à-dire de macromolécules spécifiques responsables des interactions adhésives sur une surface⁹. Dans le processus d'adhérence, les propriétés moléculaires de la surface des cellules bactériennes sont d'une importance cruciale. Habituellement, les bactéries présentent une charge globale négative mesurée dans une suspension aqueuse à un pH physiologique.⁵

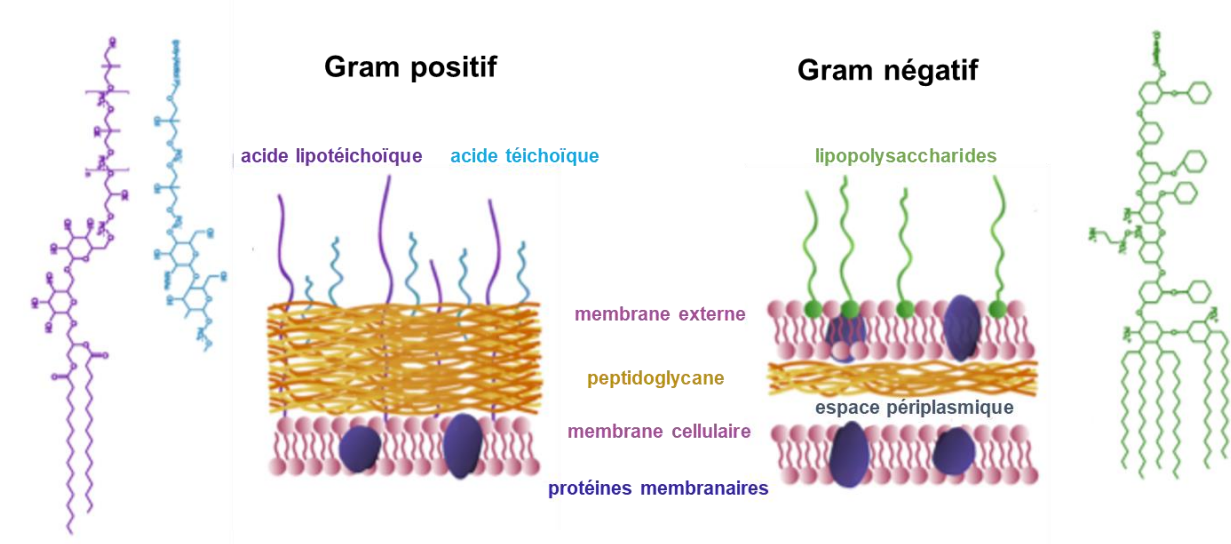


Figure 1 : Schéma de la structure de la membrane d'une bactérie Gram positif et d'une bactérie Gram négatif d'après la référence ⁵.

2.2 Les biofilms : la vie communautaire des bactéries

Les microbes (bactéries, virus, champignons microscopiques, microalgues...) représentent la plus grande partie de la biomasse vivante sur Terre. Le plus souvent inoffensifs, nombreux ont un rôle essentiel au fonctionnement et à l'équilibre de la planète jouant un rôle écologique

capital et contribuant très largement au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes¹⁰⁻¹². Mais en général on garde une mauvaise image des bactéries à travers par exemple les familles bactériennes des *Listeria*, *Salmonella* ou encore *Escherichia coli* qui ont conduit à de nombreuses crises sanitaires graves¹³.

Une particularité de ces microorganismes est leur mode de vie privilégié qui est la vie en communauté. Les microbes possèdent une vie sociale liée en générale à une surface ou à une interface¹⁴. Cette vie communautaire répond à un instinct de survie, en effet ce regroupement leur permet d'être plus résistants face à un environnement hostile.

La mise en évidence de l'organisation communautaire des microorganismes provient d'un long cheminement scientifique. Le début de la recherche microbiologique est le plus souvent associé aux découvertes d'Antoni Van Leeuwenhoek au XVIIe siècle, qui mit en évidence, grâce à un microscope optique, l'existence de microorganismes présents à la surface de ses dents qu'il nomma « *animalcus* » ce fut le premier biofilm observé¹⁵. Deux cents ans plus tard, par l'observation visuelle des micro-organismes, Louis Pasteur a mis en lumière l'existence de germes responsables d'infection.¹⁶

En 1943, Claude Zobell montre que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension que l'on nomme les bactéries planctoniques¹⁷. Enfin, dans les années 1980, les travaux de William Costerton mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixée sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines nommée matrice extracellulaire (EPS)¹⁸, c'est ce que l'on appelle biofilm.

L'utilisation de la microscopie optique, puis confocale, a permis de montrer que le biofilm est composé d'agrégats de microorganismes, séparés par des espaces libres, dépourvus de bactéries et parcourus par des courants aqueux que l'on nomme canaux assurant la circulation de fluides et permettant à la fois l'apport de nutriments aux bactéries et l'élimination de leurs déchets¹⁹. La matrice extracellulaire apporte ainsi architecture et stabilité au biofilm. Ainsi le biofilm est un environnement structuré qui présente souvent une architecture complexe, très variable d'un biofilm à l'autre selon les microorganismes qui le composent et les conditions environnementales²⁰. En effet, en fonction des systèmes spécifiques étudiés et de la nature

du micro-organisme, les biofilms peuvent afficher une large gamme de phénotypes. Par exemple, les biofilms produits par les *Listeria monocytogenes*, cultivés dans des conditions statiques, se composent généralement d'une couche homogène de cellules et/ou de microcolonies, ces cellules présentant une morphologie similaire à celle de cellules planctoniques. En revanche, les biofilms de *L. monocytogenes* cultivées dans des conditions d'écoulement continu se composent de microcolonies de forme sphérique qui sont entourées d'un réseau de chaînes composé de cellules allongées²¹. Autre exemple, les biofilms de *Staphylococcus aureus* cultivés dans des conditions d'écoulement statique et continu forment une couche dense de cellules avec une matrice élaborée abritant divers types de polymères. La formation et la maturation du biofilm chez *S. aureus* dépendent de l'interaction entre divers régulateurs²². Les biofilms de *Bacilli*, bactérie *Gram +*, sont généralement étudiés à l'interface air-liquide où ils forment des pellicules structurées flottantes ou des colonies complexes sur le plan architectural sur milieu gélosé solide²³. Ce dernier type de biofilm développe des structures aériennes appelées « organes de fructification » qui servent de sites de sporulation²⁴. De plus, le *Bacilli* peut également former des biofilms submergés sous conditions d'écoulement statique et continu.²⁵

La matrice extracellulaire est ainsi une caractéristique de nombreux biofilms. Le développement de l'architecture des biofilms bactériens est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les bactéries du biofilm. Cette matrice apporte aux biofilms plusieurs propriétés émergentes, c'est-à-dire des propriétés qui ne sont pas prévisibles de l'étude des cellules bactériennes planctoniques. Ces propriétés comprennent l'existence de gradients localisés qui assurent la diversité de l'habitat, la capture de ressources par sorption, la rétention enzymatique qui fournit des capacités digestives, des interactions sociales et la capacité, grâce à la tolérance et / ou la résistance, de survivre à l'exposition aux antibiotiques (Figure 2)¹⁰.

CHAPITRE I
Etude bibliographique

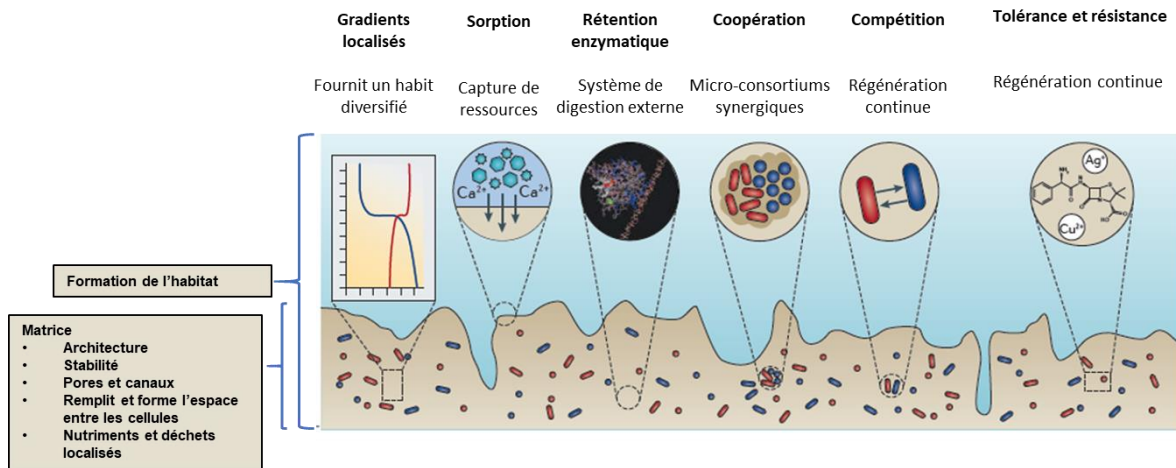


Figure 2 : Schéma représentant les propriétés du biofilm bactérien, d'après la référence.¹⁰

Un exemple de la manifestation de ces biofilms sont les couleurs du parc de Yellowstone, aux États-Unis (Figure 3), produites par des millions de bactéries enrobées dans une matrice qui forment le biofilm. Lorsqu'ils sont observés au microscope, ces films bactériens offrent une organisation tridimensionnelle, constitués de microbes collés les uns aux autres constituant des niveaux de filaments, des chemins sinueux et des structures comparables à de minuscules tours.²⁶



Figure 3 : L'un des bassins d'eau chaude du parc de Yellowstone, le Grand Prismatic Spring, aux États-Unis, est entouré de rivières colonisées par des biofilms géants composés d'algues et de bactéries.²⁶

2.3 Le cycle de vie d'un biofilm

La formation et la croissance du biofilm sont régies par un certain nombre de processus chimiques et biologiques constitué d'étapes distinctes²⁷ (Figures 4 et 5) :

- (a) La couche dite de conditionnement est la base sur laquelle un biofilm se développe. En effet, toute surface présente dans un milieu environnant humide ou aqueux est contaminée par de la matière organique (protéines telles que la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine, la thrombospondine, collagène et polysaccharides) ou de composés inorganiques (sels, minéraux) qui sont dissous dans le milieu composant le film²⁸⁻²⁹. La présence de ce dernier conduit à la modification des propriétés physico-chimiques du support telles que la charge, le potentiel et les tensions de surface, ce qui peut favoriser ou non l'adhérence des bactéries au support³⁰. L'ancrage microbien semble être favorisé par le film de conditionnement qui sert alors de couche « primaire » à l'adhérence³¹.
- (b) Lorsque les cellules planctoniques entrent en contact avec un film de conditionnement, elles y adhèrent par des forces physiques ou par des macromolécules appelées adhésines présentes à la surface des bactéries^{28, 32}. L'adhérence des biofilms aux matériaux est principalement régie par des interactions hydrophobes, stériques, interactions électrostatiques et de forces Van der Waals qui contribuent à l'adhérence des bactéries sur les surfaces et interfaces³³⁻³⁴. La capacité, le taux et le degré d'adhérence des bactéries à la surface dépendent de la composition du matériau, de la température, de la pression et des propriétés de la cellule bactérienne³⁵. Lorsque les forces d'attraction sont supérieures aux forces de répulsion, certaines cellules attachées restent immobilisées et deviennent par la suite irréversiblement attachées.
- (c) Cette adhérence irréversible laisse place à la formation précoce du biofilm, au cours de laquelle les microorganismes commencent à se diviser et à produire une substance de polymère extracellulaire (EPS), ce qui améliore et accentue l'adhérence.

- (d) La maturation du biofilm se déroule ensuite, étape durant laquelle des structures 3D se développent dans lesquelles la matrice EPS fournit un échafaudage multifonctionnel et protecteur (Figure 4).
- (e) Et enfin la « dispersion » : processus grâce auquel des cellules quittent le biofilm pour réintégrer l'état planctonique. La dispersion est une étape cruciale dans la progression de la formation du biofilm car c'est le mécanisme par lequel les bactéries se propagent d'une région à une autre, ce qui contribue à la propagation du biofilm et des infections, par exemple. En effet, à mesure que le biofilm mûrit, les ressources deviennent limitées et des produits toxiques peuvent s'accumuler. Ainsi, afin de se développer, de se nourrir et d'éliminer les conditions induisant le stress et les déchets, les cellules se dispersent vers d'autres régions.

Ainsi les paramètres influençant la formation du biofilm sont nombreux. En effet comme il a été décrit précédemment, l'adhérence bactérienne représente l'étape initiale de la formation du biofilm. Ainsi les caractéristiques de la surface telles que la topographie, la rugosité ou la mouillabilité influencent l'adhérence des bactéries. Par exemple, Lorenzetti *et al.*³⁶ ont montré l'affinité des revêtements d'anatase envers l'attachement bactérien en étudiant à l'aide d'une souche d'*Escherichia coli* exprimant une protéine fluorescente verte (*gfp-E. coli*) en relation avec la photoactivation de surface par irradiation UV.

On voit ainsi que l'étude et la compréhension du cycle de vie d'un biofilm est essentielle dans une optique de lutte contre la formation de ces systèmes vivants. Il s'avère que la formation et le développement du biofilm peuvent être empêchés ou freinés en ciblant les toutes premières étapes du développement du biofilm.

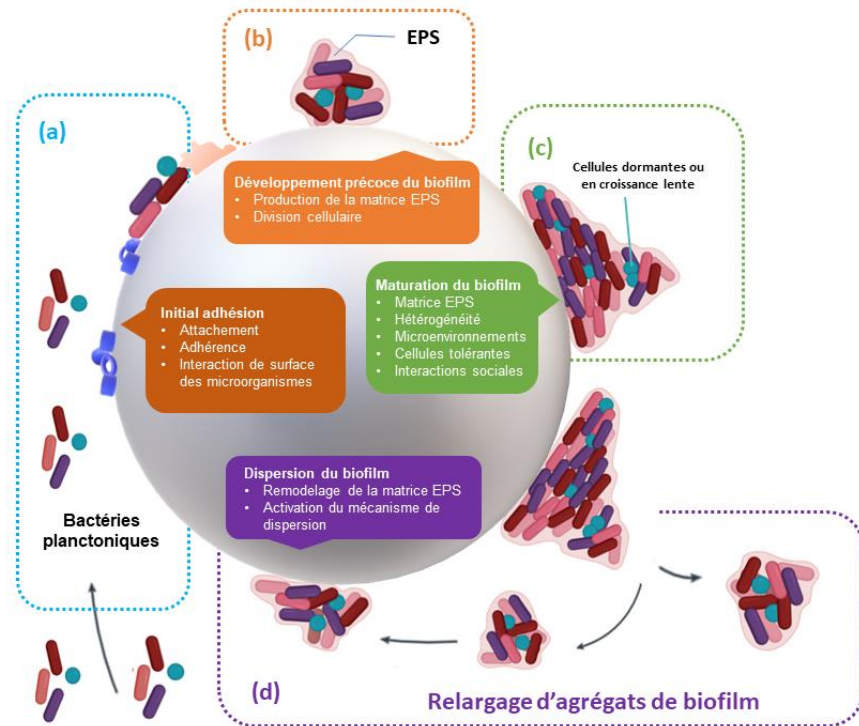


Figure 4 : Les différentes étapes de formation d'un biofilm d'après la référence ³⁷ : (a) attachement initial, (b) formation précoce du biofilm, (c) maturation du biofilm et (d) détachement.

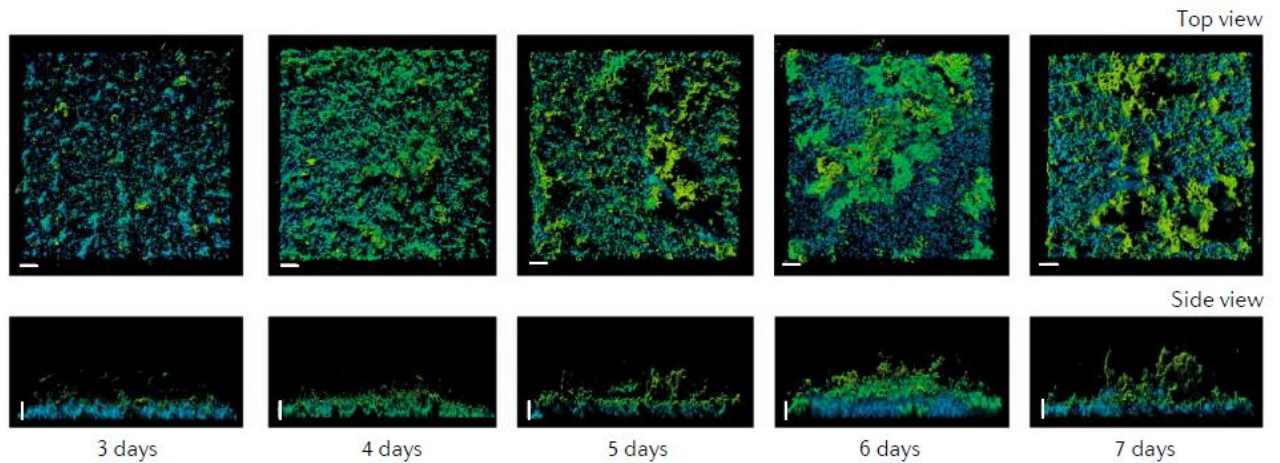


Figure 5 : Images de microscopie confocale à balayage laser de clichés de la formation d'un biofilm de *Sulfolobus acidocaldarius* pris à différents temps. En bleu apparaît l'ADN extracellulaire composant le biofilm, en vert le glucose et mannose et en jaune la N-acetyl-d-glucosamine.³⁷

2.4 Tolérance/résistance du biofilm aux antibiotiques

La résistance accrue ou la tolérance aux antibiotiques et autres agents antimicrobiens par rapport aux cellules bactériennes libres sont des exemples typiques des propriétés émergentes des biofilms. La "résistance" et la "tolérance" sont des termes qui sont utilisés pour désigner une capacité accrue d'un organisme à survivre à une exposition à des composés qui sont létaux pour des organismes sensibles. Le terme « résistance » est généralement employé pour désigner une caractéristique héréditaire génétique qui est acquise soit par mutation qui subsiste même lorsque les cellules du biofilm sont dispersées. Au contraire, le terme "tolérance" s'utilise plutôt pour désigner une caractéristique qui est spécifique aux biofilms et qui est perdue après lorsque la bactérie retourne à un état planctonique^{38,39}. En raison de la capacité des cellules du biofilm à survivre à l'exposition aux antibiotiques et de leur capacité à survivre à la dessiccation, le biofilm est considéré comme une forteresse.

En effet, comparées aux bactéries planctoniques, les bactéries présentes dans les biofilms développent jusqu'à 1000 fois plus de résistance aux agents antimicrobiens⁴⁰, un biofilm agit ainsi comme une barrière^{30, 41}. Étant donné que les exopolysaccharides et l'ADN composant la matrice extracellulaire (Figure 5) ont des charges négatives, certains types d'agents antimicrobiens chargés positivement peuvent être piégés par eux et le temps nécessaire aux antibiotiques pour pénétrer la matrice polymère est retardé⁴²⁻⁴³.

2.5 Les stratégies mises en place pour la lutte contre les biofilms

2.4.1 Introduction

Il est désormais largement admis que les bactéries survivent en se fixant sur des substrats solides, communautés structurées appelées biofilms, où elles peuvent persister pendant de longues périodes, pouvant agir comme réservoir d'agents pathogènes. Les bactéries dans les

biofilms sont considérablement plus résistantes aux antibiotiques et aux contraintes liées à l'environnement.

L'impact négatif des biofilms touche de nombreux domaines comme le domaine maritime entraînant l'accélération de la corrosion des pipelines pétroliers et des systèmes d'écoulement aquatiques⁴⁴, dans le domaine du textile⁴⁵ ou encore le domaine médical à travers les maladies nosocomiales. En effet la lutte contre les infections dites nosocomiales résultant d'un traitement hospitalier ou d'un service de santé⁴⁶, est considérée comme un défi majeur pour la santé. Le taux de prévalence des infections nosocomiales qui sont principalement causées par la colonisation bactérienne d'un large éventail de surfaces varie généralement de 4 % à 10 % (atteignant jusqu'à 30 % dans les unités de soins intensifs) dans les pays occidentaux industrialisés, ce qui en fait la sixième cause de décès⁴⁷⁻⁴⁹. Les estimations du coût annuel varient de 4,5 milliards de dollars à plus de 11 milliards de dollars.

Une façon de prévenir la contamination de surface consiste à maintenir l'environnement stérile, par exemple en utilisant des désinfectants, tels que l'hypochlorite de sodium ou une espèce réactive de l'oxygène telle que le peroxyde d'hydrogène. De même, des sels d'argent, des composés d'ammonium quaternaire ou des alcools sont utilisés ; un autre désinfectant largement utilisé est le triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy) phénol). L'interaction entre les groupes fonctionnels des désinfectants et le récepteur biologique approprié des bactéries conduit à l'endommagement et l'inactivation des cellules microbiennes. Malheureusement, l'état stérile ne dure pas longtemps et l'utilisation fréquente de tels désinfectants pose un problème environnemental important, particulièrement dans le cas du triclosan⁵⁰. Aucune de ces stratégies ne peut totalement éviter la formation de biofilm. Puisque lorsque qu'un biofilm est généré, peu de biocides efficaces peuvent éradiquer les bactéries dans les biofilms. Il est donc primordial d'éviter la formation des biofilms.

2.4.2 Traitements de surface : Surfaces antibactériennes

Comme il a été décrit précédemment, la formation de biofilms a été largement étudiée au cours des dernières décennies dans le but de développer plusieurs approches de modification de surface pour prévenir ou réduire l'attachement des bactéries.

Le traitement de surface apparait comme une stratégie efficace en permettant d'éviter les premières étapes de colonisation des surfaces par les bactéries soit en les repoussant en créant par exemple une surface répulsive par effet stérique à travers le greffage de longues chaînes de polymère, en modifiant la charge de surface ou en abaissant l'énergie de surface. Une autre stratégie est de tuer les cellules qui approchent soit par relargage d'un biocide dans le milieu ou par contact (Figure 6)⁵¹. Enfin, un troisième effet antibactérien qui pourra être envisagé, plus connu dans le domaine des antibiotiques, est l'effet bactériostatique. Cette voie conduit à une bactériostase des bactéries c'est-à-dire à un ralentissement de leur croissance pouvant aller jusqu'à l'arrêt de cette dernière par une inhibition de la synthèse protéique ou de la synthèse ou du fonctionnement des acides nucléiques.

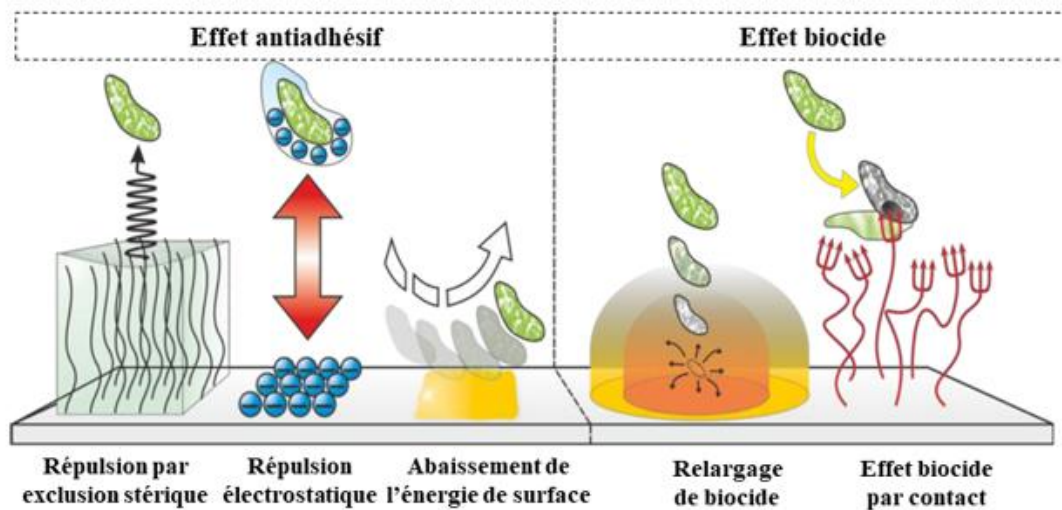


Figure 6 : Les 2 grandes stratégies de revêtements antibactériens : l'effet antiadhésif et l'effet biocide.⁵¹

La répulsion des microbes peut être par exemple réalisée avec des revêtements d'hydrogel principalement à base de polyéthylène glycol (PEG) ou de polymères similaires formant des hydrogels, par des polymères fortement chargés négativement (les parois des bactéries étant également chargées négativement) ou des modifications rendant la surface ultra hydrophobe. Les propriétés des surfaces telles que davantage de rugosité, une topographie bien définie et plus de rigidité peuvent également contrôler l'adhérence des bactéries et donc la formation de biofilms. Les méthodes chimiques peuvent également être utilisées pour créer des surfaces permettant de repousser ou de tuer les bactéries.

La destruction des microbes peut être obtenue soit en libérant un biocide à partir d'une matrice, qui est soit préalablement incorporée, soit activement formée, par exemple par formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par du TiO₂ photoactivé⁵¹. Soit cet effet biocide s'opère par contact actif, les surfaces pouvant en effet être rendues biocides après greffage de polymères antimicrobiens, par exemple.

Par la suite, seules les surfaces avec des polymères antimicrobiens seront discutées. En effet, comparés aux biocides de faible poids moléculaire, les biocides polymères ont une activité antimicrobienne à long terme et une efficacité antimicrobienne élevée car ils présentent, en général, une densité de groupements fonctionnels plus élevée.

2.4.2.1 Les revêtements polymères bactéricides

a- Polymères biocides relarguant

La polymérisation de macromolécules libérant des biocides, d'abord réalisée par Vogl et Tirell qui ont polymérisé l'acide salicylique, n'a pas abouti à des polymères dotés de propriétés antimicrobiennes⁵². Cependant, il a été démontré que la dégradation du polyester libèrait de l'acide salicylique de manière contrôlée, ce dernier ayant un effet biocide. Des effets similaires ont été trouvés pour les polymères à base d'acrylate avec des groupes latéraux d'acide salicylique⁵³ et les poly(esters d'anhydride) à base d'acide salicylique⁵⁴.

L'oxyde nitrique (NO), ou monoxyde d'azote, est l'une des molécules les plus prometteuses présentant une activité antibiofilm, en inhibant sa formation et en déclenchant la dispersion du biofilm⁵⁵⁻⁵⁶ et ce pour une large variété de bactéries. Dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, par exemple, le traitement d'un biofilm mature à des concentrations sublétales (allant du pM au nM) déclenche une transition du sessile (biofilm) au mobile (planctonique), fournissant ainsi un moyen de thérapie efficace par antibiotique⁵⁷. Néanmoins ce composé reste difficile à manipuler en raison de la nature réactive et de la courte demi-vie (0,1 à 0,5 seconde)⁵⁸ de la molécule gazeuse, de plus l'oxyde nitrique induit une dispersion du biofilm à des concentrations spécifiques sublétales pour les bactéries (MIC), ce qui signifie qu'un traitement à l'oxyde nitrique nécessitera un traitement ultérieur ou combiné avec un agent

antimicrobien pour éradiquer les cellules dispersées. Pour résoudre ainsi les problèmes autour de l'utilisation de l'oxyde nitrique, une approche innovante a été ainsi développée, une nouvelle classe de polymères biocides libérant du NO, dite donneur de NO, a été introduite par Schoenfisch⁵⁹⁻⁶⁰. Les polymères contiennent des groupes diolzeniumdiolate, qui peuvent être formés par addition de NO à un polymère contenant un groupe amine sous une pression élevée. L'optimisation de ces groupes a abouti à des polymères qui libèrent le NO en quelques heures (Figure 7).

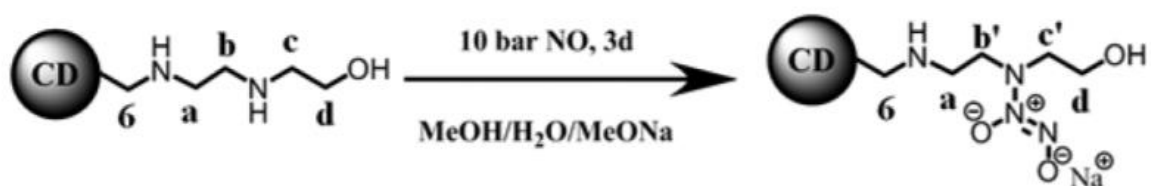


Figure 7 : Schéma de la génération du groupement NO à partir d'un dérivé de la cyclodextrine CD-HEDA7.⁶⁰

Par ailleurs, les polyphénols provenant de sources naturelles telles que les thés ont montré des propriétés antimicrobiennes⁶¹. Des imitations de ces polymères naturels ont été synthétisées par Kenawy *et al.*⁶². Des recherches sur le modèle d'activité ont révélé que les polymères doivent libérer des phénols pour tuer les cellules microbiennes.

Recentment, une autre classe de polymères antimicrobiens a été mise au point par Schanze, Whitten et leurs collègues qui ont conçu des polyélectrolytes conjugués cationiques à base de polymères conjugués de type poly(phénylène éthynylène) fonctionnalisés avec des groupes solubilisants cationiques d'ammonium quaternaire⁶³. Ces polymères se sont révélés très efficaces en présence de lumière en formant et en libérant efficacement l'oxygène singulet (¹O₂), mais étaient également efficaces dans l'obscurité, en raison de leur structure imitant l'adénosine monophosphate⁶⁴. La formation d'oxygène singulet est également à l'origine des propriétés antivirales du polymère⁶⁵.

b- Polymère biocide par contact

Les agents antibactériens actifs par contact désignent les biocides qui inactivent les bactéries tout en restant liés aux surfaces sur lesquelles ils sont immobilisés, donc sans libération de

biocide. Bien que l'affirmation d'un tel mode d'action ait été faite maintes fois faite, elle est plutôt difficile à prouver. En effet, les tests courants d'activité antimicrobienne ne peuvent pas faire la distinction entre l'activité de contact et les systèmes de libération. La raison en est qu'un biocide sur ou dans un matériau diffusera hors du matériau s'il n'est pas lié de manière covalente. Cependant, pour être létale pour les microbes, la concentration doit être supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou même la concentration biocide minimale (CBM) uniquement dans une région d'un μm au-dessus de la surface. Si la concentration de biocide est inférieure à la CMI en dehors de la petite zone de destruction, tous les tests existants concluent à une activité de contact. Jusqu'à présent, aucun test ne permet de faire la distinction entre ces cas. La seule façon d'obtenir une meilleure image est d'effectuer des tests de lavage à long terme, de surveiller et de concentrer en permanence les solutions de lavage et de tester les performances antimicrobiennes. L'un des premiers modèles proposés sur le mode d'action par contact de polymères antimicrobiens fixés en surface a été proposé par Tiller *et al.* en 2001 (Figure 8)⁶⁶. Ce système est composé d'un ammonium quaternaire greffé sur une chaîne polymérique, espaceur qui permet à l'agent biocide, s'il est placé à une distance d'environ 19 nm^{51, 66}, de pénétrer la paroi des bactéries adhérentes à la surface et de les tuer en perçant un trou dans la membrane cellulaire interne pour finalement tuer la cellule par rupture de la bicouche phospholipidique, tel que cela est représenté sur la Figure 8. La concentration de polymère est si importante qu'elle permet de tuer des microorganismes insensibles à ces polymères en solution, indiquant que les mécanismes d'action biocides diffèrent en solution et en surface.

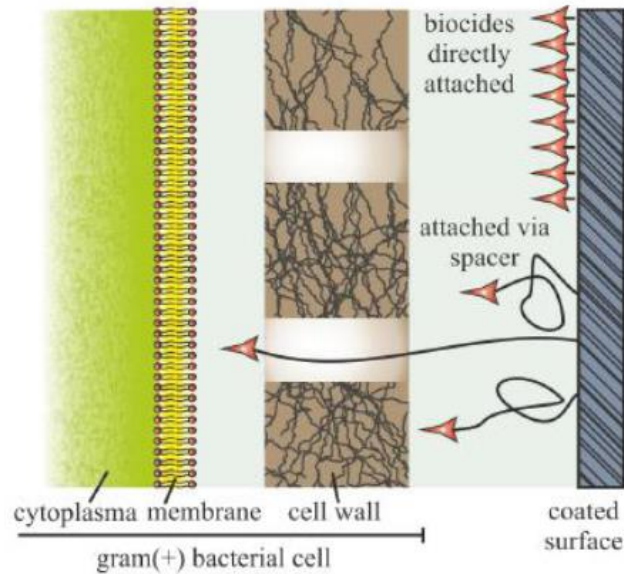


Figure 8 : Pénétration de la paroi bactérienne par un composé biocide ancré en surface par un espaceur.³⁶

D'autres études ont pu montrer que l'activité de telles surfaces dépendait de la masse moléculaire des polymères utilisés⁶⁷⁻⁶⁸ confortant le rôle crucial attribué à l'espaceur. L'hydrophobicité et la charge des chaînes polymériques apparaissent également comme des paramètres clés pour éviter leur coagulation et par conséquent la disparition de tout effet biocide⁶⁹.

Le concept d'espaceur a néanmoins fait l'objet de plusieurs controverses. Il a en effet été mis en doute car la longueur effective des chaînes polymériques greffées ne permet pas d'atteindre la membrane interne des bactéries sans une forte tension de la macromolécule. Cependant la distribution statistique des longueurs de chaîne implique que certaines soient plus longues que la moyenne et permettent donc de traverser la paroi externe des bactéries

Les agents antibactériens actifs de contact les plus fréquemment rapportés dans la littérature comprennent les composés d'ammonium quaternaire (CAQ) tels que les alkyl pyridiniums et le poly(2-(diméthylamino) éthyl méthacrylate quaternisé), les phosphoniums quaternaires (PQ), et les chloramines.

Les CAQ sont des molécules organiques chargées positivement et représentent une grande classe d'agents bactéricides par contact à large spectre. Leur structure de base est amphiphile comprenant quatre groupes alkyle attachés de manière covalente à un azote central (R_4N^+).

Isquith *et al.*⁷⁰ ont introduit le concept de surfaces antibactériennes à contact actif en 1972 lorsqu'ils ont mené une expérience pour déterminer si un CAQ à base d'organosilicium a conservé son activité antimicrobienne après avoir été chimiquement attaché à une surface. Du coton et du verre ont été fonctionnalisés avec du chlorure de 3-(triméthoxysilyl)propyldiméthyl-octadécylammonium (Si-QAC) par condensation hydrolytique. Le comportement antibactérien non lixiviant par contact des échantillons de verre et de coton greffés de Si-QAC a été proposé sur la base de l'absence de zone d'inhibition et une réduction significative des colonies vivantes sur les surfaces revêtues de Si-QAC inoculées par aérosol par rapport à des surfaces non modifiées.

Kugler *et al.*⁷¹ ont quant à eux greffé des chaînes de poly(vinylpyridine) quaternisées (PVP) sur des billes de SiO₂ et les ont mis en présence d'un inocula de *S. epidermidis* à l'état de croissance exponentielle. Deux rapports de suspension bactérienne/billes ont été utilisés dans leur expérience: 2 mL d'inoculum bactérien contre plusieurs centaines de billes de SiO₂ de 1,5 mm de diamètre (minimum de volume aqueux pour couvrir toutes les billes) et 4 mL d'inoculum bactérien contre la même quantité de billes de SiO₂. Les auteurs ont constaté 98% de réduction bactérienne dans le premier cas, contre près de 0% de réduction bactérienne dans le second cas, mettant ainsi en évidence le mode d'action de mort des bactéries par contact par des billes de SiO₂ chargées positivement (densité de charge positive 5×10^{15} N⁺/cm²), en effet les cellules bactériennes ont moins de chance de rencontrer les billes à travers le mouvement brownien dans un plus grand volume de solution.

Enfin, Waschinski *et al.* ont synthétisé une série de monomères macromoléculaires (appelés «macromères») constitués d'un CAQ, N-diméthyl-dodécylammonium (DDA), d'un espaceur polymère de longueur variable (20–117 unités répétitives) et d'un groupe terminal méthacrylamide polymérisable. Les auteurs ont copolymérisé les macromères avec du 2-hydroxyéthylméthacrylate (HEMA) et du 1,3-du glyceroldiméthacrylate (GDMA) sur des lames de verre modifiées au méthacrylate pour générer des revêtements contenant du CAQ. Cette étude a confirmé l'activité des revêtements contenant du CAQ contre des bactéries à Gram positif et a montré que le biocide n'était pas libéré. La propriété de non-lixiviation a été confirmée par les résultats selon lesquels la pleine activité antibactérienne a été préservée même après des séries de lavage de l'échantillon traité, sans zone d'inhibition apparente⁷².

Une autre façon de créer des surfaces actives par contact consiste à immobiliser de petites protéines antimicrobiennes. Les peptides antimicrobiens (PAM) sont l'une des classes de composés biocides les plus étudiées et sont souvent considérés comme une alternative intéressante aux antibiotiques⁷³. Ce sont des composés naturels, produits par une variété de plantes et d'espèces animales. Les PAM peuvent varier en taille, entre cinq et quatre-vingt dix acides aminés avec une masse moléculaire entre 1 et 5 kDa. Ils sont le plus souvent de nature cationique, ce qui a conduit à les appeler peptides antimicrobiens cationiques⁷⁴. Cependant, des formes anioniques ont également été signalées⁷⁵. Leur mécanisme d'action antimicrobien n'est pas encore pleinement compris, mais leur activité est souvent liée à une perturbation cytoplasmique de la membrane et à une inhibition du repliement des protéines perturbant l'activité enzymatique⁷⁶⁻⁷⁷. Tandis que l'utilisation potentielle des PAM comme alternative aux antibiotiques a reçu beaucoup d'attention au cours des dernières décennies, leur utilisation contre les biofilms microbiens est de loin la plus récente.

Par ailleurs, la première enzyme testée dans la fonctionnalisation de surface a été le lysozyme mureinase. Cette enzyme a été décrite pour la première fois comme une protéine antimicrobienne par Fleming en 1922⁷⁸. Bien que la plupart des approches d'immobilisation du lysozyme ait abouti à une perte complète de ses propriétés lytiques de la paroi cellulaire, certaines méthodes alternatives d'immobilisation du lysozyme, y compris avec des espaceurs polymères, ont conduit à des surfaces capables de tuer les bactéries telles que *Micrococcus lysodeikticus* et *Bacillus subtilis*, et d'inhiber la croissance ou même tuer *S. aureus*⁷⁹.

Récemment, des enzymes antimicrobiennes plus efficaces, telles que l'endopeptidase lysostaphine⁸⁰, des lysines⁸¹ et l'enzyme lytique bactériophage pneumococcique à destruction rapide⁸² ont été découvertes. Par exemple, Dordick *et al.* ont décrit un revêtement à base de lysostaphine, immobilisé sur des nanotubes de carbone⁸³. Le revêtement est actif à long terme et tue efficacement le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM). Il est probable que les nanotubes de carbone dépassent de la surface et pénètrent ainsi profondément dans la paroi cellulaire microbienne. Cependant, ces composés restent des matériaux biologiques difficiles à manipuler et leurs conditions d'activité sont limitées (température, pH, toxicité...).

2.4.2.2 Les revêtements antiadhésifs

Dans cette approche, les surfaces sont modifiées pour éviter l'adhérence des bactéries et non pour les tuer. En général, les propriétés des matériaux telles que l'énergie de surface, la mouillabilité (hydrophobicité et hydrophilicité), la charge de surface, la composition chimique de la surface, la topographie de la surface, le module d'élasticité de la surface et l'épaisseur du revêtement se sont avérés avoir une influence ou une influence conjointe sur l'adhérence bactérienne sur les surfaces.

Il a été constaté que dans certaines conditions, le contrôle de l'hydrophobicité⁸⁴ et de la rugosité de surface⁸⁵ peut aboutir à des substrats qui résistent à la fixation des bactéries. Les surfaces super-hydrophobes ont été développées à partir de l'inspiration de la feuille de lotus sur laquelle l'eau forme des gouttelettes et roule à cause de la microstructuration et de la nanostructuration ainsi que de la cire épicuticulaire hydrophobe présente sur la surface⁸⁶. La super-hydrophobicité peut réduire les forces d'adhérence entre une surface solide et les bactéries, permettant une élimination facile des bactéries avant la formation d'un biofilm épais sur la surface⁸⁷. Une théorie connue sous le nom de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) suggère qu'il est possible de minimiser l'attachement bactérien en utilisant une combinaison d'interactions électrostatiques et les forces de van der Waals⁸⁸. Il y a encore une autre approche qui stipule que la quantité de bactéries fixées peut être considérablement réduite en contrôlant les propriétés mécaniques de la surface. Spécifiquement, les surfaces à faible module élastique se sont avérées fournir la résistance la plus efficace contre l'adhérence bactérienne⁸⁹.

Néanmoins, la limitation d'une surface répulsive réside dans son incapacité à influencer la viabilité des micro-organismes pathogènes. Même si l'encrassement biologique et la contamination des surfaces traitées sont peu susceptibles de se produire, les microorganismes existants peuvent encore être libérés pour contaminer d'autres cibles.

2.4.2.3 Le revêtement multifonctionnel : antiadhésif et biocide par relargage

Les revêtements à base de polymères libérant des biocides changent souvent de propriétés de surface après avoir libéré le biocide. Si les polymères résultants sont solubles dans l'eau ou au moins hydrophiles, la surface peut repousser les cadavres de microbes attachés et nettoyer ainsi le matériau. Les exemples les plus importants sont les peintures antisalissures. Elles combinent la libération d'un biocide avec un renouvellement fréquent de la surface (auto-polissage).

Par exemple, les revêtements d'hydrogel typiques pour implants généralement à base de polymères tels que l'alcool polyvinylique, les copolymères PEG ou les dérivés d'acide polyacrylique, ont tendance à réduire l'adhérence microbienne de près de deux ordres de grandeur par rapport à un témoin. Le chargement de ces hydrogels avec des antibiotiques ou d'autres biocides rend ces revêtements plus actifs et en principe capables de simultanément repousser les bactéries et de relarguer le biocide. Par exemple, un revêtement basé sur un réseau polymère hydrophile de poly(2-hydroxyéthylacrylate) avec des points de réticulation polyéthylèneimine (PEI) (Figure 9) a été décrit par Ho *et al.* Ce revêtement est capable d'absorber sélectivement les ions argent d'une solution aqueuse et servent de *template* pour la formation de nanoparticules d'argent⁹⁰. La PEGylation de ce réseau aboutit à un matériau qui tue efficacement les bactéries *S. aureus* et les repousse toujours après épuisement des nanoparticules d'argent.

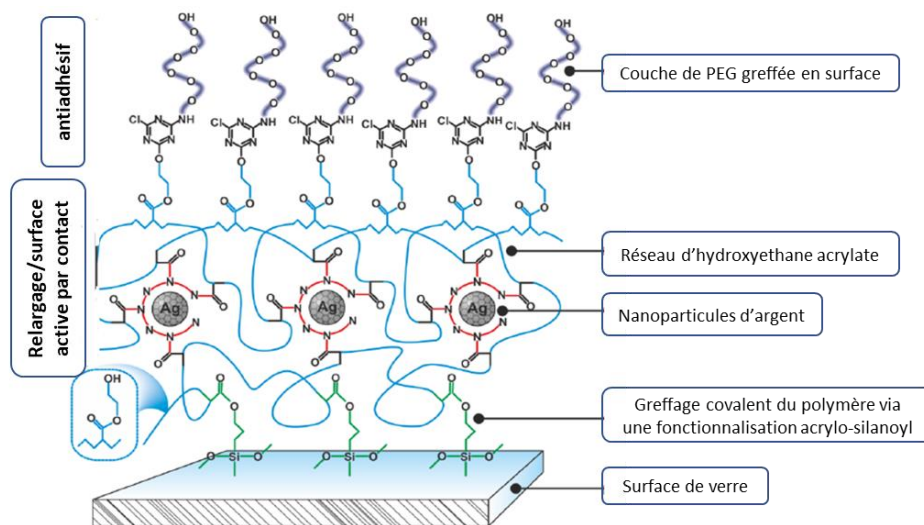


Figure 9 : Concept du revêtement antiadhésif et relarguant, d'après la référence⁹⁰.

2.4.2.4 Biocide par contact et repoussant

Les surfaces actives par contact sont souvent considérées comme auto-désactivantes, car les microorganismes tués peuvent adhérer à la couche active et de nouveaux microbes peuvent adhérer et proliférer sur ces cadavres. Une amélioration de ces surfaces serait un matériau qui tue les microorganismes et repousse les cellules mortes simultanément. Chen *et al.* ont créé une surface antimicrobienne active de contact contre *E. coli* en fixant le bromure de poly (N,N-diméthyl-N-(éthoxycarbonylméthyl)-N-[2'-(méthacryloyloxy)éthyl]-ammonium) via la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP)⁹¹. Le contact constant avec le milieu aqueux conduit à un clivage hydrolytique de l'ester éthylique à côté du groupe de tête ammonium quaternaire. Le groupe de tête zwitterionique résultant n'est plus biocide, mais repousse efficacement toutes les cellules microbiennes attachées, mortes ou vivantes. Cet effet intéressant n'est pas encore réversible, mais montre les opportunités de telles surfaces. Plus récemment, Laloyaux *et al.* ont présenté une surface constituée de magainine (un PAM) greffée en surface avec des méthacrylates d'oligo (éthylène glycol)⁹². Les chaînes polymères sont étirées à température ambiante et tuent efficacement les cellules microbiennes. Lorsqu'ils sont chauffés à plus de 35°C, les polymères s'effondrent laissant apparaître le PEG en surface qui repousse efficacement les cellules Gram+ attachées et non attachées. En abaissant la température, les propriétés de destruction sont réactivées. En principe, cela permet de tuer ou de repousser les cellules microbiennes par de fréquentes variations de température (voir Figure 10).

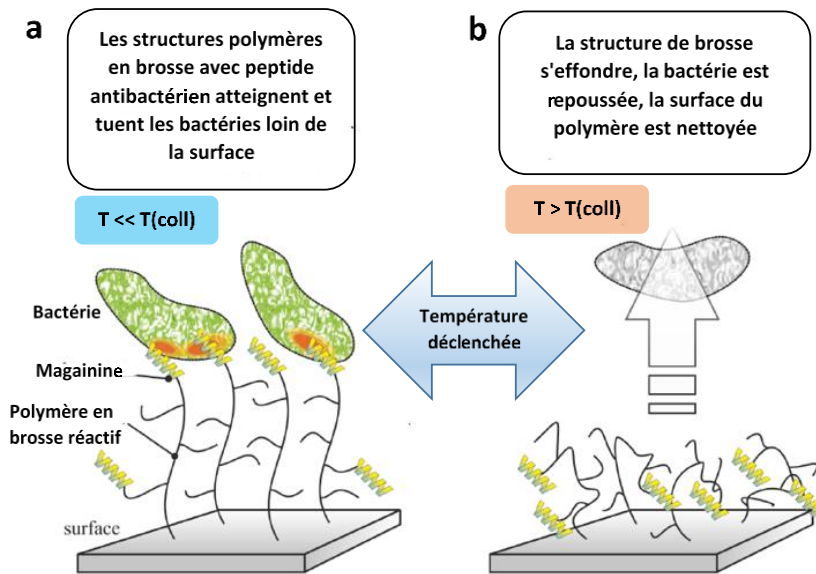


Figure 10 : Concept des surfaces thermoréactives avec de la magainine greffée via des méthacrylates d'oligo (éthylène glycol) thermosensibles qui (a) tuent les cellules bactériennes en dessous et (b) les repoussent au-dessus de la température de transition ($T(\text{coll})$). Créé selon la Ref.⁹².

2.4.2.5 Biocide par libération et par contact

Une autre façon de prolonger l'activité d'un système de libération de biocide consiste à combiner ce concept avec une approche biocide par contact. Worley et ses collègues ont été les pionniers de la libération d'oxydants composés de chlore(+I) en tant que systèmes à libération lente⁹³. En combinant les groupes contenant des fonctions haloamine (liaisons azote-halogène) avec des groupes d'ammonium quaternaire dans un revêtement de polyuréthane, l'effet antimicrobien dû à la libération de $\text{Cl}(+I)$ a été considérablement prolongé par la présence des groupes antimicrobiens supplémentaires non libérables⁹⁴.

Un comportement similaire pourrait être obtenu en incorporant des nanoparticules d'argent dans un revêtement dit couche par couche (LbL, *layer by layer*) et en incorporant en bout de chaîne des groupes d'ammonium quaternaire⁹⁵. La libération d'ions argent s'accompagne de la destruction par contact de la couche contenant des groupes ammonium quaternaire. Un autre avantage de ce revêtement est un rechargement possible en nanoparticules d'argent à l'aide de sels d'argent.

Comme démontré par Shamby *et al.*, la poly(4-vinylpyridine) alkylée avec du bromure d'hexyle réagit avec le nitrate d'argent en solution aqueuse pour former des molécules insolubles dans

l'eau du polymère antimicrobien et des nanoparticules d'argent. Les revêtements créés à partir de ces composites tuent simultanément les microbes en libérant des ions argent et au contact des groupements d'ammonium quaternaire⁹⁶.

Plus récemment, il a été développé un revêtement à base de cellulose avec un groupement antimicrobien le N,N-diméthyl-dodecylammonium greffé *via* le poly(2-éthyl-1,3-oxazoline), qui tue les cellules microbiennes par contact⁹⁷. Une fois qu'une cellule microbienne est perturbée en surface, la cellule libère l'enzyme cellulase omniprésente. Il a été montré que cette enzyme est capable de dégrader le revêtement et de le réactiver (voir Figure 11). Contrairement aux peintures antisalissures auto-polissantes courantes, le revêtement à base de cellulose agit comme un système actif de contact, est biologiquement compatible, dégradé et peut en outre libérer des biocides en cas de contamination biologique uniquement.

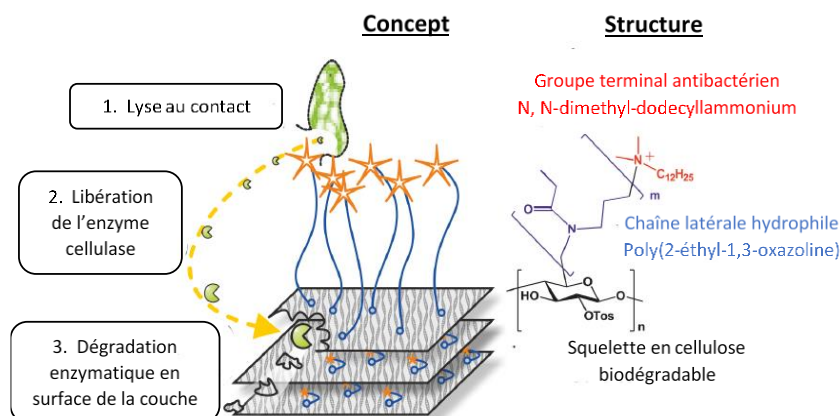


Figure 11 : Concept d'un revêtement à base de cellulose avec un polymère biocide attaché qui peut être dégradé par la cellulase. Créé selon la réf.⁹⁷.

En conclusion, la fonctionnalisation de surface joue un rôle essentiel dans la lutte contre le développement de biofilm. Nous avons pu aborder les différentes stratégies de modifications de surface permettant d'apporter de nouvelles propriétés antibactériennes via le dépôt de revêtements en créant des surfaces antiadhésives, biocides, voire les deux en même temps. Néanmoins tous ces composés présentent des désavantages soit par un revêtement instable que l'on rencontre lorsque l'on manipule du matériel biologique tel que les peptides ou enzymes, soit par une complexité du dépôt du revêtement antibactérien en multiétapes. Pour

résoudre ces difficultés, une nouvelle classe de composés biocides à large spectre a été développée qui sont les composés *N*-halamine, faciles à générer et dont la stabilité est grande.

3-Les revêtements *N*-halamine : Nouvelle génération de revêtements antibactériens

La colonisation des surfaces et interfaces par les bactéries conduisant à la formation de biofilms constitue une menace sérieuse dans différents domaines dont celui de la santé donnant lieu à un véritable défi dans la recherche de lutte contre la colonisation des surfaces par des microorganismes.

Les agents antibactériens à base d'halogène ont été adoptés dans le monde entier en raison de leur rentabilité et de leur capacité à tuer rapidement la majorité des microorganismes^{93, 98}. La plupart des agents antibactériens à base d'halogène sont des oxydants forts, tels comme le Cl₂ gazeux, l'hypochlorite de sodium (NaOCl), le dioxyde de chlore (ClO₂) et les composés *N*-halamine (N-X, où X un halogène au degré d'oxydation +I). Ces derniers sont devenus parmi les biocides les plus populaires⁹⁹⁻¹⁰⁰. En effet, l'efficacité désinfectante des *N*-halamines est similaire à celle de l'eau de Javel (dont le principe actif est l'ion hypochloreux OCl⁻), mais ces composés se révèlent plus stables, moins corrosifs et génèrent moins de sous-produits que l'eau de Javel.¹⁰¹ En particulier les *N*-halamines à base de polymère se présentent comme des revêtements de choix dans la modification des surfaces de divers matériaux tels que, le nylon, le coton, le gel de silice et la peinture.¹⁰²⁻¹⁰⁷ Le développement des polymères *N*-halamine découle de leurs avantages inhérents tels leur efficacité contre un large éventail de microorganismes, la stabilité physicochimique à long terme, et surtout la possibilité de régénérer leurs groupes fonctionnels avec une solution de NaOCl à plusieurs reprises, avec donc un renouvellement de leurs propriétés antibactériennes, une faible toxicité pour l'homme et l'environnement et un coût relativement faible^{105, 108}. Les *N*-halamines sont employés dans une large gamme d'applications, telles que le traitement de l'eau, l'épuration de l'air, les produits textiles, les produits médicaux et de santé, les colorants, les peintures et dans le domaine agroalimentaire.¹⁰⁹

De façon rapide, après une immobilisation des précurseurs de *N*-halamine sur une surface, ces derniers sont convertis en fonction haloamine par un processus d'halogénéation, comme indiqué pour la cellulose sur la Figure 12, en général grâce à une solution d'hypochlorite de sodium.^{105, 110-111}

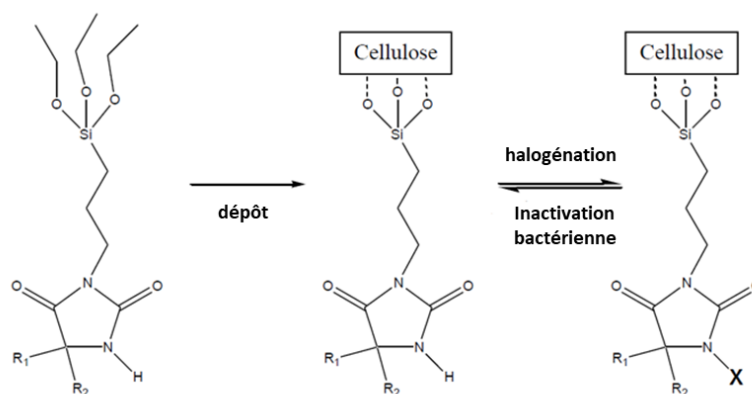


Figure 12 : Préparation d'un revêtement *N*-halamine antibactérien¹¹⁰.

3.1 La fonction haloamine

L'idée des composés *N*-halamine a été proposée pour la première fois par Kovacic et ses collaborateurs en 1969¹¹²⁻¹¹³. Un composé *N*-halamine peut être défini comme un composé contenant une ou plusieurs liaisons covalentes azote-halogène¹¹⁴⁻¹¹⁵. L'état d'oxydation +I des atomes d'halogène dans les groupes chloramine (>N-Cl) ou bromamine (>N-Br) confère aux *N*-halamines une activité biocide contre les agents pathogènes¹¹⁶, le mode d'action antibactérien des *N*-halamines sera présenté par la suite.

Les *N*-halamines organiques peuvent être classés en trois catégories, les *N*-halamines imide, les *N*-halamines amide et *N*-halamines amine, voir la Figure 13.

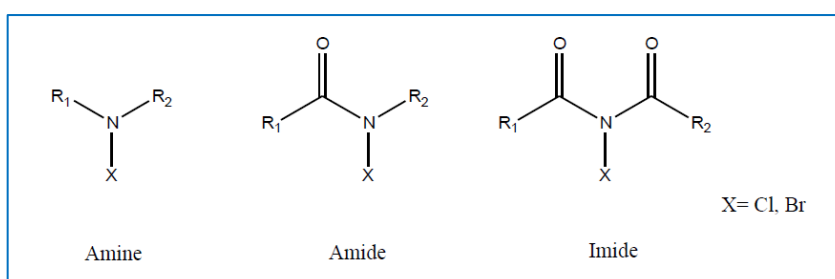


Figure 13 : Les 3 catégories de groupement *N*-halamine¹¹⁷.

La stabilité du chlore face à l'hydrolyse des fonctions haloamine est affectée par la force de la liaison covalente azote-halogène, leur stabilité est dans l'ordre suivant imide < amide < amine (Tableau 1)¹¹¹. Tandis que leur activité antimicrobienne suit un ordre inverse : imide > amide > amine *N*-halamine¹¹⁸. En effet, les groupes attracteurs d'électrons (tels que les groupes carbonyle dans les *N*-halamines à base d'imide et à base d'amide) sont capables d'affaiblir la liaison covalente azote-halogène et de stabiliser la charge négative présente sur l'azote, augmentant la vitesse de libération de l'halogène. Inversement, les groupes donneurs d'électrons (tels que les groupes alkyles dans les *N*-halamines à base d'amine) peuvent améliorer la liaison covalente azote-halogène en déstabilisant l'anion azote et en ralentissant la libération des halogènes (X), ce qui entraîne une haute stabilité de la liaison N-X.

Les constantes de dissociation des liaisons covalentes azote-halogène reflètent également la stabilité des *N*-halamines en solution aqueuse. Comme le montre le Tableau 1, les *N*-halamines à base d'amine en solution aqueuse ne libèrent pratiquement pas d'halogène libre, ce qui indique que ces composés sont très stables en solution aqueuse et qu'ils présentent un effet biocide par contact. D'un autre côté, une constante de dissociation plus élevée conduit à une activité antimicrobienne rapide, ce qui signifie que les *N*-halamines à base d'imide présentent une activité biocide.^{117, 119}

Tableau 1 : Constantes de dissociation en solution aqueuse des fonctions *N*-halamine en fonction de la nature des *N*-halamines¹¹¹.

	Constante de dissociation
<i>N</i>-halamine à base imide	< 10 ⁻⁴
<i>N</i>-halamine à base amide	< 10 ⁻⁹
<i>N</i>-halamine à base amine	< 10 ⁻¹²

Cette stabilité en fonction du type d'azote est très importante à connaître dans le choix du matériau biocide idéal en fonction de l'objectif souhaité. En effet, si l'action biologique rapide est requise, des composés *N*-halamine à base d'imide seront privilégiés. En revanche, si une stabilité à long terme est recherchée, alors les *N*-halamine à base d'amine semblent être les meilleurs candidats.

Dans ce projet de recherche, les biocides de *N*-halamine présentant un mode d'action à long terme sont préférés. Par conséquent, cette recherche se concentre sur des *N*-halamines à base de fonctions amine primaire ou secondaire.

3.2 Génération des fonctions haloamine

Pour les polymères organiques, les groupements *N*-halamine peuvent être regroupés en structure cyclique et acyclique. Les *N*-halamines cycliques¹²⁰ sont stables en raison de l'absence d'un hydrogène en position α de l'atome d'azote, ce qui empêche la déshydrohalogénéation et donc la formation d'acide chlorhydrique, à la suite d'une réaction d'élimination entre l' α -hydrogène et l'halogène dans les liaisons N-X. Les *N*-halamines cycliques sont des biocides à large spectre.

L'halogène employé est généralement le chlore, mais le brome ou l'iode peuvent également être utilisés.¹²¹⁻¹²² La liaison haloamine est formée par réaction d'une amine, imine, amide ou imide avec le dihalogène (X_2), l'acide hypohalogéneux (HOX) ou l'hypohalogénite (OX^-)¹²³. Les *N*-halamines sont généralement générés dans des solutions basiques. Les basicités des *N*-halamines sont de l'ordre amine > amide > imide, et donc le taux d'halogénéation est dans le même ordre amine > amide > imide¹²³ :



Debiemme-Chouvy *et al.* ont présenté une méthode originale pour générer ces fonctions haloamine par voie électrochimique¹¹¹. En effet, en présence de protéines (albumine de sérum bovin (BSA)) et d'acide hypochloreux ou hypobromeux électrogénéré par oxydation des ions chlorure ou bromure, respectivement, il a été montré qu'une polymérisation des protéines se produit et conduit à la poly-BSA (pBSA) avec formation de nanoclusters de protéines renfermant des fonctions haloamine, c'est-à-dire des protéines contenant des Cl(+I) ou Br(+I) selon la nature de l'électrolyte utilisé. Il a été également démontré que les surfaces revêtues du polymère pBSA chloré ou bromé ont des propriétés antibactériennes. La régénération des fonctions haloamine peut ainsi être effectuée par voie électrochimique, c'est-à-dire par

oxydation de ions chlorure/bromure en milieu aqueux, conduisant à un processus plus respectueux de l'environnement.

De même cette méthode de fonctionnalisation par voie électrochimique a aussi été employée par *Qu et al.*¹²⁴ dans la chloration d'un revêtement de chitosane. Une tension anodique appliquée au revêtement a permis la génération *in situ* de HOCl ($pK_a = 7,4$) à partir des ions chlorure permettant la chloration des atomes d'azote du chitosane pour former les liaisons N-Cl¹²⁵ (Figure 14). Cette approche d'électrofabrication permet un contrôle de la chloration du film. *In vitro* des études démontrent que le film chitosane-Cl possède des liaisons N-Cl et a une activité antimicrobienne.

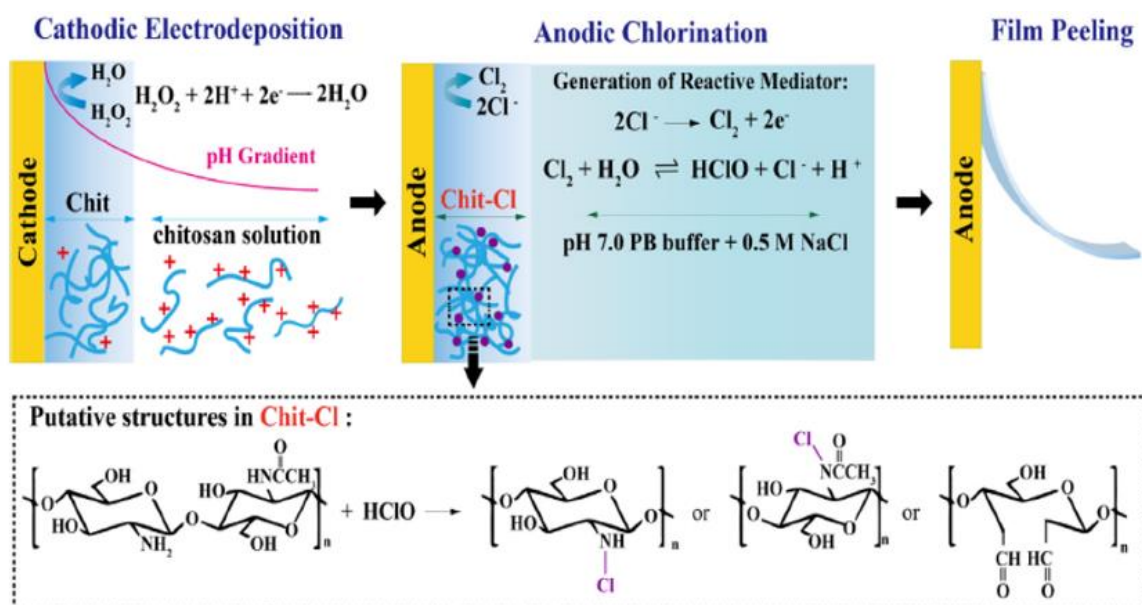


Figure 14 : Electrogénération de fonctions haloamine sur un revêtement chitosane¹²⁴.

3.3 L'action antibactérienne des N-halamines

Les N-halamines sont devenues ces dernières années des agents antibactériens prisés en raison de leur action antibactérienne efficace contre un large spectre de bactéries, dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*¹⁰⁶.

À ce jour, de nombreuses études ont tenté de comprendre les mécanismes de l'action antibactérienne des *N*-halamines. Ces mécanismes peuvent être classés en trois catégories (Figure 15).

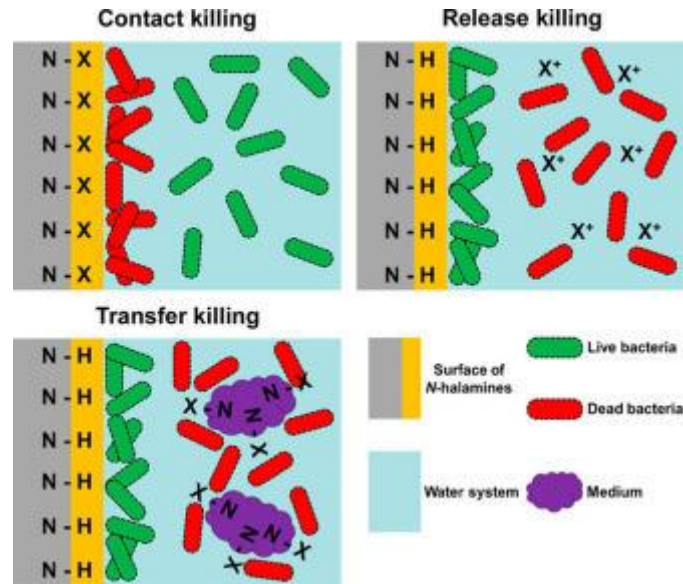


Figure 15 : Schéma illustrant les trois modes d'action antibactérienne des composés *N*-halamine.¹⁰⁶

(1) Effet biocide par libération

Un des mécanismes d'action possible des *N*-halamines s'effectue par dissociation de l'halogène (+) dans le milieu conduisant à l'inactivation des bactéries. Le test de la zone d'inhibition est un moyen efficace pour vérifier le mode d'action des *N*-halamines par libération de l'halogène (voir Figure 16), comme l'ont montré Worley *et al.*¹²⁶⁻¹²⁷. En effet, ils ont synthétisé une série de *N*-halamines contenant de l'oxazolidinone pour étudier l'activité antibactérienne des matériaux. La présence de zones d'inhibition autour des *N*-halamines a prouvé le mécanisme d'action de mise à mort par libération. De même Liu et ses collaborateurs¹²⁴ ont confirmé cette libération en constatant que le chitosane chloré présentait une zone d'inhibition, indiquant qu'au moins une partie des chloramines possédait un mécanisme biocide par libération, Figure 16.

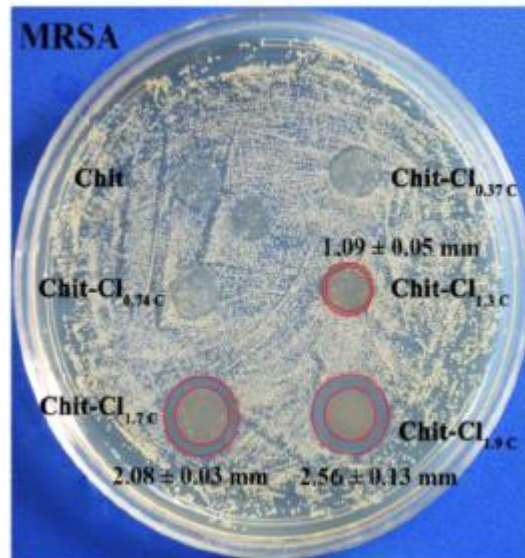


Figure 16 : Exemple de zones d'inhibition par des fonctions haloamine, fonction de la teneur en Cl du revêtement chitosane.¹²⁴

(2) Effet biocide par contact

Comme il a été décrit précédemment, les agents antibactériens actifs par contact désignent les biocides qui inactivent les bactéries tout en restant liés sur les surfaces. Le mécanisme de mise à mort par contact implique le transfert direct d'un halogène oxydant à partir de *N*-halamines vers les cellules bactériennes. L'halogène a une forte tendance à se combiner avec un autre élément, détruisant ou inhibant le processus métabolique des cellules bactériennes. De cette façon, l'action antibactérienne se produit sans la dissociation de l'halogène des liaisons N-X. Les *N*-halamines présentant des liaisons N-X stables conviennent mieux à un mode d'action biocide par contact. Par exemple, Luo *et al.*¹²⁸ ont préparé du poly[[6-morpholino-*s*-triazine-2,4-hexaméthylène[(2,2,6,6-4-pipéridyl) imino]] (APA-1) et l'ont incorporé comme additif dans du polyuréthane (PU). Ils ont ensuite utilisé un test sandwich pour déterminer le mécanisme biocide par contact du PU modifié par APA-1, tandis que le mécanisme de mise à mort par libération a été étudié en utilisant l'expérience basée sur le principe de la zone d'inhibition (zone autour de l'échantillon ne présentant pas de pousse bactérienne). Le matériau a présenté une excellente activité antibactérienne dans le test sandwich, alors qu'aucune région d'inhibition a été observée autour de l'échantillon, suggérant que l'APA-1 inactive les bactéries en contact direct plutôt qu'en libérant des halogènes. Cette caractéristique de l'APA-1 dépend fortement de la stabilité de ses liaisons N-

Cl. En effet, l'effet inducteur donneur des 4 groupements méthyl, qui sont présents sur les carbones voisins des liaisons N-Cl, ont tendance à déstabiliser toute charge négative développée sur l'azote, rendant ainsi la liaison N-Cl stable expliquant ainsi le mode d'action biocide par contact direct, plutôt qu'une action par relargage de chlore de l'agent bactérien l'APA-1.

(3) Effet biocide par transfert

Dans le mode d'action par transfert, le milieu environnant le revêtement *N*-halamine peut jouer le rôle d'intermédiaire. Ce mécanisme implique le transfert d'halogène(+I) aux constituants du milieu environnant conduisant à la création de fonctions haloamine, ces dernières vont jouer ainsi le rôle d'intermédiaire et permettent l'inhibition de la croissance et diminue la viabilité des bactéries. Ce mécanisme de destruction par transfert a été découvert avec l'acide barbiturique contenant des composés *N*-halamines. Une explication possible, confirmée par le groupe d'Ahmed¹²⁹, est que l'échange de l'halogène se produit entre les liaisons N-X des *N*-halamines et les fonctions amide du milieu environnant, donnant au milieu des propriétés biocides.

Ainsi, nous avons vu que les *N*-halamines peuvent présenter un mécanisme de mort des bactéries par contact sans dissociation de l'halogène actif de la liaison N-X, tandis que pour les deux autres mécanismes, tels que la mise à mort et le transfert, les halogènes (+I) peuvent migrer à partir des *N*-halamines dans une solution aqueuse ou un milieu contenant des atomes d'azote ayant au moins une liaison avec un atome d'H. Il a été suggéré que le mode d'action des *N*-halamines réside plutôt en une combinaison de ces mécanismes fonctionnant en même temps et responsables de l'efficacité biocide. De cette façon, la stabilité de la liaison N-X est une clé importante influençant et déterminant le mode d'action antibactérien des *N*-halamines. De plus, le milieu environnant des *N*-halamines peut être un autre facteur important car il est étroitement lié à l'efficacité de l'action antibactérienne des *N*-halamines. En effet, en l'absence de milieux liquides, la mise à mort par contact est la seule voie possible. En revanche, en présence d'une solution aqueuse, une combinaison de deux ou trois mécanismes d'action antibactériens est possible. Lorsque le support contient des liaisons N-H, les *N*-halamines peuvent souvent suivre le mécanisme de transfert.

3.4 Identification des fonctions haloamine

3.1.1 Méthode chimique

La liaison N-X des *N*-halamines organiques peut être identifiée via diverses réactions d'oxydo-réduction liées à différentes méthodes chimiques, telles que le titrage idométrique/thiosulfate ou en présence du 5-thio-2-nitrobenzoïc (TNB), ou de manière qualitative avec la méthionine.

Le titrage idométrique/thiosulfate fait à ce jour partie des méthodes chimiques d'identification qualitative et quantitative des *N*-halamines les plus employées. Elle implique deux réactions d'oxydo-réduction (réactions 1 et 2 Figure 17A). Les ions iodure sont oxydés par l'halogène(+I), puis l'iode libéré conduit à une réaction chromogène dans la solution d'amidon, entraînant l'apparition d'une couleur bleue (Figure 17)¹⁰⁸. Lorsque le thiosulfate de sodium est employé comme titrant il réagit avec l'iode conduisant à la décoloration de la solution. La quantification des fonctions haloamine peut ainsi être obtenue.

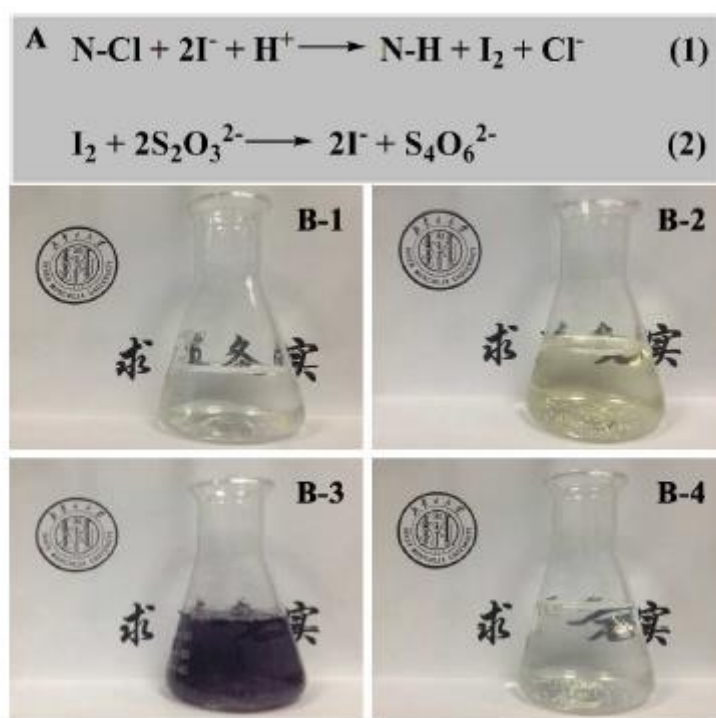
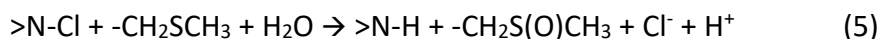
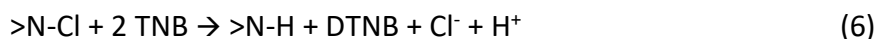


Figure 17 : Les réactions d'oxydoréduction (A – 1 et A – 2) et les changements de couleur pendant le titrage idométrique/thiosulfate (de B – 1 à A – 4).¹⁰⁸

L'oxydation de fonctions thiol est une autre voie pour la détection des fonctions haloamine. Notamment la réaction de la méthionine ($\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2)\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$) permet l'identification de ces groupements (5)¹³⁰.



La présence de *N*-halamines peut également être détectée quantitativement via une réaction en présence de l'acide 5-thio-2- nitrobenzoïque (TNB)¹³¹⁻¹³².



L'échantillon de *N*-halamine peut être directement introduit dans une solution de TNB, entraînant la formation de l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) en raison de la réaction entre les fonctions haloamine et le TNB (réaction 6). En mesurant l'absorbance de la solution à 412 nm, le pic d'absorbance du TNB diminue clairement au fur et à mesure de la réaction, tandis que le pic du DTNB augmente à 324 nm. Le groupe de Debiemme-Chouvy¹³³ a confirmé l'identification des groupements haloamine en utilisant du TNB (Figure 18).

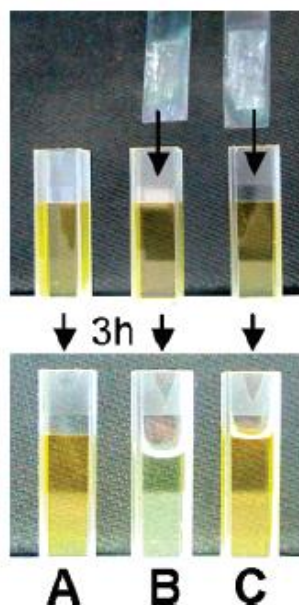


Figure 18 : Caractérisation chimique des chloramines par le TNB. Films de SnO_2 et images optiques de cuvettes (1 cm) contenant la solution de TNB. (A) Solution de TNB non modifiée. En haut : Avant immersion des films SnO_2 recouverts d'un dépôt organique. Bas : échantillon B après une immersion de 3 h des films de SnO_2 polarisés à 1,5 V/SCE dans une solution de NaCl 0,5 M contenant 1 mg/mL de BSA; échantillon C comme échantillon B mais avant immersion, le film de SnO_2 a été plongé pendant 4 h dans une solution de méthionine 0,1 M. ¹³³

3.1.2 Méthode physique

Enfin, l'identification des *N*-halamines organiques est également menée à l'aide de techniques physiques telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), la spectroscopie de photoélectrons induits par rayonnement X (XPS), la microanalyse par dispersion d'énergie de rayons X (EDX), l'analyse thermogravimétrique (TGA), calorimétrie à balayage différentiel (DSC), entre autres.

Habituellement, la spectroscopie FT-IR est considérée comme une technique indispensable dans l'identification des *N*-halamines organiques. Les spectres FT-IR sont utilisés pour identifier la transformation de liaisons N-H en liaisons N-Cl, en utilisant les différents signaux des *N*-halamines organiques et des précurseurs correspondants. Trois contributions dans les spectres FTIR sont impliquées : la disparition du pic N-H, l'apparition du pic N-Cl et un décalage du pic C=O, pour les matériaux présentant cette liaison. Un critère clé est que la contribution due à la liaison N-H disparaisse toujours lorsque celle due à N-Cl apparaît, en raison de la transformation de N-H en N-Cl.¹²⁰

Sur la base des signaux des spectres FTIR présentés sur la Figure 19, le groupe de Sun¹²⁰ a confirmé la transformation de la 1-chloro-3-dodécyl-5,5-diméthylhydantoïne (Cl-DDMH) à partir de la 3-dodécyl-5,5-diméthylhydantoïne (DDMH). Sur le spectre de la DDMH, un large pic vers 3280 cm^{-1} peut être attribué à l'étirement vibrationnelle de la liaison N-H ; ce massif a disparu sur le spectre de la Cl-DDMH, tandis que deux nouvelles bandes sont apparues à 758 et 735 cm^{-1} , fournissant la preuve de la présence de liaisons N-Cl. Un changement dans le pic C=O est un autre élément de preuve significatif, attribuable à la rupture de la liaison hydrogène entre N-H et C=O pendant la transformation de N-H en N-Cl. Le même groupe¹²⁰ a montré que les deux pics de la liaison C=O à 1782 et 1707 cm^{-1} pour le composé DDMH se sont décalés respectivement à 1794 et 1728 cm^{-1} pour le composé Cl-DDMH.

Dong *et al.*¹³⁴ ont quant à eux confirmé la présence de *N*-halamines contenant de l'hydantoïne à la surface de nanoparticules de silice magnétiques en analysant la liaison N-Cl caractéristique à 760 cm^{-1} sur les spectres FT-IR.

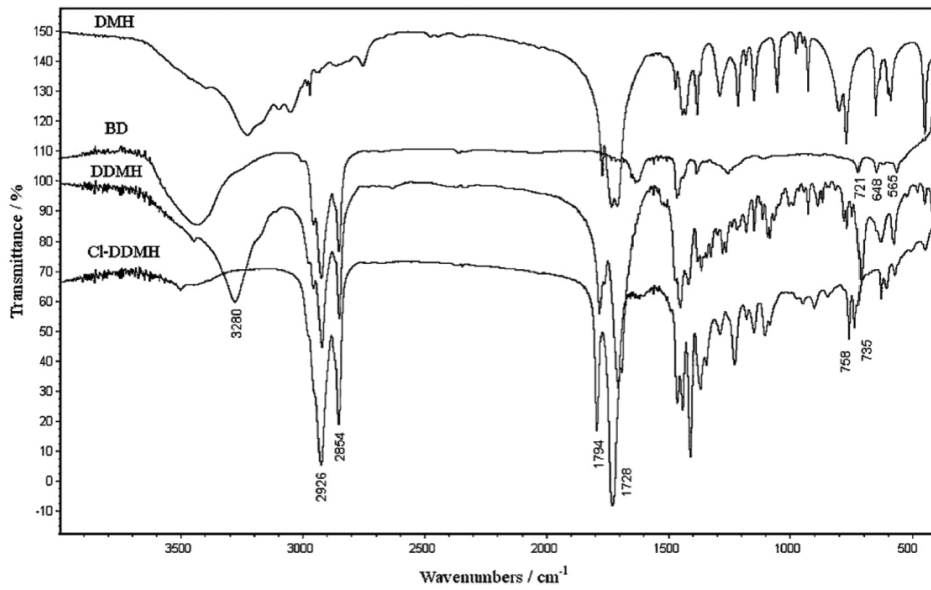


Figure 19 : Spectres FT-IR des composés 5,5-diméthylhydantoïne (DMH), 1-bromododécane (BD), 3-dodécyl-5,5-diméthylhydantoïne (DDMH) et 1-chloro-3-dodécyl-5,5-diméthylhydantoïne (Cl-DDMH).

L'XPS quant à elle est une technique analytique s'appuyant sur l'analyse élémentaire et/ou chimique pour obtenir des informations sur la composition chimique à la surface des revêtements *N*-halamine. La présence de signaux Cl2p à environ 200 eV (ou Br 3d à environ 66 eV), correspondant au groupement N-X (X = Cl ou Br) peut être une preuve de la formation des fonctions haloamine comme proposé par l'équipe de C. Debiemme-Chouvy (Figure 20)¹³⁵⁻¹³⁶.

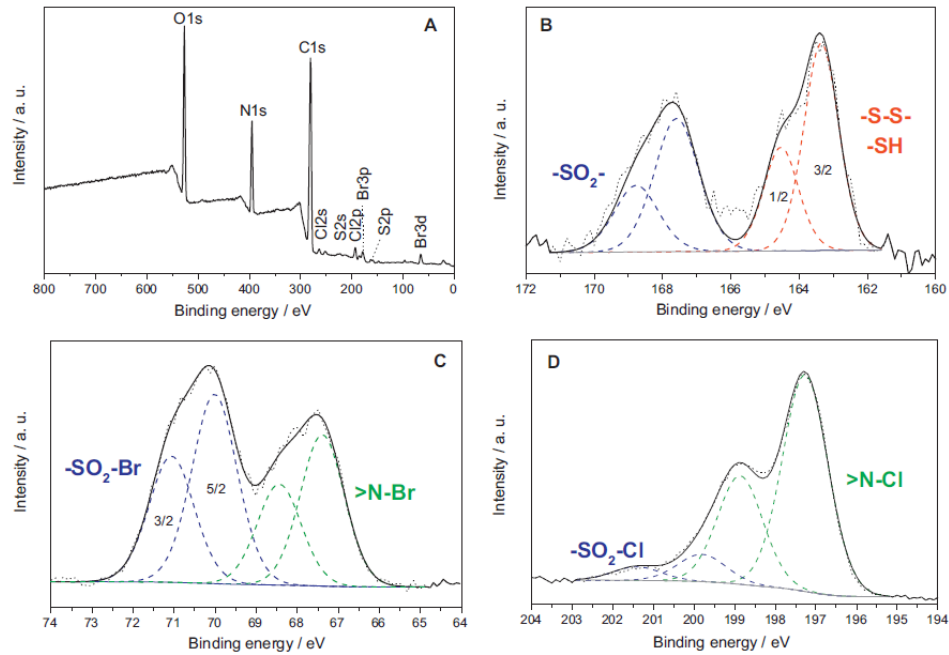


Figure 20 : (A) Spectre XPS général et spectres à haute résolution (B) S2p, (C) Br3d et (D) Cl2p d'un film SnO₂ polarisé à 1,5 V/SCE pendant 2 h dans l'eau de mer + 0,1% BSA.¹³⁶

Jie *et al.*¹³⁷ ont également détecté sur le spectre XPS d'un composé polymérique *N*-halamine, les signaux des niveaux N1s et Cl2p, suggérant la présence de la liaison N–X, tandis que Jiang *et al.*¹³⁸ ont utilisé l'apparition du signal du chlore Cl2p à 198,7 eV pour prouver la conversion de N–H en N–Cl. Jie *et al.*¹³⁷ ont également employé l'analyse XPS pour mettre en évidence la présence de fonctions haloamine au sein d'une résine réticulée macroporeuse contenant des groupes *N*-halamine quaternaires, la poly(1-chloro-5,5-diméthylhydantoinyl-3-éthyl-p-éthénylphénylméthyl diméthylammonium) (Cl-PSQH) (Figure 21). Après quaternisation, le spectre du niveau de cœur Cl2p de PSQH montre un pic à 197,4 eV attribuable aux espèces de chlore anioniques (Cl⁻). Après chloration (Cl-PSQH), le spectre N1s de Cl-PSQH a montré peu de changement, indiquant que la chloration n'a pratiquement aucun effet sur l'ammonium quaternaire. En revanche un nouveau pic vers 200,2 eV apparaît pour le composé chloré attribuable au chlore lié de manière covalente à l'azote.

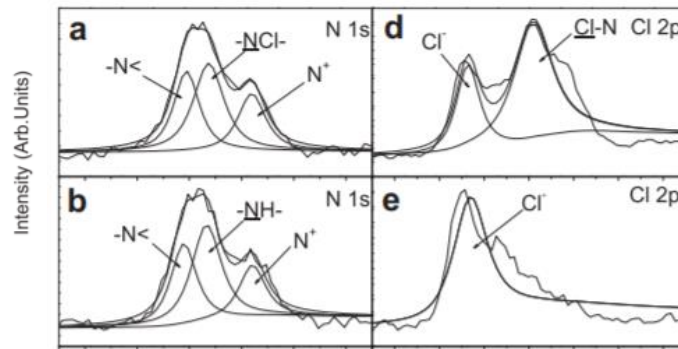


Figure 21 : Spectres N1s de (a) Cl-PSQH, (b) PSQH, Spectres Cl2p de (d) Cl-PSQH, (e) PSQH. ¹³⁷

En raison d'un manque de liaison hydrogène, les *N*-halamines organiques ont des points de fusion et des points endothermiques inférieurs à leurs précurseurs non halogénés, donc deux méthodes d'analyse thermique, TGA et DSC peuvent être employées pour vérifier la transformation de N-H en N-Cl.¹²⁰ Le groupe de Sun¹²⁰ a testé un échantillon non chloré pour caractériser les 1-chloro-3-alkyl-5,5-diméthylhydantoïnes, ces dernières se sont avérées avoir un pic intense de fusion à 76,1°C, alors qu'après chloration, ce pic apparaît à 52,4°C. De plus, un pic exothermique intense a été observé à 176,0°C en raison de la décomposition des liaisons N-Cl (Figure 22).

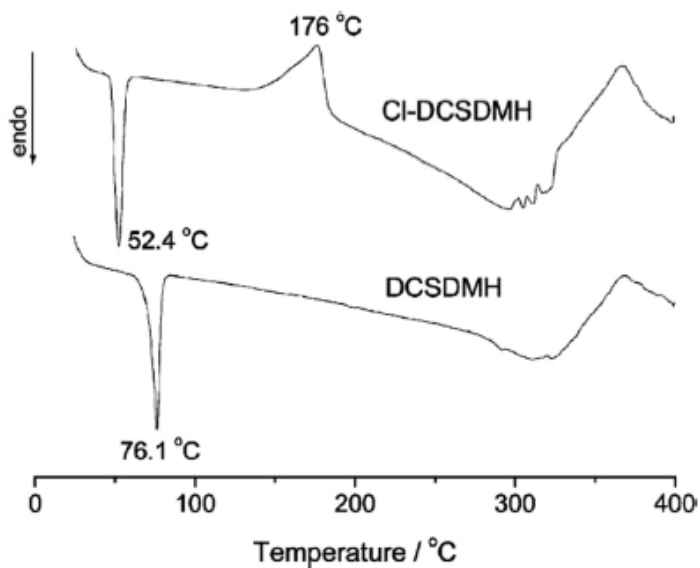


Figure 22 : Courbes DSC pour les deux composés 3-docosyl-5,5-diméthylhydantoïne (DCSDMH) et 1-chloro-3-docosyl-5,5-diméthylhydantoïne (Cl-DCSDMH). ¹²⁰

Ces résultats confirment l'intérêt de la TGA et de la DSC pour l'analyse du comportement thermique des *N*-halamines organiques. Luo et Sun¹³⁹ ont constaté que les *N*-halamines acycliques greffées sur des tissus présentaient un pic exothermique à 171°C, ce pic n'était pas détecté pour les tissus non chlorés. De manière significative, lorsque Tan et Obendorf¹⁴⁰ ont employé la DSC pour mener une analyse quantitative, ils ont pu mettre en évidence une corrélation entre la charge des fonctions haloamine greffées sur le nylon-6 et ses propriétés thermiques. Ils ont montré qu'une augmentation de la charge de *N*-halamines organiques sur le nylon-6 provoquait un déplacement vers un plus bas du point de fusion, suggérant que la stabilité thermique était inversement proportionnelle au nombre de fonctions haloamine contenues dans le matériau.

La méthode du potentiel zêta n'est pas régulièrement utilisée pour identifier les *N*-halamines organiques, elle peut, en revanche, permettre de confirmer les tests d'identification évoqués précédemment. Le groupe de Liang¹⁴¹⁻¹⁴² a utilisé la technique de caractérisation du potentiel zêta comme technique potentielle pour caractériser les *N*-halamines organiques en la combinant avec d'autres techniques chimiques / physiques, telles que le titrage idométrique/thiosulfate, la FT-IR et l'XPS (Figure 23).

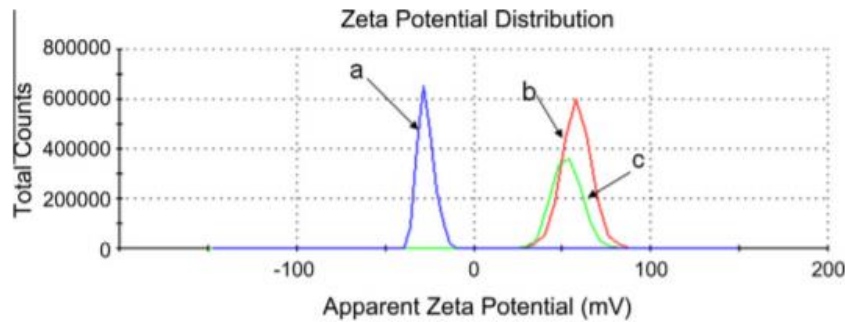


Figure 23 : Le potentiel zéta du (a) CMPS, (b) PSQH and (c) Cl-PSQH.¹⁴¹

La mesure d'angle de contact peut également être utilisée pour analyser l'hydrophilicité des matériaux, elle a été utilisée comme une approche complémentaire pour identifier les *N*-halamines organiques.¹⁴³

4-La polydopamine : un polymère biomimétique

4.1 De l'observation de l'adhérence des moules au revêtement de polydopamine

La science des surfaces s'est caractérisée durant ce dernier siècle par le développement de méthodes de modification de surface afin d'apporter de nouvelles fonctionnalités à des matériaux pour répondre à des enjeux technologiques.

Au cours des dernières décennies, plusieurs technologies clés ont été développées pour modifier les surfaces des matériaux, tels que la chimie de conjugaison¹⁴⁴, les monocouches auto-assemblées (SAMs)¹⁴⁵, le dépôt de film couche par couche¹⁴⁶ et le traitement par plasma¹⁴⁷.

Cependant, la plupart de ces techniques de modification de surface sont des processus longs et compliqués reposant largement sur une surface possédant des caractéristiques physico-chimiques spécifiques. Par exemple, les SAMs élaborées à partir de thiolates ne peuvent être déposés que sur des surface de métaux nobles^{145, 148-149}; tandis que les SAMs d'alkylsilane ne peuvent être appliqués qu'aux surfaces présentant des fonctions OH¹⁵⁰. De même, les oxydes

peuvent être modifiés quant à eux avec des silanes ou des phosphonates¹⁵¹. Concernant les matériaux polymères, ces derniers peuvent être fonctionnalisés s'ils portent des chaînes latérales réactives, mais la modification chimique de la surface des matériaux polymères peut être un défi car les revêtements ainsi produits ne sont souvent pas assez stables pour des applications à long terme¹⁵².

Par conséquent, une approche de modification de surface simple et universelle avec une applicabilité sur une large gamme de substrats et un traitement facile est hautement souhaitable. Cela peut être envisagé avec le développement de revêtements à base de catécholamines, marquant une avancée majeure dans la science des surfaces¹⁵³⁻¹⁵⁶. Ces techniques de revêtement se basent sur l'oxydation des catécholamines, telles que la dopamine, la norépinéphrine et la L-DOPA¹⁵⁷⁻¹⁵⁸, et leur polymérisation ou autoassemblage en un matériau semblable à l'eumélanine appelé « polydopamine » (PDA). Les revêtements à base de poly(catécholamine) bioinspirés, principalement de "polydopamine", ont été inspirés de la chimie utilisée par les moules.

En effet, les moules produisent et sécrètent de puissants adhésifs leur permettant de se fixer dans leur environnement dont les conditions de contraintes de cisaillement sont élevées dues à l'écoulement de l'eau. Ces protéines adhésives de la moule sont connues comme présentant l'adhérence la plus importante dans la nature. Typiquement, une moule peut adhérer à une surface avec une force de 300 N, ce qui correspond sur Terre à un poids de 30 kg¹⁵⁹.

L'étude des protéines composant ce bioadhésif a montré une extrême richesse en 3,4-dihydroxy-L-phénylalanine (L-DOPA) (jusqu'à 30% molaire) et en résidus L-lysine (Figures 24 et 25)¹⁶⁰⁻¹⁶⁵. Ces résidus d'acides aminés spécifiques, contenant un catéchol (pour la L-dopa) et une amine (pour la lysine) permettent une forte adhérence de la moule à toutes sortes de substrats dans un environnement humide et légèrement basique comme l'eau de mer¹⁶⁶.

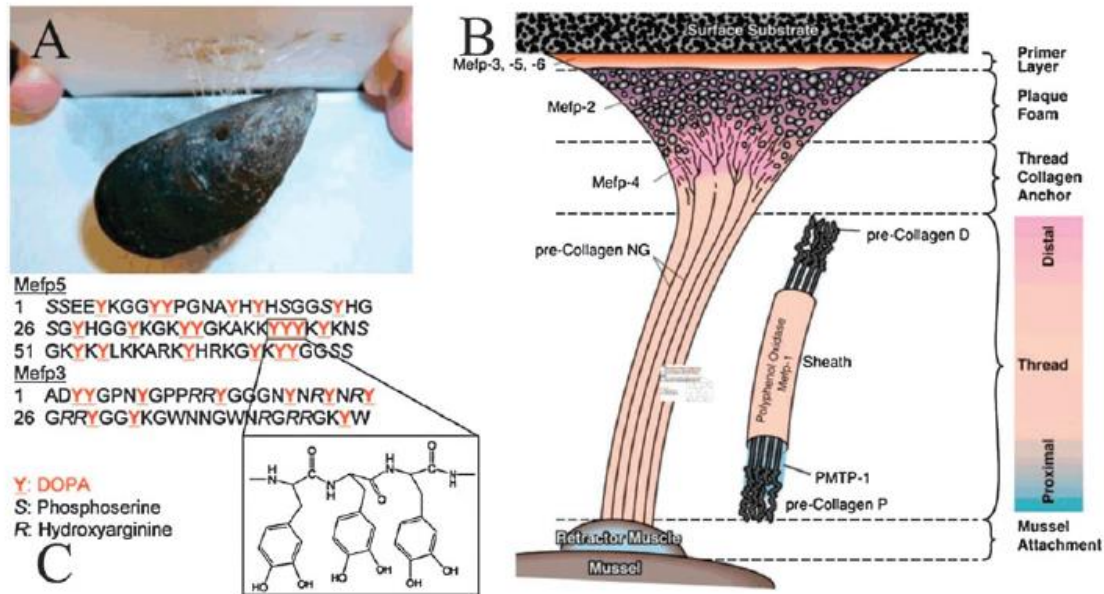


Figure 24: (A) Photographie d'une moule se liant à une surface, (B) Schéma représentant le byssus produit par la moule et (C) composition des protéines Mefp-5 et Mefp3 composant le byssus.^{164-165, 167}

Sur la base de ces résultats, la polydopamine, avec une structure moléculaire similaire à celle de la DOPA, suscite un grand intérêt en tant que nouveau matériau de revêtement depuis 2007¹⁵³. Le principal avantage de la polydopamine est qu'un large éventail de surfaces de matériaux peut être fonctionnalisé allant des surfaces nobles, aux surfaces organiques, y compris des surfaces super hydrophobes.

4.2 Voies de synthèse de la polydopamine (PDA)

La méthode d'oxydation en solution est celle la plus utilisée pour la production de la PDA. La modification de certains paramètres de dépôt, comme la nature de l'oxydant, peut donner lieu à une variété de cinétique et de morphologie de la PDA. Néanmoins, comme nous le verrons, d'autres voies peuvent être envisagées comme le dépôt par voie électrochimique ou voie enzymatique.

4.2.1 Voie chimique

4.2.1.1 Le dioxygène comme agent oxydant

La méthode de synthèse largement utilisée et décrite par Messersmith *et al.*¹⁵³ est directement inspirée du byssus de la moule (Figure 25A)¹⁵³ et notamment de la mepf-5 présente dans la plaque où une forte proportion de L-DOPA et la L-lysine est disponible (Figure 25B).

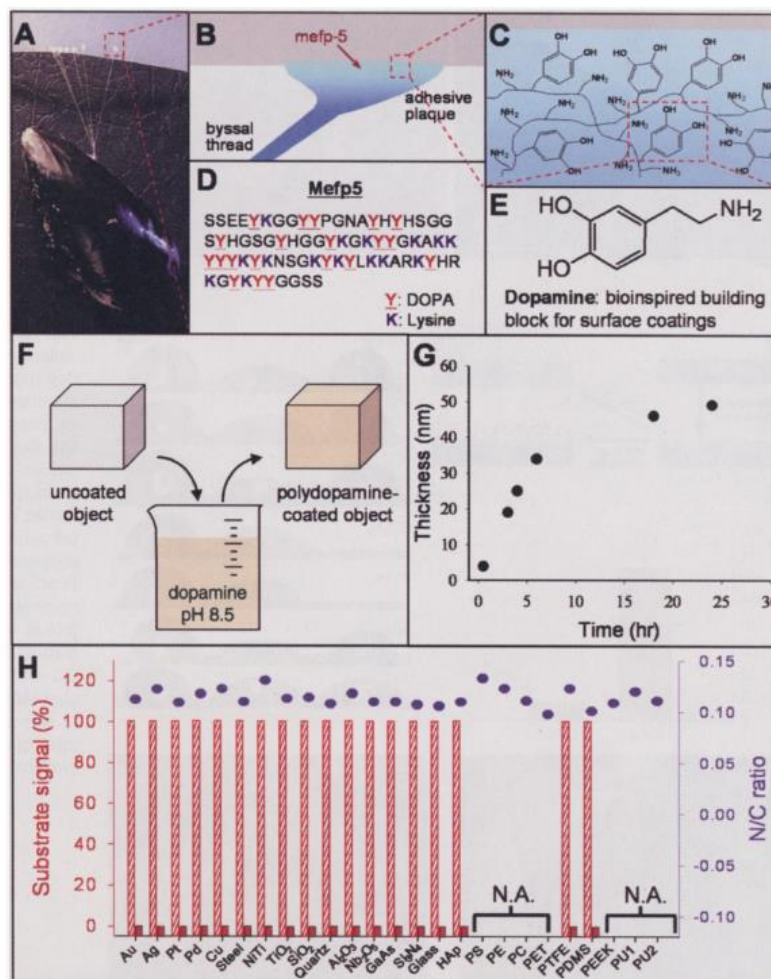


Figure 25 : (A) Photographie d'une moule attachée à du PTFE commercial. (B) Localisation interfaciale de la protéine mepf-5. (C) Illustration schématique de la localisation interfaciale de la protéine mepf-5 et de la représentation simplifiée des groupements amine et catéchol. (D) La séquence d'acides aminés de la protéine mepf-5. (E) Structure de la dopamine. (F) Schéma illustrant le dépôt d'une couche mince de polydopamine à partir de la dopamine. (G) Evolution de l'épaisseur du revêtement de polydopamine sur les surfaces au cours de temps. (H) Caractérisation XPS de 25 surfaces différentes revêtues de polydopamine. Le graphique rouge représente l'intensité du signal de substrat caractéristique avant (hachuré) et après (solide) revêtement par la polydopamine.¹⁶⁸

La présence de catéchols et d'amines proches dans la séquence de la protéine mefp-5 a encouragé ces chercheurs à utiliser la dopamine, une petite catécholamine pour imiter ce système (Figure 25 C, D). La dopamine est un neurotransmetteur^{169,170} impliqué dans la maladie de Parkinson¹⁷¹. Typiquement, former la PDA, la dopamine à 2 mg/mL (10,6 mM) est dissoute dans une solution tampon TRIS (tris hydroxyméthyl aminométhane) à pH alcalin (pH = 8 - 8,5). Cela conduit à un changement rapide de couleur de la solution incolore à orange, puis brune et brun foncé aux temps les plus longs (Figure 26 c). Au cours de cette réaction, la dopamine est oxydée par le dioxygène présent dans la solution et polymérise. Cette réaction conduit à la formation d'un film mince de polydopamine qui peut recouvrir pratiquement toutes les surfaces organiques ou inorganiques avec une épaisseur contrôlable jusqu'à 50 nm après 24 h dans ces conditions (Figure 25 F, G).

Kim *et al.*¹⁷² ont démontré que par rapport à un dépôt en présence de dioxygène ambiant, le dépôt de PDA se déroule non seulement à un rythme plus rapide, mais produit un revêtement plus uniforme et lisse sous une atmosphère pure d'O₂. En effet, la morphologie de surface hétérogène sous air se produisant en raison d'un empilement moléculaire aléatoire contrairement à une voie de dépôt sous dioxygène pur conduisant à un empilement moléculaire régulier. Ce phénomène semble être provoqué par un changement dans la réaction d'équilibre poussant vers l'oxydation de la dopamine. Ce décalage permet un empilement régulier de la structure supramoléculaire déposée et réduit considérablement le dépôt d'agrégats.

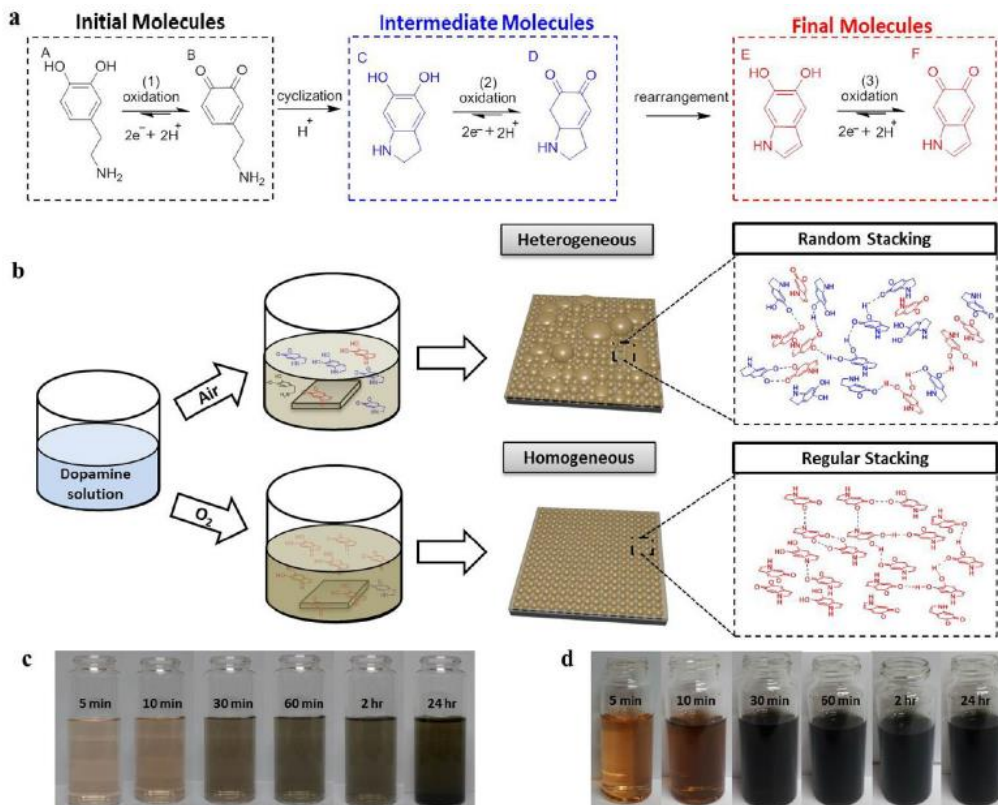


Figure 26 : (a) Mécanisme proposé de réaction de la dopamine. (b) Schéma montrant l'effet de l'environnement ambiant sur le milieu aqueux d'oxydation de la dopamine. Image de solutions de dopamine après divers temps de réaction (c) sous air, (d) sous O₂ pur.¹⁷²

4.2.1.2 Les autres oxydants

Il a rapidement été constaté que d'autres oxydants pouvaient être utilisés, tels que le cuivre(II), le peroxydisulfate d'ammonium et le périodate de sodium¹⁷³. Ce dernier conduit à une croissance rapide du film de PDA avec la possibilité d'atteindre une épaisseur proche de 100 nm, après environ 2 h, en présence de 2 mg/mL de dopamine et 10 mM de NaIO₄¹⁷⁴ alors qu'en présence de tampon Tris et d'O₂ ambiant comme oxydant, l'épaisseur du film sature à 40–45 nm après environ 16 h^{153, 174}. Récemment, un mélange de sulfate de cuivre et de peroxyde d'hydrogène comme oxydant a permis le dépôt plus rapide de films de PDA. Dans cette réaction, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme HO₂[•], O₂^{•-} et OH[•], sont produites en mélangeant Cu²⁺ et H₂O₂ dans un milieu alcalin.¹⁷⁵ Ces radicaux facilitent grandement la polymérisation de dopamine et augmentent le taux de dépôt de la PDA¹⁷⁶.

Ainsi une variété d'oxydant est disponible en fonction des conditions de dépôt et de l'application souhaitée. Le choix de l'oxydant revêt une grande importance sur la cinétique de dépôt, l'utilisation d'un oxydant plus puissant que l'oxygène peut conduire à une accélération de la vitesse d'oxydation de la dopamine et donc du dépôt de PDA et à une augmentation de son épaisseur. Cependant, il faut garder en mémoire que ces oxydants peuvent être piégés au sein de la structure de la PDA et peuvent altérer ses propriétés de surface en fonction des applications souhaitées. En effet, l'analyse XPS de substrats revêtus de PDA a révélé que les deux oxydants Cu (II) et IO_4^- étaient présents au sein de la couche de PDA (Figure 27). Pour le periodate, les photopics correspondant à $3\text{d}_{5/2}$ et $3\text{p}_{3/2}$ ont été détectés respectivement vers 632,5 eV et vers 931,0 eV. Pour le CuSO_4 , les photopics du $\text{Cu}2\text{p}$ et de l'Auger CuLMM ont été observés en plus des photopics dus à la PDA ($\text{C}1\text{s}$, $\text{N}1\text{s}$ et $\text{O}1\text{s}$).

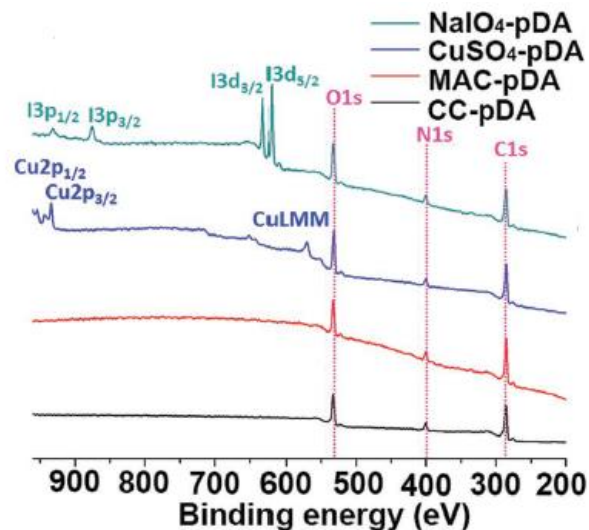


Figure 27 : Spectres XPS du dépôt de PDA sous différentes conditions de synthèse : en utilisant l'oxydant (en vert) NaIO_4 , (en bleu) CuSO_4 , (en noir) l'oxygène ambiant et (en rouge) assisté par microondes.¹⁷⁷

Enfin, d'autres méthodes de polymérisation de la dopamine sans oxydants exogènes ont été reportées. Une méthode utilise l'irradiation UV afin de contrôler extérieurement la synthèse de PDA mais le dépôt du revêtement est très lent¹⁷⁸. Cette méthode permet la formation d'un film de manière indépendante au pH grâce à l'oxydation de la dopamine par les ROS créés lorsque la solution est exposée aux UV. Le mécanisme de formation de la PDA n'est pas basé sur un mécanisme radicalaire mais est dû au potentiel oxydant élevé des ROS¹⁷⁸. Une autre méthode est l'utilisation d'un microplasma électrochimique, un plasma de petites dimensions

allant d'une dizaine à des milliers de micromètres, comme moyen de génération d'espèces oxydantes *in situ* a été également étudié¹⁷⁹⁻¹⁸⁰. En effet, il a été démontré que le traitement de la solution de dopamine avec une anode microplasma peu non seulement générer des espèces oxydantes pour déclencher la nucléation des nanoparticules de polydopamine à l'interface plasma-liquide, mais également fournir un environnement acide pour empêcher leur croissance ultérieure pendant le processus de diffusion¹⁸⁰. Cette stratégie de dépôt présente plusieurs avantages : (1) la synthèse est verte et propre, car aucun ion métallique ou agent oxydant supplémentaire n'est nécessaire, (2) le revêtement PDA sur une tranche de silicium pourrait atteindre une vitesse de dépôt très élevée, d'environ 53 nm h⁻¹¹⁸⁰, ce qui est comparable aux méthodes les plus rapides à savoir avec l'utilisation du périodate ou du mélange Cu²⁺ et H₂O₂¹⁷⁴⁻¹⁷⁵, (3) la réaction de polymérisation peut être déclenchée et arrêtée facilement en allumant ou en éteignant le plasma, la vitesse de réaction peut également être régulée en variant le courant de décharge.

Enfin, l'utilisation des ROS comme oxydant, combiné à l'effet synergique d'un chauffage assisté par micro-ondes peut être envisagée permettant de diminuer de façon considérable le temps de dépôt (Figure 28)¹⁸¹. En effet, il a été montré que les radicaux libres générés par l'énergie micro-ondes jouent un rôle dans l'accélération du dépôt de PDA, la polymérisation de la dopamine via des radicaux catéchol ayant été évoquée¹⁸²⁻¹⁸³. En outre, contrairement à une polymérisation sous oxygène ambiant, la polymérisation radicalaire peut être grandement accélérée par chauffage.

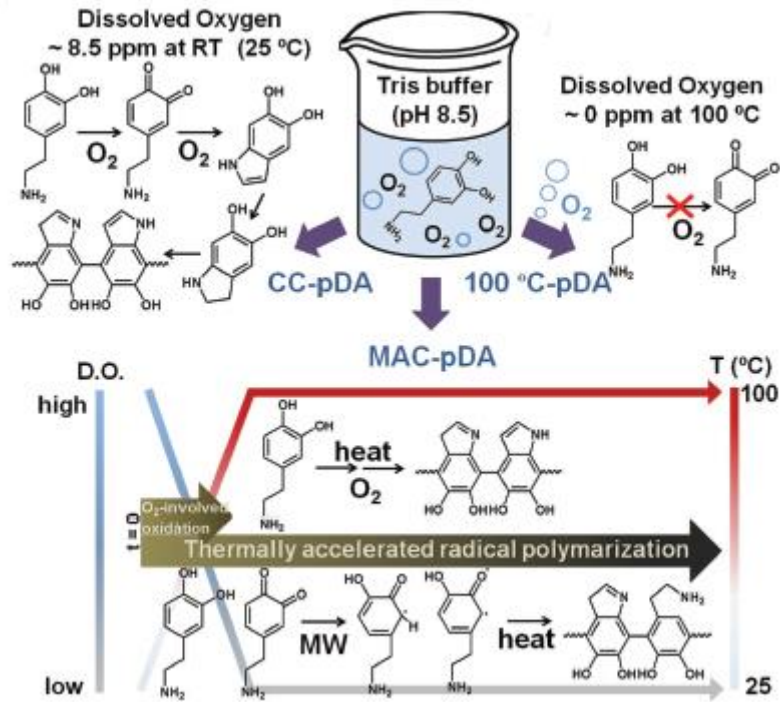


Figure 28 : Etude du processus de polymérisation de la dopamine par chauffage microonde.¹⁸¹

4.2.1.3 Les paramètres physico-chimiques influençant le dépôt

a- L'effet du pH

Lorsque la formation de la PDA se fait avec du dioxygène ambiant comme oxydant, l'oxydation ne peut pas se produire si le pH est inférieur à 5¹⁸⁴. Une augmentation du pH, avec l'oxygène comme oxydant, entraîne une augmentation de l'épaisseur et accélère le dépôt des films jusqu'à pH 9 mais aucun film ne peut être déposé au-dessus de pH 10¹⁸⁴. Ceci s'explique par la consommation des protons lorsque le pH augmente conduisant au déplacement de l'équilibre dopamine-dopaquinone en faveur de la forme oxydée de la dopamine (dopaquinone) (Figure 29).

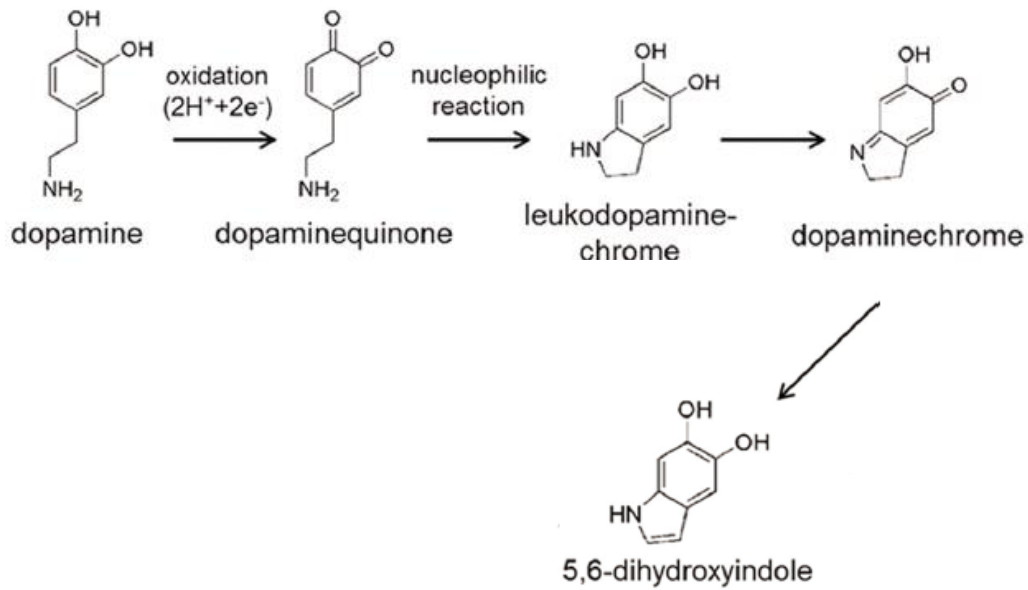


Figure 29 : Schéma de l'oxydation de la dopamine en milieu basique sous le dioxygène comme oxydant selon la référence¹⁸⁵.

Cette influence du pH a été notamment étudiée par l'équipe de Hong¹⁸⁴. Différents substrats ont été mis en présence soit dans une solution de dopamine fortement basique (St-Bc; pH 9,8) ou moyennement basique Md-Bc (pH 8,8) (Figure 31A). Comme le montrent les clichés, tous les substrats testés avec de la polydopamine dans la solution Md-Bc présentent un revêtement PDA (première colonne), tandis qu'aucun dépôt PDA ne s'est pas formé sur tous les substrats testés dans une solution de pH 9,8. Des expériences d'ellipsométrie ont montré que l'épaisseur de la polydopamine sur les substrats TiO₂ variait entre 20 à 100 nm dans des conditions Md-Bc entre pH 7,4 et 8,8. Le dépôt du revêtement de polydopamine sous pH Md-Bc (<8,8) peut s'expliquer par le pKa1 (= ~ 8,7) du groupe 3'-hydroxyl de la partie catéchol (Figure 28B). En revanche, le substrat traité avec une solution de St-Bc (pH > 10) ne présente presque pas de résidus polydopamine en surface (Figure 30B).

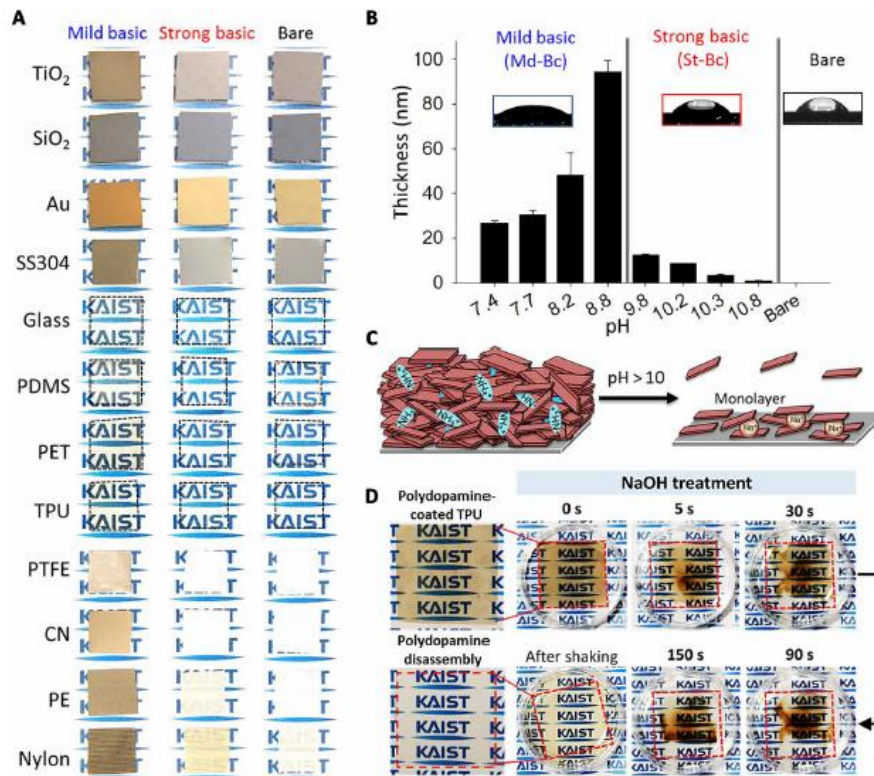


Figure 30 : Dépolymérisation du revêtement PDA sous pH fortement basique (St-Bc). (A) Clichés montrant les changements de couleur avant et après le dépôt de PDA à différents pH [Md-Bc, pH 8,8 (à gauche) ; St-Bc, pH 9,8 (milieu) ; et non modifié (à droite)]. (B) Epaisseur de la PDA sur TiO₂ à différentes valeurs de pH et les images d'angle de contact correspondantes du substrat revêtu de PDA immergé dans des solutions de Md-Bc (7,4 pH < 8,8 à gauche) ou des solutions de St-Bc (9,8 < pH < 10,8 ; milieu) et le substrat de TiO₂ nu (à droite). (C) Schéma de la dégradation du revêtement de PDA par déprotonation dans des solutions alcalines fortes. (D) Le revêtement de polydopamine sur un film de TPU a été décollé dans une solution de NaOH 0,1 M.¹⁸⁴

Cependant, l'effet du pH ne devrait pas être le même lorsqu'un oxydant exogène est introduit dans la solution. Lors de l'utilisation du périodate de sodium dans un rapport de 2:1 par rapport à la dopamine, la synthèse de la PDA dans des conditions acides (pH = 5) ou alcalines (pH = 8,5) donne lieu à une tendance opposée à celle de l'oxygène. En effet la vitesse de réaction, l'épaisseur ainsi que l'homogénéité du film sont plus élevées pour la synthèse réalisée en milieu acide. Cela pourrait s'expliquer par une compétition entre l'augmentation du pH et la présence de l'oxydant ainsi que l'incorporation d'amines du tampon à pH alcalin.¹⁷⁴

b- Le choix de la solution tampon

Le changement de tampon peut également avoir un effet sur la croissance du film. La plupart des expériences sont réalisées dans un tampon Tris à pH = 8,5 conduisant à une épaisseur d'environ 45 nm après 24 h en présence d'oxygène dissous. De plus, l'utilisation de tampon phosphate dans les mêmes conditions de pH et de concentration de dopamine conduit à une

épaisseur de 90 nm après 24 h en présence d'oxygène dissous (Figure 31)^{177, 186}. Ce résultat montre que la cinétique de dépôt et certainement les propriétés des revêtements de polydopamine peuvent être affinées par le choix des conditions expérimentales, la réactivité des groupes catéchol et quinone étant fortement influencée par la présence de nucléophiles dans le milieu réactionnel.

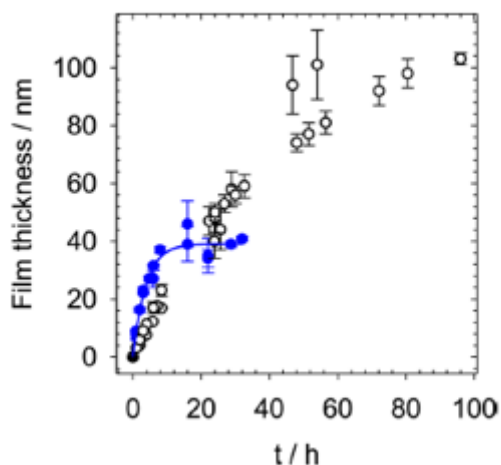


Figure 31 : Épaisseur des films de polydopamine en fonction du temps de dépôt à partir d'une solution à 2 mg/mL de dopamine en utilisant l'O₂ ambiant comme oxydant en présence de deux tampons différents à 50 mM : phosphate (o) et Tris (•). Les barres d'erreur correspondent à un écart standard sur cinq mesures effectuées sur l'échantillon.

c- L'effet de la température et de la pression

Ponzio *et al.* ont montré que lorsque le périodate de sodium est employé comme oxydant, une augmentation de la température entraîne une augmentation de l'épaisseur du film de 90 nm en une heure à 70°C contre seulement quelques nm à 4°C¹⁷⁴. Un tel effet de la température ne peut être atteint lorsque l'oxydant mis en jeu est le dioxygène dissous de l'air ambiant, la concentration d'oxygène dissous dans l'eau diminuant avec l'augmentation de la température, une épaisseur maximale du film est obtenue lorsque la température est d'environ 60°C¹⁸¹. Par conséquent, on voit qu'il peut être important de contrôler la température afin d'obtenir des données reproductibles en termes d'épaisseur de film.

Enfin, il a été démontré la possibilité d'une polymérisation de la dopamine en milieu fortement acide via une méthode hydrothermale, une voie de synthèse de la PDA sans utiliser d'oxydants exogènes. Les propriétés chimiques de la PDA générée via cette méthode sont

similaires à celles retrouvées via à un dépôt dans une solution basique¹⁸⁷. Cela ouvre ainsi la voie à des dépôts de PDA sous environnement acide pour des substrats dont un dépôt en milieu basique n'est pas possible.

4.2.2 Voie électrochimique

La méthode d'électropolymérisation est très intéressante par sa simplicité, la possibilité d'effectuer la synthèse dans une solution désoxygénée, à pH neutre en ayant un contrôle de la localisation et de l'épaisseur du dépôt¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Ji *et al.* ont étudié le dépôt de la PDA par voie électrochimique sur des stents d'or et démontré un dépôt à pH 7,4 pouvant atteindre des épaisseurs de 20 nm contrairement à un dépôt classique par auto-polymérisation de la dopamine à ce même pH (Figure 32).

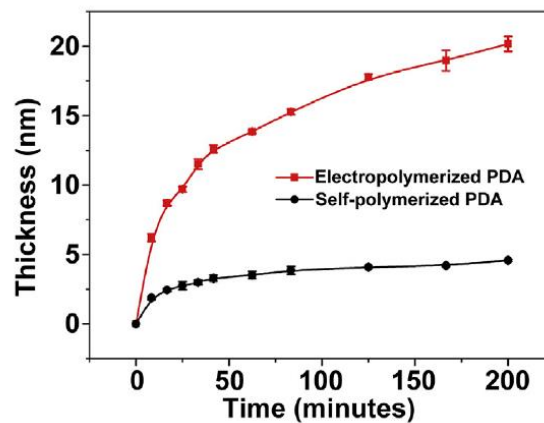


Figure 32 : Epaisseurs mesurées par ellipsométrie de la PDA électropolymérisée et de la PDA auto-polymérisée sur surface d'or en fonction du temps.¹⁸⁸

Cependant le principal inconvénient est que les films de PDA ne peuvent être déposés que sur des substrats conducteurs. De plus la PDA n'est pas électriquement conductrice, elle forme donc une couche isolante sur l'électrode conduisant à un dépôt moins épais que pour un dépôt par voie chimique.

4.2.3 Voie enzymatique

En complément de ces différentes méthodes de synthèse de la PDA, il est également possible de produire ce polymère au moyen d'un processus d'oxydation enzymatique. L'utilisation d'enzymes pour catalyser la synthèse de la PDA a suscité un intérêt croissant, car faisant appel

à des conditions de synthèse douces¹⁹¹. En effet, la formation de mélanine dans les organismes est basée sur l'oxydation catalytique de la L-tyrosine par la tyrosinase. La laccase est une sorte de polyphénol oxydase contenant plusieurs sites de cuivre et est largement utilisée dans les processus industriels tels que la dégradation catalytique des composés phénoliques dans les eaux usées¹⁹². De par la structure diphenolique de la dopamine, il a également été démontré que cette dernière subit une oxydation suivie d'une polymérisation en PDA par l'action de la laccase à pH 6¹⁹³. Cette méthode de synthèse de la PDA catalysée par une enzyme offre l'avantage d'une synthèse en conditions douces et à pH proche de la neutralité.

4.3 Etude la de la structure de la PDA

Bien que la PDA puisse être produite facilement et en faisant appel à un processus de polymérisation simple, le mécanisme moléculaire derrière la formation de la PDA a longtemps été le sujet de débats scientifiques, qui se poursuivent à ce jour, en raison du processus redox complexe auquel il fait appel, ainsi que la génération d'une série d'intermédiaires pendant la polymérisation. Aux tout premiers stades des études, il était convenu que la formation de la PDA était censée suivre un processus similaire à la voie de synthèse de la mélanine (eumélanine) dans un organisme vivant^{173, 185, 194}.

Cependant, Lee et ses collègues ont suggéré que la formation de la PDA était le résultat de la combinaison d'un auto-assemblage non covalent et d'une polymérisation covalente de la dopamine oxydée (Figure 33).¹⁹⁵ Sous conditions alcalines, la dopamine est d'abord oxydée en dopamine-quinone suivi d'une cyclisation intramoléculaire via un addition de Michael de type 1,4 pour produire le leucodopaminechrome (Figure 33).

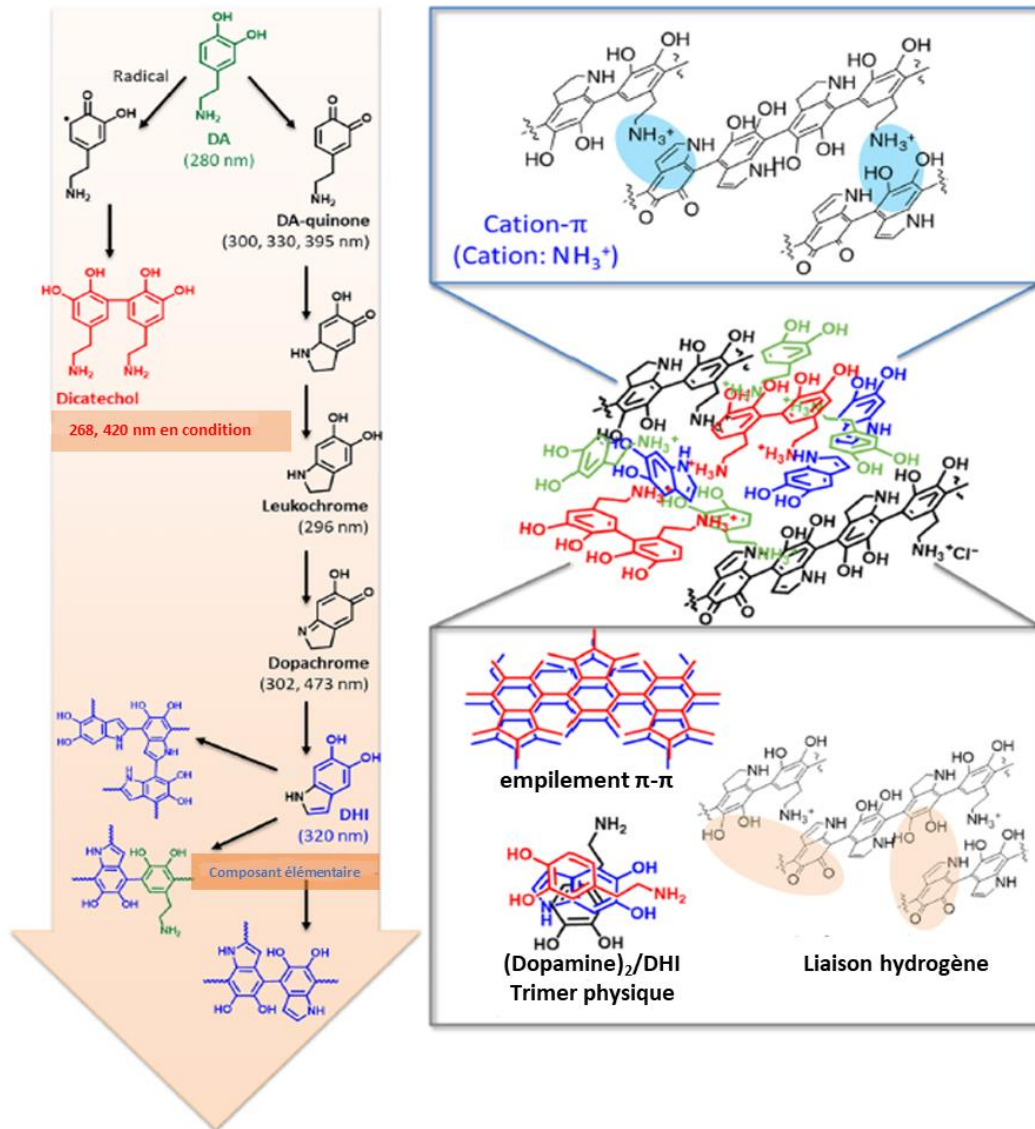


Figure 33 : Proposition du processus de polymérisation de la polydopamine.¹⁸⁴

Par la suite, la dopaminechrome subit un réarrangement intramoléculaire pour former du 5,6-dihydroxyindole, qui est facilement oxydé en 5,6-indolequinone (DHI). Ces deux produits de réaction sont capables de subir des réactions de ramification au niveau des positions 2, 3, 4 et 7, conduisant à la formation de multiples isomères de dimères et, éventuellement, des oligomères supérieurs, qui s'assemblent après réaction de dismutation inverse entre le catéchol et l'o-quinone donnant le polymère réticulé. En outre, la PDA est également considérée comme un agrégat de dimères et de trimères, qui sont réticulés principalement par l'intermédiaire de forces non covalentes incluant les liaisons hydrogène, le transfert de

charge et le π - empilement, similaire à d'autres polymères supramoléculaires synthétiques ou biologiques (Figure 33).

4.4 Propriétés du dépôt de polydopamine

Les films obtenus lors de l'oxydation des catécholamines sont noirs¹⁹⁶ comme attendu pour un matériau qui partage de nombreuses propriétés avec les eumélanines. Les matériaux en polydopamine sont caractérisés par un rendement quantique de fluorescence très faible, une propriété qu'ils partagent avec les eumélanines¹⁹⁷. Une très grande partie de l'énergie des photons absorbés est donc convertie en phonons, ce qui signifie qu'en plus du *photodamage*, la polydopamine subit une augmentation de température lors de l'exposition à la lumière.¹⁸⁶

Les films de PDA d'une épaisseur de 40 à 45 nm ont d'excellentes propriétés mécaniques, avec des modules élastiques de l'ordre d'un GPa déterminés au moyen de tests de nanoindentation¹⁹⁸. Ceci est *a priori* inattendu pour un matériau amorphe à base de carbone, d'oxygène, d'azote et d'hydrogène dans lequel il existe de nombreux domaines non connectés dans lesquels se trouvent de petites molécules non liées. L'une des raisons d'une telle élasticité peut résider dans la structure de la PDA : lorsqu'elle est produite en présence d'O₂, il existe des domaines graphitiques (avec un espacement intercouche de 3,4 Å, comme dans le graphite) entourés d'une matrice de matériau amorphe suggérant une structure identique à celle d'un matériau composite.¹⁹⁹

Les films de PDA sont plutôt stables dans des conditions acides et sous conditions physiologiques²⁰⁰, contrairement à des conditions alcalines fortes (pH ~12)¹⁸⁴. Cependant, le dépôt de PDA en présence de polyéthylénimine (PEI) permet une plus grande stabilité du revêtement face à un pH élevé²⁰¹. De plus, les matériaux PDA ne se dégradent pas lors du chauffage et peuvent supporter des températures pouvant atteindre 200°C. En revanche, les films de PDA sont sujets à la décomposition lorsqu'ils sont exposés à des oxydants, comme l'hypochlorite ou le peroxyde d'hydrogène.

Il a été décrit précédemment que la structure et les propriétés des eumélanines et de la PDA peuvent être similaires. Les eumélanines sont des pigments très présents dans notre corps et en ce sens sont connus pour être biocompatibles. En effet, le revêtement PDA dans les conditions classiques favorise l'adhérence et la prolifération des ostéoblastes, neurones,

fibroblastes et cellules endothéliales²⁰² sur différents matériaux. La possibilité de rendre une surface hydrophobe, hydrophile joue un rôle important dans l'adhérence cellulaire. Ces résultats sont en bon accord avec la faible cytotoxicité de la PDA. Des études *in vivo* montrent que la dose létale médiane de nanoparticules de PDA est très élevée (585 mg/kg)²⁰³. De plus, après injection de nanoparticules de PDA une absence d'effets toxicologiques, de lésions neurologiques, tissulaires, une absence d'inflammation et une réponse fibreuse ont été constatées chez des souris. Enfin, une dégradation de la PDA implantée après 8 semaines a été observée, peut-être due au processus de dégradation impliquant H₂O₂ et les radicaux libres.

Enfin, des propriétés antibactériennes ont été pour la première fois mises en avant à partir d'un revêtement PDA préparé sous agitation²⁰⁴. Il a été constaté qu'une modification mineure apportée à la procédure de synthèse conventionnelle de la PDA, à savoir le remplacement d'un dépôt statique par un dépôt sous agitation peut produire des revêtements de PDA rugueux (rPDA) sur différents substrats, par exemple le verre, l'acier inoxydable, le plastique et la gaze. L'activité antibactérienne des revêtements rPDA a été évaluée par un test avec une bactérie à Gram positif, *Staphylococcus aureus*, et *Escherichia coli* comme bactérie à Gram négatif. Les résultats des tests ont révélé qu'en l'absence d'autres agents antibactériens, les revêtements rPDA présentaient des activités biocides de 99,99%, Figure 34.

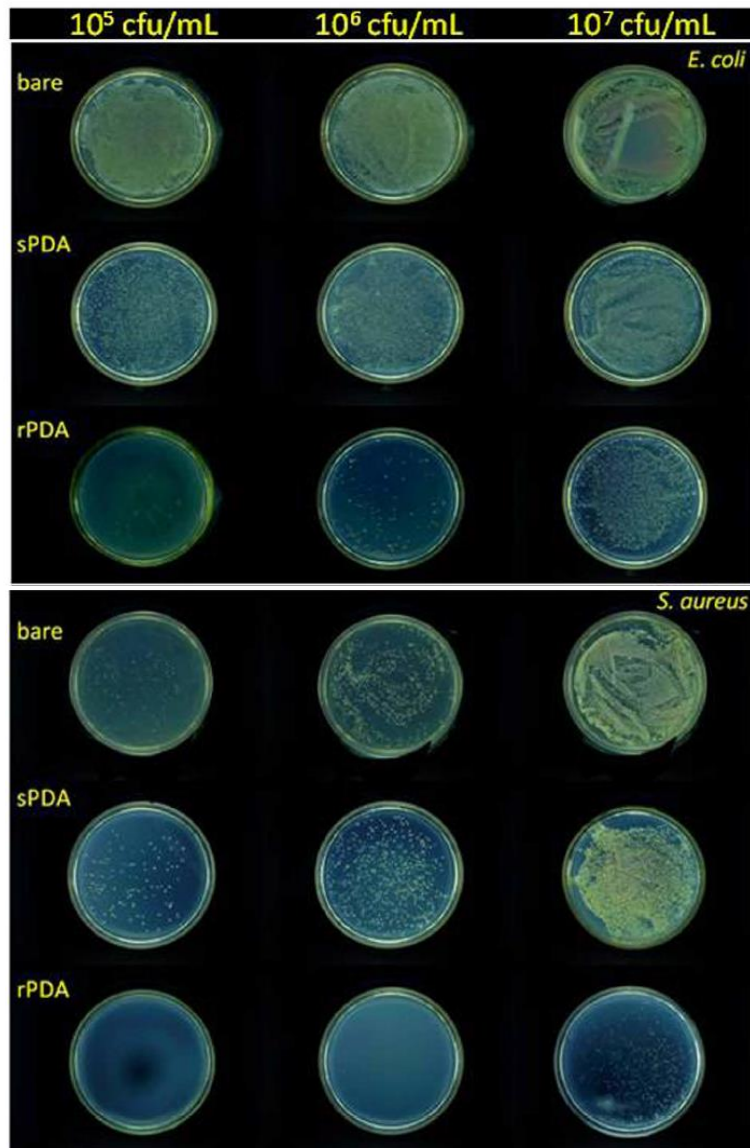


Figure 34 : Photographies des résultats des tests sur plaque d'agar du substrat nu, du PDA (revêtement PDA préparé sans agitation) et du rPDA (revêtement PDA préparé sous agitation mécanique) contre les bactéries *E. coli* et *S. aureus* à différentes concentrations.²⁰⁴

4.5 Les applications de la polydopamine

La PDA a été introduite pour la première fois en 2007¹⁵³ comme un polymère adhésif polyvalent, inspiré de l'adhérence des moules. Depuis lors le nombre d'article sur ce composé augmente d'année en année. La possibilité de fonctionnaliser n'importe quel matériel avec la PDA, la simplicité de le faire avec une méthode « *one-pot* », les différentes fonctions chimiques disponibles et les propriétés intrinsèquement et diverses de la PDA conduisent à de très nombreuses applications.

Dans le domaine médical, l'utilisation directe de cellules vivantes a conduit à l'émergence des applications dans de nombreux domaines de recherche sur les biomatériaux, comme dispositifs, capteurs, ainsi que dans le domaine de l'étude des interactions cellule – cellule et comportements cellulaires. Protection ou immobilisation des cellules vivantes semblent essentielles pour ces applications, mais s'est avéré difficile et compliqué à réaliser²⁰⁵. Récemment, de nombreux groupes de recherche ont exploité le potentiel de la PDA dans ces domaines, en montrant une immobilisation réussie de cellules et de substances biologiques sur divers substrats revêtus de PDA, due à l'interaction de la PDA avec les parois cellulaires généralement composées de protéines avec une amine et des groupements thiol accessibles²⁰⁶. Par exemple, Yang *et al.* ont proposé une approche biomimétique de l'encapsulation individuelle de cellules de levure en les enrobant d'une couche de PDA, et en les immobilisant sur un substrat. Les coquilles artificielles de PDA ainsi formées peuvent contrôler la division cellulaire en fonction de l'épaisseur de la coquille, tout en préservant ces cellules d'un environnement hostile.²⁰⁶

On retrouve également la PDA dans le domaine du stockage et de la conversion de l'énergie. La PDA est une matière organique amorphe avec toujours une structure encore difficilement connue comme on a pu le voir. Cependant, il a été démontré qu'elle est composée d'espèces hautement conjuguées qui interagissent par empilement, affichant une distance intercouche de 3,3 Å comme pour le graphite. En ce sens, le groupe de Müllen, a déposé de la PDA sur un substrat d'intérêt et l'a pyrolysé, permettant de former un film conducteur transparent²⁰⁷. Le besoin de films transparents et conducteurs flexibles est grand notamment dans le domaine des panneaux solaires. Encore une fois, le principal avantage de la PDA est sa facilité de

préparation à partir d'une solution en opposition au dépôt de nanotubes carbone ou matériaux liés au graphène faisant appel à des électrodes qui peuvent être encombrantes.

De même, la PDA peut avoir un effet synergique avec des photocatalyseurs grâce à la présence d'électrons $\pi - \pi^*$ de transition, ce qui peut grandement améliorer l'activité photocatalytique des catalyseurs. Feng et ses collègues ont synthétisé des nanoparticules monodisperse coeur/coquille Ag@PDA induisant la photodégradation d'un colorant²⁰⁸. Après irradiation avec une lumière UV, le taux de photodégradation du colorant était beaucoup plus rapide avec le composite Ag@PDA qu'en utilisant les nanoparticules d'Ag nues, indiquant l'activité photocatalytique accrue des nanoparticules l'Ag@PDA. Il est bien connu que les nanoparticules d'Ag peuvent induire des paires électron-trou sous lumière UV qui peuvent être piégés par des groupes hydroxyle conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène. La coque en PDA peut non seulement adsorber plus de molécules de colorant sur la surface du catalyseur, mais peut également produire des paires électron-trou supplémentaires sous UV, conduisant à la recombinaison retardée entre les électrons photo-induits et les trous.

4.6 Enrichissement du revêtement PDA en fonction amines : Les copolymères PDA-PEI

Pour rappel, le but de cette étude est le développement d'un revêtement antibactérien *N*-halamine basé sur la PDA. Afin d'enrichir la structure en fonctions amine et donc en fonction haloamine par la suite, la copolymérisation de la PDA et de la PEI branchée (voir Figure 35a) sera également envisagée.

L'étude de la cinétique de co-déposition des systèmes PDA-PEI a été menée par Lv *et al.*²⁰⁹. La PEI de faible masse moléculaire à une faible concentration accélère le processus de co-déposition et stabilité du revêtement en agissant comme un réticulant covalent. En outre, la PEI de haute masse moléculaire à haute concentration retarde la croissance des agrégats PDA-PEI et stabilise les particules en solution, et est donc préjudiciable au processus de co-déposition.

Le processus de co-déposition du revêtement PDA-PEI peut être résumé par la Figure 35. La PEI peut se combiner avec la PDA conduisant à des agrégats contenant la PEI et PDA se formant

en solution et se déposant sur les substrats simultanément. Le processus de dépôt peut être accéléré par l'ajout de PEI de faible masse moléculaire à faible concentration, au cours duquel les molécules de PEI agissent comme des réticulants conduisant à un grossissement rapide des agrégats. Lorsque la quantité de PEI augmente, la croissance des agrégats de PDA est entravée, car la PEI peut compromettre les interactions non covalentes comme les liaisons hydrogènes et les interactions $\pi - \pi$ dans la PDA empêchant ainsi le processus de dépôt. De plus, l'excédent de PEI recouvrant les agrégats les rendant très solubles dans l'eau, conduit à une diminution de l'efficacité de dépôt avec l'augmentation de la concentration en PEI, tandis que les revêtements deviennent plus lisses. La tendance est similaire lorsque la masse moléculaire du PEI est augmentée. Les grosses molécules de PEI sont susceptibles de recouvrir les agrégats de PDA, l'agrégation supplémentaire de la PDA devient compromise, et donc les agrégats hybrides se dispersent dans la solution plutôt que de se déposer sur la surface du substrat. De façon analogue, les oligomères de PDA oxydés peuvent être recouverts par des grosses molécules de PEI empêchant de poursuivre l'auto-polymérisation entraînant ainsi une diminution du dépôt.

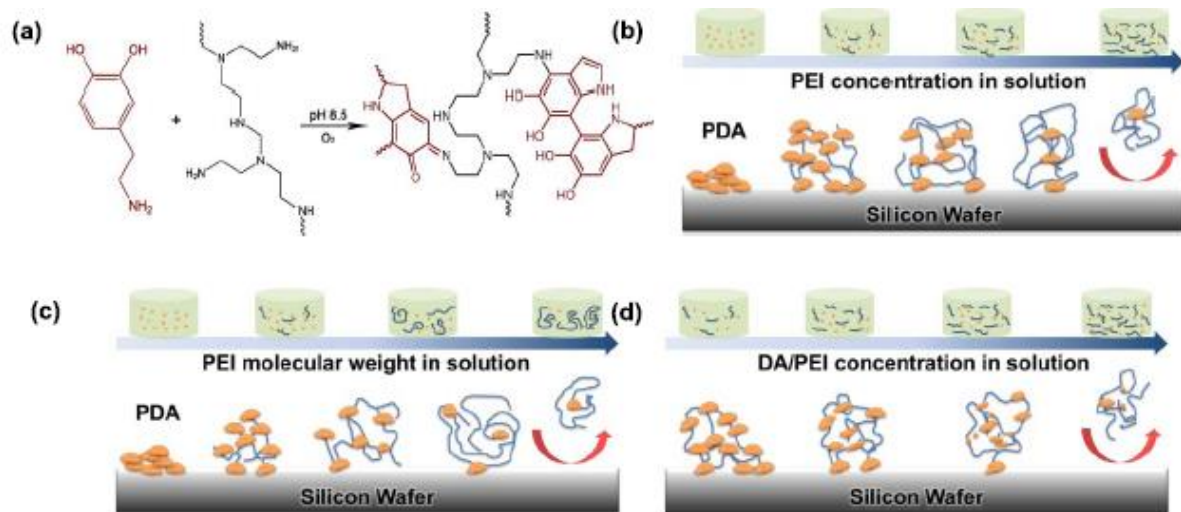


Figure 35 : Diagrammes schématiques (a) du mécanisme de réaction pour la formation d'agrégats PDA-PEI, de la variation d'agrégats en fonction (b) de la concentration en PEI, (c) du poids moléculaires du PEI, et (d) du rapport des concentrations dopamine/PEI.²⁰⁹

Références

1. Gutierrez, O.; Mohanakrishnan, J.; Sharma, K. R.; Meyer, R. L.; Keller, J.; Yuan, Z., Evaluation of oxygen injection as a means of controlling sulfide production in a sewer system. *Water Research* **2008**, *42* (17), 4549-4561.
2. Nielsen, A. H.; Vollertsen, J.; Jensen, H. S.; Wium-Andersen, T.; Hvitved-Jacobsen, T., Influence of pipe material and surfaces on sulfide related odor and corrosion in sewers. *Water Research* **2008**, *42* (15), 4206-4214.
3. Zhang, L.; De Schryver, P.; De Gussemme, B.; De Muyenck, W.; Boon, N.; Verstraete, W., Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems. *Water Research* **2008**, *42* (1-2), 1-12.
4. Nazi, N.; Humblot, V.; Debiemme-Chouvy, C., A New Antibacterial *N*-Halamine Coating Based on Polydopamine. *Langmuir* **2020**, *36* (37), 11005-11014.
5. Pajerski, W.; Ochonska, D.; Brzychczy-Wloch, M.; Indyka, P.; Jarosz, M.; Golda-Cepa, M.; Sojka, Z.; Kotarba, A., Attachment efficiency of gold nanoparticles by Gram-positive and Gram-negative bacterial strains governed by surface charges. *Journal of Nanoparticle Research* **2019**, *21* (8), 186.
6. Stock, J. B.; Rauch, B.; Roseman, S., Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252* (21), 7850-7861.
7. Hobot, J.; Carlemalm, E.; Villiger, W.; Kellenberger, E., Periplasmic gel: New concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *Journal of Bacteriology* **1984**, *160*, 143-152.
8. Malanovic, N.; Lohner, K., Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **2016**, *1858* (5), 936-946.
9. Bar Dolev, M.; Bernheim, R.; Guo, S.; Davies, P. L.; Braslavsky, I., Putting life on ice: bacteria that bind to frozen water. *Journal of The Royal Society Interface* **2016**, *13* (121), 20160210.
10. Flemming, H. C.; Wingender, J.; Szewzyk, U.; Steinberg, P.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S., Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* **2016**, *14* (9), 563-575.
11. Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W., Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* **2002**, *56*, 187-209.
12. Meckenstock, R. U.; Elsner, M.; Griebler, C.; Lueders, T.; Stumpp, C.; Aamand, J.; Agathos, S. N.; Albrechtsen, H.-J.; Bastiaens, L.; Bjerg, P. L.; Boon, N.; Dejonghe, W.; Huang, W. E.; Schmidt, S. I.; Smolders, E.; Sørensen, S. R.; Springael, D.; van Breukelen, B. M., Biodegradation: Updating the Concepts of Control for Microbial Cleanup in Contaminated Aquifers. *Environmental Science & Technology* **2015**, *49* (12), 7073-7081.

13. Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P., Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **1999**, *284* (5418), 1318-1322.
14. Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C., What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*, Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1999; 1-19.
15. Percival, S.; Malic, S.; Cruz, H.; Williams, D., Introduction to Biofilms. 2011; Vol. 6, pp 41-68.
16. Kilinc-Balci, F. S.; Fan, X.; Kocer, H. B.; Broughton, R. M., Synthesis, Structure-Bioactivity Relationship, and Application of Antimicrobial Materials. *Extrusion of Composite Fibers*. INTC, Atlanta.
17. Zobell, C. E., The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology* **1943**, *46* (1), 39-56.
18. Costerton, J. W.; Geesey, G. G.; Cheng, K. J., How bacteria stick. *Scientific American* **1978**, *238* (1), 86-95.
19. Lawrence, J. R.; Korber, D. R.; Hoyle, B. D.; Costerton, J. W.; Caldwell, D. E., Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology* **1991**, *173* (20), 6558-6567.
20. Stoodley, P.; Debeer, D.; Lewandowski, Z., Liquid flow in biofilm systems. *Applied and Environmental Microbiology* **1994**, *60* (8), 2711-2716.
21. Rieu, A.; Briandet, R.; Habimana, O.; Garmyn, D.; Guzzo, J.; Piveteau, P., *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, *74* (14), 4491-4497.
22. Cue, D.; Lei, M. G.; Luong, T. T.; Kuechenmeister, L.; Dunman, P. M.; O'Donnell, S.; Rowe, S.; O'Gara, J. P.; Lee, C. Y., Rbf promotes biofilm formation by *Staphylococcus aureus* via repression of *icaR*, a negative regulator of *icaADBC*. *Journal of Bacteriology* **2009**, *191* (20), 6363-6373.
23. Houry, A.; Briandet, R.; Aymerich, S.; Gohar, M., Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology* **2010**, *156* (Pt 4), 1009-1018.
24. Branda, S. S.; González-Pastor, J. E.; Ben-Yehuda, S.; Losick, R.; Kolter, R., Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (20), 11621-11626.
25. Wijman, J. G.; de Leeuw, P. P.; Moezelaar, R.; Zwietering, M. H.; Abee, T., Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73* (5), 1481-1488.
26. SAUER, K., Vaincre les biofilms. In <https://www.pourlascience.fr/sd/medecine/vaincre-les-biofilms-13121.php>, science, P. I., Ed. 2018.
27. Garrett, T. R.; Bhakoo, M.; Zhang, Z., Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* **2008**, *18* (9), 1049-1056.

28. Veerachamy, S.; Yarlagadda, T.; Manivasagam, G.; Yarlagadda, P. K., Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* **2014**, *228* (10), 1083-1099.
29. Shunmugaperumal, T., Pathogenesis of Device-Related Nosocomial Infections. In *Biofilm Eradication and Prevention*, 2010; pp 73-86.
30. Donlan, R. M., Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* **2002**, *8* (9), 881-890.
31. Dufour, D.; Leung, V.; Lévesque, C. M., Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics* **2010**, *22* (1), 2-16.
32. Bjarnsholt, T., The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS. Supplementum* **2013**, (136), 1-51.
33. Khatoon, Z.; McTiernan, C. D.; Suuronen, E. J.; Mah, T.-F.; Alarcon, E. I., Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* **2018**, *4* (12), e01067-e01067.
34. Büttner, H.; Mack, D.; Rohde, H., Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2015**, *5*, 14, 1-13.
35. Gupta, P.; Sarkar, S.; Das, B.; Bhattacharjee, S.; Tribedi, P., Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall. *Archives of Microbiology* **2016**, *198* (1), 1-15.
36. Lorenzetti, M.; Dogša, I.; Stošicki, T.; Stopar, D.; Kalin, M.; Kobe, S.; Novak, S., The Influence of Surface Modification on Bacterial Adhesion to Titanium-Based Substrates. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (3), 1644-1651.
37. Koo, H.; Allan, R. N.; Howlin, R. P.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L., Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology* **2017**, *15* (12), 740-755.
38. Thuptimdang, P.; Limpiyakorn, T.; McEvoy, J.; Prüß, B. M.; Khan, E., Effect of silver nanoparticles on Pseudomonas putida biofilms at different stages of maturity. *Journal of Hazardous Materials* **2015**, *290*, 127-133.
39. Königs, A. M.; Flemming, H. C.; Wingender, J., Nanosilver induces a non-culturable but metabolically active state in Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Microbiology* **2015**, *6*, 395.
40. Govan, J. R.; Deretic, V., Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. *Microbiological Reviews* **1996**, *60* (3), 539-574.
41. Sutherland, I., Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **2001**, *147* (Pt 1), 3-9.
42. Nichols, W. W.; Dorrington, S. M.; Slack, M. P.; Walmsley, H. L., Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **1988**, *32* (4), 518-523.

43. Zheng, Z.; Stewart, P. S., Penetration of rifampin through *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobiol Agents Chemotherapy* **2002**, *46* (3), 900-3.
44. de Carvalho, C. C. C. R., Marine Biofilms: A Successful Microbial Strategy With Economic Implications. *Frontiers in Marine Science* **2018**, *5* (126), 1-11.
45. Schmidt-Emrich, S.; Stiefel, P.; Rupper, P.; Katzenmeier, H.; Amberg, C.; Maniura-Weber, K.; Ren, Q., Rapid Assay to Assess Bacterial Adhesion on Textiles. *Materials* **2016**, *9* (4), 249.
46. McBryde, E. S.; Bradley, L. C.; Whitby, M.; McElwain, D. L., An investigation of contact transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Hospital Infection* **2004**, *58* (2), 104-108.
47. Klevens, R. M.; Edwards, J. R.; Richards, C. L., Jr.; Horan, T. C.; Gaynes, R. P.; Pollock, D. A.; Cardo, D. M., Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Reports* **2007**, *122* (2), 160-166.
48. Rutledge-Taylor, K.; Matlow, A.; Gravel, D.; Embree, J.; Le Saux, N.; Johnston, L.; Suh, K.; Embil, J.; Henderson, E.; John, M.; Roth, V.; Wong, A.; Shurgold, J.; Taylor, G., A point prevalence survey of health care-associated infections in Canadian pediatric inpatients. *American Journal of Infection Control* **2012**, *40* (6), 491-496.
49. Peleg, A. Y.; Hooper, D. C., Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine* **2010**, *362* (19), 1804-1813.
50. Andresen, J. A.; Muir, D.; Ueno, D.; Darling, C.; Theobald, N.; Bester, K., Emerging pollutants in the North Sea in comparison to Lake Ontario, Canada, data. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2007**, *26* (6), 1081-1089.
51. Siedenbiedel, F.; Tiller, J., Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers* **2012**, *4*, 46-71.
52. Vogl, O.; Tirrell, D., Functional Polymers with Biologically Active Groups. *Journal of Macromolecular Science - Chemistry* **1979**, *13* (3), 415-439.
53. Bortnowska-Bareła, B.; Połowińska, A.; Połowiński, S.; Vaskova, V.; Bartoń, J., Bioactive emulsions of o-carboxyphenyl methacrylate copolymers. *Acta Polymerica* **1987**, *38*, 187-192.
54. Rosenberg, L. E.; Carbone, A. L.; Römling, U.; Uhrich, K. E.; Chikindas, M. L., Salicylic acid-based poly(anhydride esters) for control of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology* **2008**, *46* (5), 593-599.
55. Schmidt, I.; Steenbakkers, P. J.; op den Camp, H. J.; Schmidt, K.; Jetten, M. S., Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers. *Journal of Bacteriology* **2004**, *186* (9), 2781-2788.
56. Cutruzzolà, F.; Frankenberg-Dinkel, N., Origin and Impact of Nitric Oxide in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Journal of Bacteriology* **2016**, *198* (1), 55-65.
57. Barraud, N.; Hassett, D. J.; Hwang, S.-H.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S.; Webb, J. S., Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **2006**, *188* (21), 7344-7353.

58. Miller M.R., Megson I.L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *British Journal of Pharmacology* **2007**; 151(3):305-321.
59. Coneski, P. N.; Rao, K. S.; Schoenfisch, M. H., Degradable nitric oxide-releasing biomaterials via post-polymerization functionalization of cross-linked polyesters. *Biomacromolecules* **2010**, 11 (11), 3208-3215.
60. Jin, H.; Yang, L.; Ahonen, M. J. R.; Schoenfisch, M. H., Nitric Oxide-Releasing Cyclodextrins. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, 140 (43), 14178-14184.
61. Ferrazzano, G. F.; Roberto, L.; Amato, I.; Cantile, T.; Sangianantoni, G.; Ingenito, A., Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: an in vivo study. *Journal of Medicinal Food* **2011**, 14 (9), 907-911.
62. Kenawy, E.-R.; El-Shanshoury, A. E.-R. R.; Omar Shaker, N.; El-Sadek, B. M.; Khattab, A. H. B.; Ismail Badr, B., Biocidal polymers: Synthesis, antimicrobial activity, and possible toxicity of poly (hydroxystyrene-co-methylmethacrylate) derivatives. *Journal of Applied Polymer Science* **2011**, 120 (5), 2734-2742.
63. Chemburu, S.; Corbitt, T. S.; Ista, L. K.; Ji, E.; Fulghum, J.; Lopez, G. P.; Ogawa, K.; Schanze, K. S.; Whitten, D. G., Light-induced biocidal action of conjugated polyelectrolytes supported on colloids. *Langmuir* **2008**, 24 (19), 11053-11062.
64. Ji, E.; Corbitt, T. S.; Parthasarathy, A.; Schanze, K. S.; Whitten, D. G., Light and Dark-Activated Biocidal Activity of Conjugated Polyelectrolytes. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2011**, 3 (8), 2820-2829.
65. Wang, Y.; Canady, T. D.; Zhou, Z.; Tang, Y.; Price, D. N.; Bear, D. G.; Chi, E. Y.; Schanze, K. S.; Whitten, D. G., Cationic phenylene ethynylene polymers and oligomers exhibit efficient antiviral activity. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2011**, 3 (7), 2209-22014.
66. Tiller, J. C.; Liao, C.-J.; Lewis, K.; Klibanov, A. M., Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, 98 (11), 5981-5985.
67. Lin, J.; Qiu, S.; Lewis, K.; Klibanov, A. M., Bactericidal Properties of Flat Surfaces and Nanoparticles Derivatized with Alkylated Polyethylenimines. *Biotechnology Progress* **2002**, 18 (5), 1082-1086.
68. Lin, J.; Qiu, S.; Lewis, K.; Klibanov, A. M., Mechanism of bactericidal and fungicidal activities of textiles covalently modified with alkylated polyethylenimine. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, 83 (2), 168-172.
69. Klibanov, A. M., Permanently microbicidal materials coatings. *Journal of Materials Chemistry* **2007**, 17 (24), 2479-2482.
70. Isquith, A. J.; Abbott, E. A.; Walters, P. A., Surface-bonded antimicrobial activity of an organosilicon quaternary ammonium chloride. *Journal of Applied Microbiology* **1972**, 24 (6), 859-863.
71. Kügler, R.; Bouloussa, O.; Rondelez, F., Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology* **2005**, 151 (Pt 5), 1341-1348.

72. Waschinski, C. J.; Zimmermann, J.; Salz, U.; Hutzler, R.; Sadowski, G.; Tiller, J. C., Design of Contact-Active Antimicrobial Acrylate-Based Materials Using Biocidal Macromers. *Advanced Materials* **2008**, *20* (1), 104-108.
73. Baltzer, S. A.; Brown, M. H., Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2011**, *20* (4), 228-235.
74. Brown, K. L.; Hancock, R. E., Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology* **2006**, *18* (1), 24-30.
75. Harris, F.; Dennison, S. R.; Phoenix, D. A., Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein & Peptide Science* **2009**, *10* (6), 585-606.
76. Shai, Y., Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1462* (1-2), 55-70.
77. Bechinger, B.; Gorr, S. U., Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research* **2017**, *96* (3), 254-260.
78. Fleming, A.; Wright, A. E., On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Royal Society* **1922**, *93* (653), 306-317.
79. Bang, S. H.; Sekhon, S. S.; Ahn, J.-Y.; Kim, Y.-H.; Min, J., Advances in antimicrobial agents based lysosomes. *Molecular & Cellular Toxicology* **2014**, *10* (3), 229-235.
80. Desbois, A. P.; Lang, S.; Gemmell, C. G.; Coote, P. J., Surface disinfection properties of the combination of an antimicrobial peptide, ranalexin, with an endopeptidase, lysostaphin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Applied Microbiology* **2010**, *108* (2), 723-730.
81. Shima, S.; Matsuoka, H.; Iwamoto, T.; Sakai, H., Antimicrobial action of epsilon-poly-L-lysine. *The Journal of Antibiotics* **1984**, *37* (11), 1449-1455.
82. Fischetti, V. A., Using phage lytic enzymes to control pathogenic bacteria. *BMC Oral Health* **2006**, *6*, S16-S16.
83. Miao, J.; Pangule, R. C.; Paskaleva, E. E.; Hwang, E. E.; Kane, R. S.; Linhardt, R. J.; Dordick, J. S., Lysostaphin-functionalized cellulose fibers with antistaphylococcal activity for wound healing applications. *Biomaterials* **2011**, *32* (36), 9557-9567.
84. Ciston, S.; Lueptow, R. M.; Gray, K. A., Bacterial attachment on reactive ceramic ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science* **2008**, *320* (1), 101-107.
85. Whitehead, K. A.; Verran, J., The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food and Bioproducts Processing : Transactions of The Institution of Chemical Engineers*. **2006**, *84*, 253-259.
86. Zhang, X.; Wang, L.; Levänen, E., Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion. *RSC Advances* **2013**, *3* (30), 12003-12020.

87. Crick, C.; Ismail, S.; Pratten, J.; Parkin, I., An investigation into bacterial attachment to an elastomeric superhydrophobic surface prepared via aerosol assisted deposition. *Thin Solid Films* **2011**, *519*, 3722-3727.
88. Hermansson, M., The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, *14* (1), 105-119.
89. Lichter, J. A.; Thompson, M. T.; Delgadillo, M.; Nishikawa, T.; Rubner, M. F.; Van Vliet, K. J., Substrata mechanical stiffness can regulate adhesion of viable bacteria. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (6), 1571-1578.
90. Ho, C. H.; Tobis, J.; Sprich, C.; Thomann, R.; Tiller, J. C., Nanoseparated Polymeric Networks with Multiple Antimicrobial Properties. *Advanced Materials* **2004**, *16* (12), 957-961.
91. Cheng, G.; Xue, H.; Zhang, Z.; Chen, S.; Jiang, S., A switchable biocompatible polymer surface with self-sterilizing and nonfouling capabilities. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (46), 8831-8834.
92. Laloyaux, X.; Fautré, E.; Blin, T.; Purohit, V.; Leprince, J.; Jouenne, T.; Jonas, A. M.; Glinel, K., Temperature-responsive polymer brushes switching from bactericidal to cell-repellent. *Advanced Materials* **2010**, *22* (44), 5024-5028.
93. Kocer, H. B.; Cerkez, I.; Worley, S. D.; Broughton, R. M.; Huang, T. S., Polymeric Antimicrobial *N*-Halamine Epoxides. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2011**, *3* (8), 2845-2850.
94. Liang, J.; Chen, Y.; Barnes, K.; Wu, R.; Worley, S. D.; Huang, T. S., *N*-halamine/quat siloxane copolymers for use in biocidal coatings. *Biomaterials* **2006**, *27* (11), 2495-24501.
95. Li, Z.; Lee, D.; Sheng, X.; Cohen, R. E.; Rubner, M. F., Two-Level Antibacterial Coating with Both Release-Killing and Contact-Killing Capabilities. *Langmuir* **2006**, *22* (24), 9820-9823.
96. Sambhy, V.; MacBride, M. M.; Peterson, B. R.; Sen, A., Silver bromide nanoparticle/polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (30), 9798-9808.
97. Bieser, A. M.; Thomann, Y.; Tiller, J. C., Contact-active antimicrobial and potentially self-polishing coatings based on cellulose. *Macromolecular Bioscience* **2011**, *11* (1), 111-121.
98. Bull, R. J.; Reckhow, D. A.; Li, X.; Humpage, A. R.; Joll, C.; Hrudey, S. E., Potential carcinogenic hazards of non-regulated disinfection by-products: haloquinones, halo-cyclopentene and cyclohexene derivatives, *N*-halamines, halonitriles, and heterocyclic amines. *Toxicology* **2011**, *286* (1-3), 1-19.
99. Scarlett, K.; Collins, D.; Tesoriero, L.; Jewell, L.; van Ogtrop, F.; Daniel, R., Efficacy of chlorine, chlorine dioxide and ultraviolet radiation as disinfectants against plant pathogens in irrigation water. *European Journal of Plant Pathology* **2016**, *145* (1), 27-38.
100. Gall, A. M.; Shisler, J. L.; Mariñas, B. J., Inactivation Kinetics and Replication Cycle Inhibition of Adenovirus by Monochloramine. *Environmental Science & Technology Letters* **2016**, *3* (4), 185-189.

101. Kou, L.; Liang, J.; Ren, X.; Kocer, H. B.; Worley, S. D.; Tzou, Y. M.; Huang, T. S., Synthesis of a Water-Soluble Siloxane Copolymer and Its Application for Antimicrobial Coatings. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2009**, *48* (14), 6521-6526.
102. Barnes, K.; Liang, J.; Wu, R.; Worley, S. D.; Lee, J.; Broughton, R. M.; Huang, T. S., Synthesis and antimicrobial applications of 5,5'-ethylenebis[5-methyl-3-(3-triethoxysilylpropyl)hydantoin]. *Biomaterials* **2006**, *27* (27), 4825-4830.
103. Lin, J.; Cammarata, V.; Worley, S. D., Infrared characterization of biocidal nylon. *Polymer* **2001**, *42* (18), 7903-7906.
104. Ahmed, A. E.-S. I.; Hay, J. N.; Bushell, M. E.; Wardell, J. N.; Cavalli, G., Macroscopic N-halamine biocidal polymeric beads. *Journal of Applied Polymer Science* **2010**, *116* (4), 2396-2408.
105. Kenawy el, R.; Worley, S. D.; Broughton, R., The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (5), 1359-1384.
106. Dong, A.; Wang, Y. J.; Gao, Y.; Gao, T.; Gao, G., Chemical Insights into Antibacterial N-Halamines. *Chemical Reviews* **2017**, *117* (6), 4806-4862.
107. Kocer, H. B.; Cerkez, I.; Worley, S. D.; Broughton, R. M.; Huang, T. S., N-halamine copolymers for use in antimicrobial paints. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2011**, *3* (8), 3189-3194.
108. Li, C.; Xue, L.; Cai, Q.; Bao, S.; Zhao, T.; Xiao, L.; Gao, G.; Harnood, C.; Dong, A., Design, synthesis and biocidal effect of novel amine N-halamine microspheres based on 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinol as promising antibacterial agents. *RSC Advances* **2014**, *4* (88), 47853-47864.
109. Kang, J.; Han, J.; Gao, Y.; Gao, T.; Lan, S.; Xiao, L.; Zhang, Y.; Gao, G.; Chokto, H.; Dong, A., Unexpected Enhancement in Antibacterial Activity of N-Halamine Polymers from Spheres to Fibers. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (31), 17516-17526.
110. Sun, Y.; Chen, T.-Y.; Worley, S. D.; Sun, G., Novel refreshable N-halamine polymeric biocides containing imidazolidin-4-one derivatives. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2001**, *39* (18), 3073-3084.
111. Hui, F.; Debiemme-Chouvy, C., Antimicrobial N-halamine polymers and coatings: a review of their synthesis, characterization, and applications. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (3), 585-601.
112. Bell, H. M.; Vanderslice, C. W.; Spehar, A., Reduction of organic halogen compounds by sodium borohydride. *The Journal of Organic Chemistry* **1969**, *34* (12), 3923-3926.
113. Kovacic, P.; Lowery, M. K.; Field, K. W., Chemistry of N-bromamines and N-chloramines. *Chemical Reviews* **1970**, *70* (6), 639-665.
114. Kohl, H. H.; Wheatley, W. B.; Worley, S. D.; Bodor, N., Antimicrobial activity of N-chloramine compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1980**, *69* (11), 1292-1295.
115. Selk, S. H.; Pogány, S. A.; Higuchi, T., Comparative antimicrobial activity, in vitro and in vivo, of soft N-chloramine systems and chlorhexidine. *Applied and Environmental Microbiology* **1982**, *43* (4), 899-904.

116. Jiang, Z.; Liu, Y.; Li, R.; Ren, X.; Huang, T. S., Preparation of antibacterial cellulose with a monochloro-s-triazine-based N-halamine biocide. *Polymers for Advanced Technologies* **2016**, *27* (4), 460-465.
117. Kocer, H. B. In Synthesis, structure-bioactivity relationship, and application of antimicrobial materials, *A dissertation submitted in* **2009**.
118. Qian, L.; Sun, G., Durable and regenerable antimicrobial textiles: Synthesis and applications of 3-methylol-2,2,5,5-tetramethyl-imidazolidin-4-one (MTMIO). *Journal of Applied Polymer Science* **2003**, *89* (9), 2418-2425.
119. Kleinpeter, E., The structure of hydantoins in solution and in the solid state. *Structural Chemistry* **1997**, *8* (2), 161-173.
120. Chen, Z.; Sun, Y., N-Halamine-Based Antimicrobial Additives for Polymers: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2006**, *45* (8), 2634-2640.
121. Ahmed, A. e.-S. I.; Cavalli, G.; Bushell, M. E.; Wardell, J. N.; Pedley, S.; Charles, K.; Hay, J. N., New approach to produce water free of bacteria, viruses, and halogens in a recyclable system. *Applied and Environmental Microbiology* **2011**, *77* (3), 847-853.
122. Tyagi, M.; Singh, H., Iodinated P(MMA-NVP): an efficient matrix for disinfection of water. *Journal of Applied Polymer Science* **2000**, *76* (7), 1109-1116.
123. Gratzl, G.; Paulik, C.; Lackner, M., *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2014; 1-29.
124. Qu, X.; Liu, H.; Zhang, C.; Lei, Y.; Lei, M.; Xu, M.; Jin, D.; Li, P.; Yin, M.; Payne, G. F.; Liu, C., Electrofabrication of functional materials: Chloramine-based antimicrobial film for infectious wound treatment. *Acta Biomaterialia* **2018**, *73*, 190-203.
125. Cao, Z.; Sun, Y., N-halamine-based chitosan: Preparation, characterization, and antimicrobial function. *Journal of Biomedical Materials Research* **2008**, *85A* (1), 99-107.
126. Tsao, T. C.; Williams, D. E.; Worley, S. D., A new disinfectant compound. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1990**, *29* (10), 2161-2163.
127. Eknoian, M. W.; Worley, S. D.; Bickert, J.; Williams, J. F., Novel antimicrobial N-halamine polymer coatings generated by emulsion polymerization. *Polymer* **1999**, *40* (6), 1367-1371.
128. Luo, J.; Chen, Z.; Sun, Y., Controlling biofilm formation with an N-halamine-based polymeric additive. *Journal of Biomedical Materials Research* **2006**, *77A* (4), 823-831.
129. Ahmed, A. E.-S.; Hay, J.; Bushell, M.; Wardell, J.; Cavalli, G., Biocidal polymers (II): Determination of biological activity of novel N-halamine biocidal polymers and evaluation for use in water filters. *Reactive and Functional Polymers* **2008**, *68*, 1448-1458.
130. Peskin, A.; Turner, R.; Maghzal, G.; Winterbourn, C.; Kettle, A., Oxidation of Methionine to Dehydromethionine by Reactive Halogen Species Generated by Neutrophils. *Biochemistry* **2009**, *48*, 10175-10182.

131. Vissers, M. C. M.; Winterbourn, C. C., Oxidative damage to fibronectin: I. The effects of the neutrophil myeloperoxidase system and HOCl. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1991**, *285* (1), 53-59.
132. Chapman, A. L. P.; Winterbourn, C. C.; Brennan, S. O.; Jordan, T. W.; Kettle, A. J., Characterization of non-covalent oligomers of proteins treated with hypochlorous acid. *Biochemical Journal* **2003**, *375* (1), 33-40.
133. Debiemme-Chouvy, C.; Haskouri, S.; Folcher G.; Cachet, H., An Original Route to Immobilize an Organic Biocide onto a Transparent Tin Dioxide Electrode. *Langmuir* **2007**, *23*, 3873-3879.
134. Dong, A.; Lan, S.; Huang, J.; Wang, T.; Zhao, T.; Wang, W.; Xiao, L.; Zheng, X.; Liu, F.; Gao, G.; Chen, Y., Preparation of magnetically separable N-halamine nanocomposites for the improved antibacterial application. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, *364* (2), 333-340.
135. Debiemme-Chouvy, C.; Haskouri, S.; Cachet, H., Study by XPS of the chlorination of proteins aggregated onto tin dioxide during electrochemical production of hypochlorous acid. *Applied Surface Science* **2007**, *253* (12), 5506-5510.
136. Haskouri, S.; Cachet, H.; Duval, J.-L.; Debiemme-Chouvy, C., First evidence of the antibacterial property of SnO₂ surface electrochemically modified in the presence of bovine serum albumin and chloride ions. *Electrochemistry Communications* **2006**, *7*, 1111-1114.
137. Jie, Z.; Yan, X.; Zhao, L.; Worley, S. D.; Liang, J., Eco-friendly synthesis of regenerable antimicrobial polymeric resin with N-halamine and quaternary ammonium salt groups. *RSC Advances* **2014**, *4* (12), 6048-6054.
138. Fan, X.; Ren, X.; Huang, T.-S.; Sun, Y., Cytocompatible antibacterial fibrous membranes based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and quaternarized N-halamine polymer. *RSC Advances* **2016**, *6* (48), 42600-42610.
139. Luo, J.; Sun, Y., Acyclic N-halamine-based biocidal tubing: Preparation, characterization, and rechargeable biofilm-controlling functions. *Journal of Biomedical Materials Research* **2008**, *84A* (3), 631-642.
140. Jabur, A. R.; Abbas, L. K.; Moosa, S. A., Fabrication of Electrospun Chitosan/Nylon 6 Nanofibrous Membrane toward Metal Ions Removal and Antibacterial Effect. *Advances in Materials Science and Engineering* **2016**, *2016*, 5810216.
141. Jie, Z.; Yan, X.; Zhao, L.; Worley, S. D.; Liang, J., A high-efficacy and regenerable antimicrobial resin containing quaternarized N-halamine groups. *Reactive and Functional Polymers* **2013**, *73* (11), 1580-1587.
142. Yan, X.; Jie, Z.; Zhao, L.; Yang, H.; Yang, S.; Liang, J., High-efficacy antibacterial polymeric micro/nano particles with N-halamine functional groups. *Chemical Engineering Journal* **2014**, *254*, 30-38.
143. Liu, Y.; Jiang, Z.; Li, J.; Liu, Y.; Ren, X.; Huang, T.-S., Antibacterial functionalization of cotton fabrics by electric-beam irradiation. *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, *132* (23), 42023.
144. Zhu, J., Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **2010**, *31* (17), 4639-4656.

145. Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D., Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109* (12), 3559-3568.
146. Decher, G., Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277* (5330), 1232.
147. Chu, P. K.; Chen, J. Y.; Wang, L. P.; Huang, N., Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering* **2002**, *36* (5), 143-206.
148. Ulman, A., Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (4), 1533-1554.
149. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (4), 1103-1170.
150. Chaudhury, M. K.; Whitesides, G. M., Correlation between surface free energy and surface constitution. *Science* **1992**, *255* (5049), 1230-1232.
151. Sagiv, J., Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102* (1), 92-98.
152. Cha, H. J.; Hwang, D. S.; Lim, S., Development of bioadhesives from marine mussels. *Biotechnology Journal* **2008**, *3* (5), 631-638.
153. Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B., Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* **2007**, *318* (5849), 426-430.
154. Kang, S. M.; Rho, J.; Choi, I. S.; Messersmith, P. B.; Lee, H., Norepinephrine: Material-Independent, Multifunctional Surface Modification Reagent. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (37), 13224-13225.
155. Hong, S.; Kim, J.; Na, Y. S.; Park, J.; Kim, S.; Singha, K.; Im, G. I.; Han, D. K.; Kim, W. J.; Lee, H., Poly(norepinephrine): ultrasmooth material-independent surface chemistry and nanodepot for nitric oxide. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (35), 9187-91.
156. Ryu, J. H.; Messersmith, P. B.; Lee, H., Polydopamine Surface Chemistry: A Decade of Discovery. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2018**, *10* (9), 7523-7540.
157. Jaber, M.; Lambert, J.-F., A New Nanocomposite: L-DOPA/Laponite. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2010**, *1* (1), 85-88.
158. Ball, V., Polydopamine Nanomaterials: Recent Advances in Synthesis Methods and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2018**, *6* (109).
159. Bell, E. C.; Gosline, J. M., Strategies for life in flow: tenacity, morphometry, and probability of dislodgment of two *Mytilus* species. *Marine Ecology Progress Series* **1997**, *159*, 197-208.
160. Lee, B. P.; Messersmith, P. B.; Israelachvili, J. N.; Waite, J. H., Mussel-Inspired Adhesives and Coatings. *Annual Review of Materials Research* **2011**, *41* (1), 99-132.

161. Lin, Q.; Gourdon, D.; Sun, C.; Holten-Andersen, N.; Anderson, T. H.; Waite, J. H.; Israelachvili, J. N., Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (10), 3782-3786.
162. Waite, J. H., Adhesion in byssally attached bivalves. *Biological Reviews* **1983**, *58* (2), 209-231.
163. Vreeland, V.; Waite, J. H.; Epstein, L., Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *Journal of Phycology* **1998**, *34* (1), 1-8.
164. Ye, Q.; Zhou, F.; Liu, W., Bioinspired catecholic chemistry for surface modification. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (7), 4244-4258.
165. Silverman, H. G.; Roberto, F. F., Understanding marine mussel adhesion. *Marine Biotechnology* **2007**, *9* (6), 661-681.
166. Rzepecki, L. M.; Hansen, K. M.; Waite, J. H., Characterization of a Cystine-Rich Polyphenolic Protein Family from the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. *The Biological Bulletin* **1992**, *183* (1), 123-137.
167. Lee, H.; Scherer, N. F.; Messersmith, P. B., Single-molecule mechanics of mussel adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (35), 12999-3003.
168. Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, M. W.; Messersmith P. B., Mussel inspired surface chemistry for multifunctional coating. *Science, New Series* **2007**, *318*, 426-430.
169. Wightman, R. M.; May, L. J.; Michael, A. C., Detection of dopamine dynamics in the brain. *Analytical Chemistry* **1988**, *60* (13), 769A-779A.
170. Ben-Jonathan, N., Dopamine: A Prolactin-Inhibiting Hormone. *Endocrine Reviews* **1985**, *6* (4), 564-589.
171. Zhang, A.; Neumeyer, J. L.; Baldessarini, R. J., Recent progress in development of dopamine receptor subtype-selective agents: potential therapeutics for neurological and psychiatric disorders. *Chemical Reviews* **2007**, *107* (1), 274-302.
172. Kim, H. W.; McCloskey, B. D.; Choi, T. H.; Lee, C.; Kim, M.-J.; Freeman, B. D.; Park, H. B., Oxygen Concentration Control of Dopamine-Induced High Uniformity Surface Coating Chemistry. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5* (2), 233-238.
173. Wei, Q.; Zhang, F.; Li, J.; Li, B.; Zhao, C., Oxidant-induced dopamine polymerization for multifunctional coatings. *Polymer Chemistry* **2010**, *1* (9), 1430.
174. Ponzio, F.; Barthès, J.; Bour, J.; Michel, M.; Bertani, P.; Hemmerlé, J.; d'Ischia, M.; Ball, V., Oxidant Control of Polydopamine Surface Chemistry in Acids: A Mechanism-Based Entry to Superhydrophilic-Superoleophobic Coatings. *Chemistry of Materials* **2016**, *28* (13), 4697-4705.
175. Zhang, C.; Ou, Y.; Lei, W. X.; Wan, L. S.; Ji, J.; Xu, Z. K., CuSO₄/H₂O₂-Induced Rapid Deposition of Polydopamine Coatings with High Uniformity and Enhanced Stability. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (9), 3054-3057.
176. Luo, Y.; Orban, M.; Kustin, K.; Epstein, I. R., Mechanistic study of oscillations and bistability in the copper(II)-catalyzed reaction between hydrogen peroxide and potassium thiocyanate. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111* (13), 4541-4548.

177. Bernsmann, F.; Ball, V.; Addiego, F.; Ponche, A.; Michel, M.; Gracio, J. J.; Toniazzo, V.; Ruch, D., Dopamine-melanin film deposition depends on the used oxidant and buffer solution. *Langmuir* **2011**, 27 (6), 2819-2825.
178. Du, X.; Li, L.; Li, J.; Yang, C.; Frenkel, N.; Welle, A.; Heissler, S.; Nefedov, A.; Grunze, M.; Levkin, P. A., UV-triggered dopamine polymerization: control of polymerization, surface coating, and photopatterning. *Advanced Materials* **2014**, 26 (47), 8029-8233.
179. Wang, Z.; Xu, C.; Lu, Y.; Wei, G.; Ye, G.; Sun, T.; Chen, J., Microplasma electrochemistry controlled rapid preparation of fluorescent polydopamine nanoparticles and their application in uranium detection. *Chemical Engineering Journal* **2018**, 344, 480-486.
180. Wang, Z.; Xu, C.; Lu, Y.; Wei, G.; Ye, G.; Sun, T.; Chen, J., Microplasma-assisted rapid, chemical oxidant-free and controllable polymerization of dopamine for surface modification. *Polymer Chemistry* **2017**, 8 (30), 4388-4392.
181. Lee, M.; Lee, S. H.; Oh, I. K.; Lee, H., Microwave-Accelerated Rapid, Chemical Oxidant-Free, Material-Independent Surface Chemistry of Poly(dopamine). *Small* **2017**, 13 (4), 1600443.
182. Zetterlund, P. B.; Perrier, S., RAFT Polymerization under Microwave Irradiation: Toward Mechanistic Understanding. *Macromolecules* **2011**, 44 (6), 1340-1346.
183. Sugumaran, M.; Duggaraju, P.; Jayachandran, E.; Kirk, K. L., Formation of a new quinone methide intermediate during the oxidative transformation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acids: implication for eumelanin biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, 371 (1), 98-106.
184. Hong, S.; Wang, Y.; Park, S. Y.; Lee, H., Progressive fuzzy cation- π assembly of biological catecholamines. *Science Advances* **2018**, 4 (9), 7457.
185. Liu, Y.; Ai, K.; Lu, L., Polydopamine and its derivative materials: synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields. *Chemical Reviews* **2014**, 114 (9), 5057-115.
186. Ball, V., Physicochemical perspective on "polydopamine" and "poly(catecholamine)" films for their applications in biomaterial coatings. *Biointerphases* **2014**, 9 (3), 030801.
187. Zheng, W.; Fan, H.; Wang, L.; Jin, Z., Oxidative Self-Polymerization of Dopamine in an Acidic Environment. *Langmuir* **2015**, 31 (42), 11671-11677.
188. Wang, J.-l. L., B.-c.; Li, Z.-j.; Ren, K.-f.; Jin, L.-j.; Zhang, S.-m.; Chang, H.; Sun, Y.-x.; Ji, J., Electropolymerization of dopamine for surface modification of complex-shaped cardiovascular stents. *Biomaterials* **2014**, 35, 7679-7689.
189. Stöckle, B.; Ng, D. Y. W.; Meier, C.; Paust, T.; Bischoff, F.; Diemant, T.; Behm, R. J.; Gottschalk, K.-E.; Ziener, U.; Weil, T., Precise Control of Polydopamine Film Formation by Electropolymerization. *Macromolecular Symposia* **2014**, 346 (1), 73-81.
190. Łuczak, T., Preparation and characterization of the dopamine film electrochemically deposited on a gold template and its applications for dopamine sensing in aqueous solution. *Electrochimica Acta* **2008**, 53 (19), 5725-5731.

191. Kobayashi, S.; Makino, A., Enzymatic polymer synthesis: an opportunity for green polymer chemistry. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (11), 5288-353.
192. Marjasvaara, A.; Torvinen, M.; Kinnunen, H.; Vainiotalo, P., Laccase-catalyzed polymerization of two phenolic compounds studied by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry with collision-induced dissociation experiments. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (5), 1604-1609.
193. Tan, Y.; Deng, W.; Li, Y.; Huang, Z.; Meng, Y.; Xie, Q.; Ma, M.; Yao, S., Polymeric Bionanocomposite Cast Thin Films with In Situ Laccase-Catalyzed Polymerization of Dopamine for Biosensing and Biofuel Cell Applications. *The Journal of Physical Chemistry* **2010**, *114* (15), 5016-5024.
194. Yu, F.; Chen, S.; Chen, Y.; Li, H.; Yang, L.; Chen, Y.; Yin, Y., Experimental and theoretical analysis of polymerization reaction process on the polydopamine membranes and its corrosion protection properties for 304 Stainless Steel. *Journal of Molecular Structure* **2010**, *982* (1), 152-161.
195. Hong, S.; Na, Y. S.; Choi, S.; Song, I. T.; Kim, W. Y.; Lee, H., Non-Covalent Self-Assembly and Covalent Polymerization Co-Contribute to Polydopamine Formation. *Advanced Functional Materials* **2012**, *22* (22), 4711-4717.
196. Bernsmann, F.; Frisch, B.; Ringwald, C.; Ball, V., Protein adsorption on dopamine-melanin films: role of electrostatic interactions inferred from zeta-potential measurements versus chemisorption. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, *344* (1), 54-60.
197. Meredith, P.; Sarna, T., The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment cell research* **2006**, *19* (6), 572-594.
198. Lin, S.; Chen, C.-T.; Bdikin, I.; Ball, V.; Grácio, J.; Buehler, M. J., Tuning heterogeneous poly(dopamine) structures and mechanics: in silico covalent cross-linking and thin film nanoindentation. *Soft Matter* **2014**, *10* (3), 457-464.
199. Ball, V.; Gracio, J.; Vila, M.; Singh, M. K.; Metz-Boutigue, M.-H.; Michel, M.; Bour, J.; Toniazzo, V.; Ruch, D.; Buehler, M. J., Comparison of Synthetic Dopamine–Eumelanin Formed in the Presence of Oxygen and Cu²⁺ Cations as Oxidants. *Langmuir* **2013**, *29* (41), 12754-12761.
200. Wei, H.; Ren, J.; Han, B.; Xu, L.; Han, L.; Jia, L., Stability of polydopamine and poly(DOPA) melanin-like films on the surface of polymer membranes under strongly acidic and alkaline conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *110*, 22-28.
201. Yang, H.-C.; Liao, K.-J.; Huang, H.; Wu, Q.-Y.; Wan, L.-S.; Xu, Z.-K., Mussel-inspired modification of a polymer membrane for ultra-high water permeability and oil-in-water emulsion separation. *Journal of Materials Chemistry* **2014**, *2* (26), 10225-10230.
202. Ku, S. H.; Ryu, J.; Hong, S. K.; Lee, H.; Park, C. B., General functionalization route for cell adhesion on non-wetting surfaces. *Biomaterials* **2010**, *31* (9), 2535-2541.
203. Liu, Y.; Ai, K.; Liu, J.; Deng, M.; He, Y.; Lu, L., Dopamine-Melanin Colloidal Nanospheres: An Efficient Near-Infrared Photothermal Therapeutic Agent for In Vivo Cancer Therapy. *Advanced Materials* **2013**, *25* (9), 1353-1359.

204. Su, L.; Yu, Y.; Zhao, Y.; Liang, F.; Zhang, X., Strong Antibacterial Polydopamine Coatings Prepared by a Shaking-assisted Method. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1), 24420.
205. Chi, Y. S.; Lee, J. K.; Lee, K.-B.; Kim, D. J.; Cho, I. S., Biosurface Organic Chemistry: Interfacial Chemical Reactions for Applications to Nanobiotechnology and Biomedical Sciences. *Bull. Korean Chem. Soc* **2005**, *26* (3), 361-370.
206. Yang, S. H.; Kang, S. M.; Lee, K. B.; Chung, T. D.; Lee, H.; Choi, I. S., Mussel-inspired encapsulation and functionalization of individual yeast cells. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (9), 2795-2797.
207. Li, R.; Parvez, K.; Hinkel, F.; Feng, X.; Müllen, K., Bioinspired Wafer-Scale Production of Highly Stretchable Carbon Films for Transparent Conductive Electrodes. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (21), 5535-5538.
208. Feng, J.-J.; Zhang, P.-P.; Wang, A.-J.; Liao, Q.-C.; Xi, J.-L.; Chen, J.-R., One-step synthesis of monodisperse polydopamine-coated silver core-shell nanostructures for enhanced photocatalysis. *New Journal of Chemistry* **2012**, *36* (1), 148-154.
209. Lv, Y.; Yang, S.-J.; Du, Y.; Yang, H.-C.; Xu, Z.-K., Co-deposition Kinetics of Polydopamine/Polyethyleneimine Coatings: Effects of Solution Composition and Substrate Surface. *Langmuir* **2018**, *34* (44), 13123-13131.

CHAPITRE I
Etude bibliographique

CHAPITRE II

Matériels & Méthodes

Table des matières

1. Protocole de fonctionnalisation de la PDA et de chloration/bromation.....	86
1.1. Préparation des surfaces d'or	86
1.2. Fonctionnalisation des surfaces	86
1.2.1. Dépôt du revêtement PDA	87
1.2.1.1. Dépôt sous O ₂	87
1.2.1.2. Dépôt sous périodate de sodium (NaIO ₄).....	87
1.2.2. Dépôt du revêtement composite Polydopamine- Polyéthylénimine (PDA-PEI)	88
1.3. Greffage des fonctions chloramine/bromamine.....	89
1.3.1. Préparation de la solution de NaOCl	89
1.3.2. Préparation de la solution de NaOCl	89
1.3.3. Protocole de greffage.....	90
2. Caractérisations physico-chimiques.....	91
2.1. Techniques de caractérisation de surface.....	91
2.1.1. Spectroscopie infrarouge : Spectroscopie infrarouge en mode réflexion absorption avec polarisation de modulation	92
(Polarisation Modulation InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy - PM-IRRAS).....	92
2.1.1.1. Rappel du principe.....	92
2.1.1.2. Montage expérimental et protocole d'utilisation	94
2.1.2. Spectroscopie de photoélectrons X :	95
X-ray Photoelectron Spectroscopy – XPS).....	95
2.1.2.1. Rappel du principe.....	95
2.1.2.2. Instrumentation et protocole d'utilisation.....	96
2.1.3. Microbalance à cristal de quartz	98
(Quartz Crystal Microbalance – QCM).....	98
2.1.3.1. Rappel du principe.....	98
2.1.3.2. Dispositif expérimental	98
2.1.4. Ellispométrie.....	99
2.1.5. Angle de contact.....	100
2.2. La Spectroscopie Electronique à Balayage (MEB)	100
2.3. Quantification de la fonction chloramine	101

3. Test microbiologiques	102
3.1. Souches et cultures bactériennes	102
3.2. Tests d'adhérence des bactéries sur les surfaces	103
3.3. Tests de cultivabilité des bactéries.....	104
Référence	106

Ce chapitre est dédié à la présentation des matériaux, protocoles des greffages et fonctionnalisations et des méthodes expérimentales employés durant cette étude. Nous verrons comment suivre et caractériser le dépôt du revêtement à base de PDA d'un point de vue physico-chimique, à suivre et évaluer la chloration aboutissant à la création de fonctions N-halamine et enfin à tester les propriétés antibactériennes de ce dernier. Les spécificités des produits manipulés ainsi que les conditions expérimentales des diverses mesures réalisées sont ici répertoriées. Les principes physiques sur lesquels elles s'appuient sont également expliqués dans ce chapitre.

1. Protocole de fonctionnalisation de la PDA et de chloration/bromation

1.1. Préparation des surfaces d'or

Les surfaces d'or utilisées ont une épaisseur moyenne d'environ 200 nm et sont supportées par des lames de verre recouvertes de chrome (constituant une couche d'environ 50 Å). Les coupons, fournis par Arrandee (Allemagne) mesurent 11 x 11 mm². Pour garantir une bonne cristallinité de la couche superficielle d'or, les plaques sont recuites dans une flamme de butane ($\approx 1750^{\circ}\text{C}$) au moyen d'un bec bunsen (Butagaz). La surface ainsi obtenue est constituée de micro-domaines d'Au (111). Pour éliminer un maximum de pollution organique, les échantillons sont ensuite placés sous UV-ozone pendant 30 minutes puis rincés successivement dans l'éthanol absolu et l'eau ultrapure pendant 5 minutes. Les plaques sont enfin séchées sous un flux d'azote et analysées en PM-IRRAS afin de vérifier la propreté des plaques avant d'être immédiatement fonctionnalisées.

1.2. Fonctionnalisation des surfaces

Cette partie présente les protocoles de dépôt des différents revêtements de PDA déposés sous différentes conditions ainsi que le composite PDA-PEI qui seront étudiés par la suite

1.2.1. Dépôt du revêtement PDA

1.2.1.1. Dépôt sous O₂

Pour la formation du revêtement de polydopamine, les substrats ont été immergés dans solution de dopamine, préparée en dissolvant 0,5 mg/mL de dopamine hydrochlorique (pureté à 98%, Sigma Aldrich) dans 10 mM de tris(hydroxyméthyl)aminométhane hydrochloride (Tris-HCl) (Sigma Aldrich) à pH 8,5, sous agitation sauf pour les expériences QCM qui ont été réalisées en conditions statiques (Figure 1). Ce protocole de dépôt du film PDA s'est inspiré du protocole proposé par l'équipe de Messersmith¹. Ensuite, un traitement de rinçage aux ultrasons dans de l'eau distillée a été mené sur les substrats pendant 1 minute ; enfin, les échantillons sont séchés à l'azote sec. Les échantillons ont été par la suite nommés PDA-O₂.

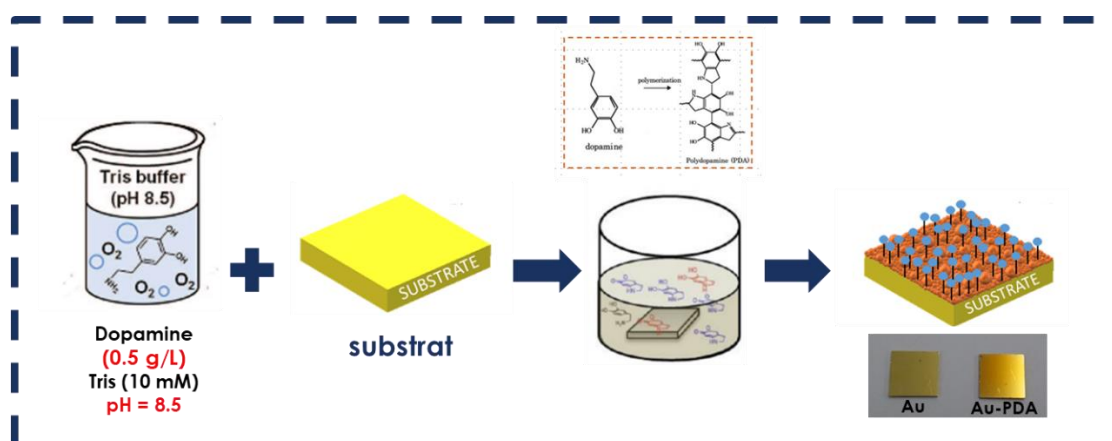


Figure 1 : Schéma résumant le principe de fonctionnalisation de surface de substrat par de la PDA sous O₂ comme oxydant.

1.2.1.2. Dépôt sous périodate de sodium (NaIO₄)

Pour le dépôt de la PDA en utilisant le périodate de sodium (NaIO₄) comme oxydant à une concentration de 5 mM, les substrats ont été immergés dans solution de dopamine, préparée en dissolvant 0,5 mg/mL de dopamine hydrochlorique (pureté de 98%, Sigma Aldrich) dans 50 mM de d'acétate de sodium (pureté à 99%, Sigma Aldrich) à pH 5,5 (Figure 2). Ce protocole de dépôt du film PDA en présence de périodate de sodium a été inspirée de l'étude menée par Ponzio *et al.*². Par la suite, les substrats ont été lavés avec de l'eau ultrapure pendant 5

minutes sous sonication et puis séché à l'azote sec. Les échantillons ont été par la suite nommés PDA-IO₄⁻.

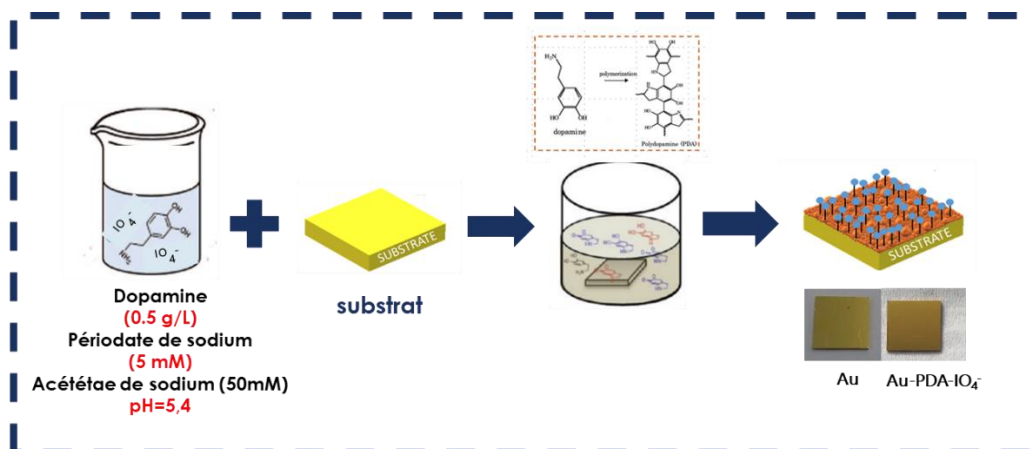


Figure 2 : Schéma résumant le principe de fonctionnalisation de surface de substrat par de la PDA en présence de périodate de sodium (NaIO₄) comme oxydant.

1.2.2. Dépôt du revêtement composite Polydopamine- Polyéthyléimine (PDA-PEI)

Le dépôt du composite PDA-PEI a été mené en plongeant les substrats sous agitation dans une solution formée du mélange de la dopamine à 0,5 mg/mL et du PEI de masse moléculaire de 600 Da (Sigma aldrich) à 0,25 mg/mL dans 10 mM de tris(hydroxyméthyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl) (Sigma Aldrich) à pH 8,5. Ce protocole de dépôt du film composite PDA-PEI s'est inspiré de l'étude menée par Xu *et al.*³. Pour les expériences QCM, ce dépôt a été qui ont été mené en conditions statiques (Figure 3). Cette fonctionnalisation est suivie d'un traitement des substrats par ultrasons dans de l'eau ultrapure et suivi d'un séchage à l'azote sec. Les échantillons ont été par la suite nommés PDA-PEI.

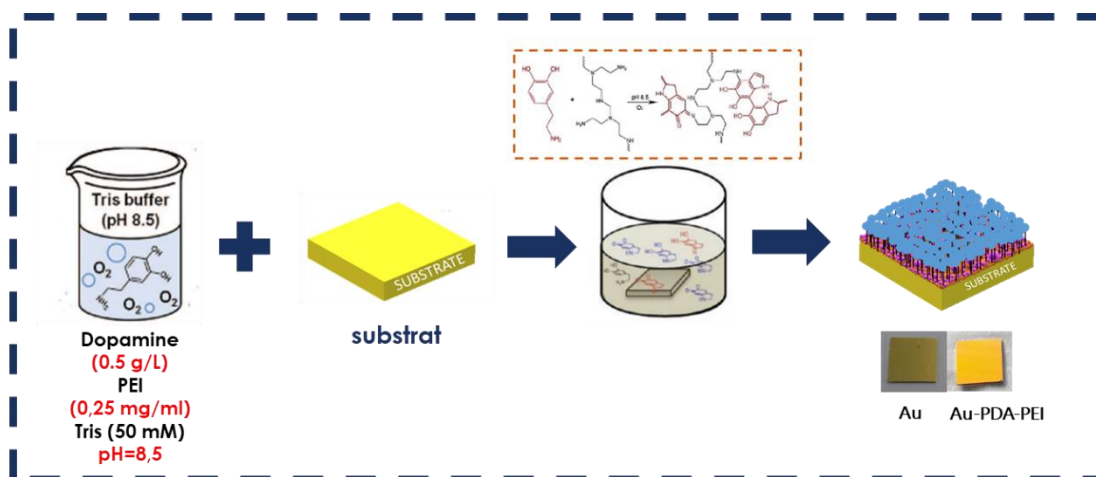


Figure 3 : Schéma résumant le principe de fonctionnalisation de surface de substrat par de la PDA en présence de périodate de sodium (NaIO₄) comme oxydant.

1.3. Greffage des fonctions chloramine/bromamine

1.3.1. Préparation de la solution de NaOCl

A partir de l'eau Javel commerciale qui contient environ 2,7 % en masse d'hypochlorite de sodium, nous avons eu besoin de déterminer la concentration exacte de cette solution. En théorie, la concentration de l'hypochlorite de sodium est égale à 0,35 M. Pour être plus précis, nous avons déterminé cette concentration, C en mesurant l'absorbance avec le spectromètre UV/visible. Après dilution au 1/100, nous avons mesuré l'absorbance de la solution à 290 nm (longueur d'onde où l'élément OCl^- absorbe). Selon la loi de Beer-Lambert, $A = \epsilon l C$ où l est l'épaisseur de la cuve, soit 1 cm, et ϵ le coefficient d'absorption molaire, ϵ de OCl^- étant égal à $344 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Ce qui conduit à une concentration en NaOCl égale à 0,34 M. Dans nos études, cette solution a été diluée afin d'obtenir la concentration en élément OCl^- souhaitée.

1.3.2. Préparation de la solution de NaOCl

La solution de NaOBr été produite en utilisant de l'eau Javel commerciale et une solution de NaBr à 0,5 M. Les éléments Br^- et OCl^- réagissent ensemble selon la réaction (1) :



Les ions hypochlorite oxydent les ions bromures de façon équimolaire. Pour préparer la solution de NaOBr à 1mM, nous avons pris une solution d'eau de javel à 1mM à laquelle a été ajouté NaBr à 1 mM.

1.3.3. Protocole de greffage

Pour la chloration/bromation, les films PDA ont été trempés dans une solution de NaOCl/NaOBr à la concentration souhaitée à pH 10, sauf indication contraire, à température ambiante. Après chloration, les substrats ont été lavés soigneusement avec de l'eau ultrapure et séchés à l'azote. Prés chloration la chloration, les échantillons sont nommés PDA-O₂-Cl et PDA-IO₄⁻-Cl et PDA-PEI-Cl (Figure 4).

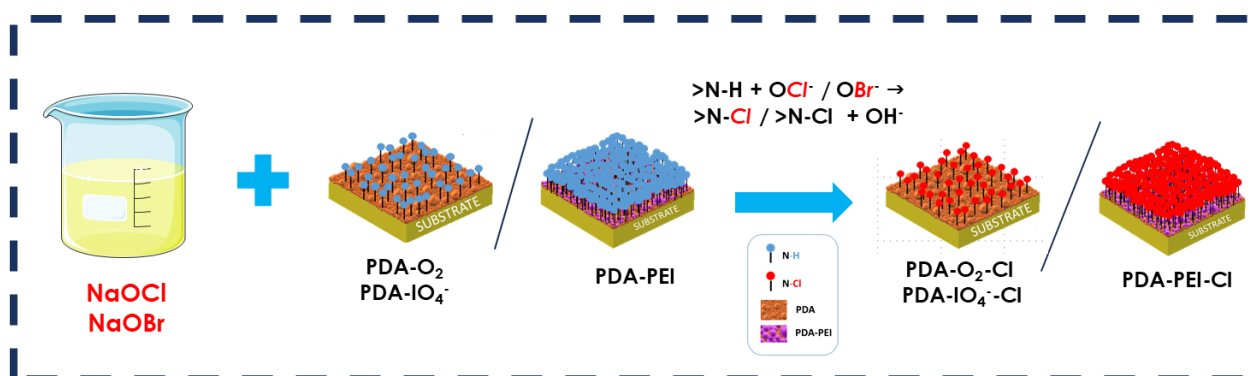


Figure 4 : Schéma résumant le principe de chloration /bromation.

2. Caractérisations physico-chimiques

2.1. Techniques de caractérisation de surface

Les caractéristiques sondées par les différentes techniques d'analyses utilisées, ainsi que leurs limitations, sont rappelées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Techniques de caractérisation utilisées et informations obtenues.

	INFORMATION	DIMENSION	LIMITATION
IR	Vibration caractéristique des liaisons au sein des molécules adsorbées	Profondeur sondée : > 200 nm Largeur de la zone d'analyse : 1mm	Détection des vibrations dont le moment dipolaire à une composante perpendiculaire à la surface (PM IRRAS)
XPS	Composition élémentaire des groupements chimiques et évaluation des couches organiques	Profondeur sondée : 1 à 10 nm Largeur de la zone d'analyse : 20 à 200 µm	Pas de détection des hydrogènes Effet de charge sur les échantillons non conducteurs Ultra-haut vide
QCM	Quantité de matière déposée en surface ; propriété viscoélastique des couches formées	Quelque ng/cm ²	Interprétation quantitative difficile pour les couches viscoélastiques, mesure délicate dans certain solvant
ELLIPSOMÉTRIE	Technique optique d'analyse de surface fondée sur la mesure du changement de l'état de polarisation de la lumière après réflexion sur une surface plane. Mesure de l'épaisseur	Mesure d'épaisseur depuis une fraction de couche monoatomique jusqu'à quelques micromètres	Interaction avec la matière possibilité d'absorption Nécessite un model particulier par surface/système
ANGLE DE CONTACT	Caractère hydrophobe ou hydrophile des couches externes de l'échantillon	Selon la mouillabilité de la surface (la goutte s'étale plus ou moins)	Mesure locale macroscopique

2.1.1. Spectroscopie infrarouge : Spectroscopie infrarouge en mode réflexion absorption avec polarisation de modulation

(Polarisation Modulation InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy - PM-IRRAS)

2.1.1.1. Rappel du principe

La spectroscopie infrarouge en mode réflexion absorption (IRRAS) est utilisée pour étudier l'orientation et la structure de molécules adsorbées sur une surface métallique ou semi conductrice. Elle utilise les propriétés particulières de réflexion d'une onde plane sur un substrat. Le comportement diélectrique de ce dernier induit une interaction entre la composante électrique de l'onde incidente, le moment dipolaire de la molécule adsorbée et les électrons du métal. Le champ électrique du faisceau subit alors un changement de phase qui dépend de l'angle d'incidence du faisceau par rapport à la surface métallique et de l'état de polarisation de la lumière⁴⁻⁵ La dépendance entre le changement de phase et l'angle d'incidence est représentée sur la Figure 5.

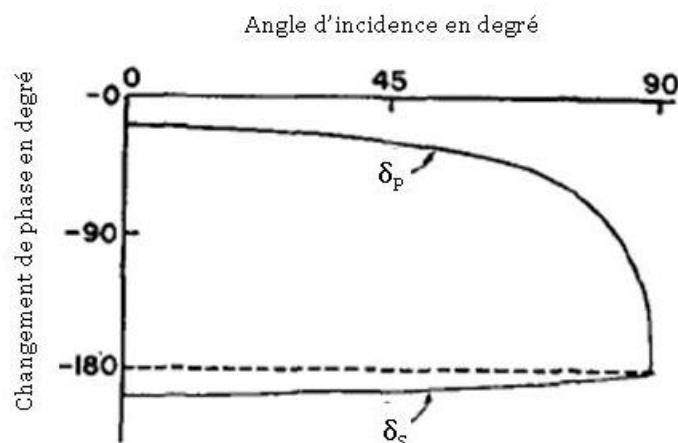


Figure 5 : Changement de phase intervenant dans les composantes parallèles (δ_p) et perpendiculaire (δ_s) au plan d'incidence du signal réfléchi en fonction de l'angle d'incidence⁶.

La composante du champ électrique parallèle à la surface (E_s) subit un changement de phase de 180° quel que soit l'angle d'incidence. Par conséquent les interférences destructives entre les ondes incidentes et réfléchies conduisent à un champ nul perpendiculairement au plan

d'incidence. La composante perpendiculaire à la surface (E_p) subit quant à elle un changement de phase quasi-nul si l'angle d'incidence Φ est compris entre 0 et 80° environ. Le déphasage est en revanche de 90° environ en incidence rasante ($\Phi = 80-88^\circ$). Le champ électrique résultant perpendiculairement à la surface est alors exalté. La Figure 6 présente la géométrie de la réflexion d'une onde plane sur une surface métallique.

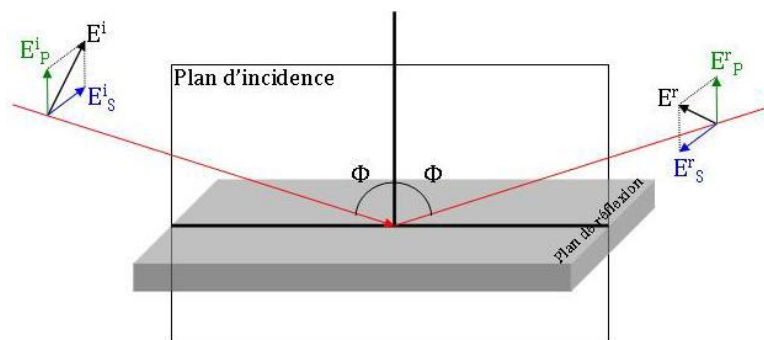


Figure 6 : Schéma de la décomposition du champ électrique avant et après réflexion sur une surface métallique.

Il n'y a aucune composante parallèle du champ électromagnétique résultant pouvant interagir avec un moment dipolaire d'un mode de vibration parallèle à la surface : ces vibrations ne sont donc pas visibles avec la technique de l'IRRAS. En revanche, l'exaltation de la composante perpendiculaire à la surface rend visible les vibrations moléculaires ayant une variation de moment dipolaire non parallèle à la surface. Ces « règles de sélection » permettent de déterminer l'orientation des molécules par rapport à la surface.

La spectroscopie d'adsorption infrarouge en mode réflexion-absorption avec modulation de polarisation (PM-IRRAS) combine la réflectivité en lumière polarisée et la modulation rapide de la polarisation du signal incident (entre les polarisations p parallèle au plan et s perpendiculaire au plan)⁷. L'acquisition simultanée du spectre de réflectivité du volume autour de la surface (noté R_s) et du spectre somme des contributions du volume et de la surface (noté R_p) donne accès au signal de réflectivité différentielle normalisée : $(R_p - R_s)/(R_p + (R_p + (R_s)))$. Les spectres obtenus permettent donc de séparer les absorptions polarisées se produisant au voisinage de la surface des absorptions isotropes se produisant en volume sans avoir à acquérir un spectre de référence. Les analyses en PM-IRRAS renseignent directement sur les vibrations ayant une composante non parallèle à la surface de la couche organique adsorbée sur la surface.

2.1.1.2. Montage expérimental et protocole d'utilisation

Le dispositif expérimental du PM-IRRAS est présenté sur la Figure 7. Le faisceau infrarouge d'un spectromètre est polarisé et dirigé vers un modulateur photoélastique. Celui-ci est constitué d'un cristal cubique en ZnSe, transparent dans le domaine moyen infrarouge. Deux cales piézoélectriques en quartz appliquent une contrainte mécanique périodique sur un axe du cristal. La polarisation du faisceau est ainsi modulée (entre les polarisations p et s) à une fréquence élevée. Le faisceau est focalisé sur la surface métallique à analyser qui le réfléchit vers un détecteur MCT (Mercure Cadmium Tellure) préalablement refroidi à l'azote liquide. Des filtres passe haut et passe bas, couplé à un système de détection synchrone à la modulation de la polarisation, permettent l'acquisition du signal.

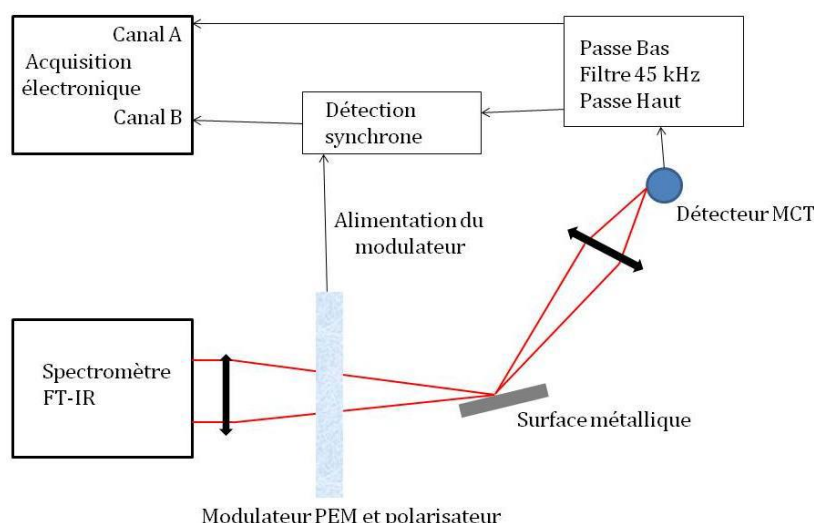


Figure 7 : Schéma du principe du PM-IRRAS.

Les surfaces à analyser sont positionnées de façon à réfléchir le faisceau externalisé d'un spectromètre infrarouge à Transformée de Fourier Nicolet Nexus 5700 vers le détecteur MCT (HgCdTe) à large bande refroidi à l'azote liquide. Les spectres sont enregistrés avec une résolution de 8 cm^{-1} et accumulés avec une co-addition de 128 scans. Un polariseur à grille en ZnSe et un modulateur photoélastique (HINDS Instruments, PM90, modulation de fréquence = 36 Hz) sont placés avant l'échantillon afin de moduler le faisceau incident en polarisation p et s. La tension appliquée au modulateur est ajustée afin d'optimiser la sensibilité des

mesures. Le signal de sortie du détecteur permet de générer des interférogrammes par somme et par soustraction. Ces derniers subissent une transformée de Fourier pour produire le signal PM-IRRAS défini comme la réflectivité différentielle $(\Delta R/R^{\circ}) = (R_p - R_s)/(R_p + R_s)$, où R_p est le signal parallèle au plan incident et R_s est la contribution perpendiculaire.

2.1.2. Spectroscopie de photoélectrons X : X-ray Photoelectron Spectroscopy – XPS)

La spectroscopie de photoélectrons X (X-ray Photoelectron Spectroscopy – XPS – ou Electron Spectroscopy for Chemical Analysis – ESCA) est une méthode d'analyse de surface basée sur l'effet photoémission découvert par Einstein qui est schématisé par la Figure 8.

2.1.2.1. Rappel du principe

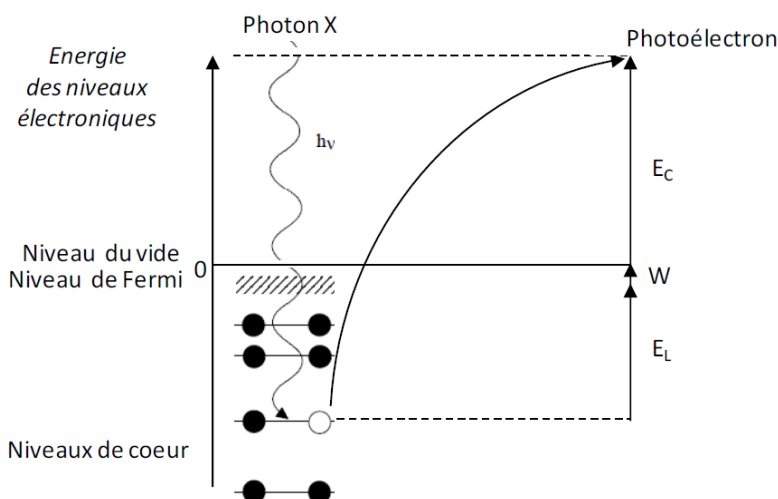


Figure 8 : Principe de la photoémission d'un électron de cœur d'un atome.

La surface d'un échantillon est irradiée sous ultraviolet par un flux de rayons X qui provoquent l'ionisation des atomes superficiels. En effet, l'énergie apportée par les photons X (~1 à 2 keV) est suffisante pour extraire les électrons appartenant à un niveau de cœur de l'atome. Ces électrons, appelés photoélectrons, quittent alors l'atome avec une certaine énergie cinétique et parcourent dans la matière une distance moyenne (appelée libre parcours moyen, qui est

fonction de cette énergie cinétique et du matériau dans lequel ils évoluent) avant d'être ralentis par une collision. Les photoélectrons émis par les atomes les plus proches de la surface atteignent cette dernière sans rencontrer de collisions (diffusion inélastique) et passent dans le vide : il y a alors photoémission. L'énergie cinétique E_C des électrons éjectés dans le vide est égale à :

$$E_C = h\nu - E_L - W \quad (\text{Eq 1})$$

avec

- $h\nu$ = énergie du photon incident (h étant la constante de Planck et ν la fréquence de l'onde incidente),
- E_L = énergie de liaisons de l'électron avec le noyau
- W = travail de sortie des électrons à la frontière matériau/vide

Ainsi, la mesure de l'énergie cinétique du photoélectron émis permet de déduire son énergie de liaison initiale. Cette énergie est caractéristique de l'atome auquel l'électron de cœur appartient et permet donc de connaître la nature de l'atome ainsi que l'environnement de ses proches voisins ou son degré d'oxydation (puisque celui-ci influe sur la structure des orbitales atomiques et provoque des variations d'énergie au sein des couches de valence)¹. Par conséquent l'XPS, qui s'appuie sur ce principe, est une méthode d'analyse élémentaire de surface, applicable à tous les solides sous toutes leurs formes. Elle permet la détection de tous les éléments, excepté l'hélium et l'hydrogène (ces éléments ne disposant pas de niveaux de cœur spécifiques).

2.1.2.2. Instrumentation et protocole d'utilisation

La Figure 9 représente schématiquement un spectromètre XPS. Celui-ci est composé d'une source qui génère les photons et d'un système collectant les photoélectrons émis qui est constitué par un analyseur hémisphérique et d'un détecteur. L'analyseur hémisphérique permet de séparer dans l'espace les photoélectrons émis en fonction de leur énergie cinétique

¹ Une même orbitale peut donner des multiplets. Ceci résulte du couplage spin-orbite. Par exemple, dans le cas de l'orbitale 2p du soufre, un ion $S2p^5$ est créé lors de l'émission d'un photoélectron. Il existe alors 2 états de spins (3/2 et 1/2) qui diffèrent légèrement en énergie. Un doublet apparaît donc sur le spectre XPS, l'intensité relative des 2 pics reflétant la densité des états finaux.

qui est mesurée avec une précision de l'ordre de 0,1 eV. La limite de détection, qui dépend de l'élément et du niveau de cœur étudié, est de l'ordre de 0,1 %.

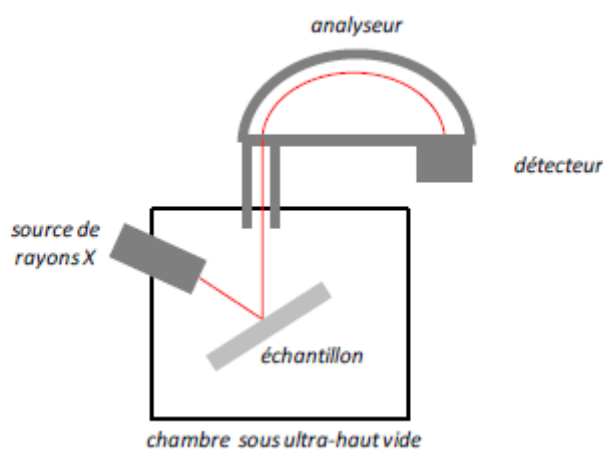


Figure 9 : Représentation schématique d'un spectromètre XPS.

Les mesures sont réalisées sous ultra-haut vide ($\leq 10^{-10}$ Torr) pour éviter, au maximum, toute collision inélastique des photoélectrons entre leur sortie de l'échantillon et leur détection. Sur les appareils récents, la zone analysée est souvent de l'ordre du mm^2 . Elle peut parfois être réduite à quelques dizaines de μm^2 mais avec une perte d'intensité du signal. La profondeur d'analyse d'un échantillon donné (poudre ou adsorbat sur une surface) est comprise entre 1 et 10 nm selon l'angle de détection θ , l'énergie cinétique des photoélectrons et la nature du matériau qui déterminent le libre parcours moyen λ des photoélectrons. Le transfert de ceux-ci dans la matière suit une loi d'absorption exponentielle, 98% du signal provient donc d'une profondeur z inférieure à $3\lambda\sin\theta$. Pour des échantillons plans avec une faible rugosité, la variation de l'angle de détection permet donc de sonder la surface sur une profondeur plus ou moins importante. En particulier, l'analyse à des angles rasants est plus sensible à l'extrême surface des échantillons.

Les analyses sont réalisées grâce à un spectromètre Omicron Argus équipé d'une source monochromatique $\text{AlK}\alpha$ ($h\nu = 1486,6$ eV) émettant un rayon d'électrons de 300 W. Les spectres sont réalisés à un seuil de 100 eV pour le spectre général et à un seuil de 20 eV. Ces spectres sont enregistrés avec une résolution de 0,1 eV. Le détecteur est placé à un angle de 45° par rapport à la surface et les énergies de liaisons sont calibrées par rapport à l'énergie de liaison du carbone aliphatique à 284,8 eV. Les intensités des pics élémentaires sont corrigés par les facteurs de Scofield⁵. L'aire des pics est déterminée après soustraction d'une ligne de

base linéaire et Shirley en fonction du pic. Les spectres sont traités en utilisant le logiciel Casa XPS v.2.3.15 et en appliquant des lois Gaussiennes/Lorentziennes de 70/30.

2.1.3. Microbalance à cristal de quartz (Quartz Crystal Microbalance – QCM)

2.1.3.1. Rappel du principe

La microbalance à cristal de quartz (Quartz Crystal Microbalance – QCM) permet de mesurer *in situ* et en temps réel des variations de masse très faibles, de l'ordre du nanogramme, à la surface d'un cristal de quartz. Cette technique est basée sur les propriétés piézoélectriques des cristaux de quartz qui permettent d'en faire des résonateurs sensibles aux perturbations provoquées par un ajout de matière en surface, mais également par une modification de la viscosité ou de la densité du milieu. Elle est très utilisée dans le domaine des biotechnologies⁸ pour étudier notamment la cinétique d'adsorption des protéines ou encore l'adhérence et la prolifération de cellules⁹.

2.1.3.2. Dispositif expérimental

Les 2 faces opposées d'un fin cristal de quartz sont recouvertes d'une couche mince métallique (généralement d'or) constituant 2 électrodes. L'application d'une différence de potentiel entre les deux électrodes engendre, par effet piezoélectrique, la déformation latérale du quartz sur l'ensemble de la surface. Si le champ électrique est alternatif, le cristal se met à vibrer dans un mode de résonance mécanique ; l'amplitude maximale de vibration est obtenue pour un champ alternatif de fréquence f_0 , appelée fréquence de résonance du quartz. Si une couche superficielle de matière est déposée sur le cristal, la fréquence de résonance décroît ; c'est cette variation de fréquence (Δf) qui est suivie par QCM. Sauerbrey a démontré en 1959 que, dans le vide ou à l'air, Δf dépend linéairement de la variation de masse adsorbée, Δm .

Les mesures QCM ont été effectuées à l'aide d'un laboratoire Dispositif QCM dans des conditions statiques et un substrat de quartz à motifs d'or 9 MHz ($A = 0,2 \text{ cm}^2$).

Les quartz ont été placés perpendiculairement au fond du récipient. Changements de fréquence (Δf) de le résonateur à cristal de quartz a été surveillé. Le Δf a été converti en changement de masse (Δm) de le cristal de quartz en appliquant l'équation de Sauerbrey¹⁰:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \Delta m \quad (\text{Eq 2})$$

où A est la surface active du capteur gravimétrique, ρ_q est la densité du quartz, μ_q est module de cisaillement du quartz, et f_0 est la fréquence de résonance fondamentale du quartz. Nous notons:

$$\Delta f = -C\Delta m \quad (\text{Eq 3})$$

avec C, la constante de sensibilité expérimentale, $16,31 \cdot 10^7 \text{ Hz}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^2$ pour 9 MHz ¹¹.

2.1.4. Ellispométrie

L'ellipsométrie est une technique optique, consistant à mesurer la modification de la polarisation d'un faisceau à la réflexion sur une surface ou un échantillon. Cette technique d'analyse et de caractérisation, non destructive, est précise et très sensible. La mesure ellipsométrique comporte trois étapes indispensables : l'étalonnage de l'instrument, la mesure proprement dite et l'analyse des données selon un modèle adéquate en fonction du système analysé. L'ellipsométrie spectroscopique effectue des mesures sur tout un spectre et concerne des structures complexes : multicouches, rugosité (interface, homogénéité...).

Les mesures d'ellipsométrie ont été effectuées en utilisant une longueur d'onde ellipsomètre SENTECH SE 400 équipé d'un laser He – Ne à $\lambda = 632,8 \text{ nm}$, l'angle d'incidence était de 70° . Toutes les mesures sont effectuées sur des échantillons séchés à l'azote à l'air ambiant. Les valeurs de des indices de réfraction de n_s et les k_s du substrat en or étaient respectivement de 0,2098 et 3,2852. Pour chaque échantillon, au moins 5 mesures ont été réalisées dans différentes zones. Par conséquent, les valeurs d'épaisseur sont données comme la moyenne sur 5 valeurs.

2.1.5. Angle de contact

Les angles de contact statiques sont mesurés à température ambiante (~20°C ; 40% d'humidité relative) par analyse du profil de gouttes sessiles d'eau ultrapure de 1 µL. Ces dernières sont déposées sur la surface grâce à un dispositif Krüss DSA100 équipé d'une caméra CCD et d'un analyseur d'image. Les angles de contact sont mesurés en utilisant 3 modèles mathématiques (prédéfini par le fournisseur Krüss) :

- (i) selon le modèle « tangente 1 », le profil complet de la goutte déposée est assimilée par le programme à une équation de conique générale ; la dérivée de cette équation au point triple (eau-surface-air) donne la pente de la tangente en ce point et donc l'angle de contact ;
- (ii) selon le modèle « tangente 2 », le profil de la goutte au voisinage de la surface est modélisée par une fonction polynômiale (du type $y = a + bx + cx^{0,5} + (d/\ln x) + e/x^2$). La pente au point triple et l'angle de contact sont déterminés par itération
- (iii) selon le modèle « cercle fitting », le contour de la goutte est assimilé à une portion de cercle ; l'angle de contact est alors calculé en mesurant la pente de la tangente au cercle modèle au point triple (cette méthode est préconisée pour la mesure des faibles angles de contact).

Sur chaque surface, 3 gouttes au minimum sont déposées à des endroits différents et les mesures ont été répétées sur 3 échantillons différents. Les valeurs reportées dans cette étude sont les moyennes de ces 9 mesures pour chaque type de surface.

2.2. La Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Le fonctionnement du microscope électronique à balayage est basé sur l'émission d'électrons produits par une cathode et la détection de signaux provenant de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon. Ces électrons qui irradiant la surface de l'échantillon pénètrent profondément dans le matériau et affectent un volume appelé « poire d'interaction ». Le volume de cette poire dépend du numéro atomique moyen de l'échantillon et de l'énergie des électrons incidents. Dans ce volume d'interaction les électrons du faisceau vont perdre leur

énergie de collisions multiples avec les atomes du matériau générant ainsi de nombreux phénomènes secondaires : réémission d'électron, émission de photons, adsorption d'électrons, courants induits, potentiels électriques, élévation de température locale, vibration du réseau.

Les surfaces ou coupes transversales des films PDA ont été examinées sous un Microscope électronique à balayage à canon à émission de champ Ultra55 Zeiss (FEG-SEM), fonctionnant à 10 kV. Pour les observations en coupe, les échantillons ont été inclinés (60 °).

2.3. Quantification de la fonction chloramine

La présence de fonctions chloramine a été confirmée en mesurant le blanchiment d'une solution d'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB), à 412 nm¹². Une solution de TNB fraîche a été produite avant chaque expérience par addition de 2 équivalents de cystéine (Cys) à 1 équivalent de 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) après la réaction :



Pour cela, à volumes égaux, 2 10⁻³ M de cystéine et 10⁻³ M de DTNB ont été mélangés dans 50 mM solution tampon phosphate (PBS) à pH 7,4 donnant une solution jaune / orange très colorée²¹⁰. Cette solution mère a été diluée 10 fois avec 50 mM de PBS, pH 7,4. Les différents substrats ont été immergés dans cette solution pendant 20 heures. Le TNB de couleur jaune réagit avec les fonctions haloamine pour régénérer le DTNB incolore, selon le schéma présenté en Figure 10.

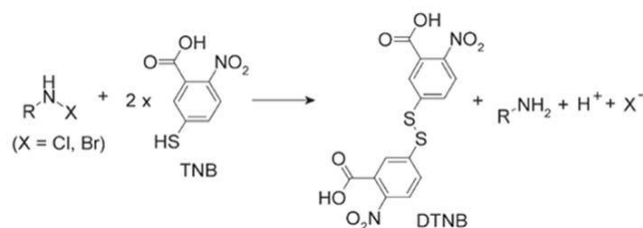


Figure 10 : Réaction entre un composé N-halamine et le TNB.

Les mesures d'absorbance UV / visible ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre avec un trajet de 1 cm de longueur pour les cuvettes. Selon la loi de Beer-Lambert, la densité des fonctions chloramines (d_{Cl}), en at/cm³, a été calculé grâce à l'équation suivante :

$$d_{Cl} = \frac{A_{PDA-Cl}}{2 * \epsilon * l * V_{revêtement}} * V_{TNB} * N_A \quad (\text{Eq 4})$$

où A_{PDA} et A_{PDA-Cl} sont l'absorbance de la solution de TNB contenant le substrat avec le revêtement PDA et avec le revêtement PDA chloré, respectivement, $\epsilon = 14100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $l = 1 \text{ cm}$, V_{coating} est le volume du film PDA en cm^3 , V_{TNB} est le volume de la solution TNB en L et N_A est la constante d'Avogadro.

3. Test microbiologiques

Tous les tests microbiologiques ont été répétés 3 fois afin d'obtenir des données statistiquement représentatives.

3.1. Souches et cultures bactériennes

Les tests microbiologiques ont été réalisés avec 2 espèces bactériennes à Gram positif et 1 espèce bactérienne à Gram négatif.

Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées lors de cette étude.

	Souche
Gram +	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CIP 6281
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CIP 104777
Gram -	<i>Escherichia coli</i> ATCC 29522

Ces différentes souches sont conservées sous forme d'alicots glycérolés à -18°C avant leur remise en culture détaillée dans le paragraphe suivant.

Une pré-culture sur gélose nutritive est préparée à partir de l'alicot glycérolé. Après 24 heures d'incubation à 37°C , une colonie est prélevée et mise en suspension dans 5 mL de bouillon nutritif. Sauf indication contraire, les tests sont réalisés après une nuit d'incubation à 37°C , en milieu aérobie et sous agitation (150 tours/minutes). Les cultures ont alors atteint la phase stationnaire de croissance. Les milieux de culture utilisés pour les différentes souches bactériennes sont indiqués dans le Tableau 3. Les géloses sont préparées en ajoutant 15 g/L d'agar au bouillon nutritif avant autoclavage.

Tableau 3 : Milieu de culture des différentes souches bactériennes.

Souche bactérienne	Milieu de culture	Concentration
<i>Escherichia coli</i>	Bouillon lysogène (<i>Lysogeny Broth</i> – LB)	20 g/L
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bouillon Mueller Hilton (MH)	25 g/L

3.2. Tests d'adhérence des bactéries sur les surfaces

Les substrats ont été placés dans des boîtes de Pétri stériles en présence de 20 mL de suspension bactérienne à 10^6 UFC/mL dans du PBS, sous agitation à température ambiante pendant 17 h.

Après incubation, pour l'évaluation de l'adhérence bactérienne, une analyse par microscopie optique a été effectuée. Pour cela, les échantillons ont été :

- rincés avec du PBS,
- colorés pendant 5 minutes avec 1 mL de cristal violet à 1 % (w/w) dans une solution de PBS,
- rincés sous écoulement d'eau jusqu'à perte de couleur,
- séchés par un flux d'azote sec.

Pour chaque échantillon, la densité des bactéries a été déterminée en faisant la moyenne de 20 champs de microscope sous un grossissement de 50x. Les résultats ont été exprimés en pourcentage des cellules bactériennes attachées sur les différentes surfaces de PDA, par rapport aux substrats TMX.

3.3. Tests de cultivabilité des bactéries

Afin d'évaluer la cultivabilité des bactéries après contact avec les surfaces fonctionnalisées, des tests de remise en culture ont été réalisés selon le protocole schématisé par les Figure 11 et 12.

Avant inoculation bactérienne, les surfaces ont été stérilisées avec une solution d'éthanol à 70 %. Les tests de *Killing*/inhibition de croissance bactérienne ont été réalisés en configuration sandwich. Pour cela, 20 µL de suspension bactérienne dans du PBS/milieu de culture ont été déposés sur une première plaque puis une deuxième plaque est placée sur la première, sur le côté revêtement de sorte que la suspension bactérienne soit prise en sandwich entre les deux substrats

Après 3 heures de contact à température ambiante pour le test de Killing et à 37°C pour le test d'inhibition de croissance, les surfaces ont été transférées dans un tube contenant 2 mL de PBS stérile solution et plongées dans un bain à ultrason (Bandelin Sonorex RK 31, Berlin, Allemagne ; $f = 35$ kHz, $P = 90$ W) pendant 2 minutes pour récupérer les bactéries adhérentes sans les endommager. Après la sonication, des observations SEM-FEG des plaques ont été effectuées pour vérifier que la plupart des bactéries adhérentes étaient détachées pendant le processus de sonication.

Les suspensions bactériennes ainsi obtenues sont diluées dans une solution stérile isotonique et 20 µL de chaque dilution sont déposés en triplicat sur des géloses nutritives. Ces boîtes de Pétri sont incubés à 37°C pendant une nuit puis les unités formant colonies (UFC) sont dénombrées. Le calcul du pourcentage de *Killing* ou d'inhibition de croissance se calcule par la différence entre l'inoculum et les bactéries adhérentes et cultivables sur les surfaces fonctionnalisées :

$$\text{Killing ou Inhibition (\%)} = \frac{\text{nombre d'UFC de l'inoculum} - \text{nombre d'UFC sur l'échantillon}}{\text{nombre d'UFC de l'inoculum}} \times 100 \quad (\text{Eq 5})$$

L'incertitude attachée à ce résultat provient de l'analyse statistique des expériences répétées.

CHAPITRE II
Matériels & Méthodes

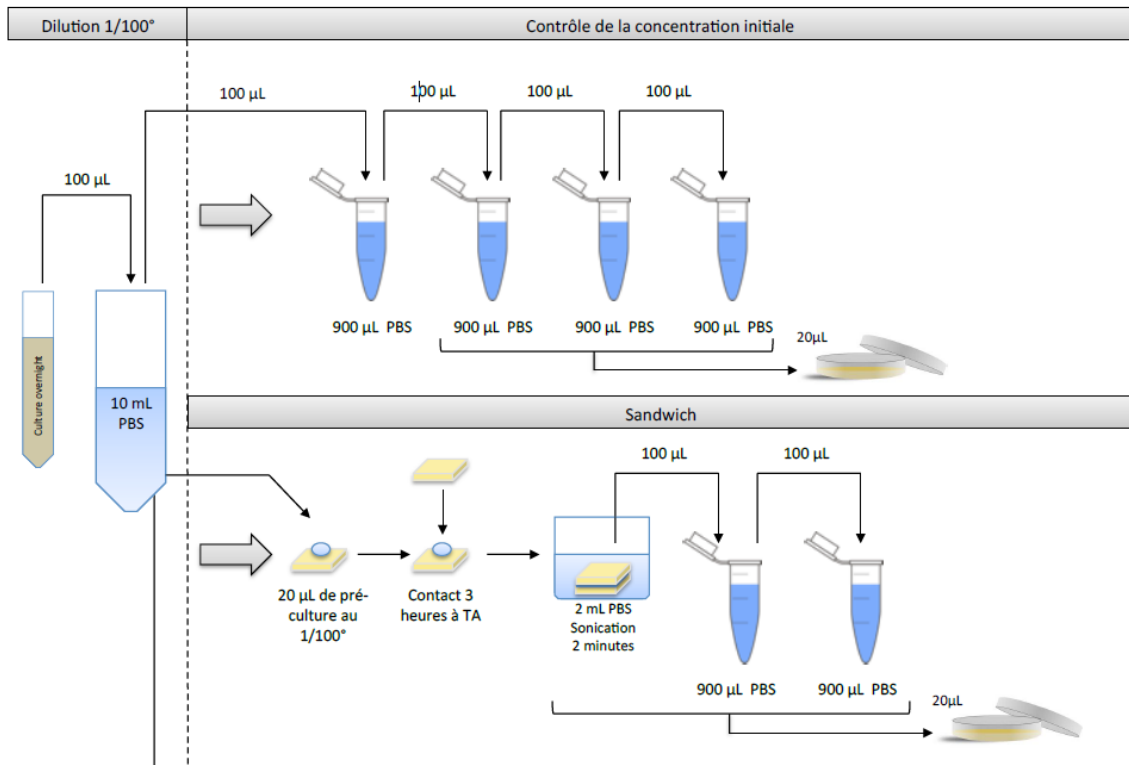


Figure 11 : Test de remise en culture des bactéries après contact avec les surfaces fonctionnalisées dans le cadre d'un test de *Killing*.

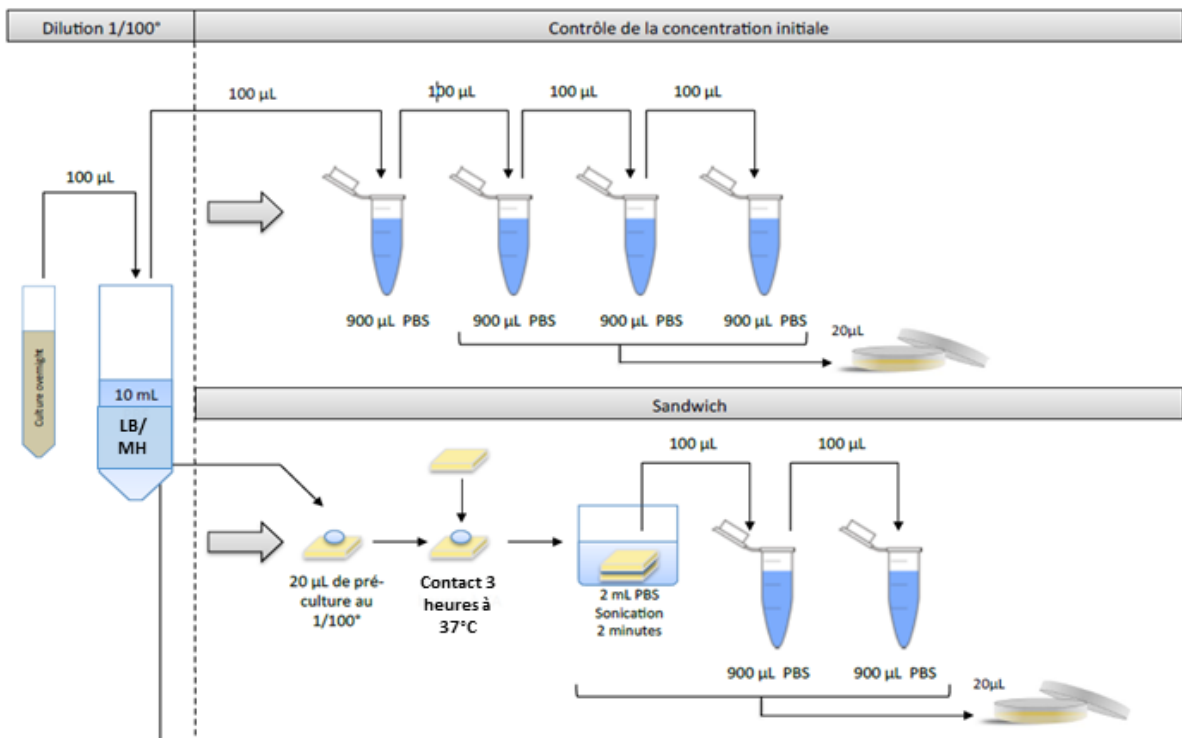


Figure 12 : Test de remise en culture des bactéries après contact avec les surfaces fonctionnalisées dans le cadre d'un test d'inhibition de la croissance bactérienne.

Références

1. Ding, Y. H.; Floren, M.; Tan, W., Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization. *Biosurface and Biotribology* **2016**, *2* (4), 121-136.
2. Ponzio, F.; Barthès, J.; Bour, J.; Michel, M.; Bertani, P.; Hemmerlé, J.; d'Ischia, M.; Ball, V., Oxidant Control of Polydopamine Surface Chemistry in Acids: A Mechanism-Based Entry to Superhydrophilic-Superoleophobic Coatings. *Chemistry of Materials* **2016**, *28* (13), 4697-4705.
3. Lv, Y.; Yang, S.; Du, Y.; Yang, H.-C.; Xu, Z.-K., Co-deposition Kinetics of Polydopamine/Polyethyleneimine Coatings: Effects of Solution Composition and Substrate Surface. *Langmuir* **2018**, *34* (44), 13123-13131.
4. Spoeckner, S.; Wray, V.; Nimtz, M.; Lang, S., Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, *51* (1), 33-39.
5. Scofield, J. H., Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1976**, *8* (2), 129-137.
6. Stypula, B.; Stoch, J., The characterization of passive films on chromium electrodes by XPS. *Corrosion Science* **1994**, *36* (12), 2159-2167.
7. Graham Beamson, D. B., Xps of Polymers Database. *Surface Spectra* **1998**.
8. Ferreira, G. N.; da-Silva, A. C.; Tomé, B., Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance. *Trends Biotechnology* **2009**, *27* (12), 689-697.
9. Wittmer, C. R.; Phelps, J. A.; Saltzman, W. M.; Van Tassel, P. R., Fibronectin terminated multilayer films: protein adsorption and cell attachment studies. *Biomaterials* **2007**, *28* (5), 851-860.
10. Sauerbrey, G., Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **1959**, *155* (2), 206-222.
11. Bizet, K.; Gabrielli, C.; Perrot, H., Immunodetection by quartz crystal microbalance. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2000**, *89* (2), 139.
12. Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B., Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Analytical Biochemistry* **1979**, *94* (1), 75-81.
13. Debiemme-Chouvy, C.; Haskouri, S.; Folcher, G.; Cachet, H., An Original Route to Immobilize an Organic Biocide onto a Transparent Tin Dioxide Electrode. *Langmuir* **2007**, *23* (7), 3873-3879.

CHAPITRE III

Synthèse et caractérisations physico-chimiques des revêtements PDA et PDA-PEI

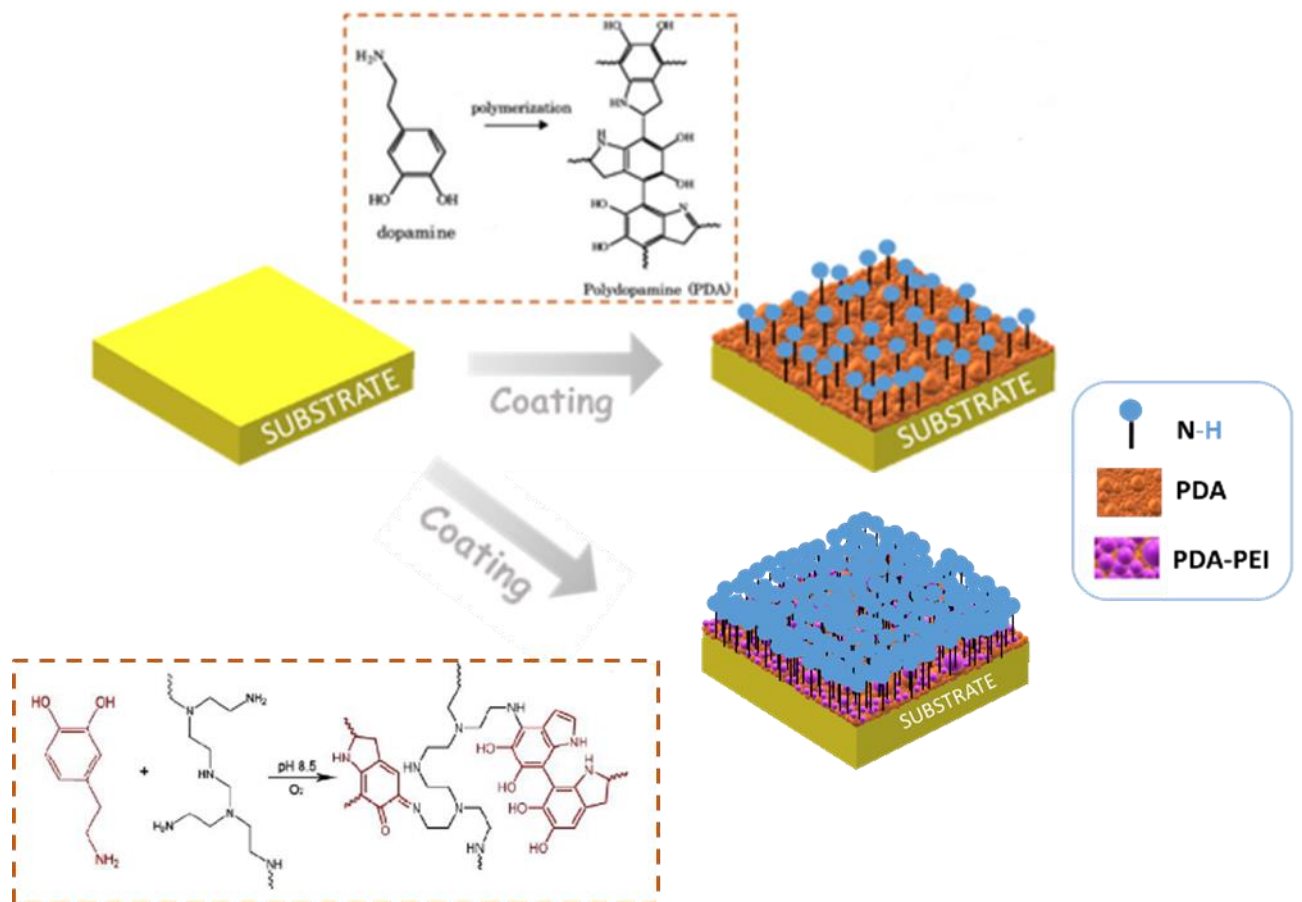


Table des matières

Introduction	110
1- Etude du dépôt de PDA	111
1.1 En milieu basique en présence d'O ₂ atmosphérique dissous	111
1.1.1 Suivi cinétique du dépôt de polydopamine.....	112
1.1.1.1 Etude sur Or.....	112
1.1.1.1.1 Influence de l'étape lavage par sonication.....	114
1.1.1.1.2 Influence de la concentration en dopamine sur la cinétique et la qualité du dépôt.....	116
1.1.1.2 Etude sur silicium : influence du substrat	119
1.1.2 Caractérisations physico-chimiques du dépôt	121
1.1.2.1 Analyse PM-IRRAS et IR-ATR	121
1.1.2.2 Caractérisation XPS	122
1.1.2.3 Caractérisation par mesures d'angle de contact.....	124
1.1.3 Dépôt 'Grafting from' versus 'Grafting to'	125
1.1.4 Revêtement multicouche	127
1.2 Etude du dépôt de PDA en milieu acide en présence de périodate comme oxydant	128
1.2.1 Suivi cinétique du dépôt.....	130
1.2.2 Caractérisation PM-IRRAS	131
1.2.3 Caractérisation XPS	132
1.2.4 Caractérisation par angle de contact	134
2- Etude du dépôt du revêtement composite PDA-PEI	135
2.1 Suivi cinétique du dépôt du film composite PDA-PEI.....	136
2.2 Caractérisation physico-chimique par PM-IRRAS	139
2.3 Caractérisation par XPS	140
2.4 Caractérisation par mesure d'angle de contact	141
Conclusion	143
Références.....	144

Les revêtements qui seront étudiés dans ce chapitre sont la polydopamine (PDA) et un composite formé par la combinaison de la PDA et de la polyéthylènimine (PEI).

Pour rappel, le choix de la PDA réside sur les fortes capacités d'adhérence de ce polymère sur une large gamme de surfaces, couplées à la présence de groupes fonctionnels amine indispensables pour la création de fonctions antibactériennes haloamine. Nous verrons dans ce chapitre que deux autres voies de synthèse ont été envisagées, avec un dépôt multicouche d'une part et d'autre part, avec l'utilisation d'un oxydant plus puissant que l'oxygène (le périodate), ceci afin d'augmenter le nombre de groupements fonctionnels amine en augmentant l'épaisseur du film de PDA.

Quant au revêtement composite (PDA-PEI), ce choix porte sur la volonté d'accroître le nombre de fonctions amine disponibles au sein du revêtement afin de maximiser l'effet antibactérien du dépôt à travers les fonctions haloamine générées par chloration des fonctions amine. De plus, comme nous le verrons par la suite, l'ajout de la PEI permet une meilleure stabilité du revêtement PDA en milieu basique¹.

Dans ces conditions, il nous est apparu opportun d'utiliser comme support modèle d'étude des surfaces d'or, d'une part à cause de leur propriété de stabilité, et d'autre part de la capacité de la PDA à développer de fortes interactions catéchol-métal et amine-métal.

Plus que l'utilisation de méthodes de caractérisation sophistiquées, nous avons privilégié la méthodologie scientifique de suivi cinétique du dépôt pour mettre en évidence les différentes étapes et vitesses de dépôt du revêtement à la surface de substrats d'or et de silicium. Enfin, les études des différents paramètres (substrat, concentration en dopamine et choix de l'oxydant) et voies de dépôt du film - *Grafting from*, *Grafting to*, multicouches - ont également été abordées dans un but d'optimisation de ces films.

Ainsi, cette étude nous a permis de mettre en évidence l'impact des différents paramètres physico-chimiques et voies de dépôt sur la cinétique de formation des revêtements. Pour cela, la microbalance à quartz (QCM), le PM-IRRAS et l'ellipsométrie ont été les trois principales techniques employées pour le suivi cinétique. Par ailleurs, l'XPS et la mesure de l'angle de contact ont également permis un suivi de la formation des films PDA et PDA-PEI.

Introduction

Comme il a été rappelé dans l'introduction générale, la modification de surfaces des matériaux joue un rôle important dans le développement de nouveaux matériaux. Néanmoins, les stratégies employées sont spécifiques à la physico-chimie des surfaces des matériaux et manquent donc d'universalité.

C'est dans ce contexte que la polydopamine (PDA), un biopolymère insoluble en milieu aqueux produit par auto-oxydation d'un neurotransmetteur catécholamine, la dopamine (DA), est devenue un polymère très étudié en sciences des matériaux en tant que système fonctionnel bio-inspiré polyvalent employé dans une très large gamme d'applications. La PDA a des propriétés d'adhérence exceptionnelles produisant un revêtement universel et offrant la possibilité d'un grand répertoire de post-fonctionnalisation²⁻⁴, ce qui a ouvert la voie à de nombreuses applications, aussi bien dans le domaine des sciences biomédicales⁵⁻⁷, des processus de conversion d'énergie⁸ ou encore des dispositifs de traitement de l'eau⁹⁻¹⁰. La dopamine, dont l'emploi a été inspiré de la composition protéinique du byssus de la moule (la mfp-3, riche en DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine) et mfp-6 riche en thiols.), s'auto polymérise spontanément en milieu alcalin en présence d'oxygène dissous qui agit comme oxydant et forme un film mince de polydopamine, sur pratiquement toutes les surfaces de matériaux par une simple immersion du substrat dans une solution aqueuse diluée¹¹.

Cependant, de nombreux matériaux ou molécules sensibles au pH, tels que la cellulose, le polyester, les résines phénoliques, les protéines ou certains gels ne conviennent pas à une fonctionnalisation par la dopamine dans un milieu aqueux alcalin. De plus, l'épaisseur maximale obtenue pour un dépôt de PDA en condition alcaline et en présence de O₂ comme agent oxydant est inférieure à 50 nm ce qui est frein à une éventuelle optimisation de l'effet antibactérien du revêtement par une augmentation de l'épaisseur du dépôt afin de maximiser le nombre de fonctions amine disponibles.

Pour répondre à cette problématique, différentes voies d'optimisation du revêtement ont été envisagées lors de cette étude. Tout d'abord augmenter l'épaisseur du film de PDA en effectuant un dépôt multicouche ou alors en modifiant l'oxydant, en remplaçant O₂ par le périodate de sodium qui permet (i) un dépôt dans un milieu acide avec une cinétique plus

rapide et (ii) d'obtenir des films plus épais. La deuxième voie explorée repose sur l'introduction de davantage de fonctions amine par l'intermédiaire de la PEI, on forme ainsi un composite PDA-PEI.

1-Etude du dépôt de PDA

1.1 En milieu basique en présence d'O₂ atmosphérique dissous

La première étape de mon projet concerne donc l'étude du dépôt de PDA sur des substrats d'or par la voie dite classique, telle que présentée par l'équipe de Messersmith², reposant sur l'auto-oxydation de la dopamine en milieu alcalin en présence d'O₂ dissous comme oxydant. Il s'agit de la voie la plus simple à mettre en œuvre. En solution, dans les bonnes conditions de pH, la dopamine est connue pour s'oxyder et s'auto-polymériser, cela se traduit par un changement de couleur de la solution, de l'incolore au brun foncé (Figure 1(a)). Puis au cours du temps, la polydopamine s'agrège pour former des nanoparticules en suspension pouvant avoir jusqu'à 400 nm de diamètre au bout de 48 h, Figures 1(b) et 1(c).

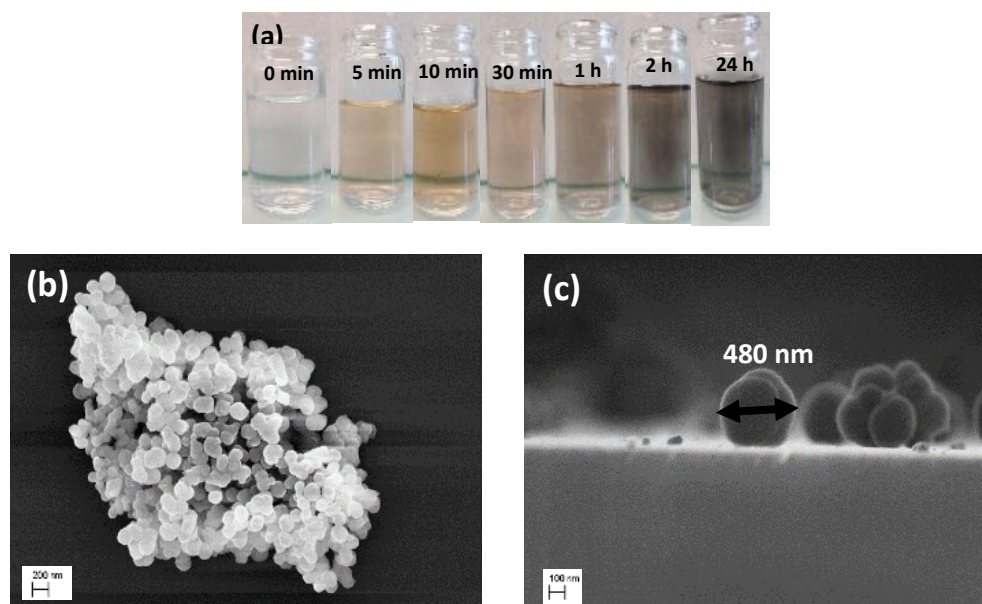


Figure 1 : (a) Evolution de la coloration d'une solution de dopamine à 0,5 mg/mL en présence de tampon Tris à pH=8,5. (b) et (c) Clichés MEB d'une surface de silicium immergée durant 24 h dans une solution de dopamine/Tris à pH = 8,5.

Dans cette étude, les surfaces d'or ont été plongées dans une solution de dopamine à 0,5 mg/mL dans laquelle du tampon Tris est ajouté après quelques minutes. Le processus de polymérisation en surface de la dopamine a été suivi *in situ* par une microbalance à cristal de quartz (QCM), et *ex situ* par spectroscopie Infra-Rouge (PM-IRRAS), ellipsométrie, microscopie électronique à balayage (MEB), spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) et mesure d'angle de contact (WCA).

1.1.1 Suivi cinétique du dépôt de polydopamine

1.1.1.1 Etude sur Or

Pour étudier *in situ* la cinétique de formation du film de PDA, la QCM est la méthode de choix. Pour rappel, le dépôt sur le quartz d'un film mince homogène, rigide et purement élastique entraîne l'abaissement de la fréquence de résonance du quartz. Dans ces conditions, la relation entre la variation de masse du quartz, Δm , et sa variation de fréquence de résonance, Δf , est linéaire (relation de Sauerbrey).

Ainsi, un suivi cinétique du dépôt de la PDA par QCM a été mené. Pour cela un quartz d'or a été immergé dans une solution de dopamine/Tris et à pH= 8,5. L'évolution de la prise de masse en fonction du temps est présentée sur la Figure 2.

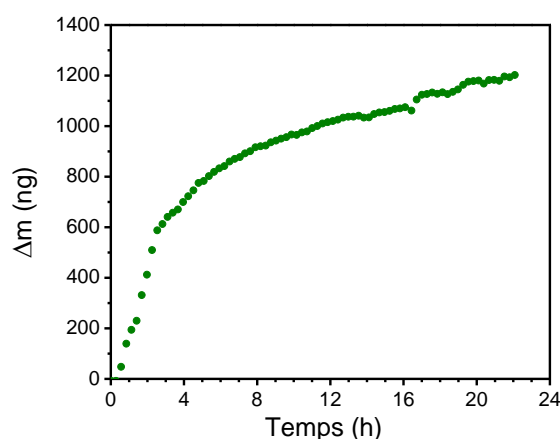


Figure 2 : Suivi par QCM de la formation du dépôt de PDA dans une solution de dopamine à 0,5 mg/mL, le TRIS a été ajouté après 0,5 h.

La croissance du film de PDA peut être également étudiée qualitativement par PM-IRRAS, en intégrant les pics caractéristiques de la PDA pour les différentes durées d'immersion du substrat (Figures 3(a) et 3(b)). Dans le même temps, des données quantitatives obtenues à

partir de ces mêmes échantillons par ellipsométrie en utilisant un modèle approprié pour les surfaces d'or et le revêtement PDA ont permis de suivre l'évolution de l'épaisseur moyenne du film PDA en fonction du temps d'immersion, Figure 3(c). Ces valeurs ont été confirmées par des observations par MEB de la section transversale des échantillons, Figure 3(d).

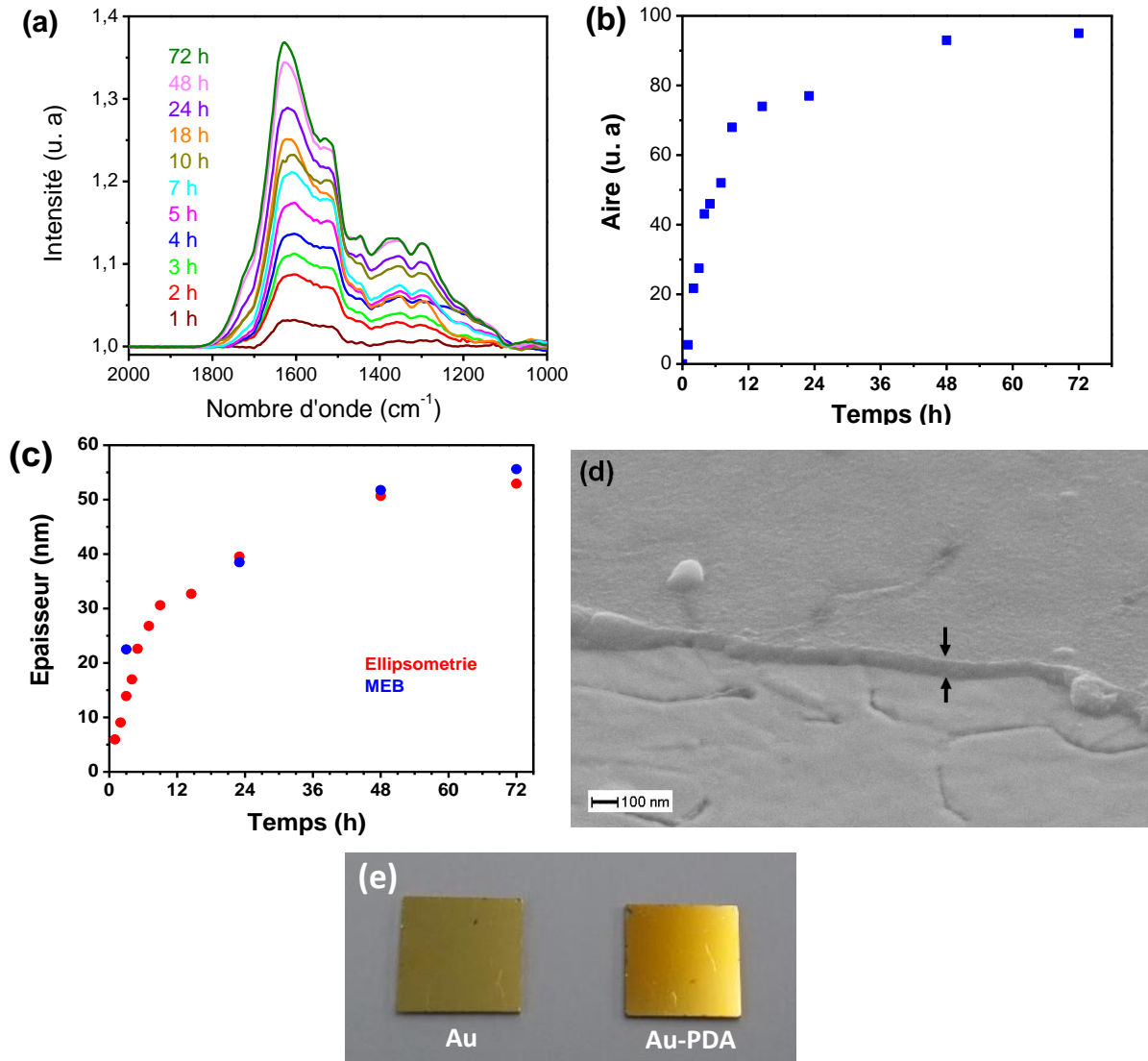


Figure 3 : Formation du revêtement de PDA dans une solution de dopamine à 0,5 mg/mL. (a) Spectres PM-IRRAS de surfaces d'or fonctionnalisées par un film de PDA par immersion dans une solution de dopamine/Tris durant différents temps. (b) Evolution des aires des pics PM-IRRAS du dépôt de PDA en fonction du temps d'immersion dans la solution de dopamine/Tris, données provenant de la Figure 3(a). (c) Epaisseur du film de PDA évaluée par ellipsométrie (cercles rouges) et analyse MEB (carrés bleus). (d) Micrographie MEB d'un revêtement PDA sur une surface d'or après 72 heures d'immersion dans une solution de dopamine/Tris. (e) Substrats d'or avant et après immersion dans la solution de dopamine/Tris.

Ainsi, l'étude *in situ* par QCM révèle une forte augmentation de la masse du quartz durant les 4 premières heures avec une vitesse de croissance de l'ordre de 5 nm/h, cette vitesse diminue

par la suite pour atteindre un plateau au bout de 24 h de dépôt, avec une prise de masse d'environ 1200 ng pour un quartz de surface 0,2 cm².

Les études *ex situ* par PM-IRRAS par l'intégration des zones des pics caractéristiques de la PDA et le suivi de l'épaisseur du dépôt PDA en fonction de la durée d'immersion du substrat mettent en avant une augmentation rapide de l'intensité des pics durant les 12 premières heures, suivie d'une diminution de cette croissance aboutissant à un plateau au bout de 24 h.

Ainsi, les différentes analyses par QCM, PM-IRRAS et mesures d'épaisseur par ellipsométrie, révèlent une croissance logarithmique du film PDA en fonction du temps d'immersion du substrat. La combinaison de la masse du dépôt de PDA obtenue par QCM (environ 1,2 µg pour 24 h d'immersion) et de son épaisseur obtenue par ellipsométrie et observations MEB (40 nm pour 24 h d'immersion) permettent d'estimer la densité du film de PDA à 1,49 g cm⁻³. Ce résultat est en accord avec la valeur reportée dans la littérature¹². De plus, les données d'ellipsométrie montrent que l'épaisseur du film de PDA sur des substrats d'or a progressivement atteint une valeur maximale d'environ 50 nm, après 48 heures d'immersion, ce qui se situe dans la gamme des épaisseurs de film de PDA en accord avec les données reportées par Messersmith *et al.*² Cette phase stationnaire peut être attribuée à l'épuisement du monomère dans la solution surnageante, pouvant se réticuler sur le film PDA, au profit des molécules de quinone non réactives²¹¹.

1.1.1.1.1 Influence de l'étape lavage par sonication

Au tout début de l'étude, il est apparu évident d'inclure une étape de sonication après formation du dépôt afin de supprimer les particules de PDA adsorbées sur le film lui-même. Après s'être interrogé sur l'impact des ultrasons sur le revêtement qui peut conduire, si le temps de traitement est trop long ou que la puissance des ultrasons est trop élevée, à une délamination du film voire à une destruction de la surface d'or, il est apparu nécessaire d'étudier l'impact d'un tel traitement sur la qualité du revêtement de PDA.

Pour cela, un suivi cinétique du dépôt a été mené en n'incluant pas d'étape de sonication. Les échantillons ont donc été uniquement rincés à l'eau distillée, l'étude a été conduite par analyse PM-IRRAS, ellipsométrie et par microscopie optique (Figure 4).

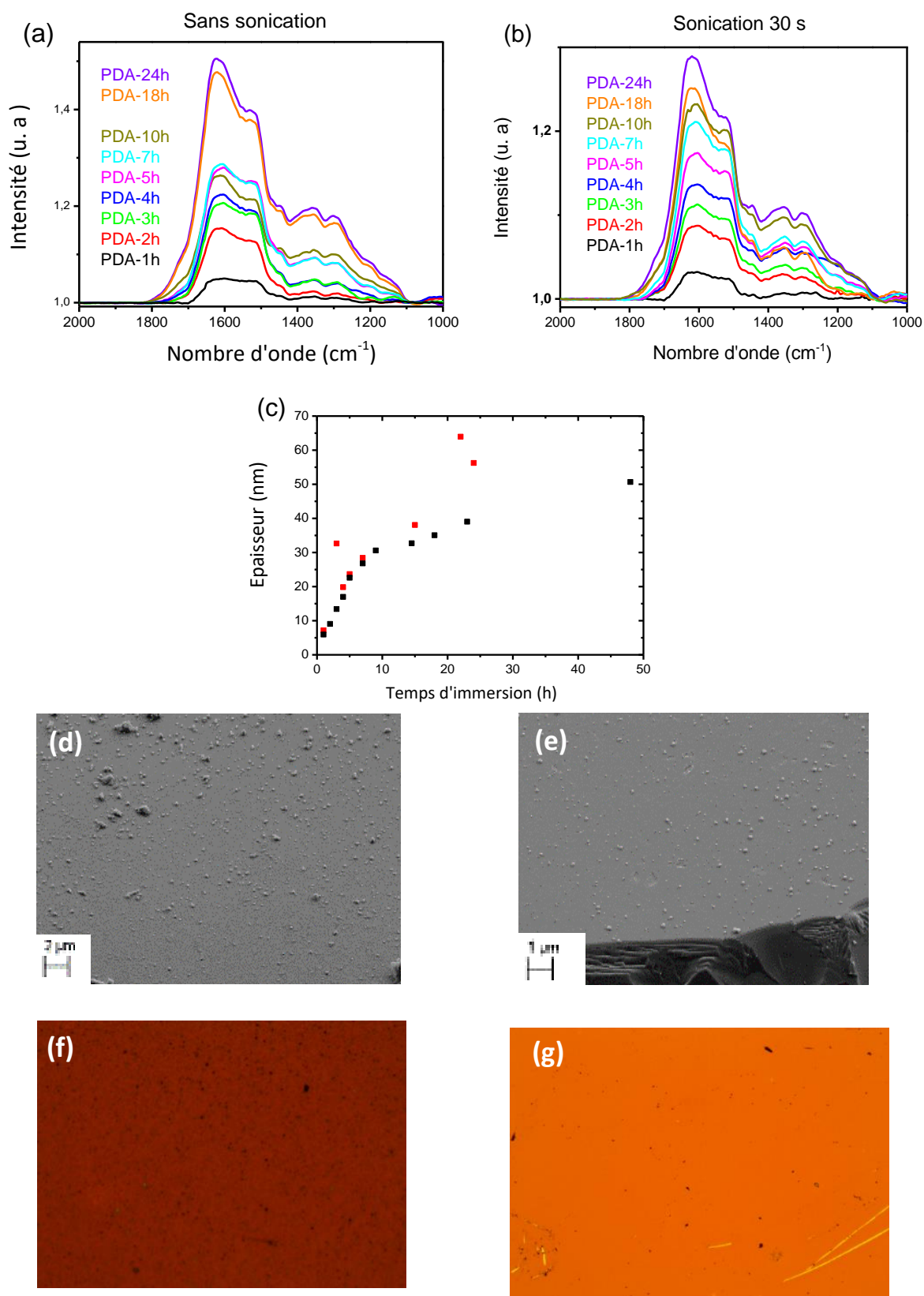


Figure 4 : Etude de l'impact d'un traitement aux ultrasons. Suivi cinétique du dépôt de la PDA sur plaque d'or par PM-IRRAS (a) sans étape de traitement aux ultrasons, (b) avec une étape de traitement aux ultrasons. (c) Suivi de l'épaisseur du dépôt de PDA sur plaques d'or par ellipsométrie avant (carrés rouges) et après traitement aux ultrasons (carrés noirs). Clichés MEB d'un revêtement PDA-O₂-24h (d) avant et (e) après sonication. Clichés de microscopie optique sous un agrandissement $\times 10$ d'un revêtement PDA-O₂-24h (f) avant et (g) après sonication.

L'étude de l'évolution des intensités des pics infra-rouge caractéristiques de la PDA au cours du temps révèle que l'étape de sonication permet d'obtenir une évolution plus homogène ; ceci est confirmé par les mesures d'épaisseur. En effet on constate que le lavage par ultrasons ne semble pas avoir d'impact sur le revêtement durant les premières heures du dépôt ce qui semble cohérent puisque à ces premières heures il n'y a pas encore formation d'agrégats de PDA. En revanche, on constate que l'absence d'étape de sonication entraîne des épaisseurs plus importantes dues au dépôt d'agrégats de PDA contribuant à une surface plus rugueuse comme on peut le voir sur les clichés MEB et les images de microscopie optique, Figures 4 (d-g). Ainsi, l'étape de traitement aux ultrasons influence la qualité du dépôt de PDA lorsque l'on envisage des dépôts de plus de 10 heures. Pour notre étude, cette étape est importante afin d'éviter l'adsorption d'agrégats de PDA en surface pouvant compromettre l'étape de chloration en profondeur en consommant des ions OCl^- et en modifiant leur diffusion.

1.1.1.1.2 Influence de la concentration en dopamine sur la cinétique et la qualité du dépôt

L'impact de la concentration en dopamine a été peu étudié dans la littérature ; en effet, la concentration type reportée par Messersmith *et al.*¹¹ et qui est la plus souvent employée est de 2 mg/mL. Cette concentration n'est pas forcément adaptée à toutes les applications.

Ball *et al.*¹⁵ ont proposé une étude de l'influence de la concentration en dopamine sur la cinétique du dépôt du revêtement PDA. En effet, en présence d'air et à température constante fixée à 20°C, ils ont montré que la concentration de dopamine, et des catécholamines en général, a une influence majeure sur la cinétique de formation du film. Augmenter la concentration de dopamine au-dessus de 2 mg/mL (en présence de 50 mM de tampon Tris) permet d'atteindre des épaisseurs supérieures à 40-45 nm (Figure 5(a)), valeur reproductible obtenue dans les conditions expérimentales décrites pour la première fois par Messersmith *et al.*¹¹ Cependant, ces revêtements deviennent également plus rugueux. En effet, la valeur moyenne quadratique de rugosité (RMS) augmente avec la concentration passant de 37 nm pour une concentration de 1 mg/mL à 81 nm pour une concentration de 5 mg/mL comme indiquée sur la Figure 5(b) témoignant d'une augmentation de la rugosité du film avec la concentration en dopamine.

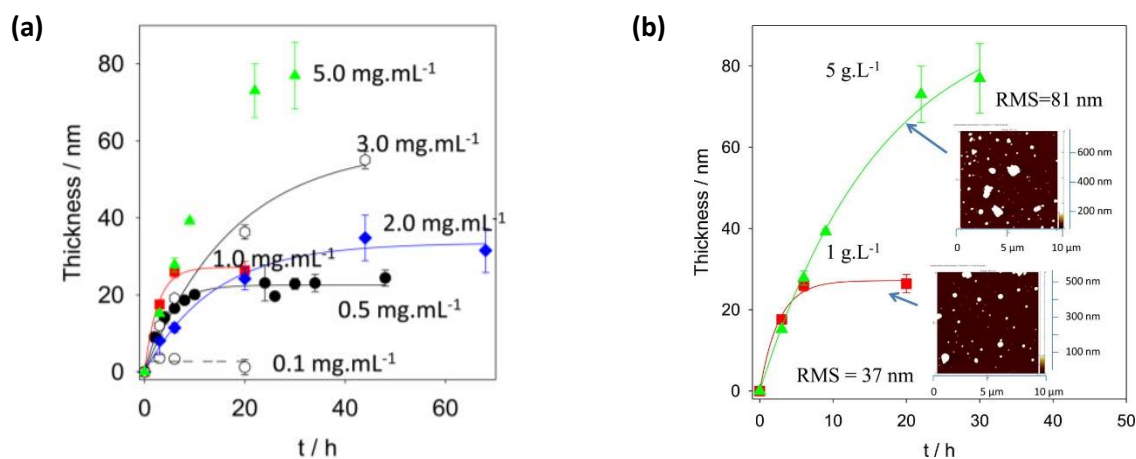


Figure 5 : (a) Evolution de l'épaisseur des films de polydopamine déposés sur des substrats de silicium en présence de tampon Tris à pH 8,5. Les expériences ont été réalisées à des concentrations initiales de dopamine de : 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 et 5,0 mg/mL. (b) Evolution au cours du temps de l'épaisseur et de la rugosité en fonction de la concentration en dopamine (1 et 5 mg/mL) des films de polydopamine déposés sur des substrats de silicium¹⁵.

Pour rappel, dans notre étude nous travaillons à une concentration à 0,5 mg/mL, il est apparu ainsi important de tester une concentration 2 fois plus élevée en dopamine, *i.e.* 1 mg/mL, afin de voir l'impact de cette concentration sur la cinétique de dépôt mais également sur l'influence de l'aspect de surface du film final.

Ainsi, une étude sur l'influence de la concentration en dopamine a été menée en s'inspirant de celle reportée dans la littérature¹⁵. Pour cela, nous avons étudié la cinétique d'un dépôt à partir d'une solution de dopamine à 1 mg/mL et nous l'avons comparé au dépôt précédemment étudié à savoir à une concentration de 0,5 mg/mL en dopamine dans la solution initiale. Un suivi d'épaisseur par d'ellipsométrie ainsi qu'une étude de la morphologie de surface par MEB ont été conduits. Les résultats sont présentés dans la Figure 6.

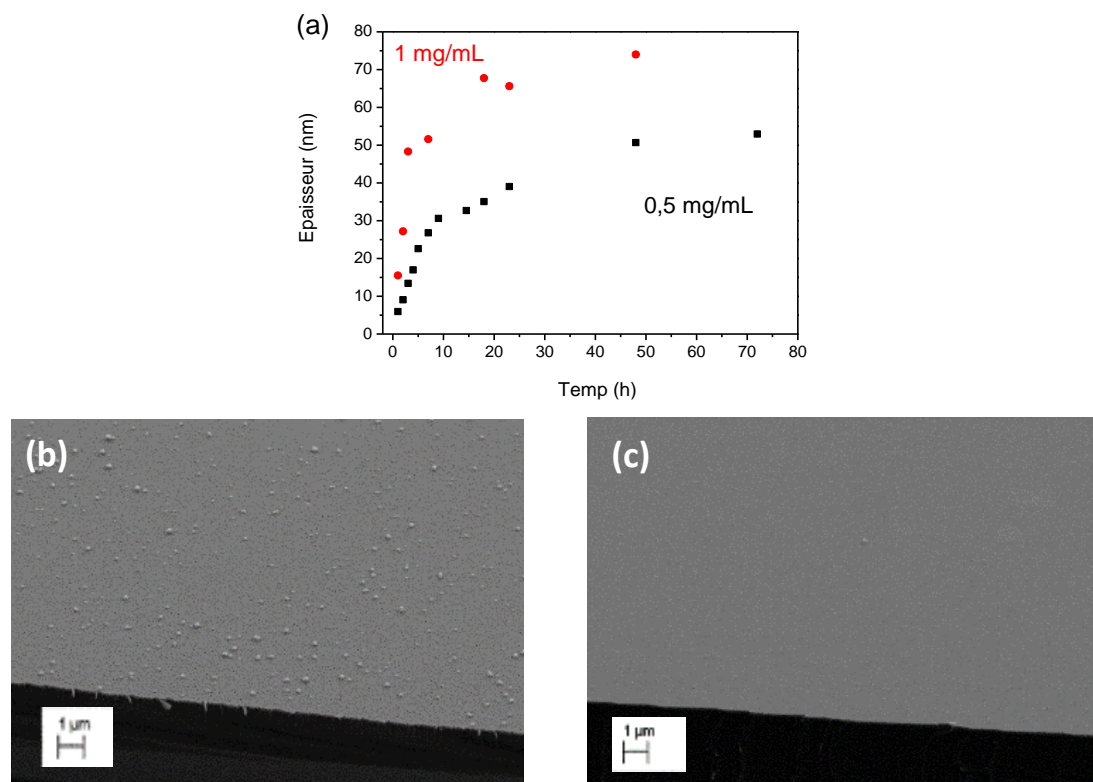


Figure 6 : (a) Evolution de l'épaisseur du dépôt de PDA, sur substrat d'or, au cours du temps d'immersion dans une solution de dopamine/Tris à deux concentrations différentes : 0,5 mg/mL (carrés noirs) et 1 mg/mL (carrés rouges). Les mesures d'épaisseur ont été réalisées par ellipsométrie. Cliché MEB d'un substrat silicium après immersion durant 24 h dans une solution de dopamine/Tris à (b) 1 mg/mL, (c) 0,5 mg/mL.

On constate après étude des données d'ellipsométrie que l'on retrouve bien un profil logarithmique pour la cinétique de dépôt du film de PDA lorsque l'on travaille à une concentration de 1 mg/mL. En revanche on atteint des épaisseurs supérieures à 50 nm allant jusqu'à 70 nm environ ; la cinétique générale est quant à elle semblable entre les deux concentrations puisque on atteint, pour les deux concentrations, un plateau au bout de 24 h environ, néanmoins la vitesse de dépôt durant les 10 premières heures semble plus élevée lorsque l'on double la concentration en dopamine, Figure 6(a).

La surface semble quant à elle plus rugueuse lorsque l'on travaille à une concentration plus élevée. En effet, d'après les micrographies MEB présentées sur les Figures 6(b) et 6(c), on observe toujours pour une concentration de 1 mg/mL des particules de PDA en surface malgré l'étape de sonication, alors que pour une concentration 2 fois moindre, peu de particules de PDA sont observées en surface du revêtement, Figure 6(c).

On voit ainsi l'impact de la concentration en dopamine sur la cinétique et l'aspect du dépôt de PDA.

Dans la suite de notre étude, nous avons décidé de travailler avec une concentration en dopamine de 0,5 mg/mL. En effet, il nous est apparu important pour l'étape de chloration, d'avoir une surface la plus lisse possible, et donc d'éviter la présence d'agrégats de PDA en surface du revêtement, non éliminés par les ultrasons, et qui pourraient interférer dans l'efficacité de la chloration du film de PDA en profondeur.

1.1.1.2 Etude sur silicium : influence du substrat

Les travaux de suivi cinétique menés jusqu'à présent reposent sur un dépôt formé sur une surface d'or que nous avons considérée comme notre surface d'étude modèle. Néanmoins, nous avons souhaité compléter cette étude en utilisant un autre support modèle tel que le silicium dont la surface est extrêmement lisse (RMS de 0,3 nm) et de fait moins rugueuse qu'une surface d'or (RMS de 1,7 nm). Le but de cette étude est d'analyser l'influence du support et de sa rugosité initiale sur le dépôt de PDA. En effet nous avons là deux surfaces antagonistes, avec la surface stable et inerte de l'or et une surface d'oxyde présentant des fonctions SiO₂ en surface. Le suivi du dépôt a été conduit par ellipsométrie et MEB afin d'évaluer l'évolution de l'épaisseur du film de PDA au cours du temps d'immersion (Figure 7).

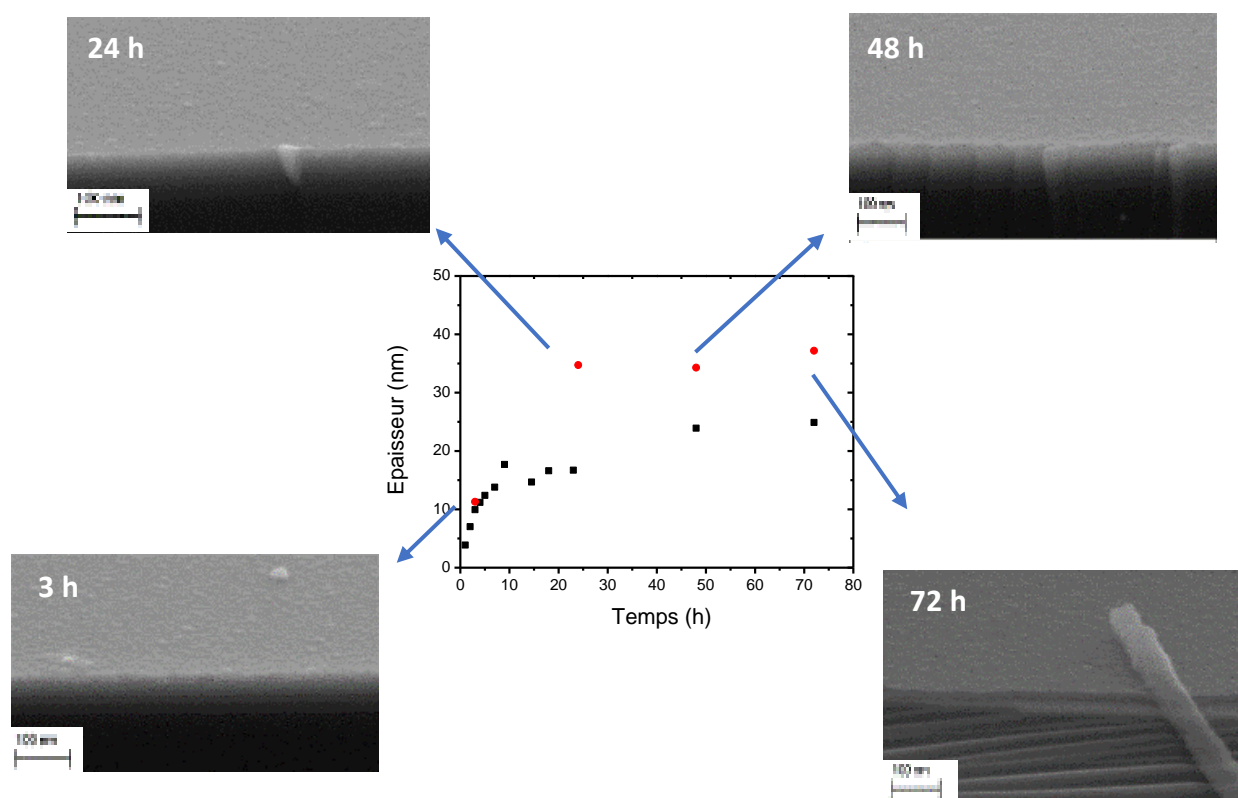


Figure 7 : Evolution de l'épaisseur du film de PDA déposé sur silicium, mesurée par ellipsométrie (carrés noirs) et par MEB (ronds rouges) au cours du temps d'immersion dans une solution de dopamine à 0,5 mg/mL. Clichés MEB associés montrant l'influence du temps d'immersion sur l'épaisseur du film formé.

On retrouve tout comme pour le dépôt sur une surface d'or une évolution logarithmique de la cinétique de dépôt avec un plateau atteint au bout de 24 heures d'immersion. En revanche, on observe que l'épaisseur maximale est d'environ 25 nm, ce qui est deux fois moins élevé que celle obtenue sur une surface d'or. Il semble donc que le silicium présente une influence sur la nucléation et le dépôt un film de PDA contribuant à un dépôt moins épais. On sait que le dépôt de PDA fait appel à une variété de mécanismes d'interaction tels que les interactions catéchol-métal, les interactions électrostatiques, les interactions $\pi - \pi$, les liaisons hydrogène et les réactions covalentes (par exemple, catéchol-NH-R / catéchol-SR) en fonction de la chimie de surface des matériaux²¹²⁻²¹⁵. Par microscopie à force atomique (AFM), les mesures de la force de contact ont pu mettre en évidence que l'adsorption de la PDA est régie principalement par les groupements catéchol. La force d'adhérence des catéchols aux interfaces TiO_2 par exemple est 4 fois plus grande que pour ses homologues d'o-quinone

oxydés et 8 fois plus grande que celle de la tyrosine²⁰. Guardingo *et al.* ont rapporté que l'adhérence moyenne d'une monocouche de catéchol sur une pointe d'AFM en silicium était légèrement supérieure à la force d'adhérence maximale d'un film PDA amorphe. Ces résultats suggèrent que les groupes catéchols sont principalement responsables de l'adhérence des films de PDA²¹. L'équipe de Kolosterman²² a montré que la chimie du substrat peut affecter le taux de nucléation et de croissance du film de PDA. Grâce à des analyses AFM, ils ont pu démontrer une densité plus faible du dépôt de PDA sur des substrats de SiO₂ que sur des surfaces neutres et hydrophobes. De plus, le taux d'absorption initial de la PDA a été mesuré en utilisant la QCM avec des mesures de dissipation. Il a été montré que ce taux est proportionnel à la densité de nucléation, qui augmente à mesure que l'hydrophobicité du substrat augmente. Ces données peuvent ainsi expliquer la différence en terme d'épaisseur de dépôt entre un substrat d'or plus hydrophobe qu'un substrat de silicium.

1.1.2 Caractérisations physico-chimiques du dépôt

1.1.2.1 Analyse PM-IRRAS et IR-ATR

Une caractérisation par IR a été menée par PM-IRRAS (voir Figure 4(a)) sur un film de PDA-O₂-24h déposé sur une plaque d'or (dont un spectre est repris sur la Figure 8(a)), caractérisation complétée par une analyse d'une suspension de PDA-O₂-6h par IR-ATR (Figure 8(b)).

Aux premiers stades de croissance, jusqu'à 3 heures, un large massif est observé dans la région de 1600 cm⁻¹ dont l'intensité augmente en fonction du temps d'immersion, Figure 4. Un deuxième groupe de pics caractéristiques est visible aux nombres d'onde inférieurs. Aucune autre contribution IR n'est détectée quel que soit le temps d'immersion du substrat. Toutes ces caractéristiques indiquent la présence d'un film intermédiaire de dopamine et d'un film de polydopamine, les principaux pics caractéristiques étant observés à 1620 et 1515 cm⁻¹, attribués respectivement aux vibrations d'élongation de la liaison aromatique $\nu(\text{C}=\text{C})$ et de vibration de déformation de la liaison amine $\delta(\text{N-H})$ ²³. Des pics IR secondaires sont également observés à plus bas nombres d'onde, à savoir 1450, 1350 et 1290 et 1210 cm⁻¹, attribués aux vibrations d'élongation $\nu(\text{C-N})$ et aux déformations/élongations liées aux groupes catéchol $\delta(\text{OH})$ et $\nu(\text{C-O})$ ²⁴⁻²⁶. Ces contributions IR sont cohérentes avec celles obtenues pour la PDA en

solution par IR-ATR et, par conséquent, les analyses PM-IRRAS permettent également de confirmer la formation d'un revêtement de PDA sur les surfaces d'or.

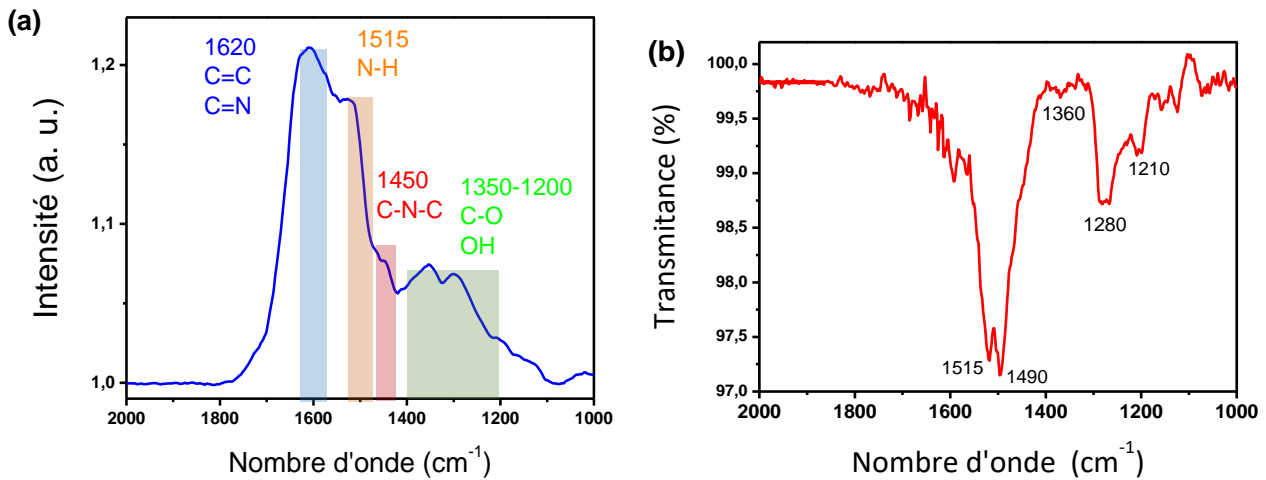


Figure 8 : Caractérisation IR de la PDA. (a) Spectre PM-IRRAS d'un dépôt de PDA-O₂-24h sur un substrat d'or. (b) Spectre IR-ATR d'une suspension de PDA-O₂-6h.

1.1.2.2 Caractérisation XPS

Une caractérisation élémentaire du dépôt de PDA sur un substrat d'or a été menée par analyse XPS permettant de déterminer, notamment, le rapport atomique N/C et de le comparer à la valeur théorique de la PDA qui est de 0,125 (valeur obtenue d'après la formule brute de la dopamine C₈H₁₁NO₂). Les analyses XPS fournissent des informations concernant la composition chimique de surface d'un matériau (10-15 nm) notamment en ce qui concerne la composition élémentaire, l'état chimique et la quantité des éléments d'intérêt. Cette technique permet donc de mettre en évidence la composition chimique du film et de confirmer le dépôt de PDA et les analyses IR précédentes. Les analyses XPS ont été menées pour deux temps de dépôt à savoir 3 h et 24 h afin de suivre l'évolution du dépôt au cours du

temps en se plaçant aux premières heures de dépôt durant lesquelles la vitesse de croissance du film est la plus élevée puis en se positionnant sur le palier de dépôt, Figure 9.

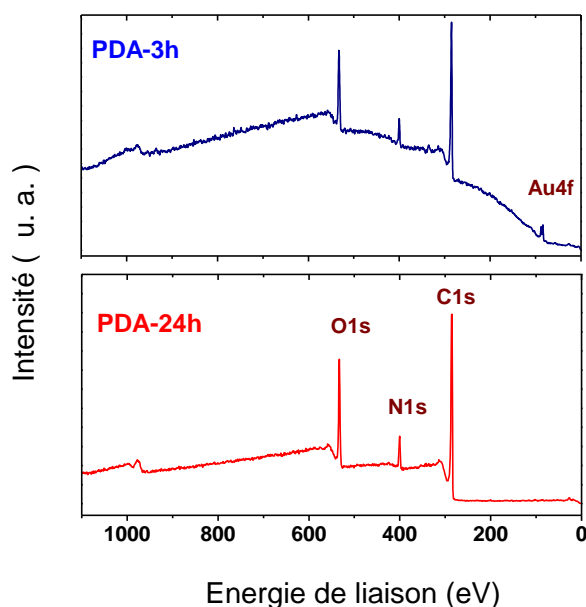


Figure 9 : Spectre XPS général des surfaces d'or recouvertes de films PDA après 3 h (spectre supérieur) et 24 h (spectre inférieur) d'immersion dans une solution de dopamine à 0,5 mg/mL.

Tableau 1 : Compositions chimiques en % atomique des revêtements PDA-O2-3h et PDA-O2-24h sur plaque d'or obtenues par analyse XPS et rapport atomique entre N et C.

	C	N	O	Au	N/C
PDA-O2-3h	76,3	7,2	16,2	0,3	0,09
PDA-O2-24h	75,5	7,3	17,2	-	0,10

Après formation du film de PDA durant 24 heures, les photopics C1s (285 eV), O1s (530 eV) et N1s (400 eV) sont observés alors que la contribution Au4f (84 eV) n'est pas détectée contrairement à l'échantillon fonctionnalisé par un film PDA formé pendant 3 heures (Figure 9).

Pour ces 2 échantillons, la composition chimique en carbone et azote est proche de la composition théorique de la polydopamine ($N/C = 0,125$) compte tenu de la contamination carbone qui réduit légèrement ce rapport (Tableau 1), confirmant ainsi le constat obtenu par PM-IRRAS (croissance de films de PDA). Concernant les épaisseurs estimées à partir des données XPS, elles sont en bon accord avec celles obtenues par ellipsométrie. En effet, pour le revêtement PDA-O₂-24h, le signal XPS Au4f n'est plus détectable suggérant une épaisseur

équivalente supérieure à 12 nm². Pour le revêtement PDA-O₂-3h, le signal Au4f est faible mais toujours visible (Figure 9), indiquant une épaisseur équivalente proche de 12 nm, là encore en bon accord avec les 15 nm obtenus par ellipsométrie et observations MEB.

1.1.2.3 Caractérisation par mesures d'angle de contact

Les mesures d'angle de contact à l'eau permettent d'évaluer la mouillabilité d'une surface et de mettre en évidence une modification de la chimie de cette dernière à la suite d'un dépôt. En effet, la PDA est un revêtement hydrophile présentant un angle de contact avec l'eau proche de 60°²⁸, contrairement à l'or nu pour lequel un angle proche de 75° est généralement observé. Un suivi de mouillabilité avec l'eau en fonction du temps de dépôt de la PDA a été mené, les résultats sont présentés sur la Figure 10. On remarque que l'angle de contact diminue au cours du temps pour atteindre un palier au bout de 3 h de dépôt, palier autour de 55° qui se rapproche de la valeur de l'angle de contact reportée dans la littérature. On voit ainsi que ce suivi de mouillabilité permet d'avoir de façon simple et rapide une indication sur le temps au bout duquel le revêtement devient homogène au niveau macroscopique en termes de couverture du substrat et complète ainsi les suivis par QCM, PM-IRRAS et ellipsométrie. Gardons également à l'esprit l'impact de l'état de surface sur les propriétés antibactériennes du revêtement et notamment sur l'adhérence bactérienne. En effet comme on a pu le voir dans le premier chapitre, plusieurs propriétés de surface entre autres la charge de surface et la mouillabilité peuvent faciliter ou au contraire empêcher l'accroche des bactéries. En général, un revêtement hydrophile tend à promouvoir l'adhésion bactérienne en milieu humide.

² 12 nm = 3λ, représentant 95% du signal, λ étant le libre parcours moyen des électrons dans la matière, pour les électrons ayant une énergie cinétique d'environ 1400 eV (à partir du niveau atomique Au4f) à travers le film organique de PDA est estimé égal à 3,62 nm²¹⁶. Tanuma, S.; Powell, C. J.; Penn, D. R., Calculation of electron inelastic mean free paths (IMFPs) VII. Reliability of the TPP-2M IMFP predictive equation. *Surface and Interface Analysis* **2003**, 35 (3), 268-275.

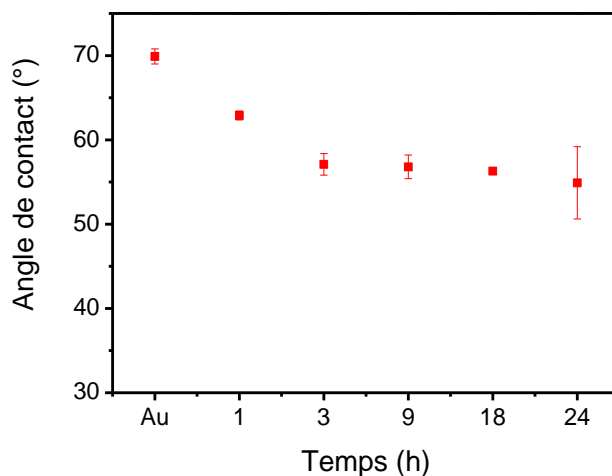


Figure 10 : Evolution de l'angle de contact eau / film de PDA sur or en fonction du temps de dépôt.

1.1.3 Dépôt *Grafting from* versus *Grafting to*

Le greffage de polymères sur une surface peut se faire selon deux voies, soit la polymérisation se déroule sur la surface conduisant au dépôt du revêtement (*Grafting from*) ou le polymère déjà formé se dépose par la suite (*Grafting to*) (Figure 11).

Lors de ce travail, nous avons donc suivi le dépôt de PDA par PM-IRRAS à partir d'une solution de dopamine/Tris et d'une solution de PDA murie durant 24 h. Le but est d'étudier ces deux modes de dépôt et de voir si un dépôt de bonne qualité est possible à partir d'une solution de PDA déjà formée et si ce dépôt présente une bonne stabilité pour une chloration *a posteriori*.

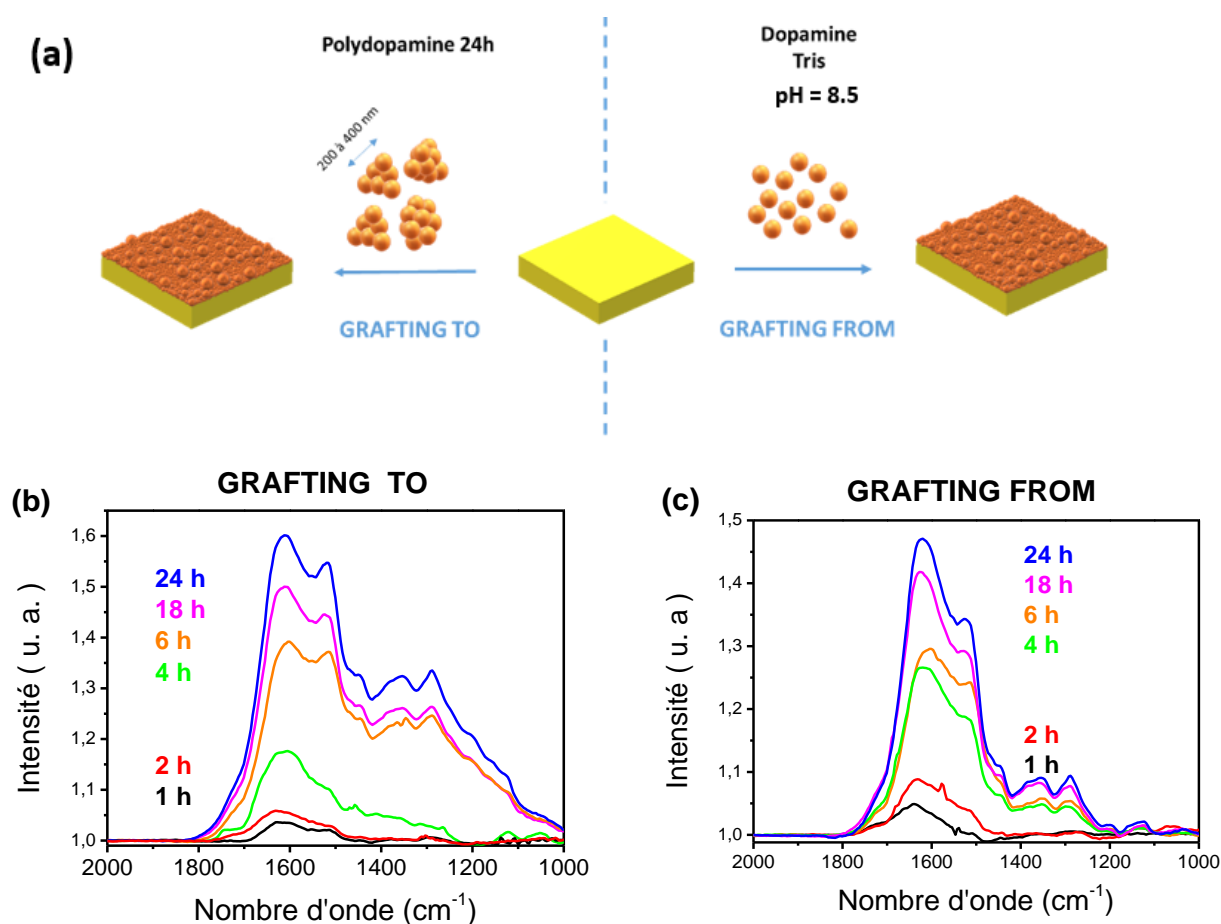


Figure 11 : (a) Schéma des procédés de dépôt *Grafting to* et *Grafting from*. Suivi du dépôt de la PDA par PM-IRRAS : (b) à partir d'une solution de PDA-O2-24h ; (c) à partir d'une solution de dopamine-Tris.

Ce qui transparaît des spectres PM-IRRAS (Figures 11(b) et 11(c)) est que l'on retrouve les pics caractéristiques de la polydopamine lorsque le dépôt s'effectue à partir d'une suspension de particules de PDA selon la méthode *Grafting to*. On remarque également que l'intensité de ces pics augmente fortement au cours des premières heures puis la croissance semble stagnée au bout de 24 heures retrouvant ainsi la cinétique logarithmique du dépôt classique de la PDA à partir d'une solution de dopamine-Tris. On constate, même si la comparaison reste à prendre avec précaution, une intensité et une aire sous les pics caractéristiques plus importantes lorsque le dépôt s'effectue en *Grafting to* suggérant ainsi un dépôt légèrement plus épais. A noter qu'un suivi de l'épaisseur par ellipsométrie ou MEB n'a pas pu être mené afin de confirmer ces observations.

Ainsi, un dépôt de film de PDA est possible en *Grafting to* c'est-à-dire à partir d'une suspension de PDA obtenue après 24 h. Il sera nécessaire dans la suite de notre étude d'étudier la stabilité

de ce revêtement lors de l'étape de chloration, dans des conditions basiques, générant les fonctions haloamine. En effet nous avons là un revêtement formé exclusivement d'un empilement d'agrégats de nanoparticules qui est très certainement moins compact qu'un revêtement formé à partir d'une solution de dopamine.

1.1.4 Revêtement multicouche

Nous savons désormais qu'en condition classique nous pouvons atteindre une épaisseur maximale de dépôt de 50 nm, bien qu'en solution il y ait encore des particules de PDA en suspension. Cela est dû d'une part à la limitation de la consommation du monomère libre dans le surnageant et au fait que les grains de polydopamine n'adhèrent pas au film déposé probablement en raison de répulsions électrostatiques¹⁵. Cette limitation s'avère être un frein à toute augmentation de l'épaisseur du film, augmentation qui pourrait être souhaitable dans le but d'optimiser les propriétés antibactériennes. En effet, une augmentation de l'épaisseur du dépôt de PDA conduirait à un nombre de fonctions amine disponibles plus important et donc *a fortiori* à un nombre plus élevé de fonctions chloramine immobilisées sur la surface du matériau à protéger.

Ainsi nous nous sommes demandé si le dépôt de multicouches successives de PDA pouvait être un moyen de contourner cette limitation. En effet, si la polydopamine est considérée comme un revêtement universel et indépendant du substrat, on doit pouvoir déposer de la polydopamine sur un substrat déjà recouvert de ce même film. Ce phénomène a été mis en évidence par Ball *et al.*²⁹ (Cf. chapitre I, Figure 13), à la condition que la solution de dopamine soit régulièrement réalimentée en monomère pour éviter la déplétion de ce dernier. Le film peut alors croître avec une épaisseur maximale d'environ 45 nm à chaque étape de dépôt (chaque étape durant 8 heures) avec, en théorie, aucune limite d'épaisseur.

Ainsi en nous inspirant de ce travail, nous avons étudié ce mode de dépôt multicouche en suivant l'évolution de l'épaisseur du film par ellipsométrie (Figure 12) et en la mettant en perspective avec celle d'un dépôt classique « monocouche ». Pour ce faire, toutes les 4 heures, les substrats d'or ont été plongés dans une solution fraîche dopamine/Tris à 0,5 mg/mL, ainsi 5 dépôts de 4 heures chacun ont été effectués. Le choix de la durée de 4 heures provient de la volonté d'obtenir un revêtement dense et homogène et donc d'éviter le dépôt

d'agrégats de PDA qui se forment au cours du temps. De plus, si l'on reprend le suivi du dépôt par QCM et ellipsométrie, c'est durant les 4 premières heures que la cinétique du dépôt est la plus élevée (Figure 3).

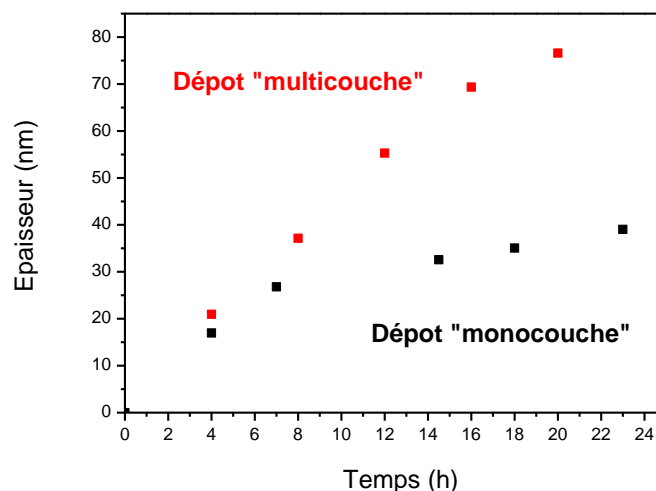


Figure 12 : Evolution de l'épaisseur du dépôt mesurée par ellipsométrie, de la PDA en fonction temps dans le cas d'un dépôt « monocouche » et « multicouche ».

Les résultats démontrent une augmentation linéaire de l'épaisseur du film de PDA au cours du temps contrairement au dépôt classique déjà étudié précédemment révélant une cinétique logarithmique avec un plateau d'épaisseur apparaissant au bout de 24 heures. Ces résultats révèlent l'importance de la dopamine et / ou de ses oligomères dans le processus de dépôt. Ainsi le dépôt multicouche permet d'atteindre des épaisseurs beaucoup plus importantes et se présente donc comme une voie intéressante d'optimisation du revêtement.

1.2 Etude du dépôt de PDA en milieu acide en présence de périodate comme oxydant

Comme il a été montré précédemment, le dépôt multicouche est une voie intéressante dans l'optique d'une augmentation de l'épaisseur du film de PDA, mais l'inconvénient de cette méthode est qu'elle est chronophage nécessitant de nombreuses étapes de préparation pouvant être un frein pour une application industrielle.

Ainsi, une autre voie a été étudiée reposant sur l'utilisation d'un oxydant plus puissant que le dioxygène, permettant une augmentation de la cinétique de formation de la PDA mais aussi

d'atteindre des épaisseurs plus importantes due à une accélération de l'oxydation de la dopamine conduisant rapidement, par l'agrégation des nanoparticules de PDA, à de gros agrégats se déposant sur le substrat. Néanmoins tout comme pour le dépôt en présence de O_2 , un seuil d'épaisseur est atteint dû à la consommation du monomère et par l'effet répulsif du revêtement vis-à-vis des particules de PDA qui restent en suspension.

Aussi, pour cette étude il est apparu que l'utilisation du périodate de sodium comme oxydant pourrait répondre à cette problématique. L'intérêt de cet oxydant qui a notamment été étudié par Ponzio *et al.*²⁸ est qu'il permet d'obtenir un revêtement très homogène pouvant atteindre une épaisseur 100 nm sur des substrats de silicium en milieu acide (Figure 13). Il semble donc possible d'obtenir à pH acide un dépôt de PDA ouvrant la possibilité de dépôt sur des matériaux sensibles à un milieu basique, conditions de dépôt classiques.

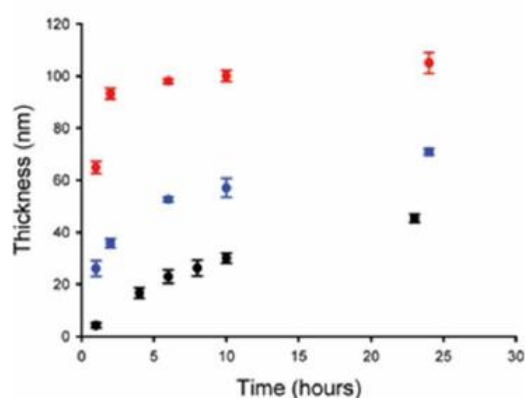


Figure 13 : Épaisseur des films PDA déposés sur des plaquettes de silicium en fonction du temps pour différentes concentrations de périodate de sodium (noir : 1 mM ; bleu : 10 mM ; rouge : 20 mM)²⁸.

En suivant le protocole décrit par Ponzio, nous avons décidé d'ajouter ce mode de dépôt de PDA à notre étude. Tout comme pour le revêtement par la voie classique, nous avons effectué un suivi cinétique de dépôt des films de PDA par PM-IRRAS, ellipsométrie, et des caractérisations physicochimiques XPS et par mesure d'angle de contact et morphologiques par MEB.

1.2.1 Suivi cinétique du dépôt

Qualitativement, le dépôt du film de PDA a été étudié *ex situ* par PM-IRRAS, en intégrant les zones des pics caractéristiques de la PDA en fonction du temps d'immersion. Des données quantitatives ont été également obtenues à partir de ces mêmes échantillons par ellipsométrie permettant de suivre l'évolution de l'épaisseur moyenne du film de PDA en fonction du temps d'immersion. Cette évolution a été confirmée par des observations MEB de la section transversale des échantillons (Figure 14).

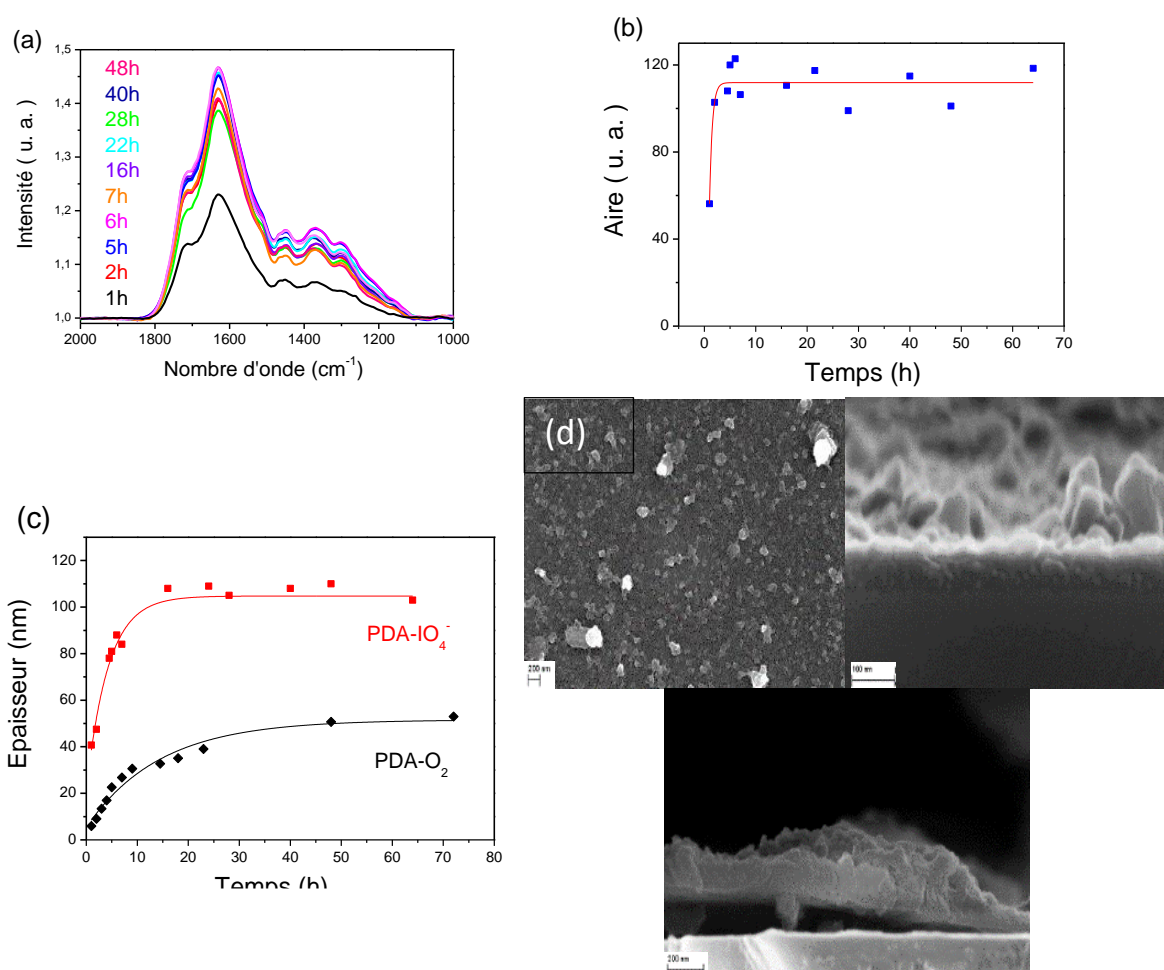


Figure 14 : Suivi cinétique du dépôt de PDA à partir d'une solution de dopamine à 0,5 mg/mL en présence de périodate de sodium à 20 mM. (a) Spectres PM-IRRAS après différents temps d'immersion des substrats d'or. (b) Evolution au cours du temps de l'intégration des aires sous le massif des pics caractéristiques de la PDA à partir de (a). (c) Evolution de l'épaisseur du dépôt, au cours du temps, mesurée par ellipsométrie (carrés rouges) en présence de périodate de sodium et (ronds noirs) en présence de dioxygène. (d) Micrographies MEB du revêtement de PDA après 24 heures d'immersion.

Les mesures PM-IRRAS démontrent une cinétique de dépôt plus rapide que lors d'un dépôt classique, en effet on observe une forte augmentation de l'intensité des pics caractéristiques de la PDA durant les premières heures de dépôt pour atteindre un plateau au bout de 3 heures environ, contrairement au dépôt conventionnel où ce plateau n'arrive qu'après 24 heures de réaction. Cette cinétique est confirmée par des mesures d'épaisseur obtenues par ellipsométrie révélant une cinétique logarithmique amenant à des épaisseurs allant jusqu'à 100 nm. Cette vitesse de croissance plus rapide peut être expliquée par le fort pouvoir oxydant du périodate conduisant plus rapidement à l'oxydation de la dopamine et à la formation de particules de PDA en solution. L'aspect du revêtement au bout de 24 heures de dépôt observé par MEB révèle un revêtement très dense et très rugueux du fait d'agrégats de PDA volumineux déposés en surface du revêtement.

Ainsi, ce suivi de formation du dépôt de PDA rejoint l'étude menée dans la littérature, le périodate permet d'accélérer la cinétique d'oxydation de la dopamine, au bout de 3 heures de dépôt nous atteignons le plateau d'épaisseur autour de 100 nm soit un gain de 60 nm d'épaisseur par rapport au dépôt classique obtenu après 48 h. Néanmoins, on constate un revêtement beaucoup plus rugueux que par la voie conventionnelle malgré l'ajout d'une étape de lavage par ultrasons. Cet état de surface devra être pris en compte lors des tests microbiologiques.

1.2.2 Caractérisation PM-IRRAS

L'étude plus précise du spectre PM-IRRAS présenté sur la Figure 14(a) lors du suivi de dépôt du revêtement révèle les groupements caractéristiques de la PDA (Figure 15) déjà évoqués lors de l'étude du revêtement PDA-O₂. On remarque néanmoins qu'un nouveau pic apparaît à 1720 cm⁻¹ attribué à la liaison C=O d'un groupement carboxylique. Ce pic témoigne d'un état hyper oxydé de la PDA dû au fort pouvoir oxydant du périodate, le matériau est probablement plus riche en groupement carboxylique ou structures quinonoïdes et a subi une perte partielle de carbone (confirmée par les rapports atomiques N/C obtenus en XPS, qui seront présentés par la suite). Ceci est conforme à la chimie connue du périodate, qui, lorsqu'il est utilisé en excès, peut provoquer un clivage oxydant o-quinone³⁰. D'ailleurs, Ball et Ponzio ont proposé par des mesures XPS et RMN des structures probables de la PDA au sein du revêtement (Figures 16)²⁸.

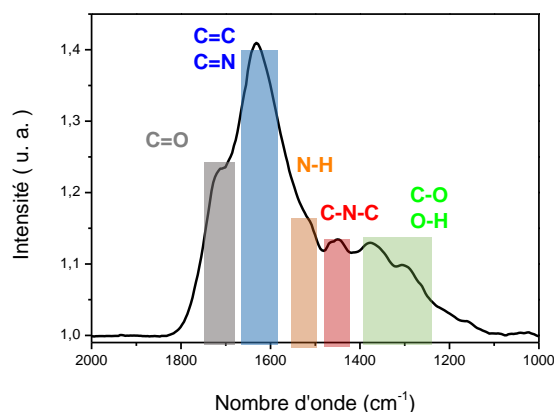


Figure 15 : Spectre PM-IRRAS d'un revêtement PDA-O₂-24h obtenu à partir d'une solution de dopamine en présence de périodate de sodium à 20 mM.

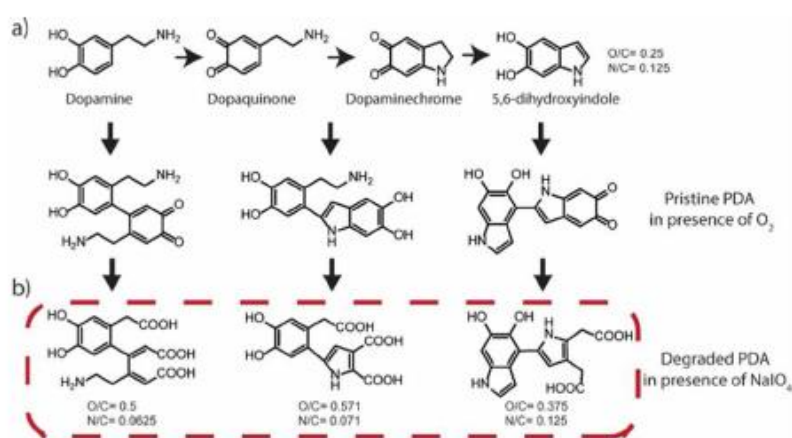


Figure 16 : a) Relations schématiques entre les précurseurs de monomères, les principaux types de composants oligomères dans PDA-O₂ et (b) représentation des composants structuraux au sein de la PDA dégradés par le périodate, expliquant l'augmentation des rapports atomiques O/C et la diminution des rapports N/C²⁸.

1.2.3 Caractérisation XPS

La caractérisation XPS de substrats d'or après 24 heures d'immersion dans une solution de dopamine en présence de périodate confirme le dépôt du revêtement PDA grâce à la présence des pics du carbone C1s, de l'oxygène O1s et de l'azote N1s combinée à l'absence du photopic de l'or Au4f (84 eV), prouvant que l'on a un dépôt d'une épaisseur supérieure à 12 nm (Figure 17).

A noter que l'on observe également la présence d'iode démontrant l'existence au sein de la structure de PDA d'iodure, présence confirmée par l'apparition du pic de sodium Na1s (contre

ion). Cette présence a été également signalée dans les travaux de Ball et Ponzio²⁸. Cependant, on peut également supposer que des fonctions iodoamine ont été formées au cours de la synthèse du film de PDA compte tenu de l'excès de I par rapport à Na.

Le calcul des rapports atomiques O/C et N/C a permis de confirmer les observations PM-IRRAS. En effet, on constate que l'oxydation de la dopamine en présence de 20 mM de périodate de sodium pendant 24 h entraîne un rapport O/C significativement supérieur à 0,25 et un rapport N/C inférieur à 0,125 (Tableau 2) confirmant un enrichissement de la structure en oxygène conséquence de la dégradation oxydante de la PDA en présence du périodate comme oxydant. La diminution du rapport N/C peut être attribuée à la rupture oxydante des chaînes latérales de la dopamine conduisant à une perte des groupements amine ainsi qu'à la dégradation oxydative des groupements pyrrole.

Ces résultats PM-IRRAS complétés par les analyses XPS mettent ainsi en évidence le rôle fondamental de la nature de l'oxydant sur le dépôt des films de PDA.

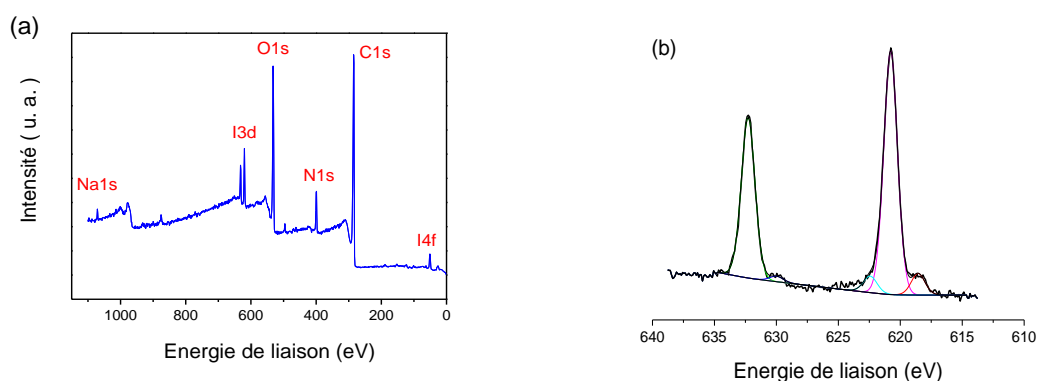


Figure 17 : Spectre général XPS d'un substrat d'or fonctionnalisé par un revêtement PDA-IO₄⁻-24h. (b) Spectre haute résolution du niveau I3d.

Tableau 2 : Compositions en at% du revêtement PDA-24-périodate sur plaque d'or obtenues par XPS et rapports entre O et C et entre N et C.

	C	N	O	Au	I	Na	O/C	N/C
PDA-IO₄⁻	72,2	7,1	19,3	-	0,9	0,5	0,26	0,10

1.2.4 Caractérisation par angle de contact

Nous avons complété notre étude du suivi du dépôt de la PDA en présence de périodate par des mesures d'angle de contact de l'eau, mesures que nous avons comparées avec celles obtenues pour le revêtement PDA-O₂. Les résultats sont présentés sur la Figure 18.

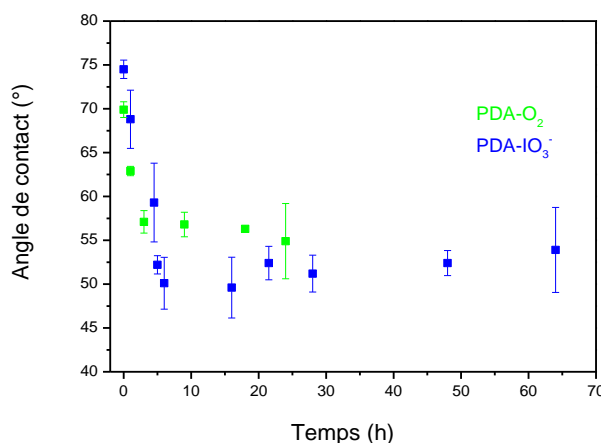


Figure 18 : Evolution de l'angle de contact à l'eau entre les revêtements PDA-IO₄⁻ (carrés verts) et PDA-O₂ (carrés bleus) en fonction du temps de dépôt.

L'évolution de l'angle de contact formé entre le revêtement et l'eau rejoint le profil obtenu pour le revêtement PDA-O₂. En effet on constate une forte diminution de l'angle durant les 10 premières heures puis un plateau est observé témoignant ainsi d'un revêtement homogène sur la surface d'or qui est complètement recouverte par le dépôt. On remarquera que cette évolution est similaire au profil retrouvé lors du suivi de l'épaisseur du dépôt. Ainsi tout comme pour le revêtement PDA-O₂ le suivi cinétique du dépôt par mesure d'angle de contact s'avère être une méthode simple du suivi du dépôt de PDA au cours du temps.

En conclusion, cette étude nous a permis de confirmer l'importance du choix de l'oxydant dans le processus de polymérisation de la dopamine conduisant à la polydopamine pouvant influencer les propriétés physicochimiques du dépôt final.

L'utilisation du périodate de sodium contribue à l'augmentation de la cinétique de dépôt ainsi que de l'épaisseur maximale du film de PDA. Il s'agit donc d'une voie intéressante d'optimisation. Néanmoins cet emploi de périodate s'accompagne d'une modification de la structure de la PDA classique avec une augmentation de groupements carboxylique au profit de groupements catéchol/quinone pouvant fragiliser l'accroche du revêtement. Elle amène

également à une surface de dépôt plus rugueuse, d'après les observations MEB, Figure 16(d), que son homologue PDA-O₂ avec la présence d'iode au sein de la structure. Il faudrait ainsi prendre en compte ces nouvelles propriétés lors des tests antibactériens.

2-Etude du dépôt du revêtement composite PDA- PEI

Nous avons jusqu'à maintenant étudié deux moyens d'optimiser le revêtement de PDA à savoir en jouant sur l'épaisseur du revêtement à travers le dépôt multicouche ou en modifiant l'oxydant conventionnel O₂ par du périodate de sodium. Ce dernier permet tout en accélérant la cinétique de dépôt, d'augmenter l'épaisseur maximale et ainsi d'obtenir un nombre de groupements amine disponibles plus important pour la génération des fonctions haloamine *via* un post-traitement par l'hypochlorite de sodium, les fonctions présentes au sein du film jouant le rôle de réservoir de composés oxydants antibactériens.

Néanmoins, les films de PDA obtenus restent relativement instables dans un environnement fortement alcalin (pH supérieur à 11)³¹ dans l'optique d'une chloration dans une eau de Javel comme on a pu le voir précédemment.

La polyéthylèneimine (PEI) riche en fonction amine a été fréquemment introduite comme agent de réticulation¹, qui permet d'obtenir spontanément des films composites PDA-PEI par réactions d'addition Michael ou de Schiff dont la stabilité chimique de la PDA est améliorée (Figure 19(a)). En solution la mise en présence de la dopamine avec la PEI en absence du tampon TRIS (donc à pH acide 5-6) amène à une coloration de la solution s'intensifiant au cours du temps conséquence du début de l'oxydation de la dopamine comme on peut le voir sur la Figure 19(b) confirmant ainsi le rôle de réticulant du PEI. Lors de l'ajout du tampon TRIS, la solution noircit rapidement au bout de 2 heures faisant apparaître des particules en suspension, particules de PDA-PEI.

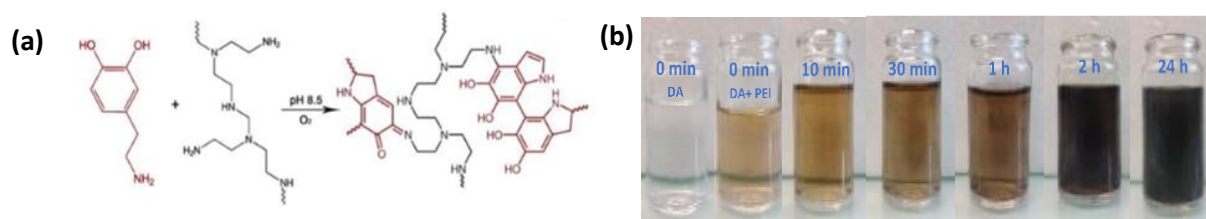


Figure 19 : (a) Réaction de réticulation de la dopamine et la PEI¹. (b) Evolution de la coloration d'une solution de dopamine à 0,5 mg/mL et de PEI de masse moléculaire 600 Da à une concentration de 0,25 mg/mL, en présence de tris à pH=8.5

Ainsi, cette autre voie d'optimisation, par l'ajout d'un second polymère plus riche en fonction amine, nous est apparue intéressante à étudier. Pour cela nous avons effectué un premier suivi cinétique de dépôt de ce composite sur des surfaces d'or. Le protocole de dépôt du film composite PDA-PEI s'est inspiré de l'étude menée par Xu *et al.*¹

Ce suivi a été mené dans un premier temps *in situ* par QCM puis complété par des études *ex situ* à travers une analyse par PM-IRRAS en suivant l'évolution des aires sous les pics caractéristiques du revêtement et par suivi en MEB sur surface d'or et de silicium. Une analyse élémentaire du revêtement par XPS a également été menée afin d'avoir une information sur les rapports atomiques, N/C étant une indication de la formation réussie du dépôt PDA-PEI.

2.1 Suivi cinétique du dépôt du film composite PDA-PEI

Un suivi *ex situ* du dépôt du composite sur des surfaces a été mené par PM-IRRAS (Figures 20(b) et 20(c)) et mesure de l'épaisseur du dépôt en fonction du temps évaluée par MEB sur des surfaces d'or et de silicium (Figure 20(a) et Figure 21). Pour cela les substrats d'or ont été immergés dans une solution de PEI de masse moléculaire de 600 Da à 0,25 mg/mL et de dopamine à 0,5 mg/mL en présence de tampon Tris à pH= 8,5.

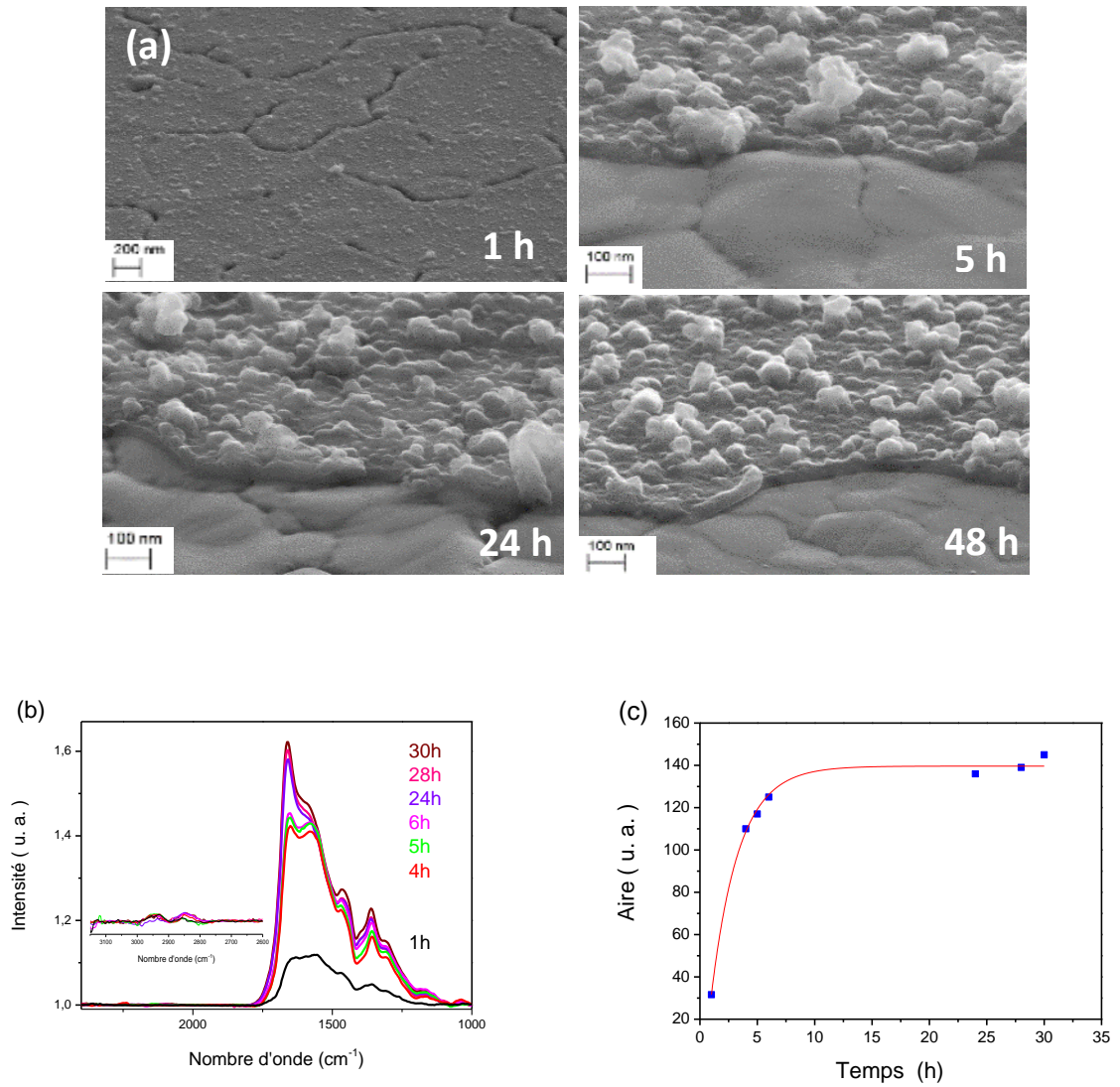


Figure 20 : Suivi de du dépôt de composite PDA-PEI sur surface d'or dans une solution de dopamine/PEI en présence de Tris à pH=8,5. (b) Spectres PM-IRRAS de surfaces d'or après immersion à différents temps dans une solution de dopamine à 0,5 mg/mL/PEI à 0,25 mg/mL. (c) Evolution au cours du temps de l'intégration des aires sous le massif de pics caractéristiques du film PDA-PEI à partir de la Figure 22(b).

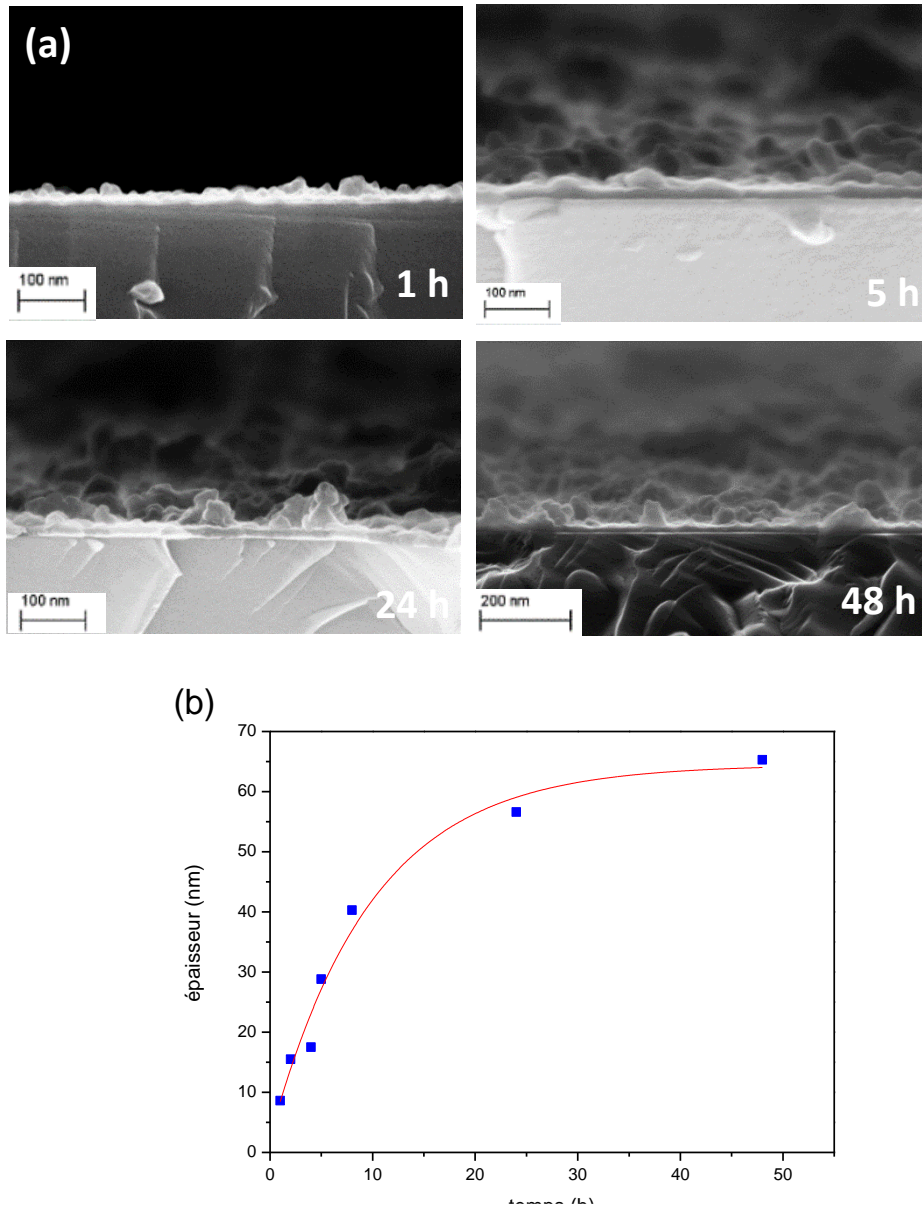


Figure 21 : Suivi de l'épaisseur de dépôt du revêtement PDA-PEI sur une surface de silicium mesurée par MEB.

(a) Clichés MEB d'un dépôt de PDA-PEI sur surface de silicium, à différents temps d'immersion dans une solution de dopamine-PEI. (b) Evolution de l'épaisseur du film de PDA-PEI déposé sur une surface de silicium mesurée par MEB en fonction du temps d'immersion dans une solution dopamine/PEI.

Ainsi, les différentes analyses par PM-IRRAS et MEB révèlent une croissance logarithmique du film en fonction du temps d'immersion du substrat.

Les observations MEB sur surface d'or (Figure 20(a)) révèlent qu'au bout de 5 heures de dépôt, la topographie de la surface d'or n'est plus visible (joint de grains toujours visibles après 1 h de temps d'immersion) contrairement au revêtement PDA-O₂ pour lequel elle y est toujours visible après 48 h de dépôt (Figure 3(d)) ce qui montre bien une épaisseur plus importante pour ce composite. Ces observations révèlent également un dépôt présentant deux couches

de morphologie distinctes. Une couche dense d'une moyenne de 80 nm formé au bout de 5 heures de dépôt puis une couche supérieure composée d'agrégats apportant une rugosité plus importante à la surface comparée à un revêtement de PDA-O₂. Il semblerait donc que durant les premiers stades du dépôt, une couche compacte se forme d'une densité comparable à celle de la PDA classique puis des agrégats de PDA-PEI formés en solution suite à la polymérisation du composite (Figure 20(a)) viennent se greffer en surface, ces agrégats ne sont pas éliminés lors de l'étape de sonication. Une mesure précise de l'épaisseur du revêtement n'a pas pu être menée sur les substrats d'or, ces derniers ne pouvant être clivés rendant donc l'observation de la tranche impossible. Pour cela, une analyse sur substrat de silicium a été menée (Figure 21) révélant là encore un revêtement présentant une morphologie de surface rugueuse, avec la présence dès les premières heures de dépôt d'agrégats. Due à la trop forte rugosité du revêtement, une estimation moyenne de l'épaisseur du dépôt au cours du temps est présentée en Figure 21(b) révélant une évolution logarithmique de l'épaisseur du dépôt au cours du temps confirmant les observations PM-IRRAS (Figure 20(a) et 20(b)).

2.2 Caractérisation physico-chimique par PM-IRRAS

L'étude du spectre PM-IRRAS du composite PDA-PEI présenté précédemment révèle les groupements caractéristiques de la PDA (Figure 22). En effet, un large massif infrarouge est observé dans la région de 1600 cm⁻¹ dont l'intensité augmente en fonction du temps d'immersion. Un deuxième groupe de pics caractéristiques est visible aux nombres d'onde inférieurs. Aucune autre vibration IR n'est détectée quel que soit le temps d'exposition. Toutes ces caractéristiques indiquent la présence du monomère non polymérisée (dopamine) et d'un film de polydopamine, les principaux pics caractéristiques étant observés à 1620 et 1515 cm⁻¹, attribués respectivement aux vibrations d'étirement de la liaison aromatique $\nu(\text{C}=\text{C})$ et de vibration de déformation de la liaison amine $\delta(\text{N-H})$. Des pics IR secondaires sont également observés aux nombres d'onde inférieurs, attribués au cycle de vibration d'étirement $\nu(\text{CNC})$ et aux vibrations liées aux groupes catéchol à savoir $\delta(\text{OH})$ et $\nu(\text{C-O})$ ²⁵. A noter qu'en l'absence de PDA, le dépôt de PEI révèle le même massif de pic entre 1500 et 1000 cm⁻¹. Les analyses PM-IRRAS indiquent ainsi la formation d'un revêtement de PDA sur les surfaces d'or. L'apparition des pics IR de la vibration asymétrique $\nu_{as}\text{CH}_2$ à 2930 cm⁻¹ et symétrique $\nu_s\text{CH}_2$ à

2860 cm^{-1} prouve le dépôt également de la PEI. On remarquera que les pics caractéristiques de la PDA ont subi un shift vers les hauts nombre d'onde comparé au spectre de la PDA seule (Figure 8(a)), qui peut être attribué à la réticulation avec la PEI modifiant les fréquences de vibration des liaisons adjacentes.

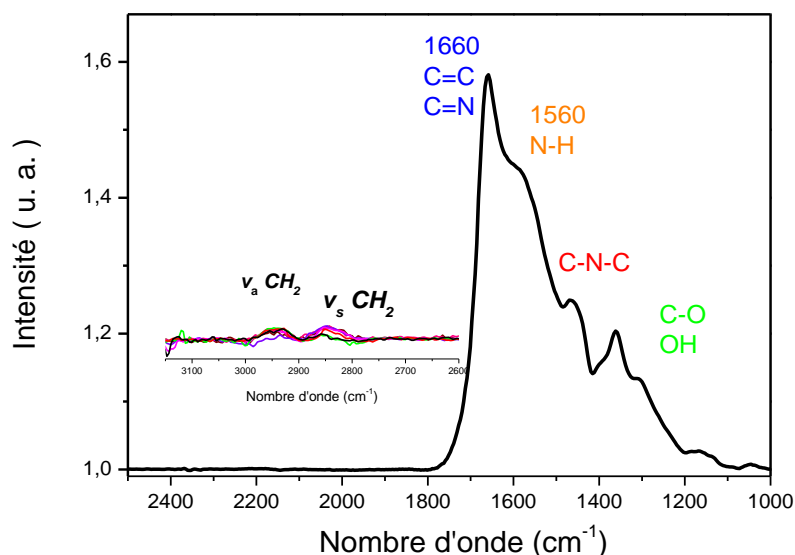


Figure 22 : Spectre PM-IRRAS d'une surface d'or immergée durant 24 h dans une solution de dopamine/PEI en présence de Tris à pH=8,5.

2.3 Caractérisation par XPS

La composition élémentaire du revêtement PDA-PEI 24 h sur surface d'or a été déterminée par analyse XPS (Figure 23). Le Tableau 3 résume les pourcentages atomiques.

Après 24 heures d'un dépôt de film composite de PDA-PEI, les photopics C1s (285 eV), O1s (530 eV) et N1s (400 eV) sont observés alors que la contribution Au4f (84 eV) n'est pas détectée. Pour cet échantillon, la composition chimique révèle un enrichissement en azote ($N/C = 0,2$) comparé à la composition théorique de la polydopamine ($N/C = 0,125$) confirmant ainsi les résultats obtenus par PM-IRRAS (croissance de films de PDA-PEI). Concernant les épaisseurs équivalentes estimées à partir des données XPS, elles sont en bon accord avec celles obtenues par ellipsométrie. En effet, pour le revêtement PDA-O2-24h, le signal XPS Au4f n'est plus détectable suggérant une épaisseur équivalente supérieure à $3\lambda = 12$ nm représentant 95% du signal.

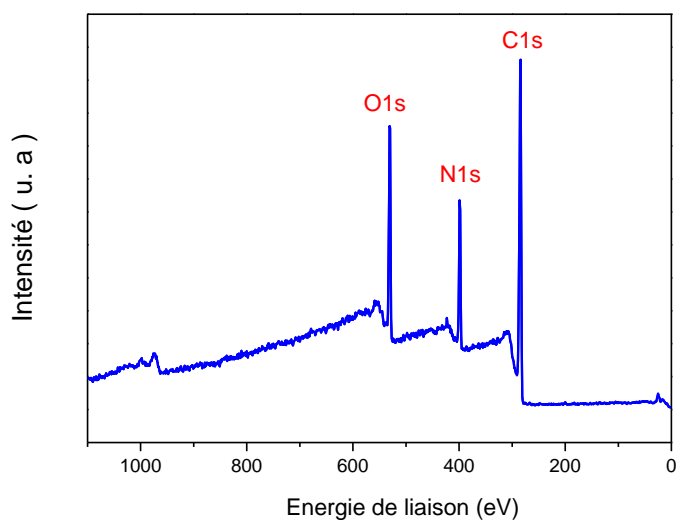


Figure 23 : Analyse XPS du spectre général d'une surface d'or fonctionnalisée par revêtement PDA-PEI-24h.

Tableau 3 : Composition chimique en pourcentage atomique du revêtement PDA-PEI-24h sur plaque d'or obtenue par analyse XPS et rapport entre N et C et entre O et C.

	C1s	O1s	N1s	Au	Na	N/C	O/C
PDA-PEI-24h	69,4	15,4	15,2	-	-	0,2	0,2

2.4 Caractérisation par mesure d'angle de contact

Un suivi de mouillabilité avec de l'eau en fonction du temps de dépôt de la PDA-PEI a été mené et est présenté sur la Figure 24. On remarque que la PDA et le composite PDA-PEI présente le même profil d'évolution de la mouillabilité au cours des 30 premières heures de dépôt. En effet l'angle de contact avec l'eau diminue au cours du temps pour atteindre un palier au bout de 5 h de dépôt, autour de 50° qui est légèrement inférieur à la valeur obtenue à partir de la polydopamine pure. Néanmoins on constate une baisse très forte de cette mouillabilité après 30 heures de dépôt suggérant un enrichissement de la surface en PEI, plus hydrophile que la PDA, au profit du composite PDA-PEI (la PEI ayant été introduite en excès). On voit ainsi que ce suivi de mouillabilité a permis de mettre en évidence différentes étapes de dépôt et d'évolution de surface du film au cours du temps complétant les observation PM-IRRAS, XPS et MEB.

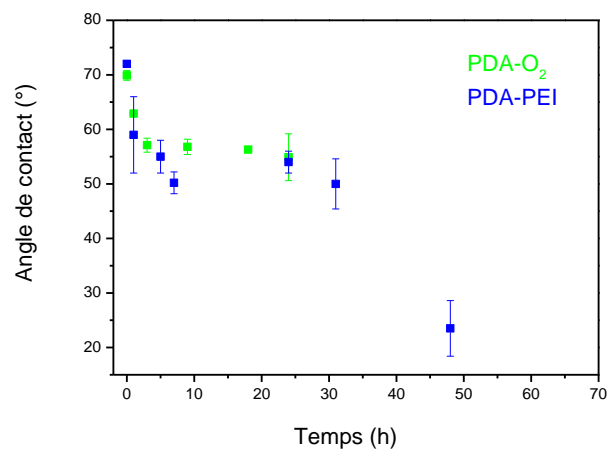


Figure 24 : Evolution de l'angle de contact avec l'eau en fonction du temps d'immersion d'une surface d'or dans une solution de PDA-PEI.

Conclusion

L'étude du suivi de la formation du film de PDA sur surface d'or dans une solution non désaérée à pH=8,5, menée *in situ* par QCM et *ex situ* par PM-IRRAS, ellipsométrie, XPS et mesure d'angle de contact à l'eau, a permis de montrer qu'après 24 heures l'épaisseur du film de PDA n'augmente quasiment plus, son épaisseur est comprise entre 40 et 50 nm, à noter que cette épaisseur dépend du substrat (Au ou Si).

Dans un souci d'optimisation de la quantité de fonctions haloamine disponibles à la surface du matériau à protéger, nous avons étudié d'autres voies de dépôt de la PDA permettant d'augmenter la quantité de fonctions amine. Pour cela, 3 voies supplémentaires ont été envisagées. Une première a été d'augmenter l'épaisseur du film de PDA en effectuant soit un dépôt multicouche ; soit en employant un oxydant plus puissant à savoir le périodate qui a contribué à accélérer la cinétique de formation du film PDA tout en permettant d'augmenter l'épaisseur du dépôt atteignant les 100 nm au bout de 24 h. Néanmoins, le dépôt de PDA reste rugueux et dans le cas du dépôt en présence de périodate, des ions iodure restent emprisonnés dans le revêtement.

Une troisième voie a été étudiée elle consiste en l'introduction d'un second polymère plus riche en fonction amine, la PEI. La PEI est connue pour jouer le rôle de réticulant au sein de la structure de PDA permettant ainsi d'obtenir des revêtements plus stables. Les analyses PM-IRRAS confirment le dépôt du composite et les mesures XPS montrent un enrichissement du revêtement PDA-PEI en fonctions amine.

En perspective, une autre voie pourra être envisagée qui est le dépôt par voie électrochimique comme il a été mentionné dans le *Chapitre 1* permettant un meilleur contrôle de la polymérisation de la dopamine et également de pouvoir déposer à pH neutre mais bien sûr le matériau doit être conducteur. Des études préliminaires ont été menées révélant des épaisseurs de l'ordre de 20 nm au bout de 24 heures de dépôt ce qui est 2 fois moins qu'en condition classique, dû au caractère isolant de la PDA. Une influence du pH a été également démontrée, le maximum de dépôt a été obtenu à pH 7.

Références

1. Lv, Y.; Yang, S.-J.; Du, Y.; Yang, H.-C.; Xu, Z.-K., Co-deposition Kinetics of Polydopamine/Polyethyleneimine Coatings: Effects of Solution Composition and Substrate Surface. *Langmuir* **2018**, *34* (44), 13123-13131.
2. Lee, H.; Rho, J.; Messersmith, P. B., Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings. *Advanced Materials* **2009**, *21* (4), 431-434.
3. Ham, H. O.; Liu, Z.; Lau, K. H. A.; Lee, H.; Messersmith, P. B., Facile DNA Immobilization on Surfaces through a Catecholamine Polymer. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (3), 732-736.
4. Liu, Y.; Ai, K.; Lu, L., Polydopamine and Its Derivative Materials: Synthesis and Promising Applications in Energy, Environmental, and Biomedical Fields. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (9), 5057-5115.
5. Liu, Q.; Yu, B.; Ye, W.; Zhou, F., Highly selective uptake and release of charged molecules by pH-responsive polydopamine microcapsules. *Macromolecular Bioscience* **2011**, *11* (9), 1227-1234.
6. Eisenberg, M. J.; Konnyu, K. J., Review of Randomized Clinical Trials of Drug-Eluting Stents for the Prevention of In-Stent Restenosis. *The American Journal of Cardiology* **2006**, *98* (3), 375-382.
7. Hong, S.; Kim, K. Y.; Wook, H. J.; Park, S. Y.; Lee, K. D.; Lee, D. Y.; Lee, H., Attenuation of the in vivo toxicity of biomaterials by polydopamine surface modification. *Nanomedicine* **2011**, *6* (5), 793-801.
8. Nam, H. J.; Cha, J.; Lee, S. H.; Yoo, W. J.; Jung, D. Y., A new mussel-inspired polydopamine phototransistor with high photosensitivity: signal amplification and light-controlled switching properties. *Chemical Communications* **2014**, *50* (12), 1458-1461.
9. Wu, D.; Xu, F.; Sun, B.; Fu, R.; He, H.; Matyjaszewski, K., Design and Preparation of Porous Polymers. *Chemical Reviews* **2012**, *112* (7), 3959-4015.
10. Zhang, S.; Wang, K. Y.; Chung, T. S.; Chen, H. M.; Jean, Y. C.; Amy, G., Well-constructed cellulose acetate membranes for forward osmosis: Minimized internal concentration polarization with an ultra-thin selective layer. *Journal of Membrane Science* **2010**, *360* (1-2), 522-535.
11. Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B., Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* **2007**, *318* (5849), 426-430.
12. Schneider, A.; Hemmerlé, J.; Allais, M.; Didierjean, J.; Michel, M.; d'Ischia, M.; Ball, V., Boric Acid as an Efficient Agent for the Control of Polydopamine Self-Assembly and Surface Properties. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**.

13. Alfieri, M.; Panzella, L.; Oscurato, S.; Salvatore, M.; Avolio, R.; Errico, M.; Maddalena, P.; Napolitano, A.; d'Ischia, M., The Chemistry of Polydopamine Film Formation: The Amine-Quinone Interplay. *Biomimetics* **2018**, *3*, 26.
14. Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B., Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science* **2007**, *318* (5849), 426-430.
15. Ball, V., Physicochemical perspective on “polydopamine” and “poly(catecholamine)” films for their applications in biomaterial coatings *Biointerphases* **2014**, *9* (3), 030801.
16. Yang, J.; Cohen Stuart, M. A.; Kamperman, M., Jack of all trades: versatile catechol crosslinking mechanisms. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43* (24), 8271-8298.
17. Mian, S. A.; Yang, L.; Saha, L. C.; Ahmed, E.; Ajmal, M.; Ganz, E., A Fundamental Understanding of Catechol and Water Adsorption on a Hydrophilic Silica Surface: Exploring the Underwater Adhesion Mechanism of Mussels on an Atomic Scale. *Langmuir* **2014**, *30* (23), 6906-6914.
18. Yu, J.; Kan, Y.; Rapp, M.; Danner, E.; Wei, W.; Das, S.; Miller, D. R.; Chen, Y.; Waite, J. H.; Israelachvili, J. N., Adaptive hydrophobic and hydrophilic interactions of mussel foot proteins with organic thin films. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (39), 15680-15685.
19. Anderson, T. H.; Yu, J.; Estrada, A.; Hammer, M. U.; Waite, J. H.; Israelachvili, J. N., The Contribution of DOPA to Substrate-Peptide Adhesion and Internal Cohesion of Mussel-Inspired Synthetic Peptide Films. *Advanced Functional Materials* **2010**, *20* (23), 4196-4205.
20. Lee, H.; Scherer, N. F.; Messersmith, P. B., Single-molecule mechanics of mussel adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (35), 12999-123003.
21. Ye, Q.; Zhou, F.; Liu, W., Bioinspired catecholic chemistry for surface modification. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (7), 4244-4258.
22. Klosterman, L.; Riley, J. K.; Bettinger, C. J., Control of heterogeneous nucleation and growth kinetics of dopamine-melanin by altering substrate chemistry. *Langmuir* **2015**, *31* (11), 3451-3458.
23. Zangmeister, R. A.; Morris, T. A.; Tarlov, M. J., Characterization of Polydopamine Thin Films Deposited at Short Times by Autoxidation of Dopamine. *Langmuir* **2013**, *29* (27), 8619-8628.
24. Zheng, W.; Fan, H.; Wang, L.; Jin, Z., Oxidative Self-Polymerization of Dopamine in an Acidic Environment. *Langmuir* **2015**, *31* (42), 11671-11677.
25. Chen, T.-P.; Liu, T.; Su, T.-L.; Liang, J., Self-Polymerization of Dopamine in Acidic Environments without Oxygen. *Langmuir* **2017**, *33* (23), 5863-5871.
26. Jiang, J.; Zhu, L.; Zhu, L.; Zhu, B.; Xu, Y., Surface characteristics of a self-polymerized dopamine coating deposited on hydrophobic polymer films. *Langmuir* **2011**, *27* (23), 14180-14187.
27. Tanuma, S.; Powell, C. J.; Penn, D. R., Calculation of electron inelastic mean free paths (IMFPs) VII. Reliability of the TPP-2M IMFP predictive equation. *Surface and Interface Analysis* **2003**, *35* (3), 268-275.

28. Ponzio, F.; Barthès, J.; Bour, J.; Michel, M.; Bertani, P.; Hemmerlé, J.; d'Ischia, M.; Ball, V., Oxidant Control of Polydopamine Surface Chemistry in Acids: A Mechanism-Based Entry to Superhydrophilic-Superoleophobic Coatings. *Chemistry of Materials* **2016**, *28* (13), 4697-4705.
29. Ball, V.; Del Frari, D.; Michel, M.; Buehler, M. J.; Toniazzo, V.; Singh, M. K.; Gracio, J.; Ruch, D., Deposition Mechanism and Properties of Thin Polydopamine Films for High Added Value Applications in Surface Science at the Nanoscale. *BioNanoScience* **2012**, *2* (1), 16-34.
30. Weidman, S. W.; Kaiser, E. T., The Mechanism of the Periodate Oxidation of Aromatic Systems. III. A Kinetic Study of the Periodate Oxidation of Catechol. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88* (24), 5820-5827.
31. Qiu, W.-Z.; Yang, H.-C.; Xu, Z.-K., Dopamine-assisted co-deposition: An emerging and promising strategy for surface modification. *Advances in Colloid and Interface Science* **2018**, *256*, 111-125.

CHAPITRE IV

Génération des fonctions haloamine

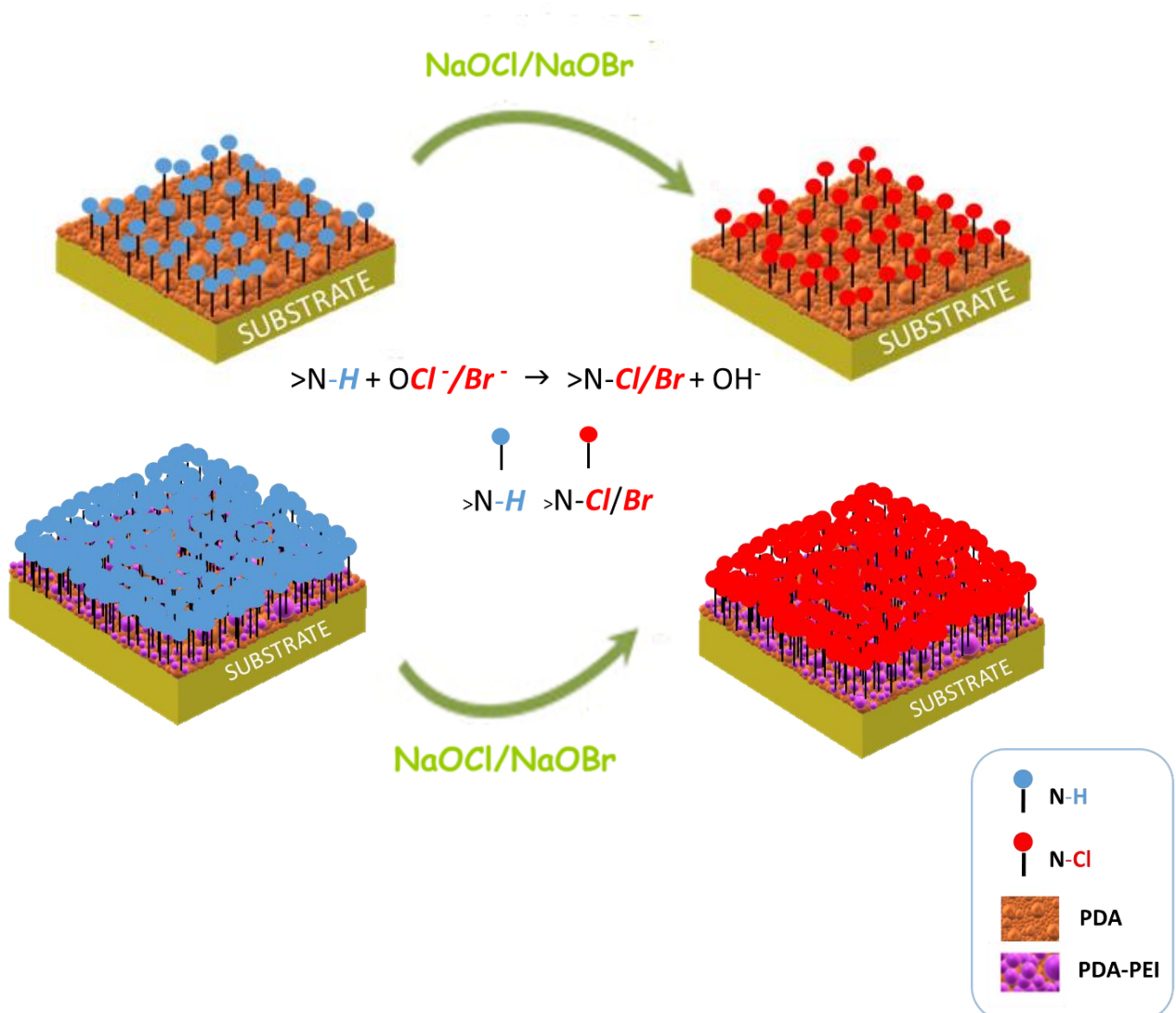


Table des matières

Introduction	150
1 Etude de la génération des fonctions haloamine à partir du revêtement PDA	152
1.1 A partir du revêtement PDA-O ₂	152
1.1.1 Génération des fonctions chloramine (N-Cl).....	152
1.1.1.1 Suivi cinétique de la chloration	152
1.1.1.1.1 Suivi <i>in situ</i>	152
1.1.1.1.2 Suivi <i>ex situ</i>	155
1.1.1.2 Caractérisations physico-chimiques.....	157
- Analyse PM-IRRAS	157
- Caractérisation XPS et XPS résolu en angle.....	158
- Mise en évidence des fonctions N-Cl par un test à la méthionine.....	160
- Observation MEB.....	161
- Caractérisation par mesure de l'angle de contact	162
- Quantification des fonctions N-Cl par titrage au TNB.....	163
1.1.1.3 Etude de la stabilité des fonctions N-Cl.....	164
1.1.2 Génération de fonctions bromamine (N-Br).....	165
1.2 A partir du dépôt <i>Grafting from</i> versus <i>Grafting to</i>	169
1.3 A partir d'un revêtement multicouche.....	172
1.4 A partir du dépôt de PDA-IO ₄ ⁻	174
1.4.1 Suivi cinétique de chloration	174
1.4.2 Caractérisation PM-IRRAS	175
1.4.3 Caractérisation XPS	176
1.4.4 Quantification des fonctions N-Cl par titrage au TNB.....	178
2 Etude de la chloration du revêtement composite PDA-PEI	179
2.1 Suivi cinétique de chloration du film composite PDA-PEI.....	179
2.2 Caractérisation physico-chimique par PM-IRRAS du film PDA-PEI-Cl	181
2.3 Caractérisation par XPS du film PDA-PEI-Cl.....	182
2.4 Quantification des fonctions N-Cl par titrage au TNB.....	183
Conclusion	185
Références.....	186

Nous avons pu montrer précédemment qu'il existait plusieurs voies de dépôt de la PDA faisant appel à des cinétiques différentes et conduisant à des morphologies de revêtement différentes. Nous avons pu voir également qu'il était possible d'enrichir en fonction amine notre revêtement par l'ajout d'un second polymère riche en fonction NH_2 qui est la PEI.

Nous arrivons maintenant à la deuxième étape de notre étude qui est la génération au sein du revêtement de fonctions chloramine (N-Cl) et bromamine (N-Br), fonctions aux propriétés antibactériennes. Ces fonctions sont générées respectivement grâce à l'hypochlorite et l'hypobromite de sodium, par une réaction de substitution entre un H d'une fonction amine du revêtement et Cl(+I) ou Br(+I) conduisant à la formation de fonctions haloamine.

Tout comme l'étude de la formation du film de PDA, nous avons mené un suivi cinétique de chloration pour mettre en évidence les différentes étapes et vitesses de génération de ces fonctions antibactériennes. Cette étude nous a permis de dégager les paramètres clés de la formation des fonctions telles que la concentration, le pH et la durée de la chloration/bromation et ainsi d'optimiser la génération des fonctions haloamine. Pour cela, la QCM, le PM-IRRAS et l'XPS ont été les trois principales techniques employées pour le suivi cinétique et pour la caractérisation physico-chimique des films obtenus. Par ailleurs, la mesure de l'angle de contact a également permis un suivi de la formation des fonctions haloamine. Enfin, la quantification de ces fonctions a été possible par un titrage chimique par le TNB (acide 5-thio-2-nitrobenzoïque).

Introduction

Comme il a été indiqué précédemment, le développement de biofilms bactériens en surface et aux interfaces représente un véritable enjeu de santé public mais également économique et environnemental¹⁻³. La formation des biofilms commence généralement avec seulement quelques bactéries. Afin d'adhérer au solide, les bactéries planctoniques s'accumulent sur les surfaces, produisent une matrice de polysaccharide agissant comme une forteresse, se multiplient et s'accumulent en amas cellulaires souvent sous forme de multicouches, conduisant à la formation de biofilms. Protégées par la matrice polymérique, les bactéries vivant dans les biofilms peuvent être jusqu'à 1000 fois plus tolérantes aux désinfectants que leurs homologues planctoniques⁴⁻⁵. Divers biocides, y compris les sels d'hypochlorite, le peroxyde d'hydrogène, les composés d'ammonium quaternaire, les sels d'argent, les alcools, l'iode, etc.... sont utilisés comme désinfectants⁶⁻⁷. Cependant, ces désinfectants ne se lient généralement pas aux biofilms préexistants, ce qui entraîne un temps de séjour court au sein de la matrice et donc un faible effet désinfectant contre les bactéries adhérentes vivantes dans le biofilm.

Une classe de composés antibactériens, les *N*-halamines, a suscité un grand intérêt ces dernières années. Ces composés contenant des liaisons covalentes azote-halogène, sont formés par halogénéation de groupes imide, amide ou amine. Les propriétés antimicrobiennes des *N*-halamines sont dues à l'halogène qui est au degré d'oxydation +I, qui peut réagir avec des récepteurs biologiques tels que les groupes thiol d'acides aminés au sein des bactéries. Cette réaction peut entraver le métabolisme des cellules telles que la respiration, en particulier les processus liés aux protéines, entraînant la mort des bactéries⁸⁻⁹. L'efficacité désinfectante des *N*-halamines est similaire à celle de l'eau de Javel à l'hypochlorite, mais ces composés sont plus stables, moins corrosifs, non toxiques et génèrent beaucoup moins de sous-produits de désinfection que l'eau de Javel¹⁰.

Diverses méthodes pour former des composés *N*-halamine sur des surfaces de substrats, telles que des méthodes de *Grafting to*^{11,12} et de *Grafting from*¹³⁻¹⁴, ont été décrites. Ces stratégies impliquent généralement la synthèse initiale de monomères de méthacrylate avec des

fractions bactéricides en bout de chaînes et une polymérisation ultérieure. Cependant, ces procédés demandent souvent soit un prétraitement de surface complexe, soit de longues procédures de formation du revêtement. La polydopamine (PDA) se révèle être un revêtement de choix, économique et facile à déposer. Dans cette étude, les fonctions antibactériennes *N*-halamine seront obtenues *a posteriori* sur un revêtement à base de PDA et un autre basé sur la PDA co-déposée avec la polyéthyléimine (PDA-PEI). On suppose que les groupements amine primaire ou secondaire dans la PDA et la PEI sont directement convertis en fonction haloamine par simple immersion dans une solution d'hypochlorite ou d'hypobromite de sodium, à pH basique.

Néanmoins, il faut garder en tête que la stabilité de la PDA dépend en grande partie du pH de la solution, donnant des taux de détachement des films jusqu'à 66% et 80% pour des pHs extrêmes de 1 et 14¹⁵. Cependant, l'augmentation de la force ionique des solutions aqueuses peut réduire le détachement du film de PDA dans des conditions d'acidité et de basicité fortes¹⁶.

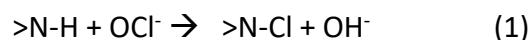
Aussi, pour répondre à cette problématique, un suivi cinétique de la chloration sera mené afin de définir les paramètres optimaux à savoir la concentration en NaOCl ou NaBr, le pH de la solution et le temps de chloration afin, tout en préservant l'intégrité du revêtement, de maximiser la densité de fonctions haloamine présentes au sein du film.

1 Etude de la génération des fonctions haloamine à partir du revêtement PDA

1.1 A partir du revêtement PDA-O₂

1.1.1 Génération des fonctions chloramine (N-Cl)

En solution, la génération des fonctions chloramine s'effectue par immersion de l'échantillon dans une solution d'eau de Javel qui permet après réaction des fonctions amine avec l'hypochlorite de créer les fonctions bactéricides N-Cl (Réaction 1). Connaissant l'instabilité du revêtement de PDA en milieu fortement acide ou basique pouvant amener à la dénaturation du film^{187, 217-218}, une première étude *in situ* par QCM a été menée afin de définir le temps adéquat et la concentration optimale en hypochlorite de sodium.



Après avoir optimisé ces deux paramètres clés de la chloration, le suivi cinétique du processus de chloration *ex situ* par PM-IRRAS, XPS, MEB et mesure d'angle de contact a été mené.

1.1.1.1 Suivi cinétique de la chloration

1.1.1.1.1 Suivi *in situ*

Pour ce suivi de la chloration *in situ* par QCM, nous avons choisi le revêtement PDA-O₂-24h, étudié précédemment, présentant la plus forte épaisseur et donc le plus grand taux de fonctions NH fonctionnalisables comparé au revêtement PDA-O₂-3h. Nous évaluerons la chloration de ce film à différentes concentrations en NaOCl et à différents pHs afin de faire varier la concentration en ion OCl⁻ (pK_a_{HOCI/OCl⁻} = 7,5). Les différentes réponses de la variation de la masse en fonction du temps de contact sont présentées sur la Figure 1.

CHAPITRE IV
Génération des fonctions haloamine

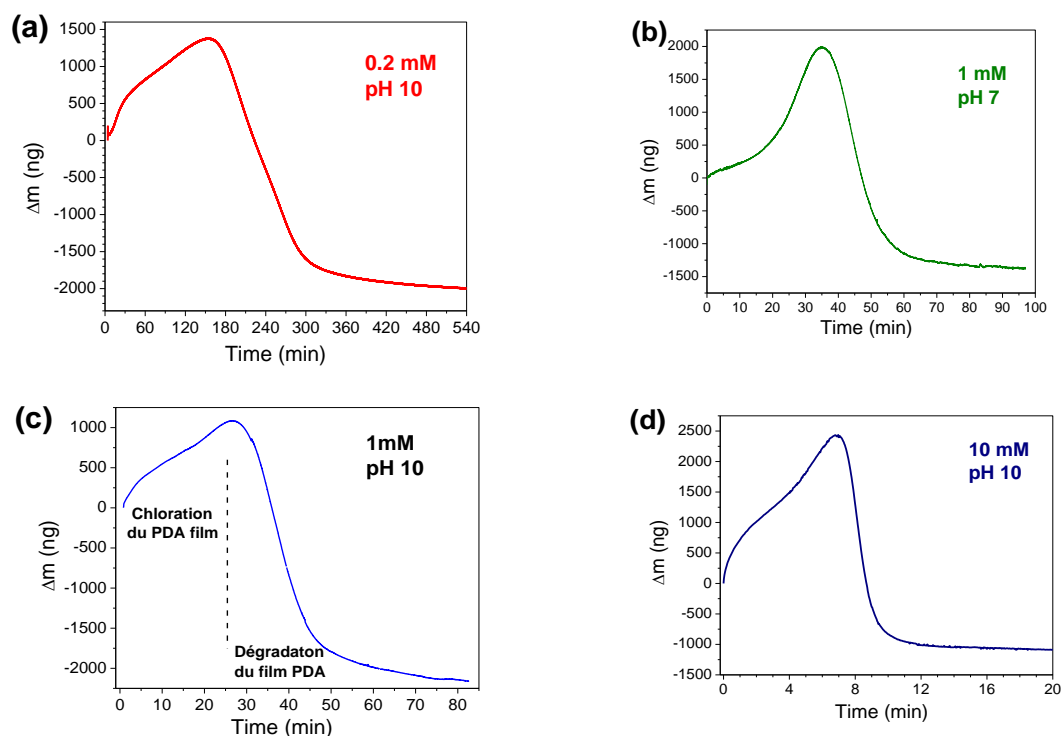


Figure 1 : Etude QCM de la chloration du film PDA-O₂-24h en présence de NaOCl (a) 0,2 mM à pH 10, (b) 1mM à pH 7. (c) 1 mM à pH 10 et (d) 10 mM à pH 10. Surface du quartz = 0,2 cm².

Tableau 1 : Résultats QCM. Moment auquel l'augmentation de masse du film PDA-O₂-24h au contact d'une solution de NaOCl d'une concentration et d'un pH donnés atteint l'optimum (données de la Figure 1).

NaOCl (mM)	0,2	1	1	1	10
pH	10	10	7	5	10
t _{Δm max} (min)	156	25	35	Pas de variation de masse	

L'augmentation de masse que l'on constate initialement est attribuée à la fixation du chlore, par substitution d'un atome d'hydrogène, sur et dans le film de PDA. Pour une solution à pH 10, quelle que soit la concentration en hypochlorite de sodium, l'allure de la courbe de variation de masse (Δm) en fonction du temps est la même. À savoir, on note d'abord une augmentation de masse rapide, atteignant progressivement un maximum correspondant au temps de chloration optimal en solution NaOCl. Ce profil révèle donc deux régimes cinétiques différents comme l'indique les deux pentes différentes de la courbe. On peut supposer que le

premier régime, au début du processus, correspond à la chloration de la surface du film de PDA avec une limitation cinétique due à la diffusion des ions OCl^- du sein de la solution vers le film alors que le second régime, plus lent, est attribué à la chloration du film avec une limitation cinétique par diffusion des ions OCl^- à l'intérieur du polymère. On peut remarquer qu'à pH 7, l'allure de la réponse est différente ; cela peut s'expliquer par une augmentation du pH à l'interface film/solution due à la libération d'ions OH^- (Réaction 1) et donc à une augmentation de la concentration interfaciale des ions OCl^- puisque le pH interfacial augmente.

Dans un deuxième temps, après avoir atteint le maximum de variation de masse, la masse du film diminue atteignant une valeur inférieure à la valeur initiale. Cette observation peut être expliquée par la dégradation du revêtement PDA lors d'une longue exposition à la solution de NaOCl. En effet, comme il a été évoqué précédemment, le mécanisme de substitution de H par Cl (+ I) (Réaction 1) conduit à la libération d'hydroxyle et ainsi à une augmentation du pH interfacial local, qui peut conduire à une dégradation progressive du film de PDA. Le temps optimal de chloration est fonction de la concentration de NaOCl, ce dernier diminue, pour un pH égal à 10, avec l'augmentation de la concentration passant de 156 min pour une concentration de 0,2 mM à 25 min pour 1 mM et enfin 7 min pour 10 mM (Tableau 1). Pour la suite de cette étude, une concentration de 1 mM a été choisie. Dans cette condition, comme le montre la Figure 1(c), le Δm maximal est de 1080 ng. Ainsi, la quantité de chlore fixée dans le film de PDA est estimée à $1,9 \cdot 10^{16}$ atomes et en tenant compte d'une épaisseur moyenne du film de 40 nm (selon l'étude précédente du dépôt de film de PDA, voir *Chapitre III*), nous avons pu calculer une densité d'atomes de Cl (d_{Cl}) égale à $2,3 \cdot 10^{22}$ at.cm⁻³ (Equation 1).

$$d_{\text{Cl}} = \frac{\Delta m}{(M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}}) * S * e_{\text{PDA}}} * N_A \quad (\text{Eq. 1})$$

Si nous comparons ce résultat avec la densité en atome d'azote théorique dans le film de PDA qui est de $5,3 \cdot 10^{21}$ at.cm⁻³, une surestimation de la densité de chlore est obtenue par QCM puisqu'un rapport N/Cl supérieur à 1 est obtenu, ce qui est théoriquement impossible. Cela est confirmé par les analyses XPS présentées dans la suite de cette étude qui révèle un rapport N/Cl inférieur à 1 indiquant que le nombre d'atomes de Cl immobilisés est bien inférieur à

celui des atomes d'azote constituant le film de PDA. Cette surestimation peut provenir du piégeage d'autres ions (K^+ , Na^+ , Mg^+ pour exemple) au sein de la structure PDA, ions présents dans l'eau de Javel. Il faut rappeler, que ce suivi se fait *in situ*, contrairement à l'étude *ex situ* XPS pour laquelle les substrats sont rincés avant analyse. De plus, l'analyse XPS montre la présence de Na^+ (Na1s à 1071 eV) qui est le contre-ion de ClO^- et Cl^- suggérant la présence de chlore libre n'ayant pas substitué un atome d'hydrogène d'un groupe N-H, et ce même après le rinçage des échantillons. Par conséquent, la variation de masse, observée *in situ* par QCM, n'est pas uniquement due à du chlore lié au film de PDA, et donc dans ces conditions, une quantification des groupes N-Cl par QCM n'est pas possible.

1.1.1.1.2 Suivi ex situ

Pour compléter l'étude QCM, une étude *ex situ* du suivi de la chloration des films de PDA a été réalisée par PM-IRRAS et XPS sur les revêtements PDA-O₂-3h et PDA-O₂-24h. Les résultats sont présentés sur la Figure 2. Le choix d'intégrer dans cette étude en plus du revêtement 24h, le dépôt à 3h, est motivé par le fait d'étudier l'influence de l'épaisseur du revêtement sur la cinétique de chloration et la quantité de fonctions chloramine immobilisées et donc sur les propriétés antibactériennes *a posteriori*.

On constate que pour ce suivi cinétique de chloration *ex situ*, les résultats de l'étude QCM sont confirmés pour le film PDA-O₂-24h pour une chloration à 1 mM en NaOCl à pH 10 (Figure 2(b)). En effet, une forte diminution de l'intensité des pics IR caractéristiques de la PDA est observée au bout de 25 minutes de chloration jusqu'à une disparition complète après 50 min révélant ainsi la dégradation du revêtement en accord avec les résultats QCM. Le suivi par XPS des rapports atomiques N/C, Au/C et Cl_{total}/N , en fonction de la durée de la chloration, présenté dans la Figure 2(c,d) est également un moyen de définir le temps optimal de chloration. Ainsi on constate pour le revêtement PDA-O₂-24h (Figure 2(d)), qu'au bout de 25 minutes de chloration, le rapport Cl_{total}/N subit une évolution, à savoir une diminution alors que le rapport Au/C jusqu' alors nul (le signal de l'or n'étant pas visible avant 25 minutes de chloration) augmente fortement révélant ainsi la dégradation du film. La diminution du rapport Cl_{total}/N donc la diminution de chlore sur la surface du film confirme également la destruction de la

PDA en surface. De même, en suivant ce raisonnement, le temps de chloration optimal pour le revêtement 3 h est estimé à 15 min (Figure 2(a) et 2(c)).

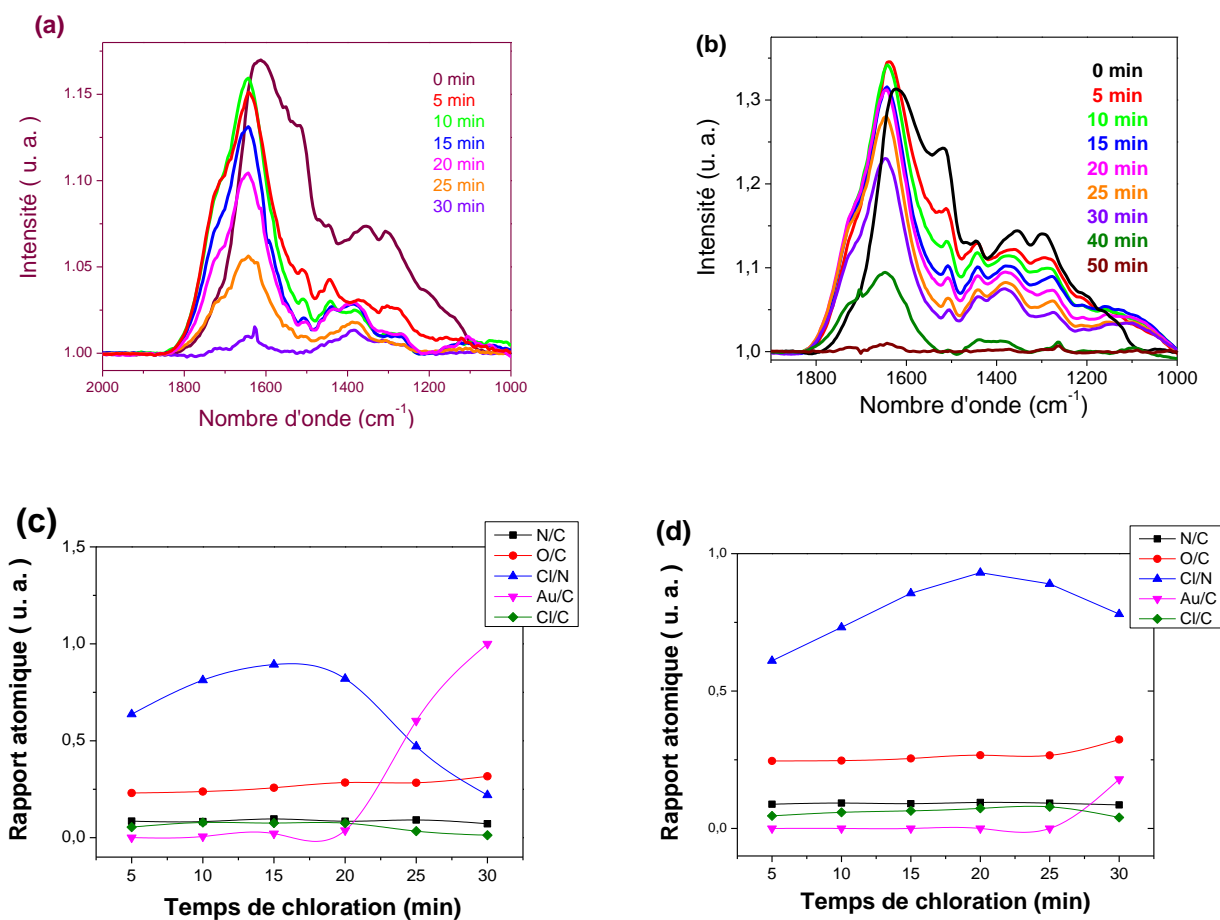


Figure 2 : Suivi cinétique *ex situ* de la chloration des revêtements PDA-O₂-3h et PDA-O₂-24h par immersion dans une solution à 1mM en NaOCl à pH 10. Evolution du spectre PM-IRRAS d'un revêtement (a) PDA-O₂-3h, (b) PDA-O₂-24h en fonction du temps d'immersion dans une solution NaOCl à 1mM. Evolution des rapports des % atomiques obtenus par XPS du revêtement (c) PDA-O₂-3h et (d) PDA-O₂-24h en fonction du temps d'immersion dans une solution de NaOCl.

1.1.1.2 Caractérisations physico-chimiques

- Analyse PM-IRRAS

L'évolution des spectres PM-IRRAS des films de PDA-O₂-3h et PDA-O₂-24h déposés sur surface d'or et chlorés durant 15 et 20 minutes respectivement par une solution d'hypochlorite de sodium à 1 mM est présenté sur la Figure 3.

On constate dans un premier temps qu'après chloration, un changement des spectres IR des films PDA-O₂-3h et PDA-O₂-24h est observé. En effet ces derniers révèlent une forte diminution du pic à 1515 cm⁻¹, pic attribué à la vibration de déformation de la liaison amine δ(N-H) suggérant donc la création de fonctions chloramine. On constate également un décalage du pic caractéristique du cycle aromatique passant de 1620 cm⁻¹ à 1645 cm⁻¹. Ce changement peut être une conséquence du greffage d'atomes de chlore sur des atomes d'azote situés à proximité du cycle aromatique modifiant l'environnement chimique de ce dernier. Enfin, l'apparition d'un épaulement vers 1720 cm⁻¹ dont l'intensité augmente avec le temps de chloration (Figures 2 et 3) peut être attribuable à l'apparition de fonctions carboxyliques dues à l'oxydation du revêtement PDA au contact des ions hypochlorite.

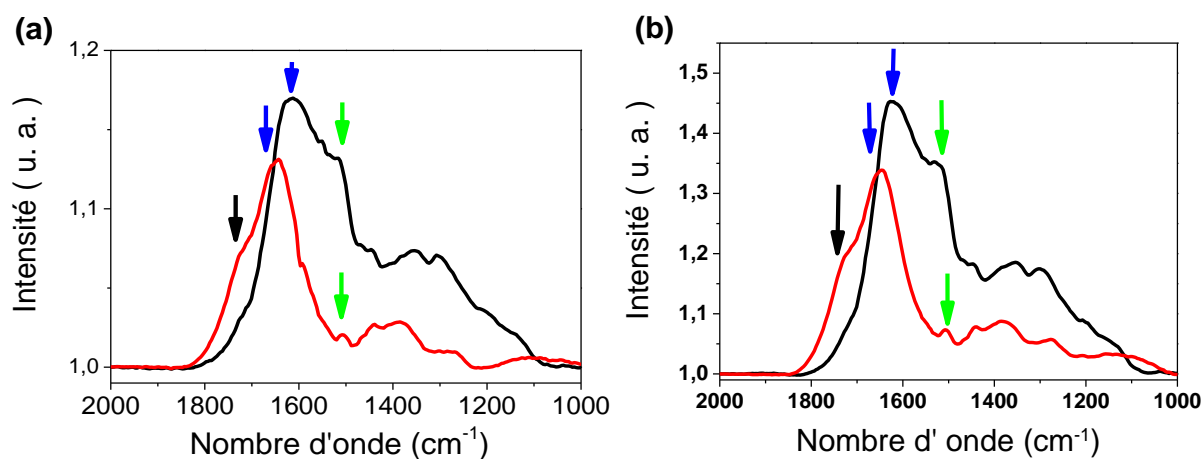


Figure 3 : Spectres PM-IRRAS d'un revêtement (a) PDA-O₂-3h et (b) PDA-O₂-24h sur surface d'or avant (en noir) et après (en rouge) immersion dans une solution à 1 mM en NaOCl durant 20 minutes. Les flèches vertes indiquent le pic N-H, les flèches bleues indiquent le pic C=C et la flèche noire le pic centré à 1720 cm⁻¹.

- Caractérisation XPS et XPS résolu en angle

La composition chimique de la surface des films PDA-O₂-3h chloré (15 nm d'épaisseur) et PDA-O₂-24h chloré (40 nm d'épaisseur) a ensuite été déterminée par XPS. Sur les spectres généraux, les contributions de chlore sont détectées à une énergie de liaison de 200 eV (Cl2p) et 280 eV (Cl2s) (Figure 4). Les spectres haute résolution du chlore Cl2p pour les revêtements PDA-O₂-3h-Cl et PDA-O₂-24h-Cl sont représentés sur les Figures 4 (c) et 4 (d), respectivement, présentant deux types de contribution. La plus intense est détectée à une énergie de liaison (EN) de 200,5 eV et 202,1 eV (Cl2p_{3/2} et Cl2p_{1/2}, respectivement) tandis que le deuxième doublet apparaît à une EN inférieure, 197,6 eV et 199,2 eV. La détection du Cl2p à une énergie de liaison d'environ 200,5 eV, nommée Cl₂₀₀, est attribuée à la liaison N-Cl tandis que le doublet à plus basse énergie de liaison est quant à lui attribué à des chlorures libres non-liés au film de PDA.

Le rapport Cl₂₀₀ /N1s pour les revêtements chlorés PDA-O₂-3h et PDA-O₂-24h (Tableau 2) révèle une quantité similaire de chlore immobilisé pour les deux échantillons.

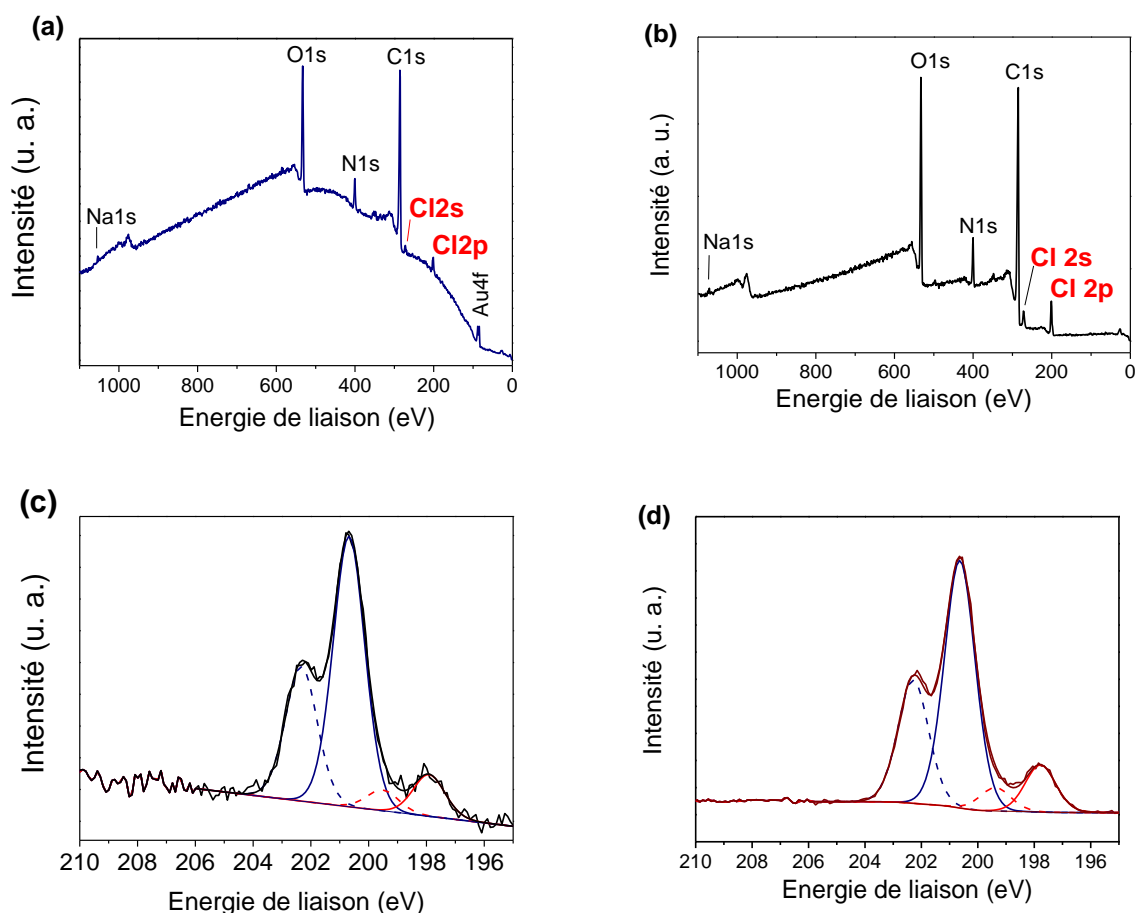


Figure 4 : Caractérisations XPS de la surface d'or revêtue de films de PDA-O₂-3h (a et c) et PDA-O₂-24h (b et d) après immersion dans une solution NaOCl 1 mM : (a, b) spectres généraux, (c, d,) spectres haute résolution Cl2p. Lignes pleines : contribution Cl2p_{3/2}, lignes pointillées : contribution Cl2p_{1/2}.

Tableau 2 : Compositions chimiques en pourcentage atomique des revêtements PDA-O₂-3h et PDA-O₂-24h sur plaque d'or obtenues par analyse XPS et rapport entre N et C.

	C1s	N1s	O1s	Au4f	N/C	Cl ₁₉₈	Cl ₂₀₀	Cl ₂₀₀ /N
PDA-O2-3h-Cl	69,3	5,7	19,4	1,1	0,08	0,6	3,9	0,68
PDA-O2-24h-Cl	69,85	6,45	18,9	-	0,09	0,8	4,0	0,62

À la suite de l'analyse XPS, le greffage de chlore au sein du film PDA est confirmé. L'analyse XPS permet d'analyser une épaisseur de film d'environ 12 nm. Cependant en faisant varier l'angle de collecte des photoélectrons c'est-à-dire en effectuant une analyse XPS résolue en angle (AR-XPS), il est possible d'évaluer l'homogénéité du film en profondeur. Cette analyse a

été effectuée pour les revêtements PDA chlorés à 3 h et à 24 h. La composition chimique des films a été déterminée à 3 angles de collecte différents (90°, 45° et 15° par rapport à la surface de l'échantillon), une émission normale (90°) permet de sonder l'épaisseur du film (12 nm) tandis qu'une émission rasante (15°) présente une sensibilité de l'extrême surface. Le Tableau 3 montre que quel que soit l'angle d'analyse, le rapport Cl₂₀₀/N pour les revêtements chlorés PDA-O₂-3h et PDA-O₂-24h sont similaires confirmant que la chloration du film PDA se produit non seulement sur la surface mais aussi à l'intérieur du film.

Tableau 3 : Rapport de pourcentage atomique entre Cl₂₀₀ et N obtenu par XPS à différents angles de détection (AR-XPS), des angles sont définis par rapport à la surface de l'échantillon pour les surfaces en or revêtues de PDA chloré.

	PDA-O2-3h-Cl			PDA-O2-24h-Cl		
Angle	15°	45°	90°	15°	45°	90°
Cl ₂₀₀ /N	0,69	0,67	0,59	0,61	0,62	0,69

- Mise en évidence des fonctions N-Cl par un test à la méthionine

Comme on a pu le voir au cours du *Chapitre I*, l'oxydation de fonctions thiol est la voie la plus employée dans l'identification des N-halamines et est une méthode complémentaire à l'analyse XPS. La présence des liaisons chloramine peut notamment être prouvée de façon qualitative par un test à la méthionine, méthode décrite dans le *Chapitre I*.

Une analyse XPS permet ainsi de vérifier la disparition de la contribution de la liaison N-Cl du chlore. Pour ce test, un substrat d'or fonctionnalisé d'un film de PDA-O₂-Cl a été immergé dans une solution de méthionine à 0,1M durant 4 heures puis rincé à l'eau distillée. L'échantillon a été par la suite analysé par XPS, les résultats sont présentés sur la Figure 5.

On constate sur le spectre général et sur le spectre haute résolution la disparition du pic du Cl2p centré à 200 eV confirmant ainsi la présence de fonctions chloramine au sein de la structure PDA-Cl.

On notera enfin l'apparition du pic Au4f à hauteur de 0,3% atomique révélant une légère dégradation du revêtement au cours du test due au caractère oxydant de la méthionine.

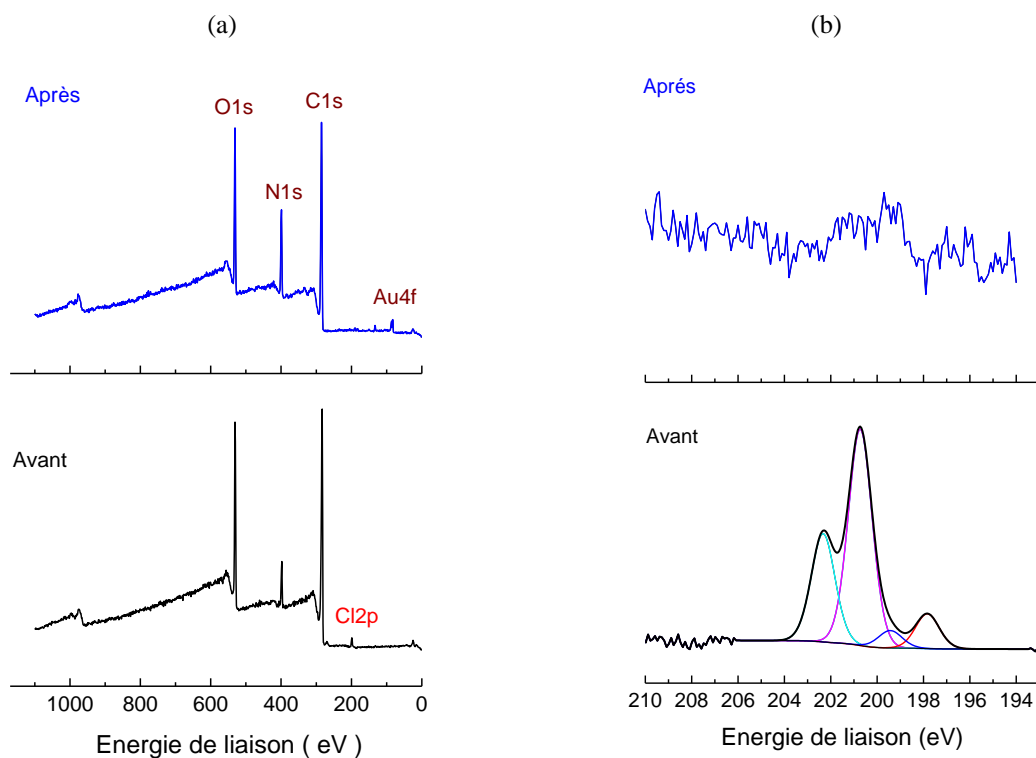


Figure 5 : Analyse XPS d'un substrat d'or recouvert d'un revêtement PDA-O₂-Cl avant (en bas) et après (en haut) immersion durant 4h dans une solution de méthionine à 0,1M. (a) Spectre général ; (b) Spectre Cl2p à haute résolution.

- Observation MEB

L'effet de la chloration sur la morphologie de la surface du PDA a été étudié par MEB (Figure 6). Les micrographies révèlent une évolution de la surface après chloration avec une forte diminution des nanoparticules de PDA liées au revêtement de surface et non éliminées lors de l'étape de rinçage par sonication. Par conséquent, il semble qu'il y ait une surface moins rugueuse après la chloration en raison du caractère oxydant des ions OCl^- , permettant ainsi de « lisser » la surface du film.

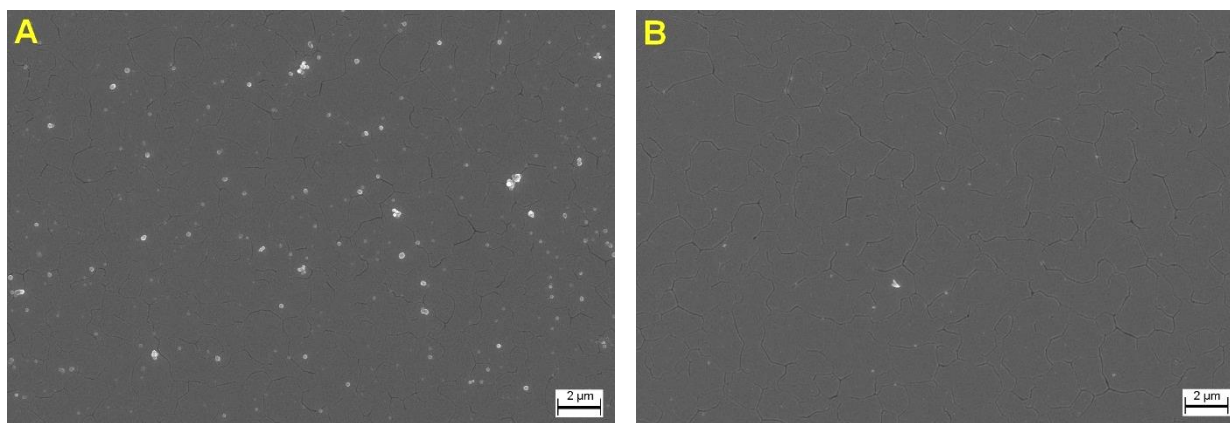


Figure 6 : Micrographies MEB des films PDA-O₂-24h formés sur substrat d'or (A) avant et (B) après une immersion de 20 minutes dans une solution de NaOCl à 1 mM à pH 10.

- Caractérisation par mesure de l'angle de contact

Comme il a été montré dans le *Chapitre III*, la PDA forme un revêtement hydrophile présentant un angle de contact avec l'eau proche de 60°²⁰ au bout de 24 h de dépôt. Le suivi de la mouillabilité s'est révélé être un outil complémentaire du suivi du dépôt de la PDA (*Cf. Chapitre III*), technique qui a également été employée comme moyen de suivi de l'évolution des propriétés de mouillabilité du revêtement au cours de la chloration et ainsi confirmer les estimations QCM et PM-IRRAS concernant le temps optimal de chloration pour une solution à 1 mM en NaOCl à pH 10 (Figure 7).

Le suivi de la mouillabilité du revêtement de PDA-O₂-24h au cours de la chloration montre une très forte diminution de l'angle de contact que forme une goutte d'eau à la surface du revêtement. Après 20 minutes de chloration une valeur de 37° est obtenue, mettant ainsi en avant une augmentation du caractère hydrophile du dépôt due à la présence de chlore favorisant les liaisons hydrogènes. Au-delà de 20 minutes de chloration, on observe une ré-augmentation de l'angle de contact pouvant être la conséquence de la dégradation du revêtement modifiant les propriétés de mouillabilité de ce dernier et confirmant ainsi les données QCM et PM-IRRAS.

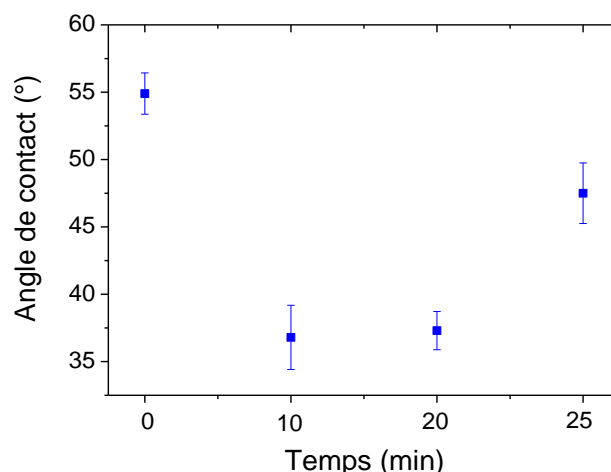


Figure 7 : Evolution de l'angle de contact eau/substrat en fonction de la durée de la chloration du film PDA-O₂-24h.

- Quantification des fonctions N-Cl par titrage au TNB

Enfin, la mise en évidence de la présence et la quantification des fonctions chloramine au sein des revêtements PDA-O₂-3h-Cl et PDA-O₂-24h-Cl ont été menées par un titrage chimique au TNB. En présence de fonctions chloramine, le TNB (solution de couleur jaune) est oxydé en dimère correspondant (DTNB) (Figure 8(a)). Cette réaction est accompagnée d'une perte d'absorbance (A) à 412 nm permettant grâce à l'équation 2 d'estimer la densité d'atome de chlore (+I) (d_{Cl}) et donc de fonctions N-Cl. Les résultats de ce dosage sont présentés sur la Figure 8 (b) et dans le Tableau 4²¹.

$$d_{Cl} = \frac{A_{PDA} - A_{PDA-Cl}}{2 * \epsilon * l * V_{coating}} * V_{TNB} * N_A \quad (\text{Eq. 2})$$

La quantité des liaisons N-Cl présentes dans le film PDA-O₂-24h-Cl a été estimée en tenant compte d'une épaisseur du film PDA de 40 nm (Cf. Chapitre III), la densité atomique d_{Cl} est égale à $2,5 \cdot 10^{21}$ at.cm⁻³ (Equation 2). Pour le film PDA-O₂-3h-Cl, la densité d_{Cl} est égal à $3,15 \cdot 10^{21}$ à cm⁻³, en tenant compte d'un film d'épaisseur de 15 nm (Cf. Chapitre III). La comparaison de ces densités avec la densité d'azote de la PDA $d_N = 5,3 \cdot 10^{21}$ at.cm⁻³ en prenant une densité de PDA de 1,49 g cm⁻³ montre qu'entre 50 et 60 % des atomes N sont chlorés, ce résultat confirme les résultats XPS (Tableaux 2, 3 et 4).

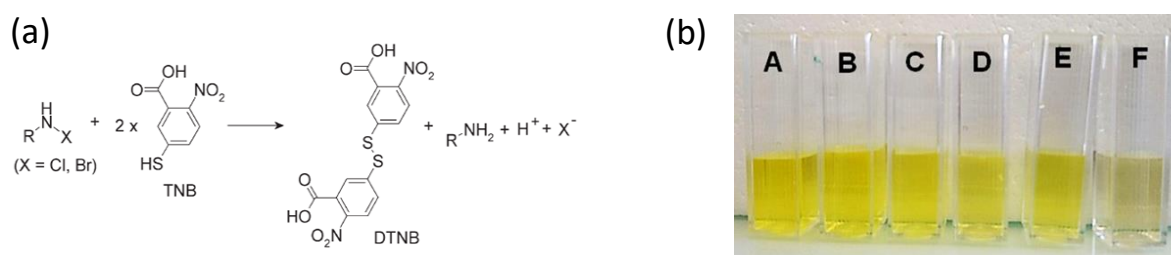


Figure 8 : (a) Réaction entre une fonction haloamine et le TNB. (b) Mise en évidence des fonctions chloramine par TNB avec des images optiques de cuvettes (1 cm) contenant la solution de TNB après 24h d'immersion. (A) solution de TNB non modifiée. Immersion du substrat (B) Au ; (C) film PDA-O₂-3h. (D) Film PDA-O₂-3h-Cl. (E) film PDA-O₂-24h et (F) film PDA-O₂-24h-Cl.

Tableau 4 : Absorption de la solution de TNB à 412 nm après 24 h d'immersion de divers échantillons, nombre d'atomes de chlore et densité (Eq.2) de chloramine dans les revêtements PDA-O₂-3h-Cl et PDA-O₂-24h-Cl estimés par dosage TNB. Rapport Cl/N prenant en compte une densité N de 5,3 10²¹ at.cm⁻³.

	Abs. at 412 nm	Cl (at.)	d _{Cl} (at.cm ⁻³)	Cl/N
PDA-O ₂ -3h	1,4	---	---	
PDA-O ₂ -3h-Cl	0,9	2,0 10 ¹⁶	3,1 10 ²¹	0,59
PDA-O ₂ -24h	1,3	---	---	
PDA-O ₂ -24h-Cl	0,3	4,0 10 ¹⁶	2,5 10 ²¹	0,47

1.1.1.3 Etude de la stabilité des fonctions N-Cl

Des tests de stabilité des films chlorés ont été réalisés dans différents milieux tel que l'air ambiant, pour le stockage des surfaces avant utilisation, ou des milieux tels que le PBS ou le milieu de culture LB dans l'optique des tests microbiologiques sur les différentes surfaces. Il est en effet important de connaître la stabilité des fonctions chloramine dans ces différents environnements. Nous avons pour cela mené une étude par XPS en suivant les rapports atomiques N/C, Cl_{total}/C, Cl₂₀₀/N et O/C avant et après 5 jours d'immersion d'un revêtement PDA-O₂-24h-Cl dans les milieux évoqués, en comparaison avec un film de PDA non chloré ; les résultats sont présentés sur la Figure 9.

On retrouve les mêmes rapports atomiques avant et après les différents tests. On rappellera que l'analyse XPS ne sonde qu'une épaisseur de revêtement de 12 nm environ, nous n'avons ainsi qu'une information sur la composition de surface. Cependant, on constate d'après les résultats XPS que les revêtement PDA et PDA-Cl semblent stables dans le temps pour les différents milieux étudiés.

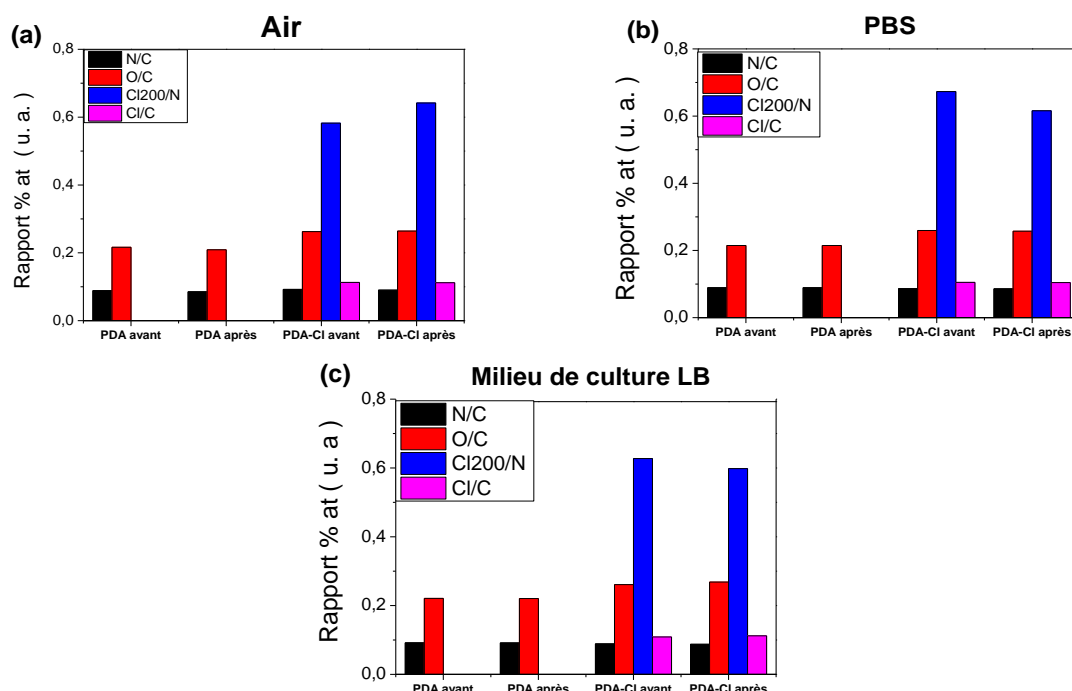


Figure 9 : Suivi du rapport des % atomiques obtenus par XPS des revêtements PDA-O₂-24h et PDA-O₂-24h-Cl avant et après une immersion durant 5 jours (a) à l'air, (b) dans du PBS et (c) dans le milieu de culture LB.

1.1.2 Génération de fonctions bromamine (N-Br)

Tout comme pour le greffage de fonctions N-Cl, la création des fonctions bromamine s'effectue par la mise en présence de fonctions amine primaire ou secondaire avec des ions hypobromite (BrO⁻) ($pK_{a_{HOB r/OBr^-}} = 8,7$).

Dans cette étude, nous avons choisi une concentration initiale en NaOBr de 1 mM tout comme pour la solution de NaOCl. La préparation de cette solution de NaOBr s'effectue par le mélange d'une solution d'eau de Javel et de NaBr conduisant à la Réaction (2) d'oxydation des ions hypochlorite au contact des ions Br⁻ :



Pour ce premier test, un revêtement PDA-O₂-24h été mis en contact dans une solution de NaOBr à 1 mM.

L'étude a été dans un premier temps menée *in situ* par QCM afin d'estimer le temps de bromation optimal. Les résultats sont présentés sur la Figure 10

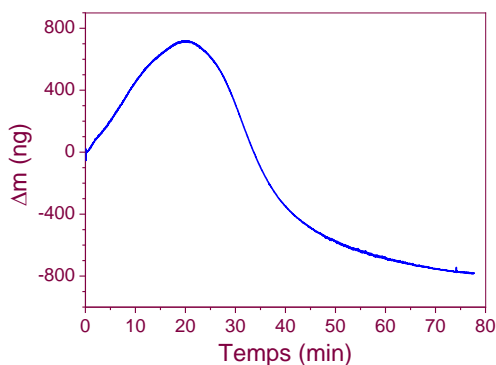


Figure 10 : Etude par QCM de la bromation du film PDA-O₂-24h dans 1 mM NaOBr. Surface du quartz = 0,2 cm².

Dans un premier temps, on peut noter que le profil de la courbe est similaire à la chloration de la PDA à savoir augmentation de la prise de masse durant les 20 premières minutes de la bromation suivi d'une forte diminution allant jusqu'à un niveau inférieur à celui de départ.

Cette augmentation que l'on observe initialement est attribuée à la fixation du brome, par substitution d'atomes d'hydrogène dans le film PDA, cette augmentation rapide atteint progressivement un maximum correspondant au temps de bromation optimal en solution NaOBr qui est ici de 20 minutes environ. Ce profil révèle, tout comme pour la chloration, deux régimes cinétiques différents indiqués par les deux pentes différentes de la courbe. On peut attribuer le premier, au début, à la bromation de la surface du film de PDA avec une limitation cinétique due à la diffusion des ions OBr⁻ du sein de la solution vers le film. Quant au second régime, plus lent, il peut être imputé à la bromation du film avec une limitation cinétique par diffusion des ions OBr⁻ à l'intérieur du polymère.

Atteignant le maximum de variation de masse, cette dernière diminue pour atteindre une valeur inférieure à la valeur initiale. Cette observation peut être expliquée par la dégradation du revêtement PDA lors d'une longue exposition à la solution de NaOBr. En effet, comme il a

été évoqué précédemment pour la chloration du revêtement, le mécanisme de substitution de H par Br(+I) conduit à la libération d'ions hydroxyle et ainsi à une augmentation du pH local, qui peut conduire une dégradation progressive du film PDA.

On remarquera enfin que le temps optimal de bromation à 1 mM avant le début de la dégradation du revêtement est estimé à environ 20 minutes ce qui est équivalent à la chloration pour la même concentration en élément oxydant.

Cette étude a été par la suite complétée par des analyses *ex situ* par PM-IRRAS et XPS, pour lesquelles nous avons choisi un temps de réaction de 4 minutes afin de se placer avant le début de la dégradation du revêtement. Les résultats des analyses PM-IRRAS et XPS sont présentés en Figure 11 et dans le Tableau 5.

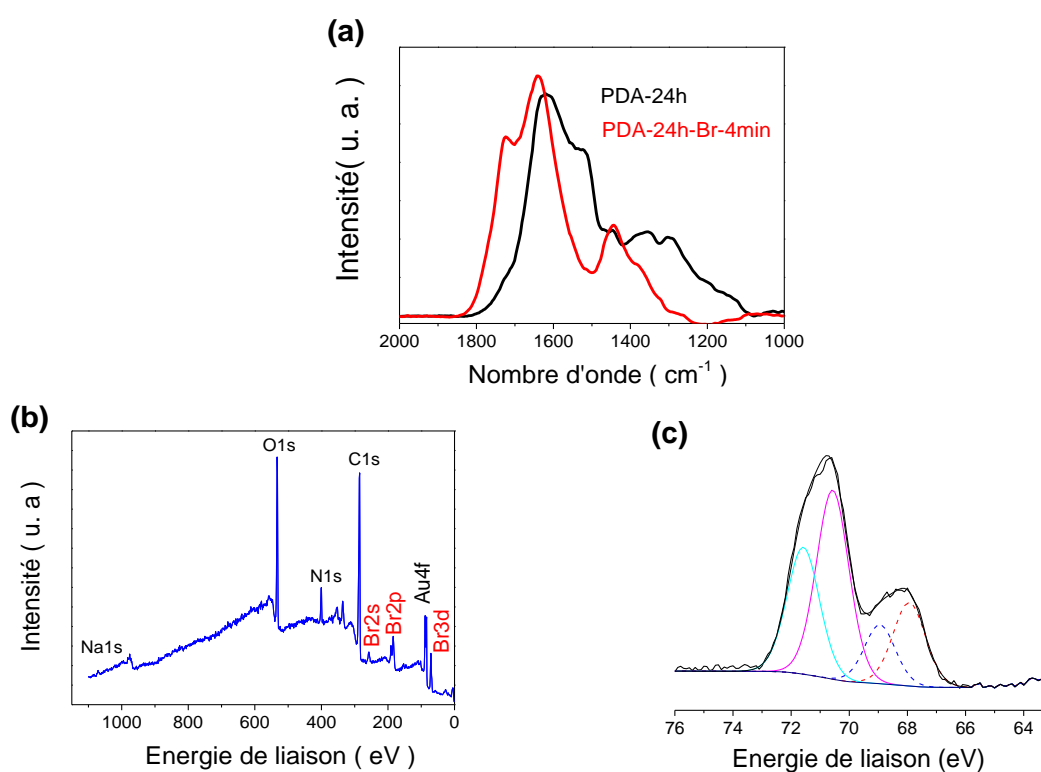


Figure 11 : Caractérisation d'un revêtement PDA-O₂-24h après 4 minutes d'immersion dans une solution de NaOBr à 1 mM. (a) Spectre PM-IRRAS avant (en noir) et après (en rouge) immersion dans une solution de NaOBr. Analyse XPS du revêtement PDA après immersion dans une solution de NaOBr, (b) spectre général et (c) spectre de haute résolution du photopic Br3d.

Tableau 5 : Composition chimique en at% obtenue par analyse XPS et rapport entre N et C du film PDA-O₂-24h-Br.

	C	N	O	Au	Na1s	N/C	Br ₆₈	Br _{70.6}	Br _{70.6} /N
PDA-O₂-24h-Br	66,3	6,8	18,5	2,3	0,6	0,1	1,8	3,7	0,5

Les résultats PM-IRRAS révèlent, tout comme pour la chloration, une forte diminution du pic à 1515 cm⁻¹ attribué à la liaison amine δ(N-H) suggérant donc la création de fonctions bromamine (Figure 11(a)). On constate également un décalage du pic caractéristique de l'aromatique passant de 1620 cm⁻¹ à 1645 cm⁻¹ accompagné de l'apparition d'un pic intense à 1720 cm⁻¹ de la liaison C=O du groupement carboxylique témoignant d'une oxydation de la structure PDA.

Quant à l'analyse XPS, on observe la présence de brome au sein du revêtement à travers l'apparition sur le spectre général (Figure 11 (b)) des photopics à diverses énergies de liaison : Br2s (257 eV), Br2p (189 eV) et Br3d (69 eV). Si l'on analyse le spectre à haute résolution en énergie du niveau Br3d, on constate deux environnements du brome, une première contribution à une énergie de liaison de 70,7 eV que l'on peut attribuer au brome lié à la structure organique et une autre contribution à 68,0 eV attribuée au brome non lié. On notera que le pourcentage atomique du contre ion Na⁺ est bien inférieur à celui du brome libre Br⁻ suggérant ainsi que la présence de ce contre ion ne semble pas une condition nécessaire à la présence du Br⁻ dans la structure, comme cela avait été le cas suite à la chloration.

Le rapport Br3d_{70.6}/N est égal à 0,5, soit légèrement inférieur au rapport Cl₂₀₀/N obtenu lors de la chloration qui est environ de 0,6. Ainsi, on montre de par ces résultats une bromation réussie avec un degré de substitution par Br(+ I) relativement équivalent à celui par Cl(+ I).

Enfin, l'analyse XPS fait apparaître la présence du photopic de l'or Au4f à une énergie de liaison de 84 eV révélant que l'on commence à détruire une partie du revêtement au bout de 4 minutes d'immersion à une concentration de 1 mM en NaOBr.

1.2 A partir du dépôt *Grafting from* versus *Grafting to*

Pour rappel, nous avons précédemment étudié deux modes de dépôt de la PDA-O₂ : à partir du monomère (*Grafting from* qui est la voie classique) et à partir de la PDA déjà formée en solution (*Grafting to*). Par un suivi du dépôt par PM-IRRAS à partir d'une solution de dopamine/Tris et d'une solution de PDA murie durant 24 h, il a été montré dans le *Chapitre III* qu'un dépôt de film de PDA est possible en *Grafting to*.

Ici nous allons étudier la chloration de ce revêtement *Grafting to* après différents temps de dépôt et comparer avec le dépôt *Grafting from* étudié précédemment, afin d'évaluer la stabilité de ce revêtement formé, pour rappel, d'empilement d'agrégats de PDA.

Les différents types de revêtements ont été immergés dans une solution de NaOCl à 1 mM durant 10 minutes. Des analyses PM-IRRAS et XPS ont été menées et les résultats sont présentés sur les Figures 12, 13 et 14 et dans le Tableau 6.

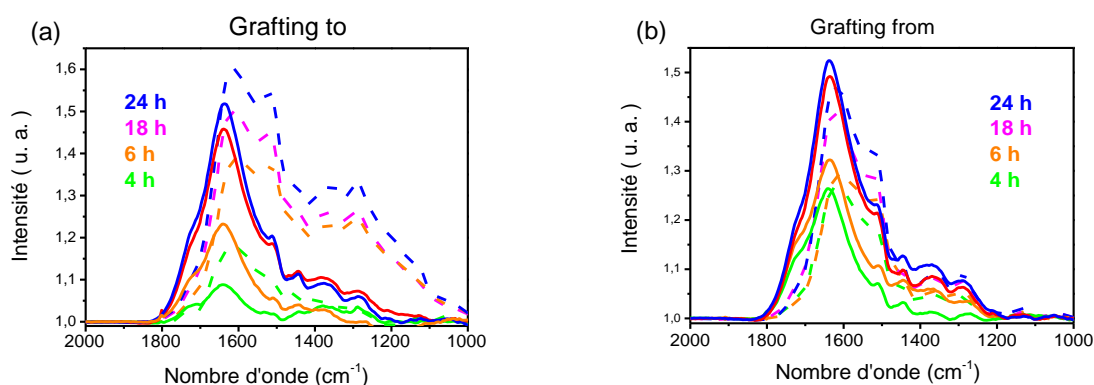


Figure 12 : Spectres PM-IRRAS des revêtements PDA déposés par voie (a) *Grafting to* (b) *Grafting from*, avant (tiret) et après (trait plein) chloration dans une solution de NaOCl à 1 mM durant 10 minutes pour différents temps de dépôt (4, 6, 18 et 24 h).

Ce qui transparaît des spectres PM-IRRAS (Figures 12 (a) et (b)) est que l'on retrouve l'évolution des spectres après chloration à savoir une diminution du pic N-H à 1515 cm⁻¹, un shift du pic de l'aromatique C=C vers les plus hauts nombres d'onde et l'apparition d'un épaulement à 1720 cm⁻¹ caractéristique de la liaison C=O de la fonction carboxylique témoignant de l'oxydation des fonctions catéchol de la PDA. On remarque une légère différence entre le dépôt *Grafting to* et *Grafting from*, une plus forte diminution de l'intensité

des pics après chloration, est constatée pour le premier dépôt. Ce qui laisserait penser que le dépôt *Grafting to* est moins stable, néanmoins la comparaison reste à prendre avec précaution, puisque l'on compare des intensités prises sur des revêtements de substrats différents. Un suivi d'épaisseur devra être mené afin de confirmer cette observation

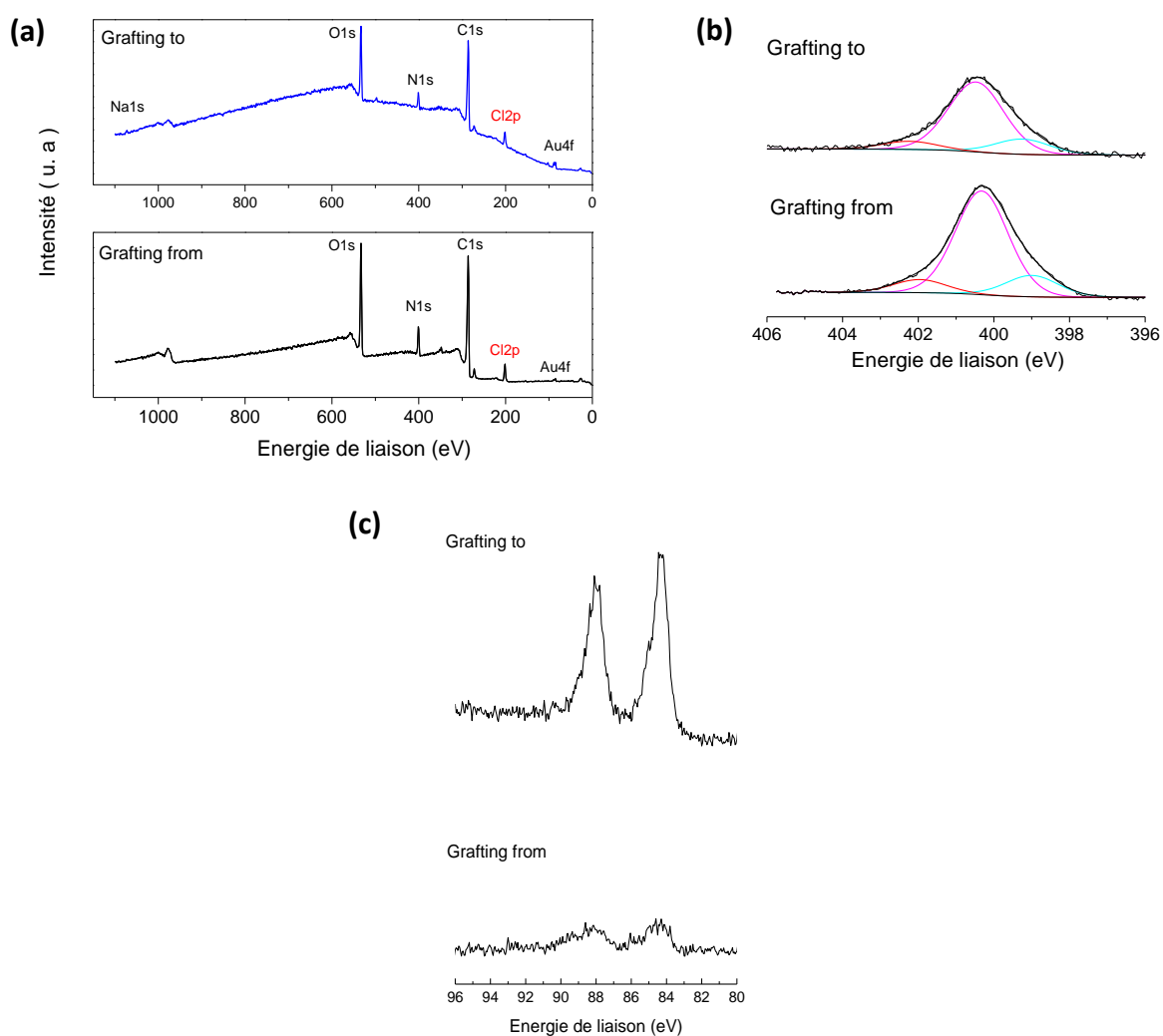


Figure 13 : Analyses XPS après chloration du revêtement PDA-O₂-6h *Grafting to* (en haut) et *Grafting from* (en bas) (a) spectre général, (b) spectre haute résolution du photopic N1s et (c) spectre haute résolution du photopic Au4f.

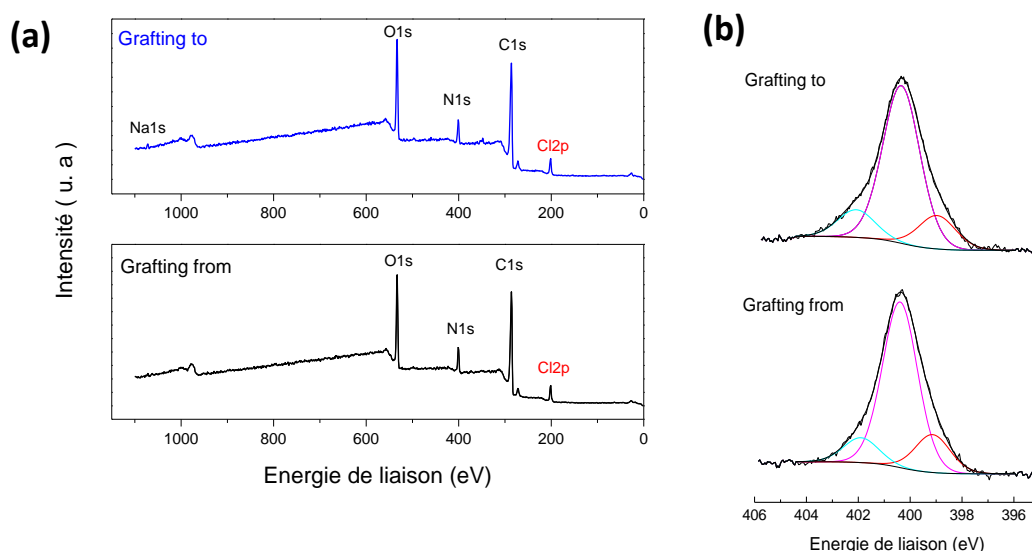


Figure 14 : Analyses XPS après chloration du revêtement PDA-O₂-24h *Grafting to* (en haut) et *Grafting from* (en bas) (a) spectre général, (b) et spectre haute résolution du photopic N1s.

Tableau 6 : Compositions chimiques en % atomique obtenues par analyses XPS et rapport entre Cl₂₀₀ et N des films PDA-O₂-6h-Cl et PDA-O₂-24h-Cl dont le revêtement a été déposé sur plaque d'or suivant un mode *Grafting to* ou *Grafting from*.

		C	N	O	Au	Na	N/C	Cl ₁₉₈	Cl ₂₀₀	Cl ₂₀₀ /N
PDA-O ₂ -6h-Cl	<i>Grafting to</i>	67,1	6,3	19,4	0,9	0,9	0,07	1,5	3,9	0,6
	<i>Grafting from</i>	66,0	7,7	21,1	0,6	-	0,11	1,0	3,6	0,5
PDA-O ₂ -24h-Cl	<i>Grafting to</i>	66,2	7,4	20,8	-	0,9	0,10	1,1	3,6	0,5
	<i>Grafting from</i>	69,9	6,4	18,9	-	-	0,09	0,8	4,0	0,6

L'étude a été complétée par une analyse XPS en sélectionnant 2 temps de dépôt 6h et 24h, les résultats sont présentés sur les Figures 13 et 14, respectivement, et les données correspondantes sont regroupées dans le Tableau 6. On observe pour le revêtement 6h une légère différence entre le dépôt *Grafting to* et *Grafting from*. En effet, après 10 minutes de chloration à 1 mM, le pourcentage atomique de l'or du revêtement *Grafting to* après chloration semble plus élevé (3 fois plus) que pour le dépôt classique pouvant laisser penser à une dégradation plus importante du revêtement (Figure 13(c)). Néanmoins, là encore cette différence n'est pas assez significative pour conclure à une véritable instabilité du revêtement

Grafting to (on passe d'un %at d'or de 0,3 à 0,1 sachant que l'erreur est de 0,1% en XPS). Concernant maintenant les rapports atomiques Cl_{200}/N , pour le dépôt PDA-O2-24h, il semblerait qu'il y ait moins de substitution par le chlore pour le revêtement déposé par voie *Grafting to* alors que pour le film PDA-O2-6h la tendance est inversée. La conclusion sur cette observation reste difficile car un seul point du dépôt a été analysé, une étude à différents endroits du substrat permettrait une étude plus précise du film.

1.3 A partir d'un revêtement multicouche

L'étude d'un revêtement multicouche a fait suite à la volonté d'augmenter l'épaisseur du dépôt limitée par voie classique à 40-50 nm, ceci afin de pouvoir avoir davantage de fonctions chloramine et donc une meilleure efficacité du revêtement dans le temps.

Il a été montré dans le *Chapitre III* une augmentation linéaire de l'épaisseur du film de PDA au cours du temps par rapport au dépôt classique qui arrive rapidement à un palier. L'utilisation du protocole de dépôt par multicouches successives permet ainsi d'atteindre des épaisseurs plus importantes : 80 nm pour un dépôt 5 couches correspondant à un temps de dépôt totale de 20 heures.

Pour le suivi de chloration, un revêtement 6 couches correspondant à un dépôt total de 24 heures (6 dépôts de 4 heures chacun, à l'aide d'une solution fraîche dopamine/Tris à 0,5 mg/mL, ont été effectués) a été mis en contact dans une solution de NaOCl à 1 mM à pH 10. Le suivi de la chloration a été mené dans un premier temps *in situ* par QCM, le résultat est présenté sur la Figure 15.

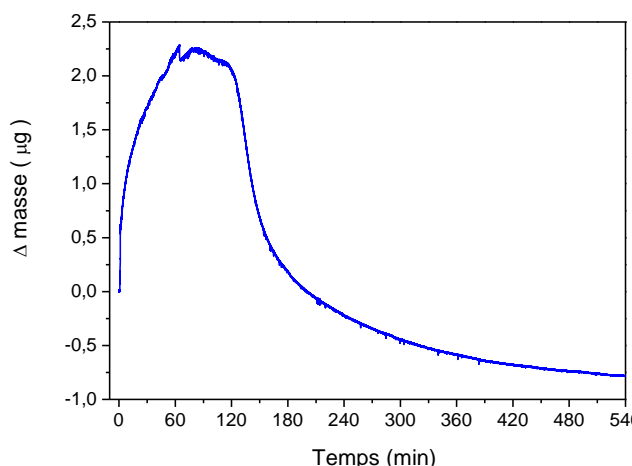


Figure 15 : Suivi de la chloration d'un revêtement 6 couches de PDA correspondant à un dépôt total de 24 heures (6 x 4h) par QCM.

Le suivi *in situ* par QCM, révèle tout comme pour le revêtement monocouche PDA-O₂-24h, une augmentation rapide de la masse atteignant un maximum au bout de 60 minutes, attribuée à la fixation du chlore sur et dans le film PDA-multicouche et correspondant donc au temps de chloration optimal en solution NaOCl à 1 mM. Ce profil révèle également deux régimes cinétique différents : le premier semble correspondre à la chloration de la surface du film PDA avec une limitation cinétique par la diffusion des ions OCl⁻ dans la solution, quant au second plus lent, pourrait être attribué à la chloration du film dans le *bulk* avec une limitation cinétique par diffusion des ions OCl⁻ à l'intérieur du polymère

Cette augmentation laisse place, pour des temps de contact plus élevés, à une diminution de la prise de masse atteignant une valeur inférieure à la valeur initiale, conséquence de la dégradation du revêtement PDA lors d'une longue exposition à la solution de NaOCl. Comme évoqué précédemment, la quantification de la quantité de chlore substitué ne peut être qu'estimée par QCM dû à une surestimation comme démontré précédemment. Néanmoins, il reste possible de comparer le Δm du film PDA-multicouche avec celui du film PDA-O₂-24h classique ; on constate ainsi une plus grande prise de masse passant de 1,8 à 2,3 μg . Il semblerait qu'il y aurait plus de chlore immobilisé dans la structure film PDA-multicouche par rapport au film équivalent PDA-O₂-24h. Une quantification par dosage chimique au TNB devra être menée pour confirmer cette tendance.

1.4 A partir du dépôt de PDA-IO₄⁻

Comme il a été introduit dans le chapitre précédent, une autre voie de synthèse de la PDA a été étudiée reposant sur l'utilisation d'un oxydant plus fort que O₂, permettant une augmentation de la vitesse de croissance du film de PDA et de l'épaisseur du film de PDA (jusqu'à 100 nm après 10 heures de dépôt).

Un suivi de la chloration du film par PM-IRRAS et XPS a été mené en se plaçant dans les mêmes conditions que pour les études précédentes, à savoir une immersion dans une solution d'eau de NaOCl à 1 mM à pH 10.

1.4.1 Suivi cinétique de chloration

Pour ce suivi de chloration, un dépôt de PDA-IO₄⁻ a été analysé après immersion durant différents temps dans une solution de NaOCl à 1 mM, la cinétique de chloration a été suivie par PM-IRRAS et XPS, les résultats sont présentés sur la Figure 16.

Qualitativement, le suivi de la chloration du film de PDA-IO₄⁻ par PM-IRRAS révèle une décroissance rapide de l'intensité des pics caractéristiques de la PDA au bout de 15 minutes de chloration signifiant le début de la dégradation du film.

Le suivi par XPS des rapports atomiques N/C, O/C et Cl_{total}/N, en fonction de la durée de la chloration, présenté sur la Figure 16(b) est également un moyen de définir le temps optimal de chloration. Ainsi on constate qu'au bout de 25 minutes de chloration les 2 rapports Cl_{total}/N et O/C subissent une diminution pour le premier et une augmentation pour le second révélant ainsi la dégradation du film. L'enrichissement en oxygène témoigne d'une suroxydation de ce dernier conduisant à la dégradation du film²¹⁹. La diminution du rapport Cl_{total}/N donc la diminution de chlore sur la surface du film confirme également la destruction de la PDA en surface.

Au vu de ces résultats, on peut donc fixer le temps optimum de chloration du revêtement PDA-IO₄⁻ à 20 minutes.

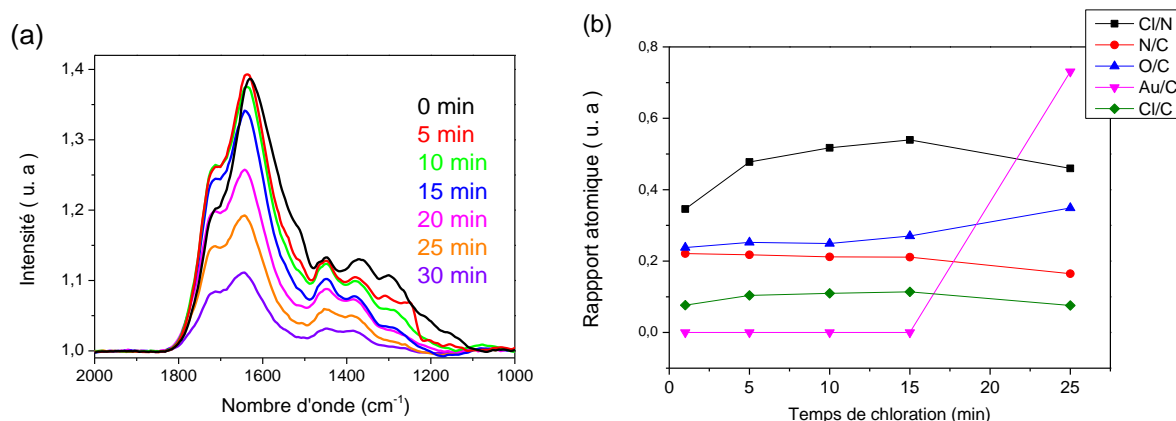


Figure 16 : Suivi de la chloration d'un revêtement PDA-IO₄⁻ par (a) PM-IRRAS et (b) par suivi des rapports atomiques obtenus par XPS.

1.4.2 Caractérisation PM-IRRAS

L'évolution du spectre PM-IRRAS du revêtement PDA-IO₄⁻-24h après 20 minutes d'immersion dans une solution de NaOCl à 1 mM est présenté sur la Figure 17. On constate une forte diminution du pic à 1515 cm⁻¹ attribué à la vibration de déformation de la liaison amine δ(N-H) suggérant donc la création de fonctions chloramine. On remarque également un décalage du pic caractéristique de l'aromatique passant de 1640 cm⁻¹ à 1655 cm⁻¹. Comme indiqué précédemment, ce changement peut être une conséquence du greffage d'atomes de chlore sur des atomes d'azote situés à proximité de l'aromatique cycle modifiant l'environnement chimique de ce dernier. Enfin, l'intensification du pic à 1720 cm⁻¹ caractéristique d'un enrichissement en fonctions carboxylique dû à l'oxydation du revêtement PDA au contact des ions OCl⁻. On rappellera en effet que la PDA produite en utilisant le périodate de sodium comme oxydant présente un état hyper oxydé dû au fort pouvoir oxydant du périodate²⁰.

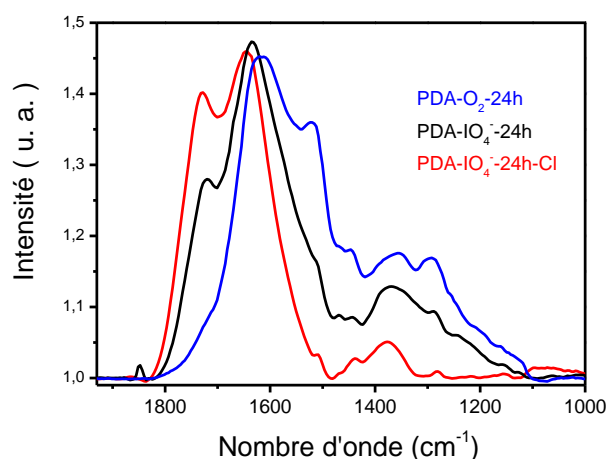


Figure 17 : Spectre PM-IRRAS des revêtements (en bleu) PDA-O₂-24h, (en noir) PDA-IO₄⁻-24h et (en rouge) PDA-IO₄⁻-24h-Cl après 20 minutes d'immersion dans une solution de NaOCl à 1 mM.

1.4.3 Caractérisation XPS

La composition chimique obtenue par XPS du film de PDA-IO₄⁻-24h après 20 minutes d'immersion dans une solution de NaOCl à 1 mM a été étudiée par une analyse XPS présentée sur la Figure 18 et dont les données sont regroupées dans le Tableau 7.

Sur le spectre général (Figure 18(a)), les deux contributions du chlore sont détectées à une énergie de liaison de 200 eV (Cl2p) et 280 eV (Cl2s), on note également que le signal de l'iode I3d apparaît sur le spectre général. Le spectre de haute résolution du chlore Cl2p présenté en Figures 18(b), révèle deux types de contributions. La plus intense est détectée à une EN de 200,3 eV et 201,9 eV (Cl2p_{3/2} et Cl2p_{1/2}, respectivement) tandis que le deuxième doublet apparaît à des EN inférieures, 197,3 eV et 199,0 eV. La détection du Cl2p à une énergie de liaison d'environ 200,5 eV, nommée Cl₂₀₀, est attribuée à la liaison N-Cl, en opposition à celle à plus basse EN qui est attribuée à du chlore libre. Enfin, le rapport Cl₂₀₀/N1s de 0,34 pour ces revêtements chlorés révèle une quantité de chlore immobilisé inférieur au revêtement PDA-O₂ (Tableau 7). Cela peut être dû à la présence d'iode au sein de la structure dont une partie pourrait être liée aux fonctions amine formant des liaisons N-I, rendant ainsi l'immobilisation de chlore moins importante. Cette observation est confirmée par un test à la méthionine (le revêtement étant immergé durant 4 heures dans une solution de méthionine à 0,1 M), révélant après le test la disparition du pic de haute résolution de l'iode I3d (Figure 18(c)).

Ainsi, les résultats PM-IRRAS complétés par les analyses XPS confirment la création de fonctions chloramine au sein de la structure de PDA.

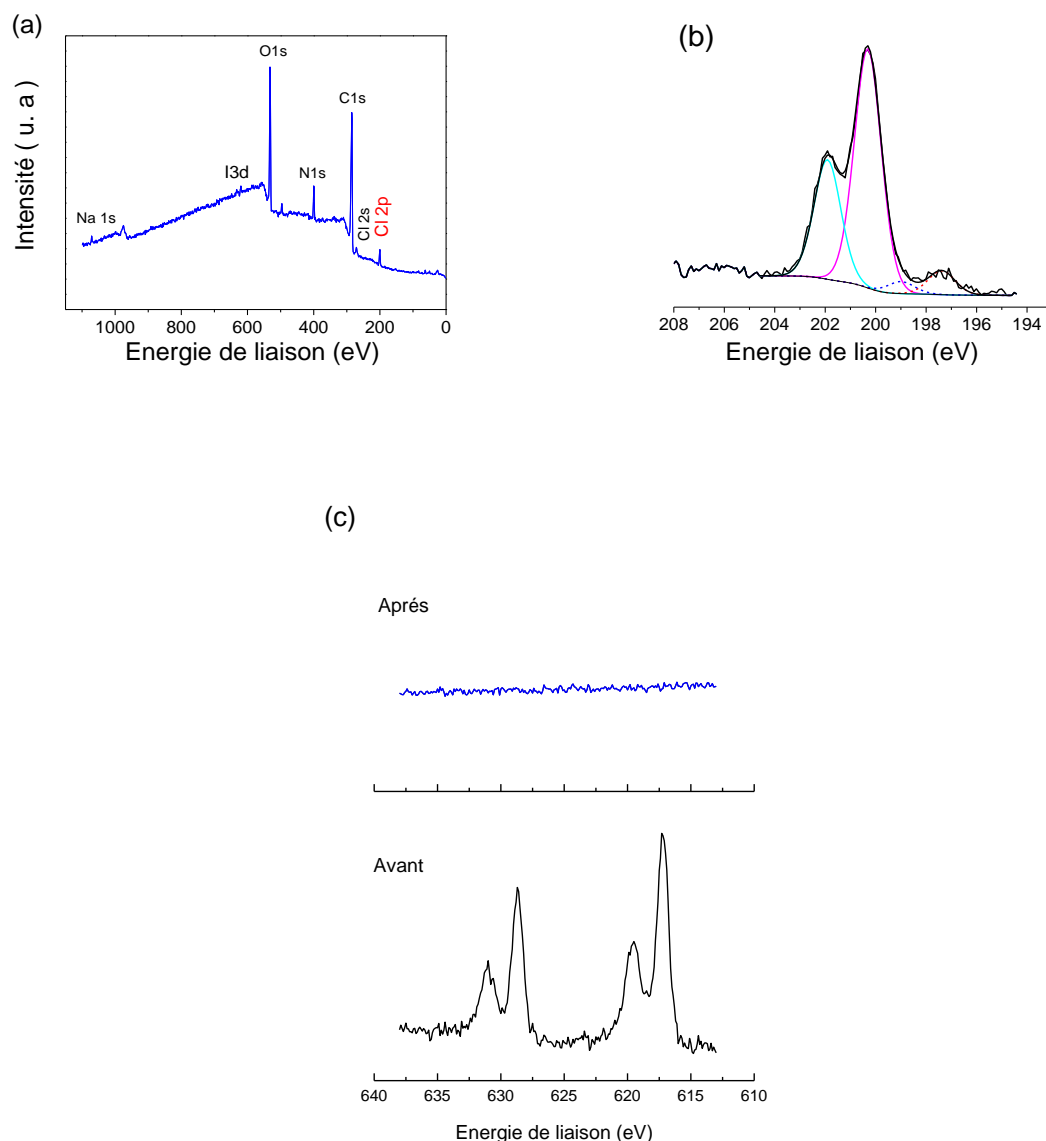


Figure 18 : Caractérisation XPS de surface d'or fonctionnalisée d'un revêtement PDA-IO₄⁻-24h-Cl. (a) spectre général, (b) spectre haute résolution du Cl_{2p} et (c) spectre haute résolution du I_{3d} (en bas) avant et (en haut) après immersion dans une solution de méthionine à 0,1M.

Tableau 7 : Composition chimique en pourcentage atomique obtenue par XPS et les rapports N/C et Cl/N associés au revêtement PDA-IO₄⁻-24h après immersion dans une solution de NaOCl à 1 mM durant 20 minutes.

	C	N	O	I	Au	Na	N/C	Cl ₁₉₈	Cl ₂₀₀	Cl ₂₀₀ /N
PDA-IO₄⁻-Cl	66,6	7,7	21,4	0,4	-	0,7	0,1	0,5	2,7	0,3

1.4.4 Quantification des fonctions N-Cl par titrage au TNB

La mise en évidence de la présence et la quantification des fonctions chloramine au sein du revêtement PDA-IO₄⁻-Cl ont été menées par un titrage chimique au TNB. Pour rappel le TNB (couleur jaune), en présence de fonctions chloramine est oxydé en dimère (DTNB) s'accompagnant d'une perte de couleur (chute de l'absorbance 412 nm). On peut ainsi estimer la densité d'atome de chlore (+I) et donc de fonctions N-Cl. Les résultats de ce dosage sont présentés en Figure 19 et dans le Tableau 8.

La quantité des liaisons N-Cl présentes dans le film PDA-IO₄⁻ a été estimée en tenant compte d'une épaisseur du film PDA de 100 nm (*Cf. Chapitre III*), la densité atomique d_{Cl} est égale à 5,8 10²⁰ at.cm⁻³. La comparaison de ces densités avec la densité d'azote de la PDA d_N = 5,3 10²¹ at.cm⁻³ en prenant une densité de PDA de 1,49 g cm⁻³ montre que 10 % des atomes N sont chlorés, ce résultat est 3 fois moins élevé que le pourcentage estimé par XPS (Tableau 8).

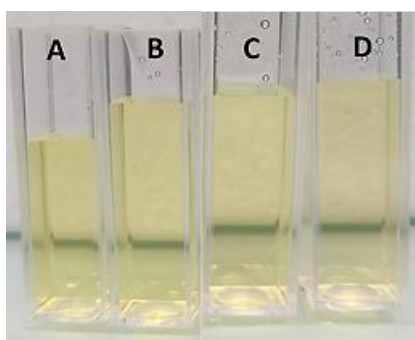


Figure 19 : Mise en évidence des fonctions chloramine : par TNB avec des images optiques de cuvettes (1 cm) contenant la solution de TNB après 24h d'immersion. (A) solution de TNB non modifiée. Immersion du substrat (B) Au ; (C) film PDA-IO₄⁻ (D) film PDA-IO₄⁻-Cl.

Tableau 8 : Absorption de la solution de TNB à 412 nm après 24 h d'immersion de divers échantillons, nombre d'atomes de chlore et densité (Eq.2) de chloramine dans les revêtements PDA-IO₄⁻ et PDA-IO₄⁻-Cl estimés par dosage TNB. Rapport Cl/N prenant en compte une densité N de 5,3 10²¹ at.cm⁻³.

	A at 412 nm	Cl (at.)	d _{Cl} (at.cm ⁻³)	Cl/N
PDA-IO ₄ ⁻	0,77	---	---	
PDA-IO ₄ ⁻ -Cl	0,50	5,8 10 ¹⁵	5,0 10 ²⁰	0,1

2 Etude de la chloration du revêtement composite PDA-PEI

Nous avons jusqu'à maintenant étudié la chloration des revêtements PDA-O₂ et PDA-IO₄⁻ et montré une immobilisation de fonctions chloramine, à hauteur de la moitié des fonctions amine pour le premier et d'un tiers pour le second revêtement. Comme il a été évoqué précédemment, l'ajout du PEI au sein de la structure PDA, permet un enrichissement en fonction amine confirmé dans le *Chapitre III* en atteignant une augmentation en atome d'azote de 42 %. Il semblerait ainsi que l'on puisse immobiliser plus de fonctions chloramine par rapport aux deux autres voies de dépôt étudiées (PDA-O₂ et PDA-IO₄⁻).

Aussi, un suivi cinétique de chloration a été effectué dans un premier temps *in situ* par QCM puis complété par des études *ex situ* à travers une analyse par PM-IRRAS. Une analyse élémentaire du revêtement par XPS a également été menée afin d'avoir une information sur la présence de chlore lié et déterminer le rapport Cl/N.

2.5 Suivi cinétique de chloration du film composite PDA-PEI

Lors de cette étude deux concentrations en NaOCl ont été employées, une concentration à 1 mM et une autre à 10 mM afin d'évaluer l'incidence de la concentration en NaOCl sur la stabilité du film composite. En effet, comme il a été indiqué au cours du *Chapitre I*, la PEI joue le rôle de réticulant au sein de la structure de PDA permettant ainsi d'obtenir des revêtements PDA plus stables et donc d'envisager des chlорations avec une plus forte concentration en NaOCl.

Ainsi, un quartz d'or fonctionnalisé avec le composite PDA-PEI-24h a été immergé dans une solution de NaOCl puis un suivi de l'évolution de la variation de fréquence en fonction du temps a été enregistré. En parallèle, un suivi *ex situ* sur plaques d'or a été mené par PM-IRRAS, les résultats sont présentés sur la Figure 20.

Les différentes analyses par QCM et par PM-IRRAS révèlent une stabilité du film PDA-PEI plus importante que pour les revêtements PDA-O₂ et PDA-IO₄⁻. En effet on constate qu'à une

concentration en NaOCl de 1 mM, on atteint un maximum de chloration du film après plus d'une heure, en comparaison d'un temps de 20 min pour les revêtements PDA-O₂ et PDA-IO₄⁻. Cette stabilité du revêtement provient du rôle réticulant de la PEI se positionnant entre deux unités de dopamine oxydée. Le suivi *in situ* avec une concentration en NaOCl de 10 mM révèle une dégradation du revêtement à partir de 10 minutes ce qui est confirmé par le suivi *ex situ* mené par PM-IRRAS. Ainsi, un traitement à une concentration de 10 mM en NaOCl permet d'atteindre un temps de chloration avant dégradation comparable à celui obtenu pour les revêtements PDA-O₂ et PDA-IO₄⁻ et ce à une concentration 10 fois plus importante. Concernant la prise de masse optimale atteinte avant dégradation, elle est de 3 µg pour un quartz de surface 0,2 cm² pour une solution à 10 mM en NaOCl, soit environ 3 fois plus que pour les deux autres modes de dépôt suggérant une immobilisation de fonctions chloramine plus importante même si on le rappelle qu'une quantification par QCM n'est pas absolue. Ainsi pour la suite de notre étude sur les films PDA-PEI, nous poursuivrons avec une concentration en NaOCl de 10 mM.

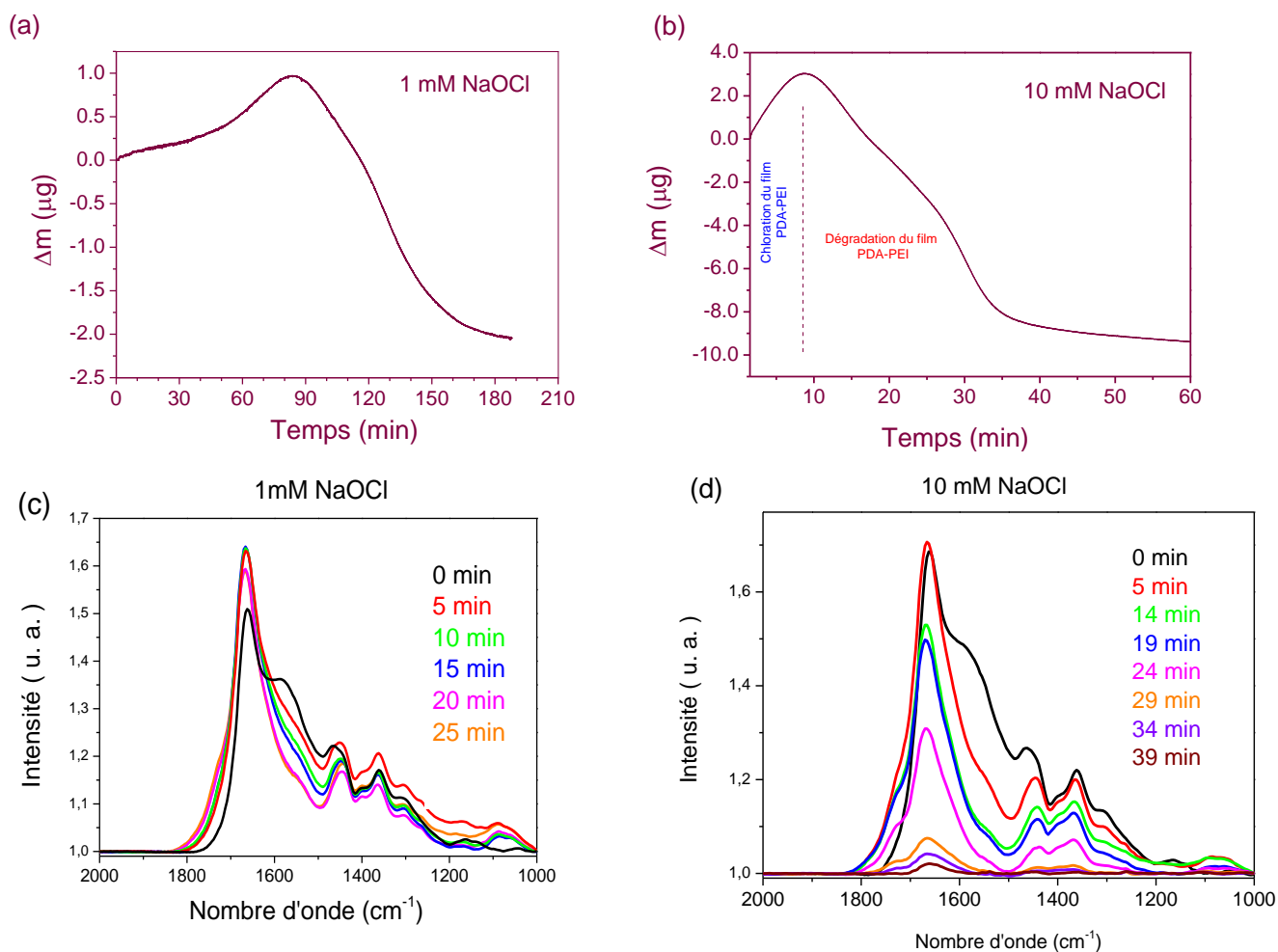


Figure 20 : Suivi de la chloration d'un revêtement PDA-PEI-24h par une solution de NaOCl à 1 mM (a) par QCM (quartz or de 0,2 cm^2) et (c) par PM-IRRAS et par une solution de NaOCl à 10 mM (b) par QCM et (d) par PM-IRRAS.

2.6 Caractérisation physico-chimique par PM-IRRAS du film PDA-PEI-Cl

L'étude du spectre PM-IRRAS après chloration du film composite PDA-PEI présenté précédemment révèle la même modification de spectre que pour la chloration du revêtement PDA seul (Figure 21). En effet, on remarque une forte diminution du pic à 1515 cm^{-1} attribué à la liaison amine N-H suggérant donc la création de fonctions chloramine. On constate également un décalage du pic caractéristique de l'aromatique passant de 1640 cm^{-1} à 1655 cm^{-1} . Ce changement peut être une conséquence du greffage d'atomes de chlore sur des atomes d'azote situés à proximité du cycle aromatique modifiant l'environnement chimique de ce dernier. Enfin, l'augmentation de l'intensité du pic à 1720 cm^{-1} caractéristique d'un

enrichissement en fonctions carboxylique dû à l'oxydation du revêtement PDA au contact des ions OCl^- est également observé.

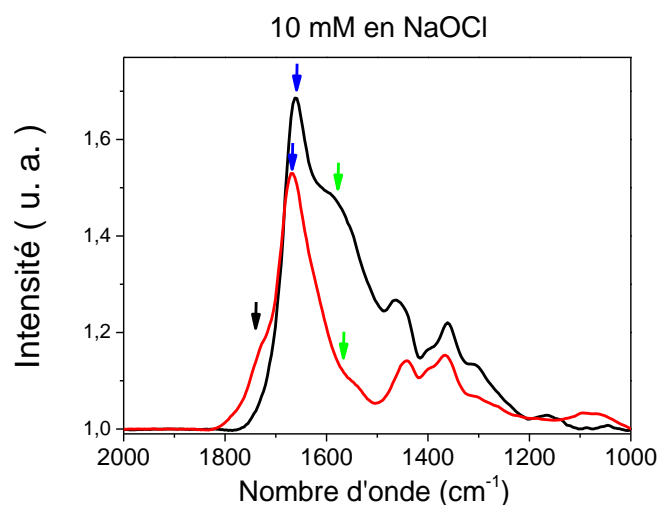


Figure 21 : Spectres PM-IRRAS d'un revêtement PDA-PEI-24h (en noir) avant et (en rouge) après immersion dans une solution NaOCl à 10 mM pendant 10 minutes. Les flèches vertes indiquent le pic N-H, les flèches bleues indiquent le pic C=C et la flèche noire le pic centré à 1720 cm^{-1} .

2.7 Caractérisation par XPS du film PDA-PEI-Cl

La composition élémentaire du revêtement PDA-PEI-24h chloré a été déterminée par analyse XPS (Figure 22) ; le Tableau 8 résume les pourcentages atomiques. Les pics C1s, N1s, O1s et Cl2p sont détectés sur le spectre général. Les contributions du chlore sont détectées à une énergie de liaison d'environ 200 eV (Cl2p) et 280 eV (Cl2s) (Figure 22 (a)). Le spectre haute résolution du chlore Cl2p représenté sur la Figure 20 (b), présente deux contributions différentes. La plus intense est détectée à une énergie de liaison de 200,6 eV et 201,3 eV (Cl2p_{3/2} et Cl2p_{1/2}, respectivement) tandis que le deuxième doublet apparaît à une EN inférieure, 197,4 eV et 198,8 eV. La détection du Cl2p à une énergie de liaison d'environ 200,5 eV, nommée Cl₂₀₀, est attribué à la liaison N-Cl, tandis que la seconde contribution à plus basse énergie de liaison est attribuée aux atomes de chlore libres. Enfin, le rapport Cl₂₀₀/N de 0,3 pour ces revêtements chlorés révèle une quantité 2 fois inférieure au dépôt sans PEI.

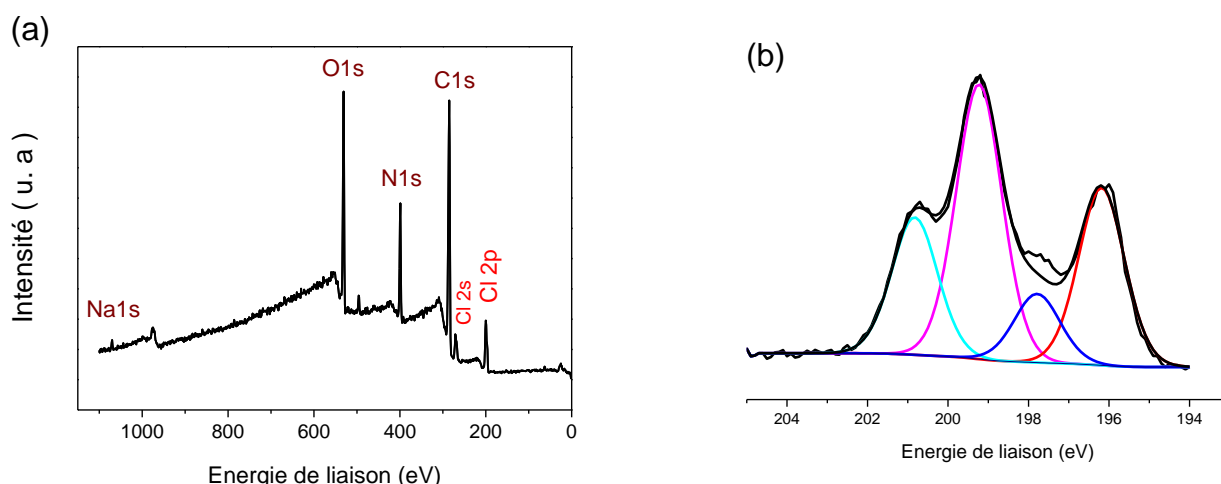


Figure 22 : Caractérisation XPS de surface d'or fonctionnalisé d'un revêtement PDA-PEI-24h et après immersion dans une solution de NaOCl à 10 mM. (a) spectre général, (b) région de haute résolution du Cl_{2p}.

Tableau 8 : Composition chimique en at% du revêtement PDA-PEI-24h-Cl obtenue par analyse XPS et rapport entre N et C et entre O et C.

	C	N	O	Au	Na	N/C	Cl ₁₉₈	Cl ₂₀₀	Cl ₂₀₀ /N
PDA-PEI-24h-Cl	61,4	13,7	16,4	-	0,8	0,2	3,2	4,5	0,3

2.8 Quantification des fonctions N-Cl par titrage au TNB

Tout comme pour les revêtements PDA-Cl et PDA-IO₄⁻-Cl, une quantification des fonctions chloramine au sein du revêtement PDA-PEI-Cl a été menée par un titrage chimique au TNB. Les résultats de ce dosage sont regroupés sur la Figure 23 et dans le Tableau 10.

La quantité de liaisons N-Cl présente dans le film PDA-PEI-Cl a été estimée en tenant compte d'une épaisseur du film PDA d'environ 100 nm (selon *Chapitre III*), la densité atomique d_{Cl} est égale à $9,25 \cdot 10^{21} \text{ at.cm}^{-3}$ (Equation 2) soit une densité augmentée de 30% par rapport au revêtement PDA seul. La comparaison de ces densités avec la densité d'azote de la PDA $d_N = 3,15 \cdot 10^{22} \text{ at.cm}^{-3}$ en prenant une densité de PDA-PEI de $4,4 \text{ g.cm}^{-3}$ (valeur obtenue au cours du *Chapitre III*) montre que 30 % des atomes d'azote du film sont chlorés, ce résultat confirme le pourcentage obtenu par XPS (Tableau 9).

CHAPITRE IV
Génération des fonctions haloamine

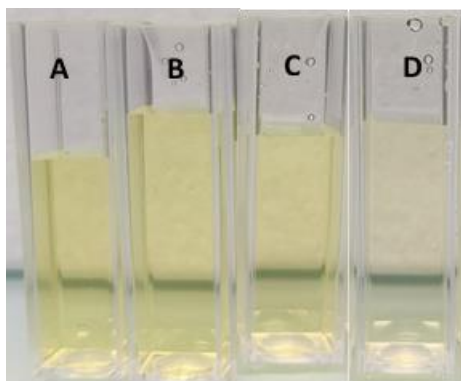


Figure 23 : Mise en évidence des fonctions chloramine par TNB : Images optiques des cuvettes (1 cm) contenant la solution de TNB après 24h d'immersion. (A) solution de TNB non modifiée. Après immersion d'un substrat (B) Au ; (C) film PDA-PEI (D) film PDA-PEI-Cl.

Tableau 9 : Absorption de la solution de TNB à 412 nm après 24 h d'immersion de divers échantillons, nombre d'atomes de chlore et densité (Eq.2) de chloramine dans les revêtements PDA-PEI et PDA-PEI-Cl estimée par dosage TNB. Rapport Cl/N prenant en compte une densité N de $3,1 \cdot 10^{22} \text{ at.cm}^{-3}$.

	A at 412 nm	Cl (at.)	$d_{Cl} \text{ (at.cm}^{-3}\text{)}$	Cl/N
PDA-PEI	0,78	---	---	
PDA-PEI-Cl	0,20	$9,25 \cdot 10^{16}$	$9,25 \cdot 10^{21}$	0,29

Conclusion

L'étude du suivi de la chloration *in situ* par QCM complétée par des études *ex situ* par PM-IRRAS, XPS et mesure d'angle de contact ont permis de définir les paramètres de chloration optimaux à savoir les temps de contact et les concentrations en NaOCl, mais aussi d'étudier la stabilité des différents revêtements PDA déposés selon plusieurs voies.

On constate ainsi une chloration réussie pour le revêtement PDA-O₂ présentant une densité de fonctions N-Cl immobilisées de l'ordre de $3,1 \cdot 10^{21}$ at/cm³ correspondant à une chloration de l'ordre de 60% des fonctions amine. Il a également pu être montré une bromation à hauteur de 50 % des atomes d'azote contenus dans le film de PDA. D'autre part, on constate une instabilité plus importante lors d'un dépôt en *Grafting from* lors de la chloration révélant ainsi l'importance des oligomères formant « un tapis dense » durant les premières heures de polymérisation de la dopamine. Enfin, l'étude de chloration du dépôt multicouche par QCM a conduit à une plus grande prise de masse par rapport au revêtement monocouche passant de 1,8 à 2,3 µg en analyse QCM. De façon quantitative relative il y aurait ainsi plus de chlore immobilisé dans la structure du film PDA-multicouche par rapport au film équivalent PDA-O₂-24h. Une quantification par dosage chimique au TNB devra être menée pour confirmer ce résultat.

Quant au revêtement PDA-IO₄⁻ présentant une épaisseur plus importante comparé au revêtement classique, à savoir 100 nm, la chloration a permis de fonctionnaliser 34 % des fonctions amine de la structure. On constate ainsi une immobilisation de Cl(+I) 2 fois plus faible que pour le revêtement conventionnel sans doute du fait de la présence de fonctions N-I au sein du film PDA. Le dosage chimique par TNB révèle quant à lui une immobilisation de 10 % des fonctions amine un résultat 3 fois plus faible que pour celui obtenu par les analyses XPS. Enfin, le dernier dépôt étudié est le film composite formé de la PDA et de la PEI. Il a été démontré une plus grande stabilité du revêtement permettant une chloration à une concentration 10 fois plus élevée pour des temps comparables à ceux du revêtement PDA seul. Cela est dû à la PEI connue pour jouer le rôle de réticulant au sein de la structure de PDA permettant ainsi d'obtenir des revêtements plus stables. La quantification des fonctions chloramine par XPS révèle une chloration de 30% des fonctions amine, ce résultat est confirmé par le dosage chimique avec le TNB.

Références

1. Rabin, N.; Zheng, Y.; Opoku-Temeng, C.; Du, Y.; Bonsu, E.; Sintim, H. O., Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry* **2015**, *7* (4), 493-512.
2. Nickel, J. C.; Ruseska, I.; Wright, J. B.; Costerton, J. W., Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobiology Agents Chemotherapy* **1985**, *27* (4), 619-624.
3. Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M., Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* **1995**, *49*, 711-745.
4. Olsen, I., Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **2015**, *34* (5), 877-886.
5. Mah, T. F., Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology* **2012**, *7* (9), 1061-1072.
6. Lu, Y.; Yue, Z.; Wang, W.; Cao, Z., Strategies on designing multifunctional surfaces to prevent biofilm formation. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* **2015**, *9* (3), 324-335.
7. Timofeeva, L.; Kleshcheva, N., Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. *Applied Microbiology Biotechnology* **2011**, *89* (3), 475-492.
8. Sun, X.; Cao, Z.; Sun, Y., N-Chloro-alkoxy-s-triazine-Based Antimicrobial Additives: Preparation, Characterization, and Antimicrobial and Biofilm-Controlling Functions. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2009**, *48* (2), 607-612.
9. Jacangelo, J. G.; Olivieri, V. P.; Kawata, K., Oxidation of sulfhydryl groups by monochloramine. *Water Research* **1987**, *21* (11), 1339-1344.
10. Kou, L.; Liang, J.; Ren, X.; Kocer, H. B.; Worley, S. D.; Tzou, Y. M.; Huang, T. S., Synthesis of a Water-Soluble Siloxane Copolymer and Its Application for Antimicrobial Coatings. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2009**, *48* (14), 6521-6526.
11. Ma, Y.; Li, J.; Si, Y.; Huang, K.; Nitin, N.; Sun, G., Rechargeable Antibacterial N-Halamine Films with Antifouling Function for Food Packaging Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11* (19), 17814-17822.
12. Ma, K.; Jiang, Z.; Li, L.; Liu, Y.; Ren, X.; Huang, T.-S., N-halamine modified polyester fabrics: Preparation and biocidal functions. *Fibers and Polymers* **2014**, *15* (11), 2340-2344.
13. Xi, G.; Xiu, Y.; Wang, L.; Liu, X., Antimicrobial N-halamine coatings synthesized via vapor-phase assisted polymerization. *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, *132* (15), 418-424.
14. Zhang, S.; Kai, C.; Liu, B.; Zhang, S.; Wei, W.; Xu, X.; Zhou, Z., Preparation, characterization and antibacterial properties of cellulose membrane containing N-halamine. *Cellulose* **2019**, *26* (9), 5621-5633.

15. Wei Yang, C. L., and Yi Chen, Stability of Polydopamine Coatings on Gold Substrates Inspected by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Langmuir* **2018**, *34*, 3565–3571.
16. Hong, S.; Wang, Y.; Park, S. Y.; Lee, H., Progressive fuzzy cation- π assembly of biological catecholamines. *Science Advances* **2018**, *4* (9), eaat7457.
17. Chen, T.-P.; Liu, T.; Su, T.-L.; Liang, J., Self-Polymerization of Dopamine in Acidic Environments without Oxygen. *Langmuir* **2017**, *33* (23), 5863-5871.
18. Zheng, W.; Fan, H.; Wang, L.; Jin, Z., Oxidative Self-Polymerization of Dopamine in an Acidic Environment. *Langmuir* **2015**, *31* (42), 11671-11677.
19. Jiang, J.; Zhu, L.; Zhu, L.; Zhu, B.; Xu, Y., Surface characteristics of a self-polymerized dopamine coating deposited on hydrophobic polymer films. *Langmuir* **2011**, *27* (23), 14180-14187.
20. Ponzio, F.; Barthès, J.; Bour, J.; Michel, M.; Bertani, P.; Hemmerlé, J.; d'Ischia, M.; Ball, V., Oxidant Control of Polydopamine Surface Chemistry in Acids: A Mechanism-Based Entry to Superhydrophilic-Superoleophobic Coatings. *Chemistry of Materials* **2016**, *28* (13), 4697-4705.
21. Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B., Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Analytical Biochemistry* **1979**, *94* (1), 75-81.
22. Del Frari, D.; Bour, J.; Ball, V.; Toniazzo, V.; Ruch, D., Degradation of polydopamine coatings by sodium hypochlorite: A process depending on the substrate and the film synthesis method. *Polymer Degradation and Stability* **2012**, *97* (9), 1844-1849.

CHAPITRE V

Evaluation des propriétés antibactériennes des revêtements PDA et PDA-PEI après un traitement d'halogénéation des fonctions amine

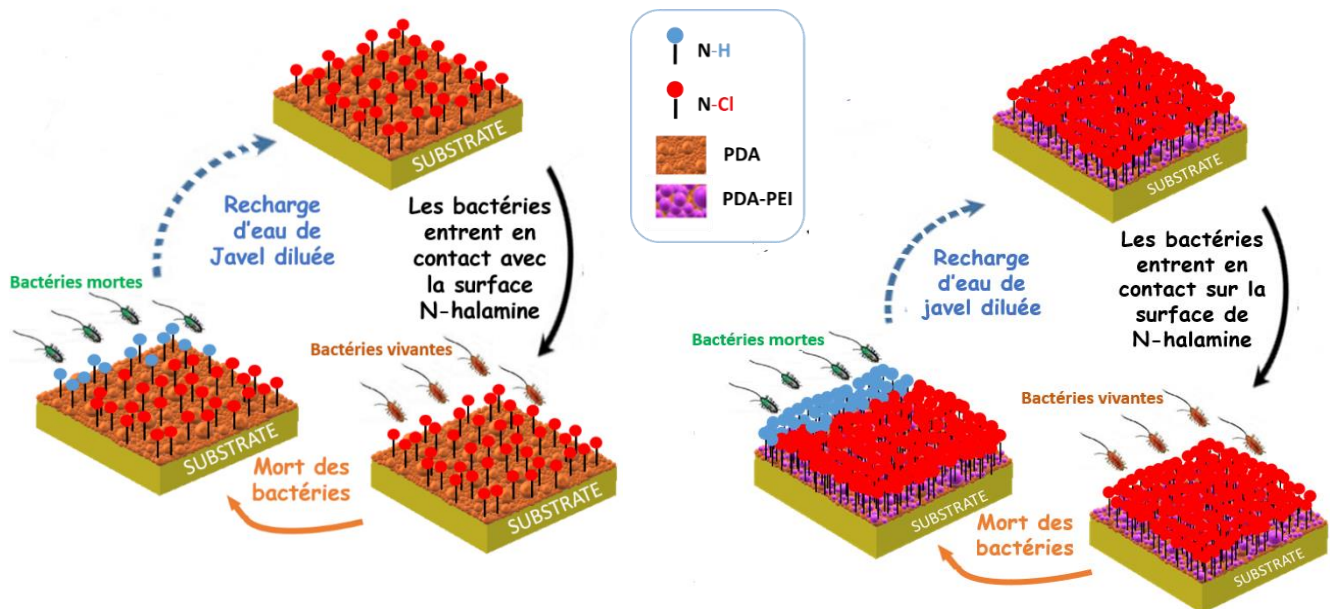


Table des matières

Introduction	191
1. Evaluation des propriétés antiadhésives	192
2. Evaluation des propriétés bactéricides	194
2.1 Le test du relargage ou halo d'inhibition	194
2.2 Le test de <i>Killing</i>	196
2.1.1 Souche bactérienne <i>E. coli</i>	196
2.1.1.1 Revêtement PDA-O ₂ -Cl	196
2.1.1.2 Revêtement PDA-IO ₄ ⁻ -Cl	198
2.1.1.3 Revêtement PDA-PEI-Cl.....	200
2.1.2 Souches bactériennes <i>S. epidermidis</i>	201
2.1.2.1 Revêtement PDA-O ₂ -Cl	202
2.1.2.1.1 Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 104777	202
2.1.2.1.2 Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 6821	203
2.1.2.2 Revêtement PDA-IO ₄ ⁻ -Cl	204
2.1.2.3 Revêtement PDA-PEI-Cl.....	205
2.1.2.3.1 Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 104777	205
2.1.2.3.2 Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 6821	207
2.3 Conclusion	208
3. Evaluation des propriétés bactériostatiques	210
3.1 Revêtement PDA-O ₂ -Cl.....	210
3.1.1 Souche bactérienne <i>E. coli</i>	210
3.1.2 Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 6821	211
3.2 Revêtement PDA-IO ₄ ⁻ -Cl	213
3.3 Revêtement PDA-PEI-Cl.....	214
3.3.1 Souche bactérienne <i>E. coli</i>	214
3.3.2 Souche bactérienne <i>S. epidermidis</i> CIP 6821	215
3.4 Conclusion	217
Conclusion	218
Références	220

Nous avons pu mettre évidence dans le *Chapitre IV* le greffage réussi de chlore sur des atomes d'azote formant ainsi des fonctions chloramine au sein de structures de PDA (PDA-O₂ et PDA-IO₄⁻) et du copolymère PDA-PEI, après une optimisation des paramètres de la chloration (temps, concentration en NaOCl). Un premier test de bromation a également été mené pour le revêtement PDA-O₂ révélant par analyses XPS la présence de brome lié correspondant à 50 % des fonctions amine bromées. Toutefois dans ce chapitre, l'évaluation des propriétés antibactériennes portera uniquement sur les revêtements chlorés.

Pour rappel, l'effet antibactérien d'un revêtement peut être divisé en 3 grandes classes : l'effet antiadhésif, l'effet bactéricide et l'effet bactériostatique. Ce dernier effet se manifeste par une inhibition de la croissance bactérienne sans obligatoirement entraîner la mort cellulaire²²⁰. Cela signifie que les bactéries sont maintenues dans la phase stationnaire de croissance. En réalité, il n'y a pas 3 catégories pures de revêtements antibactériens (un qui tue les bactéries ou un autre qui inhibe uniquement leur croissance). Par exemple, la détermination microbiologique *in vitro* du caractère bactéricide ou bactériostatique d'un revêtement peut être influencée par les conditions de croissance, la densité bactérienne, la durée du test ; la définition clinique est encore plus arbitraire. La plupart des antibactériens sont décrits comme étant potentiellement à la fois bactéricide et bactériostatique.

Une évaluation du caractère antibactérien global (antiadhésif, bactéricide et bactériostatique) des revêtements chlorés a été menée avec deux souches bactériennes de Gram différents : *Escherichia coli* (*E. coli*) bactérie à Gram négatif (*Gram -*) et *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) bactérie à Gram positif (*Gram +*). Il est important lors de l'étude des propriétés antibactériennes de tester les deux types de Gram afin d'évaluer de manière précise le pouvoir antibactérien du revêtement. En effet, comme il a déjà été rappelé au cours du *Chapitre I*, de par la différence de la structure de la membrane cellulaire des bactéries *Gram -* et *Gram +*, certaines molécules antibactériennes peuvent être efficaces sur un type de Gram et inactif pour l'autre classe de Gram.

Introduction

La contamination bactérienne des surfaces par la formation de biofilm constitue un véritable enjeu de santé public mais aussi économique et environnemental. Le processus de développement du biofilm commence après la phase de fixation réversible de bactéries planctoniques. Cela conduit à la création d'une matrice extracellulaire, l'EPS, protégeant les bactéries de l'environnement extérieur et source de nutriments, cette étape conduit à une fixation irréversible des bactéries²⁻³. La structure complexe du biofilm, formant en surface plusieurs microcolonies différentes, rend les bactéries plus résistantes aux antibiotiques et aux agents biocides (désinfectants). En effet, la quantité d'antibiotique nécessaire pour neutraliser les bactéries au sein du biofilm peut être 100 à 1000 fois plus élevée que pour les bactéries planctoniques⁴. Dans la dernière étape du cycle de vie d'un biofilm, une sursaturation des cellules bactériennes est observée ; les bactéries se (re)dispersent du biofilm dans la phase liquide.

Il est très important de développer des stratégies pour contrôler voire neutraliser le développement de biofilms durant les toutes premières étapes c'est-à-dire lorsque les bactéries ne sont pas encore fixées de manière irréversible. En réponse à cela, divers agents ayant une activité antiadhésive et/ou biocide et/ou bactériostatique ont été développés. Parmi ces agents, les *N*-halamines, présentant des liaisons covalentes azote halogène (+I), suscitent un intérêt croissant en raison de leur action biocide efficace contre un large éventail de microbes. De plus, ces composés présentent de nombreuses caractéristiques uniques, telles qu'une stabilité sur une large plage de température et d'humidité, une durabilité pour une utilisation à long terme, et d'être régénérable grâce à un processus de rechloration.

Les différentes propriétés antibactériennes des revêtements *N*-halamine à base de PDA et du composite PDA-PEI seront présentées, évaluées et discutées dans ce chapitre.

1. Evaluation des propriétés antiadhésives

Les revêtements antiadhésifs visent à empêcher la première étape de formation de biofilm en utilisant des mécanismes non cytotoxiques, contrairement aux deux autres formes de revêtements antibactériens (biocide et bactériostatique). La fixation bactérienne à la surface se produit par plusieurs mécanismes. Le contrôle de l'hydrophobicité de la surface, de la charge, de la rugosité ou encore de la topographie peut réduire considérablement l'attachement des bactéries.

Afin d'évaluer les propriétés antiadhésives des surfaces de PDA chlorées, des suspensions d'*Escherichia coli* et de *Staphylocoque epidermidis* ont été mises en contact avec ces surfaces et comparées à des contrôles négatifs, composés, d'une part, d'une surface neutre biocompatible (Thermanox ou TMX) et, d'autre part, des films PDA-O2-3h et PDA-O2-24h non chlorés.

En ce qui concerne les propriétés antiadhésives des films de PDA chlorés, les principaux résultats sont résumés sur la Figure 1 et les données moyennes sont rapportées dans le Tableau 1. Les résultats concernant la souche d'*E. coli* révèlent une baisse d'adhérence pour des revêtements PDA-O2-3h chlorés et du PDA-O2-24h chlorés de plus de la moitié par rapport à la référence TMX. En prenant le revêtement non chloré comme référence, cette baisse est respectivement de 55% et 33%. Ces résultats montrent clairement qu'après traitement des revêtements PDA en présence de NaOCl, les densités bactériennes à la surface du revêtement sont plus faibles. En conclusion, la chloration confère un effet antiadhésif vis-à-vis d'une souche bactérienne à *Gram -*.

On remarquera une différence d'adhérence entre le revêtement PDA-O2-3h et PDA-O2-24h, avec une baisse de 20 % pour le revêtement PDA-O2-24h qui peut être attribuée à la topographie plus rugueuse de surface de ce dernier due à présence de quelques particules de PDA en surface (Cf. Chapitre III).

Evaluation des propriétés antibactériennes des revêtements PDA et PDA-PEI après un traitement d'halogénéation des fonctions amine

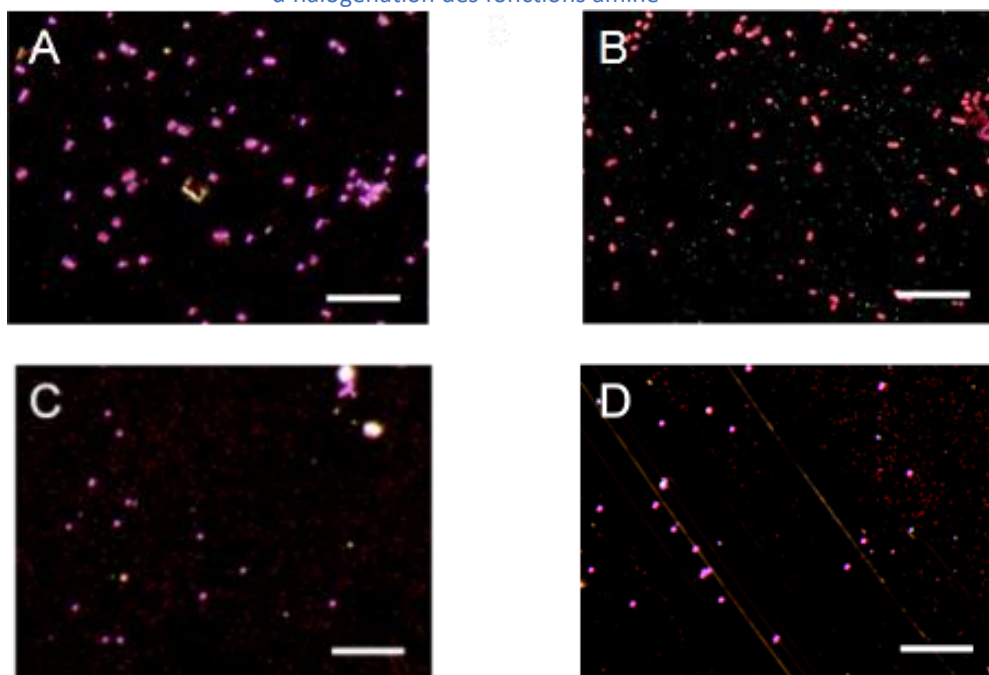


Figure 1 : Images de microscopie optique en champ noir après 17 h en contact avec *E. coli* à 10^7 UFC/mL à température ambiante suivies d'une coloration au cristal violet (A) PDA-O2-3h, (C) PDA-O2-3h-Cl, (B) PDA-O2-24h et (D) PDA-O2-24h-Cl. Echelle : 500 μ m.

Tableau 1 : Nombre moyen d'*Escherichia coli* comptées sur une image de microscopie optique (sur 20 champs) ($\times 50$), écart-type (σ) et densité bactérienne calculée, sur divers échantillons après incubation à température ambiante pendant 17 h en présence de 10^6 UFC/mL.

Echantillon	TMX	PDA-O2-3h	PDA-O2-3h-Cl	PDA-O2-24h	PDA-O2-24h-Cl
Densité bactérienne /cm ²	970	970	540	770	520
σ	78	76	59	75	51
% adhérence (Ref. : TMX)	--	100%	55%	79%	53%
% adhérence (Ref. : PDA-O2-3h /PDA-O2-24h)	--	--	55%	--	67%

2. Evaluation des propriétés bactéricides

À ce jour, le mécanisme biocide des *N*-halamines peut être divisé en deux voies principales : (i) la voie par contact, qui fait appel à un transfert direct d'halogène oxydant ($X(I^+)$) des *N*-halamines vers les récepteurs bactériens⁵⁻⁶ et (ii) la voie de libération, qui est la dissociation des halogènes des *N*-halamines en solution avec inactivation ultérieure⁷⁻⁸. Dans l'étude des mécanismes antibactériens des *N*-halamines, certains groupes de chercheurs ont pu mettre en évidence la voie par contact sans libération d'halogène dans le milieu, tandis que d'autres ont pu montrer une libération. Ici une évaluation du pouvoir bactéricide accompagnée d'une étude du mécanisme d'action des revêtements *N*-halamine suivants : PDA-O₂-Cl, PDA-IO₄⁻-Cl et PDA-PEI-Cl ont été menées. Pour cela deux types de test ont été employés :

- Un test de relargage ou test du halo d'inhibition permettant l'étude de la libération de chlore dans le milieu environnant
- Un deuxième test dit test du *Killing* dans lequel l'effet biocide/bactéricide des revêtements.

2.1 Le test du relargage ou halo d'inhibition

Un des mécanismes biocides des *N*-halamines généralement cité s'effectue par dissociation de l'halogène (+I) dans le milieu conduisant à l'inactivation ultérieure des bactéries. Le test de la zone d'inhibition permet de mettre en évidence ce mode d'action des *N*-halamines⁹⁻¹⁰. Pour cela, 100 µL d'une suspension bactérienne *E. coli* ou *S. epidermidis* à une concentration de 10⁷ d'unité formant colonie (UFC)/mL ont été déposés sur des boîtes de Petri contenant un mélange d'agar et du milieu nutritif correspondant à la souche bactérienne testée, à savoir Luria-Bertani (LB) pour *E. coli* ATCC³ 25922 et Mueller-Hinton (MH) pour *S. epidermidis* CIP⁴ 6821 et CIP 104777. Les revêtements *N*-halamine PDA-O₂-Cl, PDA-IO₄⁻-Cl et PDA-PEI-Cl obtenus ont été ensuite déposés sur ces milieux nutritifs puis incubés à 37°C pendant 17 h. A titre de comparaison, un substrat d'or nu et les revêtements non chlorés correspondants ont

³ ATCC : American Type Culture Collection

⁴ CIP : Collection Institut Pasteur

également été intégrés à l'étude comme contrôle négatif. Les résultats du test sont présentés sur la Figure 2.

On constate qu'aucune zone aseptique, qui résulterait de la diffusion du chlore, n'est observée. Il semblerait donc que le mode d'action antibactérien ne soit pas par relargage de chlore dans le milieu environnant le revêtement.

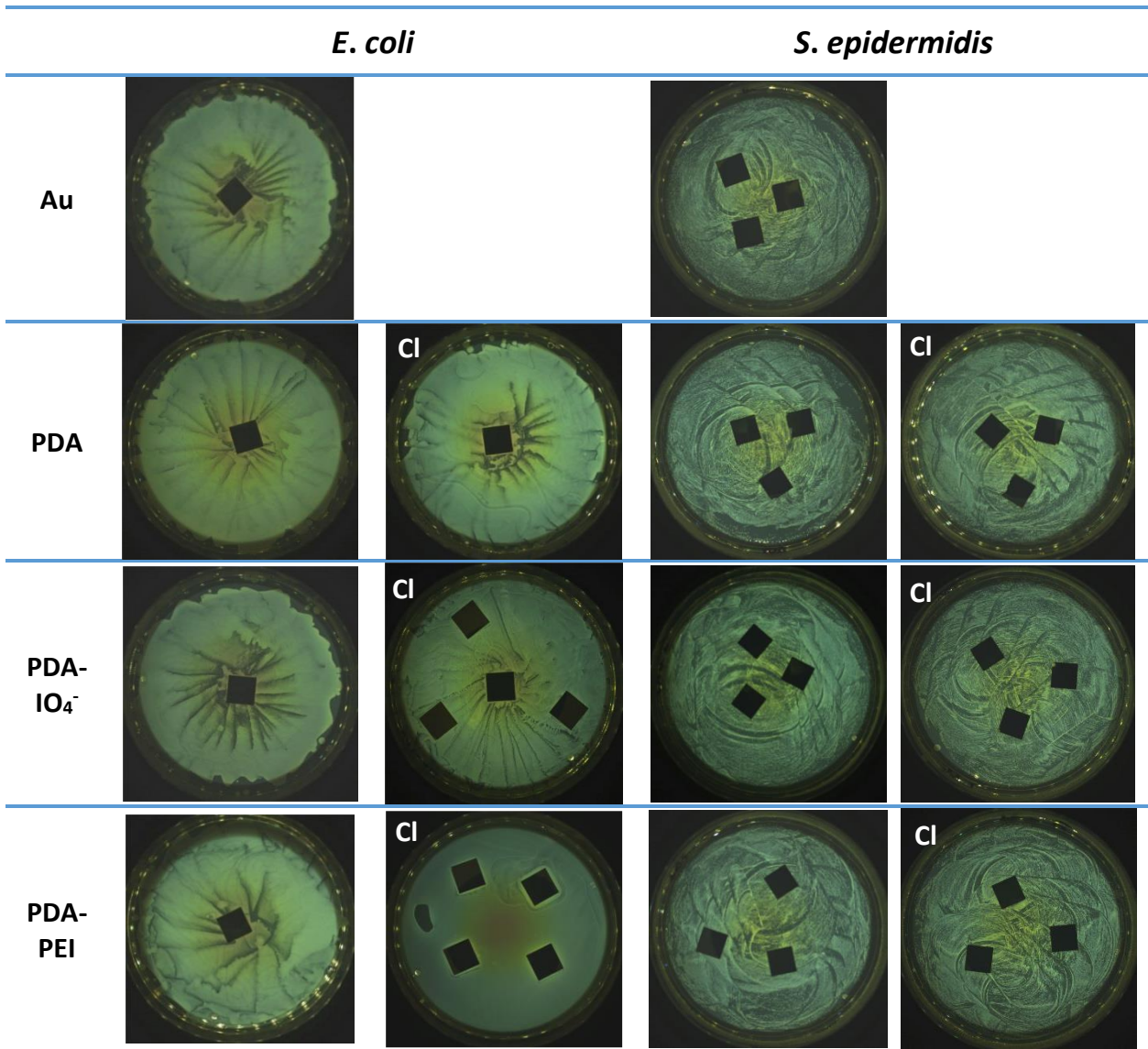


Figure 2 : Test de relargage ou halo d'inhibition vis-à-vis des souches *E. coli* et *S. epidermidis*.

2.2 Le test de Killing

D'après l'étude précédente du halo inhibition, il semblerait que les différents revêtements *N*-halamine étudiés ne montrent pas un mode d'action par relargage de chlore dans le milieu environnant. Comme il a été décrit précédemment, les agents antibactériens actifs par contact désignent les biocides qui inactivent les bactéries au contact tout en étant liés aux surfaces. Le mécanisme de mise à mort par contact implique le transfert direct d'un halogène actif à partir de fonctions haloamine aux cellules bactériennes. De cette façon, l'action antibactérienne se produit sans la dissociation de l'halogène des liaisons N-Cl. Les *N*-halamines avec les liaisons N-X stables conviennent mieux à la destruction par contact.

Une évaluation de l'effet biocide des revêtements a été menée vis-à-vis de trois souches bactériennes : une souche *Gram - E. coli* et deux souches *Gram + S. epidermidis* CIP 6821 ne produisant pas de biofilm et *S. epidermidis* CIP 104777 pouvant en produire.

Les activités biocides ont été évaluées par un test dit de *Killing* dont le protocole détaillé est décrit dans le *Chapitre II*. Brièvement, une quantité fixée de bactéries a été déposée sur les différentes surfaces dans un milieu physiologique et à température ambiante. Dans ces conditions, il est important de garder à l'esprit que les bactéries ne peuvent pas se développer et donc le nombre de bactéries comptées ensuite sur des boîtes de Petri permet d'évaluer la viabilité au contact des surfaces. De nouveau, un contrôle négatif a été utilisé pour estimer cette viabilité bactérienne, l'inoculum et les films non chlorés correspondants.

2.1.1 Souche bactérienne *E. coli*

2.1.1.1 Revêtement PDA-O₂-Cl

Il a été montré précédemment que le revêtement PDA-O₂-24h présente des propriétés antiadhésives vis-à-vis de la souche *E. coli* à hauteur de 20% contrairement à une absence d'effet antiadhésif pour le dépôt de 3h. Ce taux augmente après chloration pour atteindre 47% et 55% pour le revêtement PDA-O₂-3h-Cl mettant en avant un effet antiadhésif des fonctions haloamine.

CHAPITRE V

Evaluation des propriétés antibactériennes des revêtements PDA et PDA-PEI après un traitement d'halogénéation des fonctions amine

Les propriétés biocides des revêtements chlorés PDA-O2-3h-Cl et PDA-O2-24h-Cl ont été évaluées à travers un test en sandwich effectué en triplicata (Cf. Chapitre II). Les résultats sont présentés sur la Figure 3 et les données moyennes sont rapportées dans le Tableau 2.

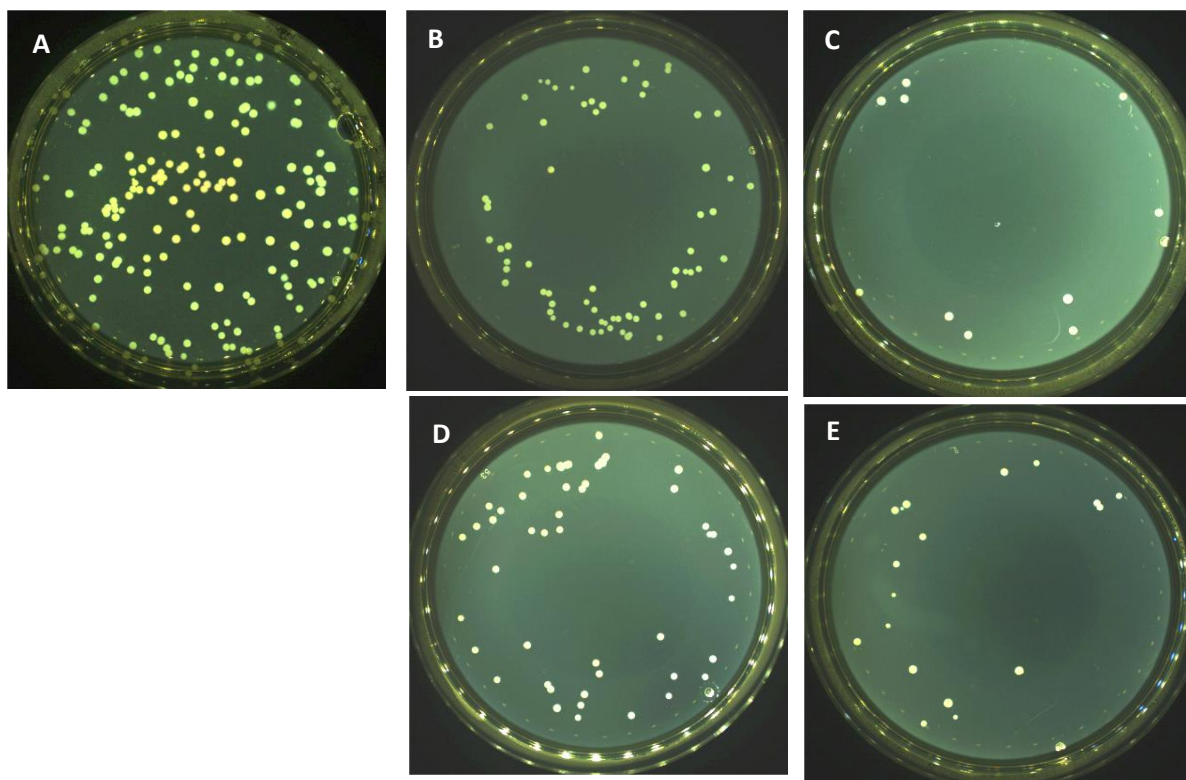


Figure 3 : Photographies de plaques d'agar-LB présentant les résultats du test de *Killing* à une dilution de 10^5 UFC/mL. (A) Inoculum *E. coli*, (B et D) revêtements PDA-O2-3h et PDA-O2-24h respectivement et (C et E) revêtement PDA-O2-3h-Cl et PDA-O2-24h-Cl respectivement, après 3 h en contact avec *Escherichia coli* à une concentration initiale de 10^7 UFC/mL.

Tableau 2 : Moyenne d'UFC/mL d'*Escherichia coli* après le test de *Killing* les revêtements PDA-O2-3h, PDA-O2-24h et revêtements PDA-O2-3h chloré et PDA-O2-24h chloré.

Echantillon	Inoculum	PDA-O ₂ -3h	PDA-O ₂ -3h-Cl	PDA-O ₂ -24h	PDA-O ₂ -24h-Cl
UFC/mL	$2,5 \cdot 10^7$ ($\pm 6,1 \cdot 10^5$)	$4,66 \cdot 10^5$ ($\pm 4,1 \cdot 10^4$)	$3,84 \cdot 10^5$ ($\pm 1,3 \cdot 10^5$)	$3,58 \cdot 10^5$ ($\pm 4,6 \cdot 10^5$)	$2,36 \cdot 10^5$ ($\pm 2,7 \cdot 10^5$)
% <i>Killing</i> / Inoculum	--	98,1 %	98,4 %	98,5 %	99,0 %
% <i>Killing</i> / PDA	--	--	17,5 %	--	34,0 %

Les 2 échantillons de PDA non chlorés, 3h et 24h, conduisent à une réduction de bactéries viables de 98% par rapport à l'inoculum. Ainsi, le revêtement PDA présente, seul, une activité antibactérienne, cette propriété a déjà été rapportée par Lei *et al.*¹¹ et Iqbal *et al.*¹². En plus de cet effet antibactérien dû au revêtement lui-même, la chloration conduit à une augmentation de 18% de l'activité antimicrobienne pour le film PDA-O₂-3h-Cl et jusqu'à 34% pour le revêtement PDA-O₂-24h-Cl comparé à leur homologue non chloré. La combinaison des deux effets antimicrobiens (antiadhésif et biocide) conduit à une réduction de la viabilité bactérienne de plus de 99,0% pour le revêtement chloré PDA-O₂-3h-Cl et 99,5% pour le film chloré PDA-O₂-24h-Cl en comparaison avec l'inoculum.

Suite à ces résultats, le revêtement PDA-O₂-24h semble présenter les meilleurs effets antibactériens, ainsi dans la suite de cette étude, uniquement le revêtement PDA-O₂-24h sera étudié, il sera renommé PDA-O₂.

2.1.1.2 Revêtement PDA-IO₄⁻-Cl

De même, le test de viabilité bactérienne a été mené sur les revêtements PDA-IO₄⁻ et PDA-IO₄⁻ Cl, les résultats sont présentés sur la Figure 4 et les données moyennes rapportées dans le Tableau 3.

Pour le revêtement non chloré, les résultats du test de la viabilité révèlent une réduction de bactéries viables de 73,4% par rapport à l'inoculum. La PDA-IO₄⁻ présente également tout comme le revêtement PDA-O₂ une activité biocide mais qui semble moindre. En plus de cet effet biocide du revêtement non chloré, la chloration conduit à une augmentation de 91,4 % de l'activité antimicrobienne.

CHAPITRE V

Evaluation des propriétés antibactériennes des revêtements PDA et PDA-PEI après un traitement d'halogénéation des fonctions amine

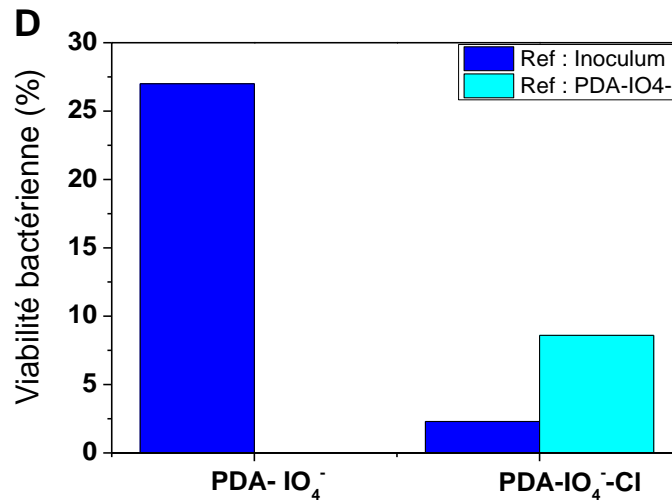
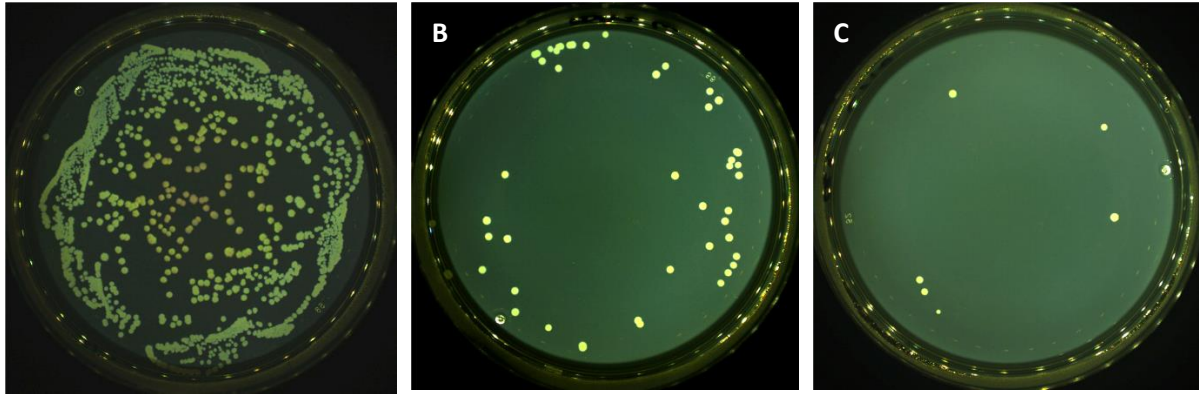


Figure 4 : Photographies optiques de plaques d'agar présentant les résultats du test de *Killing* à une dilution de 10^4 UFC/mL. (A) Inoculum *E. coli*, (B) revêtements PDA-IO₄⁻ et (C) PDA-IO₄⁻-Cl, après 3 h en contact avec *Escherichia coli* à une concentration initiale de 10^7 UFC/mL. (D) Viabilité bactérienne estimée après le test de *Killing* vis-à-vis de l'inoculum *E. coli* et du revêtement PDA-IO₄⁻ non chloré.

Tableau 3 : Moyenne d'UFC/mL d'*Escherichia coli* après le test de *Killing* les revêtements PDA-O₂-3h, PDA-IO₄⁻ et PDA-IO₄⁻-Cl.

Echantillon	Inoculum	PDA-IO ₄ ⁻	PDA- IO ₄ ⁻ -Cl
UFC/mL	$2,0 \cdot 10^7$ ($\pm 2,2 \cdot 10^5$)	$5,1 \cdot 10^5$ ($\pm 8,5 \cdot 10^4$)	$4,4 \cdot 10^5$ ($\pm 2,9 \cdot 10^5$)
% <i>Killing</i> / Inoculum	--	73,4	97,7
% <i>Killing</i> / PDA-IO ₄ ⁻	--	--	91,4

2.1.1.3 Revêtement PDA-PEI-Cl

Nous passons maintenant au dernier revêtement étudié qui est le composite PDA-PEI-Cl. Le même protocole du test de *Killing* a été mené et les résultats sont regroupés sur la Figure 5 et dans le Tableau 4.

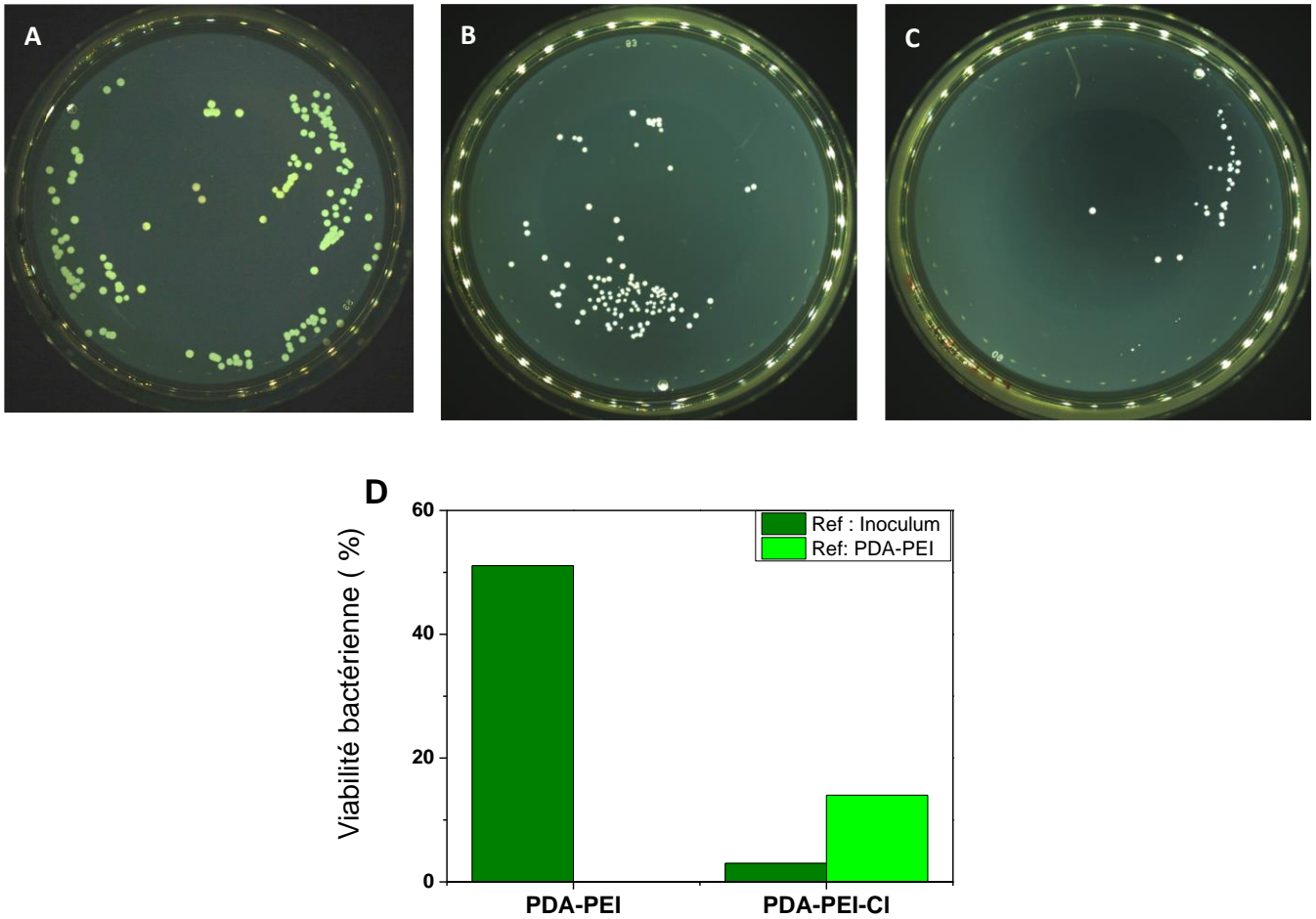


Figure 5 : Photographies optiques de plaques d'agar présentant les résultats du test de *Killing* à une dilution de 10^4 UFC / mL. (A) Inoculum *E. coli*, (B) revêtements PDA-PEI et (C) revêtement PDA-PEI-Cl, après 3 h en contact avec *E. coli* à une concentration initiale de 10^6 UFC/mL. (D) Viabilité bactérienne estimée après le test de *Killing* vis-à-vis de l'inoculum *E. coli* et du revêtement PDA-PEI non chloré.

Tableau 4 : Moyenne d'UFC/mL d'*Escherichia coli* après le test de Killing des revêtements PDA-PEI et PDA-PEI-Cl.

Echantillon	Inoculum	PDA-PEI	PDA-PEI-Cl
UFC/mL	2,9 10 ⁶ (± 9,0 10 ⁵)	1,5 10 ⁶ (± 4,0 10 ⁵)	8,6 10 ⁴ (± 1,3 10 ⁴)
% Killing / Inoculum	--	48,9	97,4
% Killing / PDA-PEI	--	--	86,2

On observe une diminution de la viabilité bactérienne du revêtement PDA-PEI de 49 % environ par rapport à l'inoculum témoignant d'une activité antibactérienne, cette activité semble moins importante que pour le revêtement PDA seul. La chloration conduit quant à elle à une augmentation de 86,2 % de l'activité biocide amenant à une activité de *Killing* du revêtement chloré de 97,4 %.

2.1.2 Souches bactériennes *S. epidermidis*

L'évaluation des propriétés biocides des revêtements *N*-chloramine présentée précédemment révèle une activité biocide de plus de 97 % vis-à-vis de la souche bactérienne à Gram-négatif *E. coli*. Pour compléter cette évaluation, un test de viabilité bactérienne des revêtements PDA-O₂-Cl, PDA-IO₄⁻-Cl et PDA-PEI-Cl vis-à-vis d'une souche bactérienne à Gram-positif, *Staphylocoque epidermidis*, a été mené.

Il existe différentes souches de *S. epidermidis*, pour cette étude deux ont été testées : une ne produisant pas de biofilm, comme *E. coli*, référencée CIP 6821 et une en produisant référencée CIP 104777.

2.1.2.1 Revêtement PDA-O₂-Cl

2.1.2.1.1 Souche bactérienne *S. epidermidis* CIP 104777

Le revêtement non chloré PDA-O₂ conduit à une réduction de bactéries viables de 70% par rapport à l'inoculum, mais cette réduction semble moins importante (70% contre 99%). En plus de cet effet antibactérien apporté par le revêtement non chloré, la chloration permet une augmentation de 54% de l'activité antimicrobienne (Figure 6 et Tableau 5). On constate ainsi une différence d'activité biocide du revêtement entre la souche *S. epidermidis* CIP 104777 et *E. coli*, le revêtement semble plus efficace vis-à-vis de cette dernière.

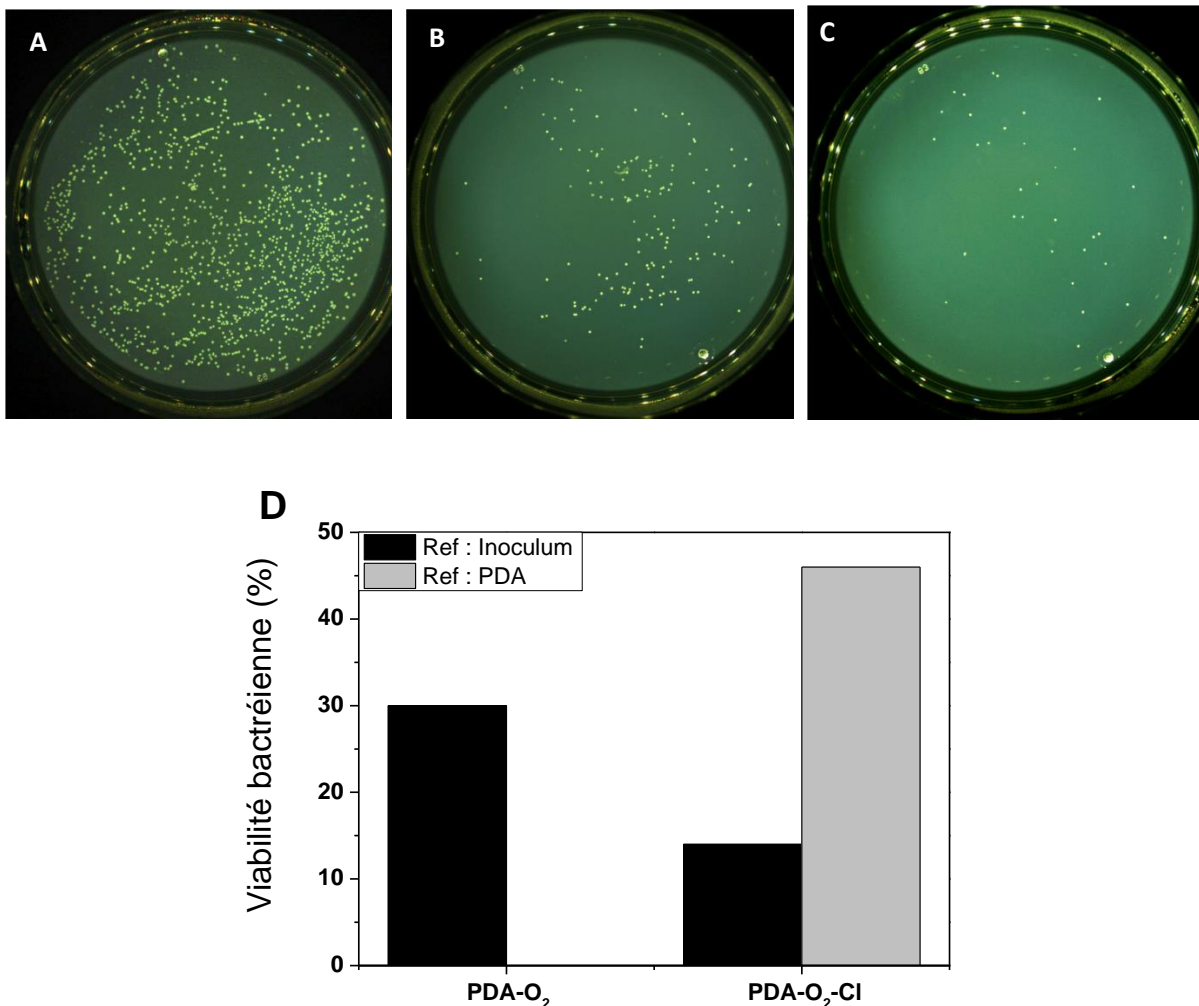


Figure 6 : Photographies optiques de plaques d'agar présentant les résultats du test de *Killing* à une dilution de 10⁴ UFC/mL. (A) Inoculum *S. epidermidis* CIP 104777, (B) revêtements PDA-O₂ et (C) revêtement PDA-O₂-Cl, après 3 h en contact avec *S. epidermidis* CIP 104777 à une concentration initiale de 10⁶ UFC/mL. (D) Viabilité bactérienne estimée après le test de *Killing* vis-à-vis de l'inoculum *S. epidermidis* CIP 104777 et du revêtement PDA-O₂ non chloré.

Tableau 5 : Moyenne d'UFC/mL de *S. epidermidis* CIP 104777 après le test de *Killing* des revêtements PDA-O₂ et PDA-O₂-Cl.

Echantillon	Inoculum	PDA-O ₂	PDA-O ₂ -Cl
UFC/mL	8,3 10 ⁶ (±1,6 10 ⁶)	2,5 10 ⁶ (±1,9 10 ⁵)	1,1 10 ⁶ (±1,2 10 ⁵)
% <i>Killing</i> / Inoculum	--	70,1	86,0
% <i>Killing</i> / PDA-O ₂	--	--	54,2

2.1.2.1.2 Souche bactérienne *S. epidermidis* CIP 6821

Concernant maintenant le test de *Killing* vis-à-vis de la souche *S. epidermidis* CIP 6821, le revêtement non chloré PDA-O₂, ne semble présenter qu'un faible effet biocide d'environ 5 %. Néanmoins, on constate que la chloration entraîne une augmentation d'environ 60 % de l'activité antimicrobienne par rapport au film non chloré (Figure 7 et Tableau 6).

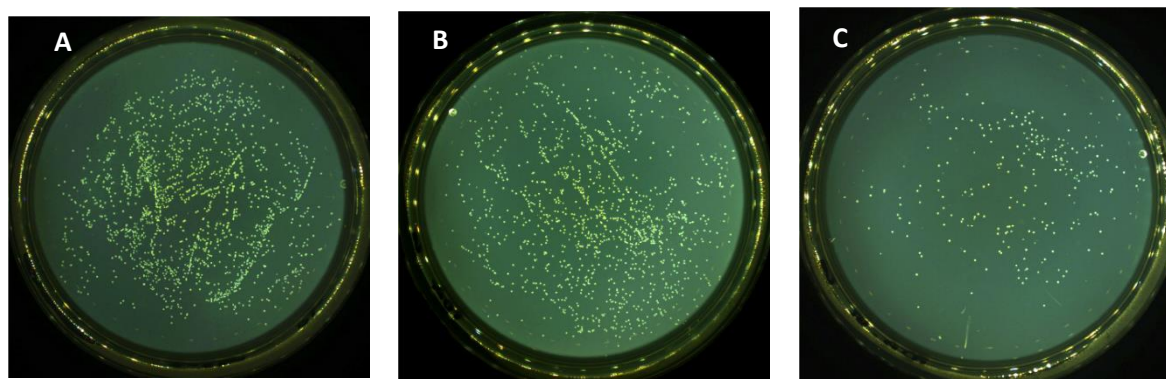


Figure 7 : Photographies optiques de plaques d'agar présentant les résultats du test de *Killing* à une dilution de 10⁴ UFC/mL. (A) Inoculum *S. epidermidis* CIP 6821, (B) revêtements PDA-O₂ et (C) revêtement PDA-O₂-Cl, après 3 h en contact avec *S. epidermidis* CIP 6821 à une concentration de 10⁷ UFC/mL.

Tableau 6 : Moyenne d'UFC/mL de *S. epidermidis* CIP 6821 après le test de *Killing* des revêtements PDA-O₂ et PDA-O₂-Cl.

Echantillon	Inoculum	PDA-O ₂	PDA-O ₂ -Cl
UFC/mL	1,4 10 ⁷ (± 1,2 10 ⁶)	1,1 10 ⁷ (± 9,0 10 ⁵)	4,6 10 ⁶ (± 1,2 10 ⁵)
% <i>Killing</i> / Inoculum	--	5,3	70,0
% <i>Killing</i> / PDA-O ₂	--	--	59,4

On constate ainsi une différence d'activité biocide du revêtement chloré entre les souches *S. epidermidis* et *E. coli*, le revêtement semble plus efficace vis-à-vis de cette dernière. Une différence d'activité bactérienne est également observée entre les deux souches *S. epidermidis*, le revêtement non chloré ne présentant pas d'activité vis-à-vis de la souche produisant des biofilms, en revanche, le revêtement chloré semble quant à lui présenter la même activité vis-à-vis des deux souches.

2.1.2.2 Revêtement PDA-IO₄⁻-Cl

Le revêtement PDA-IO₄⁻-Cl a été testé uniquement vis-à-vis de la souche *S. epidermidis* CIP 6821. Les résultats du test de *Killing* révèlent un léger effet biocide du revêtement PDA-IO₄⁻ conduisant à une réduction de la viabilité bactérienne à hauteur de 30 % par rapport à l'inoculum ; cette réduction semble moins importante que vis-à-vis de la souche *E. coli* (30 % contre 73 %). En revanche, on constate suite à la chloration une augmentation d'environ 77 % de l'activité antimicrobienne (Figure 8 et Tableau 7). On observe que le revêtement PDA-IO₄⁻-Cl présente une meilleure activité biocide vis-à-vis de la souche *E. coli* (91 %) par rapport à la souche *S. epidermidis* CIP 6821.

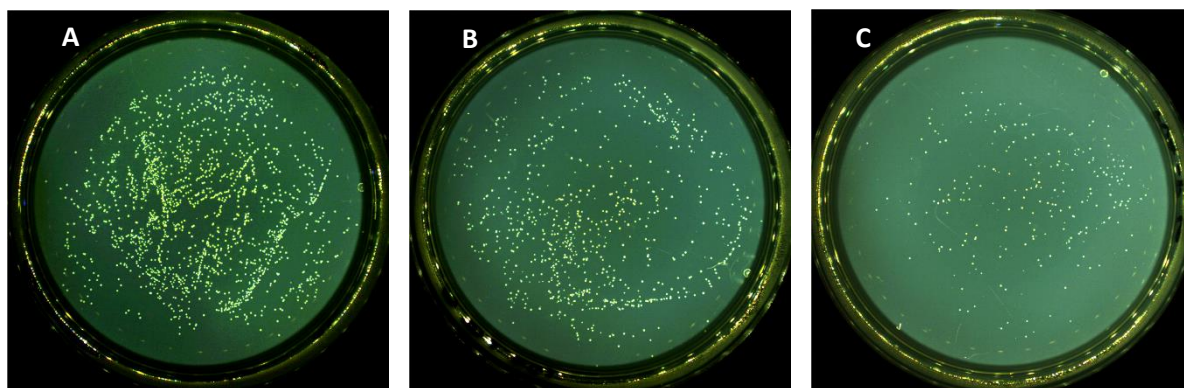


Figure 8 : Photographies optiques de plaques d'agar présentant les résultats du test de *Killing* à une dilution de 10^4 UFC/mL. (A) Inoculum *S. epidermidis* CIP 6821, (B) revêtements PDA- IO_4^- et (C) revêtement PDA- IO_4^- -Cl, après 3 h en contact avec *S. epidermidis* CIP 6821 à une concentration de 10^7 UFC/mL.

Tableau 7 : Moyenne d'UFC/mL de *S. epidermidis* CIP 6821 après le test de *Killing* des revêtements PDA- IO_4^- et PDA- IO_4^- -Cl.

Echantillon	Inoculum	PDA- IO_4^-	PDA- IO_4^- -Cl
UFC/mL	$1,5 \cdot 10^7$ ($\pm 1,1 \cdot 10^6$)	$1,1 \cdot 10^7$ ($\pm 8,5 \cdot 10^5$)	$2,6 \cdot 10^6$ ($\pm 3,6 \cdot 10^5$)
% <i>Killing</i> / Inoculum	--	28,0	83,0
% <i>Killing</i> / PDA- IO_4^-	--	--	76,6

2.1.2.3 Revêtement PDA-PEI-Cl

2.1.2.3.1 Souche bactérienne *S. epidermidis* CIP 104777

Le revêtement non chloré PDA-PEI révèle une activité biocide de 70 % par rapport à l'inoculum tout comme le revêtement PDA seul, cette activité est plus élevée que face à la souche *E. coli* (70 % contre 49 %). La chloration entraîne quant à elle une augmentation de 75 % de l'activité antimicrobienne (Figure 9 et Tableau 8) amenant à une activité antibactérienne de 93 % pour le revêtement chloré. On remarque ainsi une similitude d'activité biocide du revêtement entre les souches bactériennes *S. epidermidis* et *E. coli*, on retrouve en effet un pouvoir biocide autour de 95 % vis-à-vis de ces deux souches.

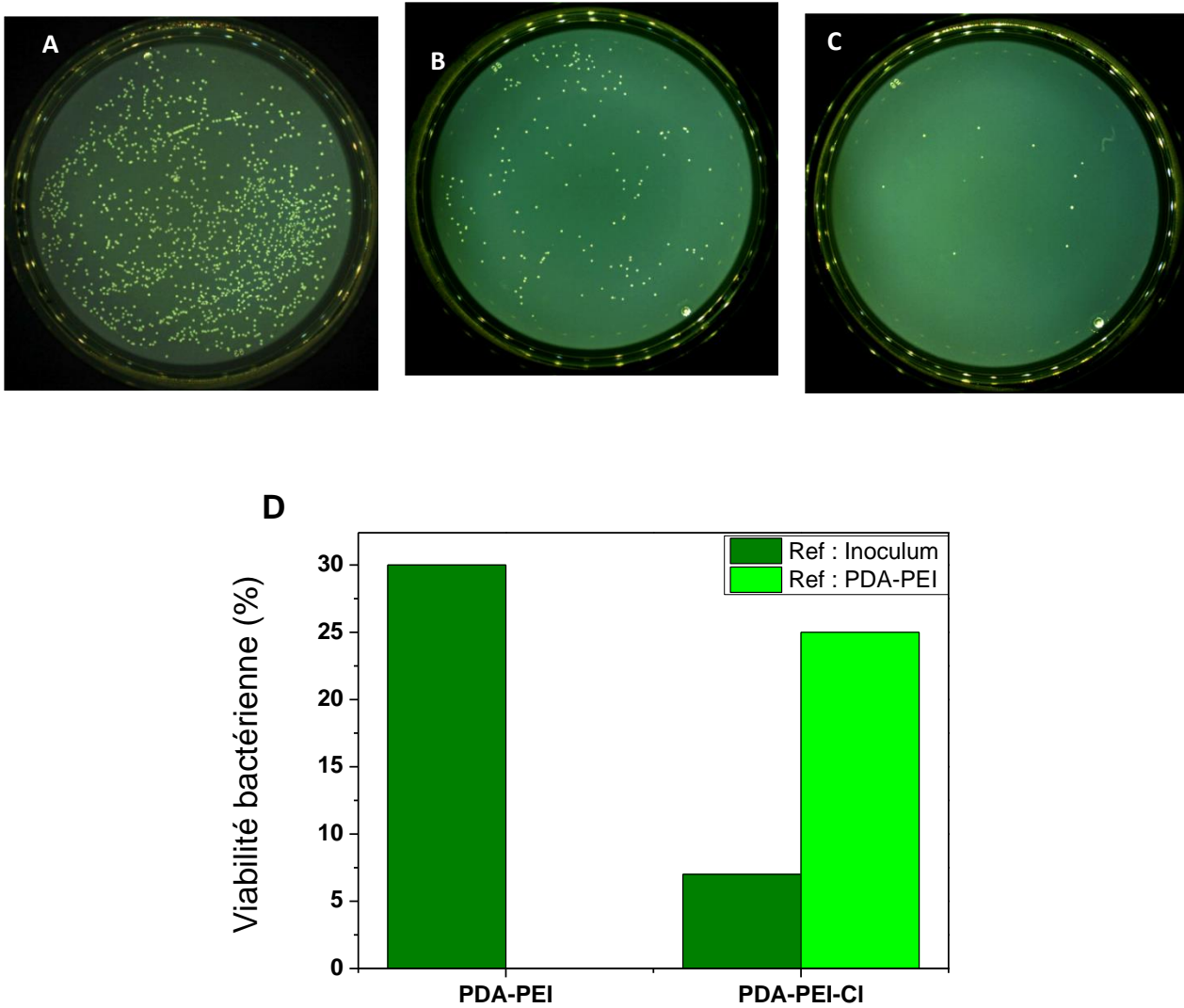


Figure 9 : Photographies de plaques d'agar présentant les résultats du test de *Killing* à une dilution de 10^4 UFC/mL. (A) Inoculum *S. epidermidis* CIP 104777, (B) revêtements PDA-PEI et (C) PDA-PEI-Cl, après 3 h en contact à 37°C avec *S. epidermidis* CIP 104777 à une concentration de 10^6 UFC/mL. Viabilité bactérienne estimée après le test de *Killing* vis-à-vis de l'inoculum *S. epidermidis* et du revêtement PDA-PEI non chloré.

Tableau 8 : Moyenne d'UFC/mL de *S. epidermidis* CIP 104777 après le test de *Killing* des revêtements PDA-PEI et PDA-PEI-Cl.

Echantillon	Inoculum	PDA-PEI	PDA-PEI-Cl
UFC/mL	8,3 10 ⁶ (± 1,6 10 ⁶)	2,5 10 ⁶ (± 1,6 10 ⁵)	6,1 10 ⁵ (± 1,1 10 ⁵)
% <i>Killing</i> / Inoculum	--	70,2	93,3
% <i>Killing</i> / PDA-PEI	--	--	75,1

2.1.2.3.2 Souche bactérienne *S. epidermidis* CIP 6821

Enfin, le revêtement non chloré PDA-PEI, révèle une activité biocide de 20 % par rapport à l'inoculum, activité légèrement supérieure par rapport au revêtement PDA seul, cette activité est beaucoup plus faible que face à la souche *S. epidermidis* CIP 104777 et la souche *E. coli* ; pour rappel cette baisse est également constatée pour les 2 autres revêtements. La chloration amène quant à elle une augmentation de 60 % de l'activité antimicrobienne (Figure 10 et Tableau 9) conduisant à une activité antibactérienne de 67 % pour le revêtement chloré. On remarque ainsi une nette baisse de l'activité biocide du revêtement chloré entre la souche *S. epidermidis* CIP 6821 et les souches *E. coli* et *S. epidermidis* CIP 104777.

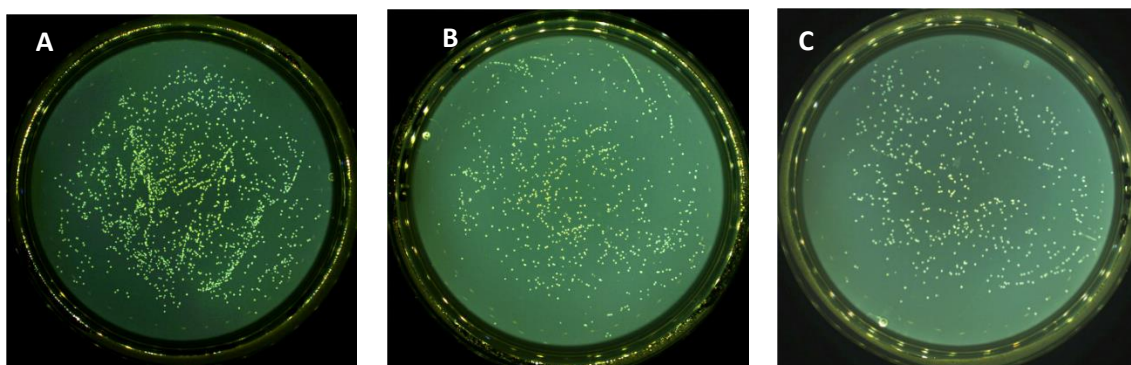


Figure 10 : Photographies de plaques d'agar présentant les résultats du test de *Killing* à une dilution de 10^4 UFC/mL. (A) Inoculum *S. epidermidis* CIP 6821, (B) revêtements PDA-PEI et (C) PDA-PEI-Cl, après 3 h en contact à 37°C avec *S. epidermidis* CIP 6821 à une concentration de 10^7 UFC/mL. Viabilité bactérienne estimée après le test de *Killing* vis-à-vis de l'inoculum *S. epidermidis* et du revêtement PDA-PEI non chloré.

Tableau 9 : Moyenne d'UFC/mL de *S. epidermidis* CIP 6821 après le test de *Killing* des revêtements PDA-PEI et PDA-PEI-Cl.

Echantillon	Inoculum	PDA-PEI	PDA-PEI-Cl
UFC/mL	$1,5 \cdot 10^7$ ($\pm 1,1 \cdot 10^6$)	$1,2 \cdot 10^7$ ($\pm 1,0 \cdot 10^6$)	$5,1 \cdot 10^6$ ($\pm 7,4 \cdot 10^5$)
% <i>Killing</i> / Inoculum	--	19,0	66,6
% <i>Killing</i> / PDA-PEI	--	--	58,7

2.3 Conclusion

Ainsi, les tests microbiologiques menés sur la souche *E. coli* montrent tout d'abord pour le revêtement PDA-O₂, que les films PDA chlorés sont capables de réduire l'adhérence d'*E. coli* jusqu'à 45 % par rapport à une surface biocompatible (TMX), tandis que dans le même temps la viabilité bactérienne est réduite de 99% sur le revêtement de PDA chloré vis-à-vis de l'inoculum, 86 % face à la souche *S. epidermidis* CIP 104777 et 70 % contre la souche *S. epidermidis* CIP 6821. Le revêtement PDA-Cl révèle ainsi une meilleure activité antibactérienne vis-à-vis d'une souche Gram - (Tableau 10).

CHAPITRE V

Evaluation des propriétés antibactériennes des revêtements PDA et PDA-PEI après un traitement d'halogénéation des fonctions amine

Pour le revêtement PDA-IO₄⁻, la chloration amène à une augmentation de l'effet biocide de 91 % amenant à une activité antibactérienne de 97 % pour la souche *E. coli*. De même, pour la souche *S. epidermidis* CIP 6821 une augmentation de 78 % de l'effet biocide est observée pour le revêtement chloré par rapport au revêtement non chloré (Tableau 10).

Enfin, pour le revêtement composite PDA-PEI, la chloration apporte une diminution de la viabilité bactérienne de 86 % par rapport au revêtement non chloré conduisant à une activité biocide du revêtement chloré de 97 % face à la souche *E. coli* et également de 93 % vis-à-vis de la souche *S. epidermidis* CIP 104777, en revanche on observe uniquement une activité biocide de 67 % pour la souche *S. epidermidis* CIP 6821. Une activité antibactérienne comparable entre les deux types de bactérie (*Gram +* et *Gram -*) est observée pour le revêtement PDA-PEI-Cl (Tableau 10).

Ainsi, au vu des résultats, il semblerait que les revêtements PDA-O₂-Cl et PDA-PEI-Cl présentent les meilleures activités antibactériennes vis-à-vis des deux types de souche bactérienne testés.

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des résultats des tests de *Killing*.

	PDA	PDA-O ₂ -Cl		PDA-IO ₄ ⁻	PDA-IO ₄ ⁻ -Cl		PDA-PEI	PDA-PEI-Cl	
Référence	Inoculum	Inoculum	PDA	Inoculum	Inoculum	PDA	Inoculum	Inoculum	PDA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	99,5 %	99,0 %	34,0 %	73,4 %	97,7 %	91,4%	48,9 %	97,4 %	86,2 %
<i>S. epidermidis</i> CIP 6821	5,3 %	70,0 %	59,4 %	28,0 %	83,0 %	76,6 %	19,0 %	66,6 %	58,7 %
<i>S. epidermidis</i> CIP 104777	70,1 %	86,0 %	54,2 %	–	–	–	70,2 %	93,3 %	75,1 %

3. Evaluation des propriétés bactériostatiques

On ne connaît des fonctions haloamine qu'un effet biocide, comme présenté dans l'étude précédente, il nous a paru intéressant de tester également les propriétés bactériostatiques du revêtement *N*-halamine car très peu d'études les mentionnent. A notre connaissance, seuls les travaux de Qu *et al.* ont pu mettre en avant un effet bactériostatique du chitosan renfermant des fonctions N-Cl.¹³

L'effet bactériostatique consiste en un ralentissement de la croissance bactérienne, il peut être évalué par le test sandwich (*Cf. Chapitre II*), tout comme pour le test de *Killing*, mais en se plaçant en condition de croissance bactérienne, c'est-à-dire à 37°C et dans un milieu dit riche (*i.e.* contenant des nutriments) dans lequel les bactéries peuvent se multiplier. Dans cette étude, l'inhibition de croissance a été évaluée vis-à-vis des souches bactériennes *E. coli* et *S. epidermidis* CIP 6821, deux souches ne produisant pas de biofilm. Ce qui sera ainsi évalué est le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne par rapport à l'inoculum et au revêtement non chloré correspondant, après comptage des bactéries viables sur plaques d'agar-LB ou agar-MH suivant la souche bactérienne étudiée.

3.1 Revêtement PDA-O₂-Cl

3.1.1 Souche bactérienne *E. coli*

Les propriétés bactériostatiques des revêtements PDA-O₂ et PDA-O₂-Cl vis-à-vis de la souche *E. coli* ont été évaluées à travers un test en sandwich effectué en triplicata. Les résultats sont présentés sur la Figure 11 et les données moyennes sont rapportées dans le Tableau 11.

On remarque que le revêtement non chloré PDA-O₂, conduit à une inhibition de la croissance bactérienne de 95 % par rapport à l'inoculum. Ainsi en plus de propriétés biocides, le revêtement non chloré présente également un effet bactériostatique important. La chloration entraîne également une augmentation de 75 % de l'activité bactériostatique par rapport au revêtement non chloré, conduisant à une inhibition de la croissance bactérienne de 99 % au

regard de l'inoculum. On constate ainsi que les fonctions haloamine, en plus d'un effet biocide déjà montré, confèrent au revêtement des propriétés bactériostatiques importantes, de l'ordre de 99 %.

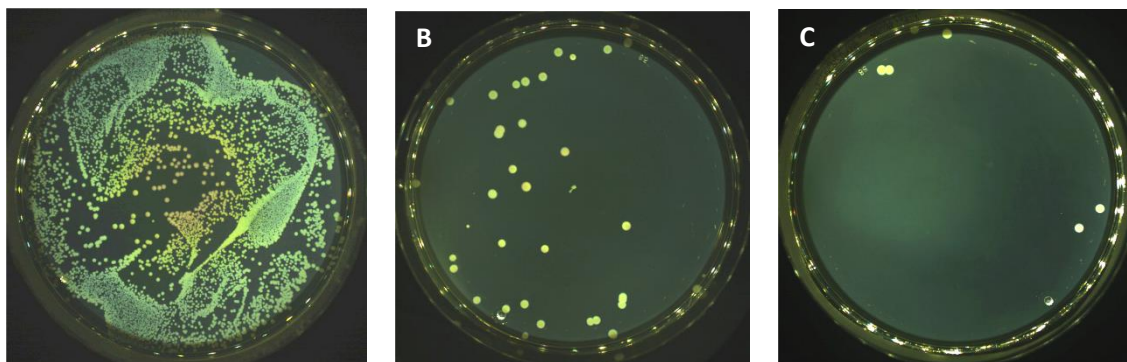


Figure 11 : Photographies optiques de plaques d'agar présentant les résultats du test d'inhibition à une dilution de 10^4 UFC/mL. (A) Inoculum *E. coli*, (B) revêtements PDA- O_2 et (C) PDA- O_2 -Cl, après 3 h en contact à 37°C avec *E. coli* à une concentration de 10^8 UFC/mL.

Tableau 11 : Moyenne d'UFC/mL d'*Escherichia coli* après le test d'inhibition des revêtements PDA- O_2 et PDA- O_2 -Cl.

Echantillon	Inoculum	PDA- O_2	PDA- O_2 -Cl
UFC/mL	$6,5 \cdot 10^8$ ($\pm 1,5 \cdot 10^8$)	$3,3 \cdot 10^7$ ($\pm 5,5 \cdot 10^6$)	$8,1 \cdot 10^6$ ($\pm 6,3 \cdot 10^5$)
% inhibition / Inoculum	--	95,0	99,0
% inhibition / PDA- O_2	--	--	75,0

3.1.2 Souche bactérienne *S. epidermidis* CIP 6821

Evaluons maintenant les propriétés bactériostatiques des revêtements PDA- O_2 et PDA- O_2 -Cl vis-à-vis de la souche *Gram + S. epidermidis* CIP 6821. Les résultats sont présentés sur la Figure 12 et les données moyennes sont rapportées dans le Tableau 12.

CHAPITRE V

Evaluation des propriétés antibactériennes des revêtements PDA et PDA-PEI après un traitement d'halogénéation des fonctions amine

Les résultats exhibent pour le revêtement non chloré PDA-O₂, une inhibition de la croissance bactérienne de 87 % par rapport à l'inoculum révélant ainsi un effet bactériostatique de ce film vis-à-vis de la souche *S. epidermidis* CIP 6821. La chloration quant à elle conduit à une augmentation de 73,0 % de l'activité bactériostatique par rapport à son homologue chloré, amenant à une inhibition de la croissance bactérienne de 98,3 % par rapport à l'inoculum, une activité antibactérienne similaire à celle observée vis-à-vis la souche *E. coli*. Ainsi le revêtement PDA-O₂-Cl, en plus de présenter un effet bactériostatique contre la souche *E. coli*, présente également des propriétés d'inhibition de croissance importantes (99 %) contre la souche *S. epidermidis* CIP 6821.

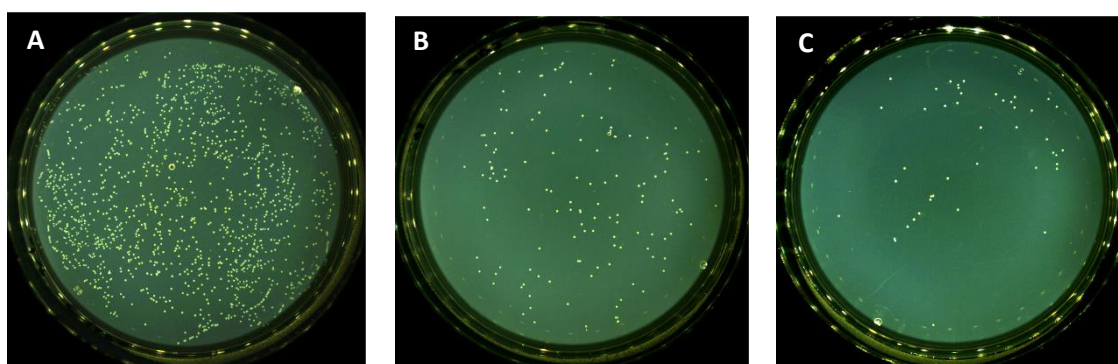


Figure 12 : Photographies optiques de plaques d'agar présentant les résultats du test d'inhibition à une dilution de 10⁶ UFC/mL. (A) Inoculum *S. epidermidis* CIP 6821, (B) revêtements PDA-O₂ et (C) PDA-O₂-Cl, après 3 h en contact à 37°C avec *S. epidermidis* CIP 6821 à une concentration de 10⁹ UFC/mL.

Tableau 12 : Moyenne d'UFC/mL de *S. epidermidis* CIP 6821 après le test d'inhibition des revêtements PDA-O₂ et PDA-O₂-Cl.

Echantillon	Inoculum	PDA-O ₂	PDA-O ₂ -Cl
UFC/mL	1,6 10 ⁹ (± 1,2 10 ⁸)	1,0 10 ⁸ (± 3,0 10 ⁷)	2,7 10 ⁷ (± 9,3 10 ⁶)
% inhibition / Inoculum	--	93,7	98,3
% inhibition / PDA-O ₂	--	--	73,0

3.2 Revêtement PDA-IO₄⁻-Cl

Les propriétés bactériostatiques des revêtements PDA-IO₄⁻ et PDA-IO₄⁻-Cl ont été évaluées uniquement vis-à-vis de la souche *S. epidermidis* CIP 6821 à travers un test en sandwich effectué en triplicata. Les résultats sont présentés sur la Figure 13 et les données moyennes sont rapportées dans le Tableau 13.

On constate que le revêtement non chloré révèle une inhibition de la croissance bactérienne de 94 % par rapport à l'inoculum. Ainsi tout comme pour le revêtement PDA-O₂, le revêtement non chloré semble présenter un effet bactériostatique. La chloration du revêtement et donc l'introduction de fonctions chloramine au sein de la structure conduit à une augmentation de 56 % de l'activité bactériostatique soit à une inhibition de la croissance bactérienne de 99,3 % en comparaison à l'inoculum. Ainsi tout comme pour le revêtement PDA-O₂-Cl, le film PDA-IO₄⁻-Cl arbore, en plus d'un effet biocide déjà démontré précédemment, des propriétés bactériostatiques élevées (plus de 99 %).

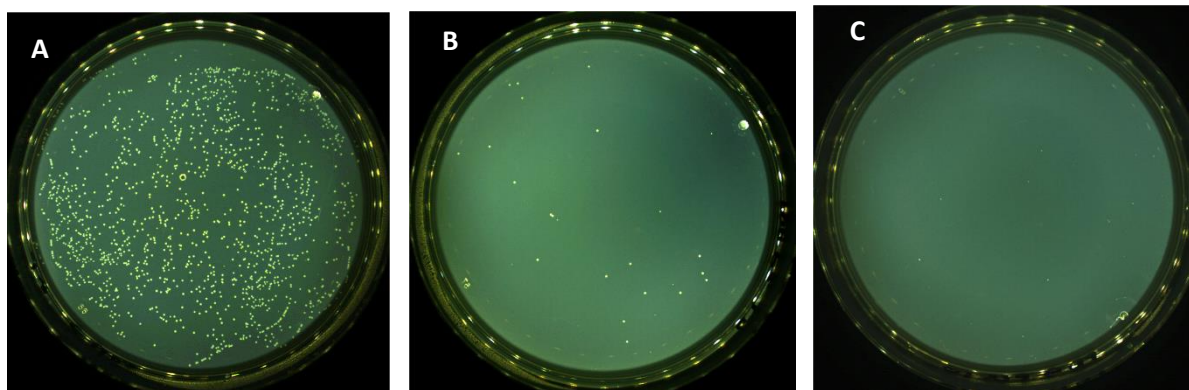


Figure 13 : Photographies optiques de plaques d'agar présentant les résultats du test d'inhibition à une dilution de 10⁶ UFC/mL. (A) Inoculum *S. epidermidis* CIP 6821, (B) revêtements PDA- IO₄⁻ et (C) PDA- IO₄⁻-Cl, après 3 h en contact à 37°C avec *S. epidermidis* CIP 6821 à une concentration de 10⁹ UFC/mL.

Tableau 13 : Moyenne d'UFC/mL de *S. epidermidis* CIP 6821 après le test d'inhibition des revêtements PDA-IO₄⁻ et PDA-IO₄⁻Cl.

Echantillon	Inoculum	PDA-IO ₄ ⁻	PDA-IO ₄ ⁻ Cl
UFC/mL	1,6 10 ⁹ (± 1,2 10 ⁸)	2,7 10 ⁷ (± 9,8 10 ⁶)	1,2 10 ⁷ (± 5,7 10 ⁶)
% inhibition / Inoculum	--	93,8	99,3
% inhibition / PDA-IO ₄ ⁻	--	--	55,5

3.3 Revêtement PDA-PEI-Cl

3.3.1 Souche bactérienne *E. coli*

Les propriétés bactériostatiques des revêtements PDA-PEI et PDA-PEI-Cl ont été évaluées vis-à-vis de la souche *E. coli* à travers un test en sandwich effectué en triplicata. Les résultats sont présentés sur la Figure 14 et les données moyennes sont rapportées dans le Tableau 14.

Les résultats révèlent tout d'abord que le revêtement non chloré PDA-PEI ne conduit pas à une inhibition de la croissance bactérienne par rapport à l'inoculum. Il semblerait donc que l'ajout du PEI inhibe l'effet de réduction de la croissance bactérienne mis en évidence précédemment pour le revêtement PDA seul. La chloration apporte quant à elle une augmentation de 99 % de l'activité antimicrobienne par rapport au revêtement non chloré (Figure 14 et Tableau 14) amenant à une activité bactériostatique de 98 % pour le revêtement chloré par rapport à l'inoculum. En effet, comme on peut l'observer sur la Figure 14, se plaçant à une dilution de 10⁴ UFC/mL, on constate une absence de pousse bactérienne pour le revêtement PDA-PEI-Cl, révélant ainsi une concentration de bactéries revivifiables recueillies plus basse après contact avec les revêtements *N*-chloramine. Ce résultat confirme ainsi l'observation précédente à savoir une activité bactériostatique démontrée des fonctions chloramine.

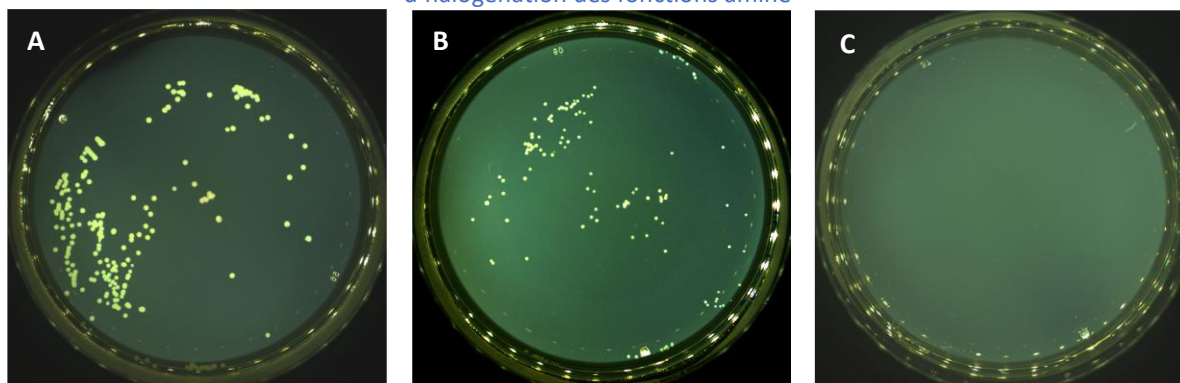


Figure 14 : Photographies optiques de plaques d'agar présentant les résultats du test d'inhibition à une dilution de 10^4 UFC/mL. (A) Inoculum *E. coli*, (B) revêtements PDA-PEI et (C) PDA-PEI-Cl, après 3 h en contact à 37°C avec *Escherichia coli* à une concentration de 10^7 UFC/mL.

Tableau 14 : Moyenne d'UFC/mL d'*Escherichia coli* après le test d'inhibition des revêtements PDA-PEI et PDA-PEI-Cl

Echantillon	Inoculum	PDA-PEI	PDA-PEI-Cl
UFC/mL	$3,1 \cdot 10^7$ ($\pm 2,4 \cdot 10^6$)	$3,5 \cdot 10^7$ ($\pm 8,0 \cdot 10^6$)	$3,5 \cdot 10^5$ ($\pm 6,0 \cdot 10^5$)
% inhibition / Inoculum	--	-12,0	98,0
% inhibition / PDA-PEI	--	--	99,0

3.3.2 Souche bactérienne *S. epidermidis* CIP 6821

Evaluons maintenant les propriétés bactériostatiques des revêtements PDA-PEI et PDA-PEI-Cl vis-à-vis de la souche *S. epidermidis* CIP 6821 par un test en sandwich effectué en triplicata. Les résultats sont présentés sur la Figure 15 et les données moyennes sont rapportées dans le Tableau 15.

CHAPITRE V

Evaluation des propriétés antibactériennes des revêtements PDA et PDA-PEI après un traitement d'halogénéation des fonctions amine

On remarque que le revêtement composite non chloré PDA-PEI montre une inhibition de la pousse bactérienne de 96,6 % par rapport à l'inoculum. Ces données confirment qu'en plus de propriétés biocides, le composite non chloré présente également un effet bactériostatique. La chloration permet une augmentation de 52,0 % de l'activité bactériostatique conduisant à une inhibition de la croissance bactérienne de 98,3 %, activité similaire vis-à-vis de la souche *E. coli*. On constate ainsi que les fonctions chloramine conduisent, en plus d'un effet biocide déjà montré, à des propriétés bactériostatiques importantes (98 %).

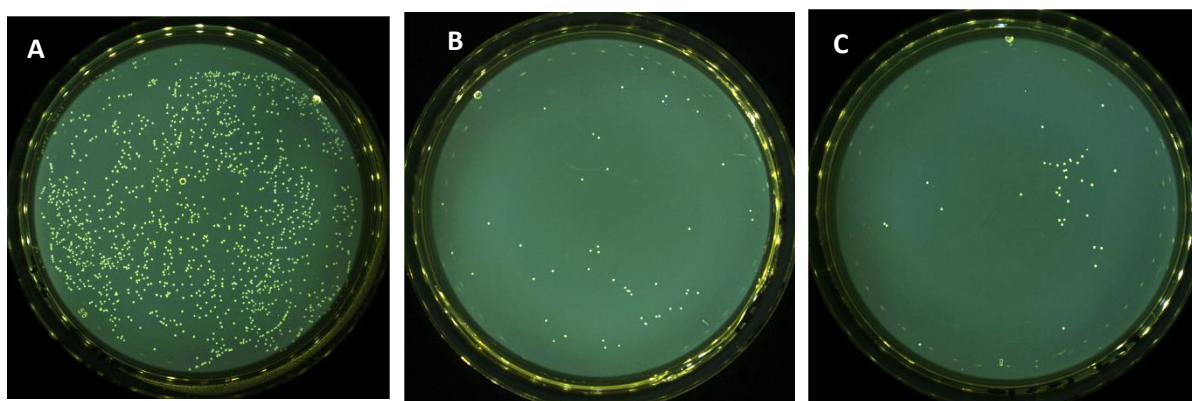


Figure 15 : Photographies optiques de plaques d'agar présentant les résultats du test d'inhibition à une dilution de 10^6 UFC/mL. (A) Inoculum *S. epidermidis* CIP 6821, (B) revêtements PDA-PEI et (C) PDA-PEI-Cl, après 3 h en contact à 37°C avec *S. epidermidis* à une concentration de 10^9 UFC/mL.

Tableau 15 : Moyenne d'UFC/mL de *S. epidermidis* CIP 6821 après le test d'inhibition des revêtements PDA-PEI et PDA-PEI-Cl.

Echantillon	Inoculum	PDA-PEI	PDA-PEI-Cl
UFC/mL	$1,6 \cdot 10^9$ ($\pm 1,2 \cdot 10^8$)	$5,4 \cdot 10^7$ ($\pm 5,3 \cdot 10^6$)	$2,6 \cdot 10^7$ ($\pm 5,2 \cdot 10^6$)
% Inhibition / Inoculum	--	96,0	97,7
% Inhibition / PDA-PEI	--	--	51,9

3.4 Conclusion

En conclusion des tests, on peut affirmer un mode d'action antibactérien des fonctions chloramine immobilisées dans les revêtements testés par inhibition de la croissance bactérienne vis-à-vis des souches *Gram +* ou *Gram -* (Tableau 16).

En effet, nos études montrent une croissance bactérienne réduite de 99 % sur le revêtement de PDA chloré vis-à-vis de la souche *E. coli*, et de 98 % contre la souche *S. epidermidis* CIP 6821. Le revêtement PDA-Cl révèle ainsi une activité antibactérienne comparable pour ces deux souches.

Pour le revêtement PDA-IO₄⁻, la chloration amène à une augmentation de l'effet bactériostatique de 55 % conduisant à une activité antibactérienne de 99 % vis-à-vis de la souche *S. epidermidis* CIP 6821.

Enfin, pour le revêtement composite PDA-PEI, la chloration apporte une activité inhibitrice de la croissance bactérienne à hauteur de 99 % par rapport au revêtement non chloré conduisant à une activité biocide du revêtement chloré de 98 % face à la souche *E. coli* et également de 98 % vis-à-vis de *S. epidermidis* CIP 6821. Une activité antibactérienne comparable pour les deux types de bactérie est observée pour le revêtement PDA-PEI-Cl.

Ainsi, au vu des résultats, il semblerait que les revêtements PDA-O₂-Cl et PDA-PEI-Cl présentent des activités bactériostatiques comparables.

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des résultats des tests d'inhibition de la croissance bactérienne.

	PDA		PDA-O ₂ -Cl		PDA-IO ₄ ⁻		PDA-IO ₄ ⁻ -Cl		PDA-PEI		PDA-PEI-Cl	
Référence	Inoculum		Inoculum	PDA	Inoculum		Inoculum	PDA	Inoculum		Inoculum	PDA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	95,0 %		99,0 %	75,0 %	-		-	-	12,0 %		98,0 %	99,0 %
<i>S. epidermidis</i> CIP 6821	93,7 %		98,3 %	73,0 %	93,8 %		99,3 %	55,5 %	96,0 %		97,7 %	51,9 %

Conclusion

En conclusion, l'évaluation des propriétés antibactériennes des fonctions chloramine révèle un effet antiadhésif du revêtement PDA à hauteur de 45 % de réduction de l'adhérence bactérienne face à la souche *E. coli* par rapport à une surface non chlorée (Figure 16).

L'étude des propriétés biocides des revêtements chlorés révèle quant à elle une augmentation de l'effet bactériostatique comparé au revêtement non chloré allant de 34 % pour le revêtement PDA-O₂ à 91 % pour le revêtement PDA-IO₄⁻ vis-à-vis de la souche *E. coli*, et allant à 54 % (pour le revêtement PDA-O₂) à 75 % (pour le revêtement PDA-PEI) vis-à-vis de la souche *S. epidermidis* CIP 6821. On retrouve ainsi des taux de réduction de viabilité bactérienne par rapport à l'inoculum pour les revêtements chlorés allant de 86,0 % à plus de 99,5 %. Au vu de ces résultats, les revêtements PDA-O₂-Cl et PDA-PEI-Cl semblent apporter la meilleure réponse biocide (Figure 16).

Cette étude a également permis de mettre en évidence un effet bactériostatique des revêtements chlorés avec une activité d'inhibition de croissance de plus de 98 %, ce sont encore là les revêtements PDA-O₂-Cl et PDA-PEI-Cl qui présentent les plus hauts taux d'inhibition de croissance (Figure 16).

Enfin, il a été démontré que les revêtements PDA (PDA-O₂ et PDA-IO₄⁻) présentent à eux seuls un effet antiadhésif à hauteur de 18 %, bactéricide (de 70 % à 99 %) et bactériostatique (95 % d'inhibition de croissance). En revanche il a été constaté que l'ajout de PEI amenait une annulation de cet effet bactériostatique du revêtement PDA.

Ainsi, il apparait que le revêtement PDA-O₂-Cl présente la meilleure réponse antibactérienne vis-à-vis des deux types de souche bactérienne testés en termes d'anti-adhérence, de propriétés bactéricides et bactériostatiques.

CHAPITRE V

Evaluation des propriétés antibactériennes des revêtements PDA et PDA-PEI après un traitement d'halogénéation des fonctions amine

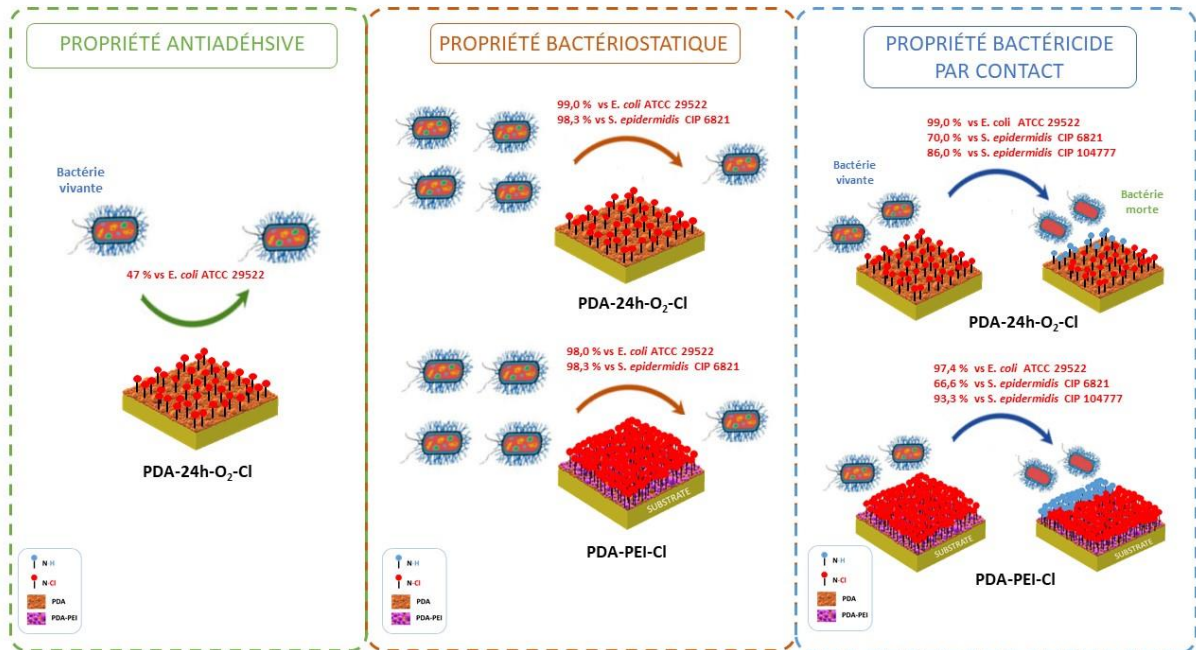


Figure 16 : Schéma bilan présentant les revêtements offrant les meilleurs effets antiadhésifs, bactériostatiques et bactéricides.

Références

1. Rabin, N.; Zheng, Y.; Opoku-Temeng, C.; Du, Y.; Bonsu, E.; Sintim, H. O., Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry* **2015**, *7* (4), 493-512.
2. Nickel, J. C.; Ruseska, I.; Wright, J. B.; Costerton, J. W., Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobiology Agents Chemotherapy* **1985**, *27* (4), 619-624.
3. Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M., Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* **1995**, *49*, 711-745.
4. Olsen, I., Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **2015**, *34* (5), 877-886.
5. Mah, T. F., Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology* **2012**, *7* (9), 1061-1072.
6. Lu, Y.; Yue, Z.; Wang, W.; Cao, Z., Strategies on designing multifunctional surfaces to prevent biofilm formation. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* **2015**, *9* (3), 324-335.
7. Timofeeva, L.; Kleshcheva, N., Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. *Applied Microbiology Biotechnology* **2011**, *89* (3), 475-492.
8. Sun, X.; Cao, Z.; Sun, Y., N-Chloro-alkoxy-s-triazine-Based Antimicrobial Additives: Preparation, Characterization, and Antimicrobial and Biofilm-Controlling Functions. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2009**, *48* (2), 607-612.
9. Jacangelo, J. G.; Olivieri, V. P.; Kawata, K., Oxidation of sulfhydryl groups by monochloramine. *Water Research* **1987**, *21* (11), 1339-1344.
10. Kou, L.; Liang, J.; Ren, X.; Kocer, H. B.; Worley, S. D.; Tzou, Y. M.; Huang, T. S., Synthesis of a Water-Soluble Siloxane Copolymer and Its Application for Antimicrobial Coatings. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2009**, *48* (14), 6521-6526.
11. Ma, Y.; Li, J.; Si, Y.; Huang, K.; Nitin, N.; Sun, G., Rechargeable Antibacterial N-Halamine Films with Antifouling Function for Food Packaging Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11* (19), 17814-17822.
12. Ma, K.; Jiang, Z.; Li, L.; Liu, Y.; Ren, X.; Huang, T.-S., N-halamine modified polyester fabrics: Preparation and biocidal functions. *Fibers and Polymers* **2014**, *15* (11), 2340-2344.
13. Xi, G.; Xiu, Y.; Wang, L.; Liu, X., Antimicrobial N-halamine coatings synthesized via vapor-phase assisted polymerization. *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, *132* (15), 418-424.
14. Zhang, S.; Kai, C.; Liu, B.; Zhang, S.; Wei, W.; Xu, X.; Zhou, Z., Preparation, characterization and antibacterial properties of cellulose membrane containing N-halamine. *Cellulose* **2019**, *26* (9), 5621-5633.

15. Wei Yang, C. L., and Yi Chen, Stability of Polydopamine Coatings on Gold Substrates Inspected by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Langmuir* **2018**, *34*, 3565–3571.
16. Hong, S.; Wang, Y.; Park, S. Y.; Lee, H., Progressive fuzzy cation- π assembly of biological catecholamines. *Science Advances* **2018**, *4* (9), eaat7457.
17. Chen, T.-P.; Liu, T.; Su, T.-L.; Liang, J., Self-Polymerization of Dopamine in Acidic Environments without Oxygen. *Langmuir* **2017**, *33* (23), 5863-5871.
18. Zheng, W.; Fan, H.; Wang, L.; Jin, Z., Oxidative Self-Polymerization of Dopamine in an Acidic Environment. *Langmuir* **2015**, *31* (42), 11671-11677.
19. Jiang, J.; Zhu, L.; Zhu, L.; Zhu, B.; Xu, Y., Surface characteristics of a self-polymerized dopamine coating deposited on hydrophobic polymer films. *Langmuir* **2011**, *27* (23), 14180-14187.
20. Ponzio, F.; Barthès, J.; Bour, J.; Michel, M.; Bertani, P.; Hemmerlé, J.; d'Ischia, M.; Ball, V., Oxidant Control of Polydopamine Surface Chemistry in Acids: A Mechanism-Based Entry to Superhydrophilic-Superoleophobic Coatings. *Chemistry of Materials* **2016**, *28* (13), 4697-4705.
21. Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B., Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Analytical Biochemistry* **1979**, *94* (1), 75-81.
22. Del Frari, D.; Bour, J.; Ball, V.; Toniazzo, V.; Ruch, D., Degradation of polydopamine coatings by sodium hypochlorite: A process depending on the substrate and the film synthesis method. *Polymer Degradation and Stability* **2012**, *97* (9), 1844-1849.

Conclusion générale et perspectives

Ce projet de thèse s'inscrit dans le contexte de la lutte contre la biocontamination de surface par le développement de stratégies novatrices pour protéger les surfaces de matériaux. En effet, ce phénomène constitue un enjeu socioéconomique important qui a de nombreuses conséquences touchant différents domaines à travers les infections nosocomiales et alimentaires, la détérioration des matériaux, les dégradations des structures ou encore le phénomène de biodégradation. Pour lutter contre ces problèmes de biocontamination, l'utilisation massive de produits biocides nocifs pour l'environnement et contribuant à l'évolution croissante de résistance bactérienne aux antibiotiques sont des conséquences négatives indirectes de ce phénomène. La mise en place de solutions préventives et écologiques est souvent mise à mal par la complexité de leur mise en œuvre et leur coût élevé.

L'innovation proposée dans cette étude repose sur l'utilisation de revêtements *N*-halamine à base de polydopamine (PDA); les *N*-halamines étant connus pour leur activité antimicrobienne à large spectre due à l'halogène qui se trouve à un degré d'oxydation (+I) et qui a donc des propriétés oxydantes. Ils sont également reconnus pour leur grande stabilité chimique et leur facilité de mise en œuvre par un processus d'halogénéation (réaction de substitution de H portés par des fonctions amine, amide ou imide par Cl(+I) ou Br(+I)), grâce à une solution d'hypochlorite de sodium si l'on souhaite des fonctions chloramine ou une solution d'hypobromite de sodium si l'on souhaite générer des fonctions bromamine.

Notre choix de revêtement à base de PDA, un polymère produit par oxydation spontanée de la dopamine dans une solution basique et aérée, repose dans un premier temps sur la présence de fonctions amine indispensables pour le greffage *a posteriori* de fonctions *N*-halamine. Ce choix a également été motivé par les propriétés de forte adhérence sur une large gamme de matériaux que propose ce polymère, devenant l'un des revêtements de choix dans le domaine de la fonctionnalisation de surface.

Afin de déterminer et d'évaluer la faisabilité d'un tel projet, des surfaces « modèles » ont été élaborées en immobilisant différents types de revêtement *N*-halamine à base de PDA sur des surfaces d'or et de silicium. Cette élaboration repose sur 2 étapes clés qui ont été étudiées et optimisées : le dépôt du revêtement à base de PDA et la création des fonctions chloramine/bromamine. Une évaluation des propriétés antibactériennes a été par la suite menée sur ces systèmes en tentant également de comprendre le ou les mécanismes antibactériens impliqués. En effet, il existe trois grandes classes de mode d'action/d'effet

antibactérien : l'anti-adhérence bactérienne, l'inhibition du développement des bactéries ou effet bactériostatique, et le mode d'action biocide ou effet bactéricide. Ces derniers peuvent agir par contact et/ou par relargage de substances antibactériennes présentes à la surface des matériaux. Dans le cas des fonctions haloamine, il a été rapporté dans la littérature un mode d'action biocide par contact, mais aussi, en fonction du type de revêtement, par relargage de chlore (+I). Ces propriétés ont été étudiées et vérifiées dans le cas de nos systèmes *N*-halamine.

La première étape du développement de ces revêtements antibactériens a été l'étude du dépôt du film à base de PDA. Un suivi de la formation du film de PDA sur surface d'or dans une solution non désaérée à pH=8,5 (dépôt classique) a été réalisé *in situ* par QCM et *ex situ* par PM-IRRAS, ellipsométrie, XPS et mesure d'angle de contact à l'eau. Ces techniques de caractérisation ont permis de montrer qu'après 24 heures, l'épaisseur du film de PDA-O₂ n'augmente quasiment plus, son épaisseur est comprise entre 40 et 50 nm, en notant que cette épaisseur dépend du substrat (Au ou Si). Une étude du mode de dépôt par voie *Grafting from* a également été validée, voie pour laquelle le dépôt de la PDA a été mené à partir non pas de la polymérisation de la dopamine en surface mais directement à l'aide d'une solution de PDA vieillie pendant 24 h (agrégats sphériques de PDA).

Dans un souci d'optimisation de la quantité de fonctions haloamine disponibles à la surface du matériau à protéger, 3 voies supplémentaires de dépôt de la PDA permettant d'augmenter la quantité de fonctions amine ont été envisagées. La première a été l'augmentation de l'épaisseur du film de PDA en effectuant soit un dépôt multicouche, soit en employant un oxydant plus puissant à savoir le périodate de sodium (revêtement nommé PDA-IO₄⁻). Cette dernière voie de fonctionnalisation a permis d'accroître la cinétique de formation du film PDA tout en augmentant l'épaisseur du dépôt qui peut atteindre 100 nm après de 24 h. Néanmoins, le dépôt de PDA reste rugueux et dans le cas du dépôt en présence de périodate, il a été montré que des ions iodure restent emprisonnés dans le revêtement. La troisième voie a consisté en l'introduction d'un second polymère plus riche en fonction amine, la PEI connue pour jouer le rôle de réticulant au sein de la structure de PDA conduisant à des revêtements plus stables. Les analyses PM-IRRAS ont confirmé le dépôt du composite et les mesures XPS ont révélé un enrichissement du revêtement PDA-PEI en atome d'azote.

La deuxième étape du développement des revêtements *N*-halamine a été l'étude du suivi de la chloration/bromation *in situ* par QCM complétée par des études *ex situ* par PM-IRRAS, XPS et mesure d'angle de contact. Ces différents travaux ont permis de définir les paramètres de chloration optimum à savoir les temps de contact et concentrations en NaOCl/NaOBr, mais aussi d'étudier la stabilité des différents revêtements PDA déposés selon différentes voies.

Nous avons constaté ainsi une chloration satisfaisante pour le revêtement PDA-O₂ faisant état d'une densité de fonctions N-Cl immobilisées de l'ordre de $3,1 \cdot 10^{21}$ at/cm³ correspondant à une chloration de 60 % des fonctions amine. Il a également pu être montré une bromation à hauteur de 50 % des fonctions amine présentes dans le revêtement. Par ailleurs, dans le cas d'un dépôt *Grafting from*, une instabilité importante lors de la chloration a été observée révélant ainsi l'importance des oligomères formant « un tapis dense » durant les premières heures de polymérisation de la dopamine. Enfin, concernant le dépôt multicouche, l'étude de la chloration par QCM a conduit à une plus grande prise de masse par rapport au revêtement monocouche passant de 1,8 à 2,3 µg en analyse QCM. Il y aurait ainsi plus de chlore immobilisé dans la structure du film PDA-multicouche par rapport au film équivalent PDA-O₂.

Quant au revêtement PDA-IO₄⁻ présentant une épaisseur plus importante comparé au revêtement classique, à savoir 100 nm, la chloration a également été réussie permettant de chlorer 34 % des fonctions amine de la structure. On constate ainsi une immobilisation de Cl(+I) 2 fois plus faible que pour le revêtement conventionnel sans doute du fait de la présence de fonctions N-I au sein de la structure. Le dosage chimique par TNB a révélé quant à lui une chloration de 10 % des fonctions amine, soit 3 fois moins que pour celui obtenu par l'étude XPS.

Enfin, le dernier dépôt étudié a été le film composite formé de la PDA et de la PEI. Il a été démontré une plus grande stabilité du revêtement conduisant à une concentration en NaOCl utilisée lors de la chloration 10 fois plus élevée pour des temps comparables à ceux du revêtement PDA seul. Cela peut être dû à la PEI connue pour jouer le rôle de réticulant au sein de la structure de PDA permettant ainsi d'obtenir des revêtements plus stables. La quantification des fonctions chloramine par XPS et dosage chimique révèle une chloration des fonctions amine à hauteur de 30 %.

Enfin, après avoir élaboré divers revêtements *N*-halamine à base de PDA, ces travaux ont été complétés par l'évaluation des propriétés antibactériennes (propriétés antiadhésives, bactéricides et bactériostatiques) des revêtements PDA-O₂-Cl, PDA-IO₄⁻-Cl et PDA-PEI-Cl ainsi obtenus. Pour cela, 2 souches de bactéries Gram positif de type *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) CIP 6821 (ne produisant pas de biofilm) et CIP 104777 (pouvant produire des biofilms), et 1 souche à Gram négatif *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 29522 ont été testés vis-à-vis de ces systèmes. Les divers tests microbiologiques effectués ont également permis de comprendre en parti le mécanisme et mode d'action antibactérien de ces dépôts *N*-halamine.

Cette étude a pu mettre en avant, tout d'abord un effet antiadhésif du revêtement PDA chloré à hauteur de 45 % de réduction de l'adhérence bactérienne face à la souche *E. coli* par rapport à une surface non chlorée.

Le mécanisme d'action des revêtements de PDA chlorés a également été étudié à travers un test dit du halo d'inhibition mettant en avant un mécanisme plutôt par contact direct plutôt que par relargage de chlore.

L'étude des propriétés biocides des revêtements chlorés a révélé quant à elle une augmentation de l'effet biocide comparé au revêtement non chloré allant de 34 % pour le revêtement PDA-O₂ à 91 % pour le revêtement PDA-IO₄⁻ vis-à-vis de la souche *E. coli*, et allant à 54 % (pour le revêtement PDA-O₂) à 75 % (pour le revêtement PDA-PEI) vis-à-vis de la souche *S. epidermidis* CIP 6821. On montre ainsi des taux de réduction de viabilité bactérienne par rapport à l'inoculum pour les revêtements chlorés allant de 86 % à plus de 99 %. Au vu de ces résultats, les revêtements PDA-O₂-Cl et PDA-PEI-Cl semblent apporter la meilleure réponse biocide.

Enfin, un effet bactériostatique des revêtements chlorés a également été mis en évidence, avec une activité d'inhibition de croissance de plus de 98 % ; ce sont là encore les revêtements PDA-O₂-Cl et PDA-PEI-Cl qui présentent les plus hauts taux d'inhibition de croissance. Il s'agit de la première fois qu'un tel effet bactériostatique est mis en évidence pour des revêtements *N*-halamine.

Enfin, il a été démontré que les revêtements PDA (PDA-O₂ et PDA-IO₄⁻) présentent à eux seuls un effet antiadhésif à hauteur de 18 %, bactéricide (de 70 % à 99 %) et bactériostatique (95 %

d'inhibition de croissance). En revanche il a été constaté que l'ajout de PEI amenait une annulation de cet effet bactériostatique du revêtement PDA.

Ainsi, il apparaît que le revêtement PDA-O₂-Cl présente la meilleure réponse antibactérienne vis-à-vis des deux types de souche bactérienne testés en termes d'anti-adhérence, de propriétés bactéricides et bactériostatiques.

Une amélioration de la compréhension des phénomènes mis en évidence au cours de cette thèse paraît notamment indispensable pour augmenter l'efficacité des surfaces antibactériennes créées. En effet, selon certaines normes, souvent liées à l'utilisation d'antibiotiques, il faudrait atteindre des efficacités de l'ordre de 99.99% pour un effet antibactérien reconnu. Cela permettra d'envisager le développement de revêtements fonctionnels applicables à des matériaux « réels », tel que cela avait été imaginé lorsque ce projet a été initié.

Une compréhension plus précise des différents mécanismes antibactériens mis en jeu de la part des revêtements *N*-halamine semble indispensable pour améliorer l'efficacité antibactérienne des surfaces créées. Cela peut être envisagé à travers, notamment, une analyse par microscopie à balayage électronique de la structure membranaire des bactéries adhérentes en surface ; ces analyses pourraient éventuellement mettre en évidence l'existence d'un endommagement membranaire dû aux fonctions chloramine dénotant de la lyse de la paroi membranaire.

Des analyses par microscopie optique à épifluorescence pourraient également compléter les tests d'adhérence et d'évaluation de l'activité biocide en permettant de distinguer pour les bactéries adhérentes en surface, à travers des marqueurs fluorescents, les bactéries mortes des bactéries vivantes. Enfin, pour appréhender plus finement les interactions se développant entre les microorganismes et les *N*-halamine, une étude de la force d'adhésion des bactéries par AFM pourrait également être envisagée.

Des voies d'amélioration du dépôt de PDA pourront être étudiées comme un dépôt par voie électrochimique comme il a été mentionné dans le *Chapitre I* permettant un meilleur contrôle de la polymérisation de la dopamine et également de pouvoir former le revêtement dans une solution de dopamine de pH neutre, voie possible uniquement pour des matériaux conducteurs. Des études préliminaires ont été menées révélant des épaisseurs de l'ordre de

20 nm au bout de quelques heures de dépôt soit 2 fois moins qu'en condition classique, dû au caractère isolant de la PDA. Une influence du pH a également été démontrée, le maximum de dépôt a été obtenu à pH 7. La littérature fait également état d'un dépôt possible par spray, méthode très intéressante pour des applications industrielles.

ANNEXE

A New Antibacterial *N*-Halamine Coating Based on Polydopamine

Nadia Nazi, Vincent Humblot,* and Catherine Debiemme-Chouvy*

Cite This: *Langmuir* 2020, 36, 11005–11014

Read Online

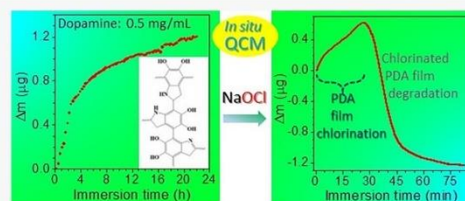
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: To prevent the formation of biofilms on material surfaces, the latter must have antibacterial properties. The aim of this study is to investigate the synthesis and the antibacterial effect of a new *N*-halamine coating based on polydopamine (PDA). The benefits of this coating are multiple, notably the green process used to prepare it and the wide variety of organic or inorganic materials that can be functionalized. First, the formation of the PDA coating by oxidative polymerization of dopamine in weak alkaline aqueous solution was studied and characterized. Then, these PDA films were exposed to a NaOCl solution in order to form chloramine functions into the coating, i.e., to immobilize oxidative chlorine on and into the coating. The PDA film chlorination was notably followed in situ by a quartz crystal microbalance (QCM). The influence of the NaOCl solution pH and concentration on chlorination kinetics and on PDA film degradation was evidenced. Finally, the antibacterial properties of the modified PDA coatings were highlighted by testing their antiadhesion and bactericidal properties toward the *Escherichia coli* bacterial strain.



INTRODUCTION

Bacterial biofilms are formed by communities that are embedded in a self-produced matrix of extracellular polymeric substances,^{1–3} and it is a complex system in which bacteria differ radically from those of planktonic cells exhibiting new properties. An important emergent property of biofilms is the ability to survive exposure to antimicrobial compounds, including disinfectants, toxic metals, and small-molecule antibiotics. In fact, bacteria in a biofilm can be 10–1000 times more resistant to antimicrobial agents.⁴ The first step in the formation of a biofilm is the adsorption of proteins usually required for the bacterial adhesion. Then, the bacterial cells will multiply and form microcolonies initially in a reversible association followed by an irreversible adhesion. The final step in the formation of a biofilm is the detachment and dispersal of bacterial cells. Biofilms can be associated with infections but are also responsible for biofouling and contamination of process water, deterioration of the hygienic quality of drinking water, and biocorrosion.^{5,6} This poses a real public health problem, economic or even environmental in view of the use of biocidal agents to prevent the development of biofilms.

As a result, the development of antimicrobial coatings has attracted substantial academic and industrial interest. Especially, *N*-halamine-based coatings were extensively studied over the past decade due to their properties such as being one of the most powerful biocides toward a broad spectrum of microorganisms, their stability, their non-toxicity to humans, and their regenerability.^{7–10} An *N*-halamine organic polymer contains nitrogen–halogen covalent bonds, and the halogen is at the oxidation state +I that confers on the coating oxidative properties. Actually, very often, the antimicrobial properties of

an *N*-halamine compound are the result of the direct transfer of chlorine (Cl(+I)) to receptors in the microorganisms.^{9,11–14} As a result, coatings containing chloramine functions appear as very promising antibacterial rechargeable materials,¹⁵ and some of them have also been studied for their interesting antiadhesive properties.¹⁶

To prepare an *N*-halamine coating, a two-step route can be used: first, the immobilization on the material surface of a polymer containing N atoms bearing an H atom followed by a treatment with a NaOCl aqueous solution to form chloramine functions by a substitution reaction



Thus, to obtain an *N*-halamine coating, the material surface should be covered with a polymer containing primary or secondary amine functions, or primary imine or amide groups.^{17–20} Herein, we report a simple and practical approach in which chloramine functions were formed into a polydopamine (PDA) coating. Inspired by the adhesive nature of catechols and amines in invertebrate mussel adhesive proteins, polydopamine is a simple compound to functionalize virtually all types of material surfaces.^{21–23} In fact, nature is a source of inspiration for surface chemistry; the protein composition of mussel byssal thread near the plaque/substrate interface reveals

Received: June 23, 2020
Revised: August 20, 2020
Published: August 22, 2020



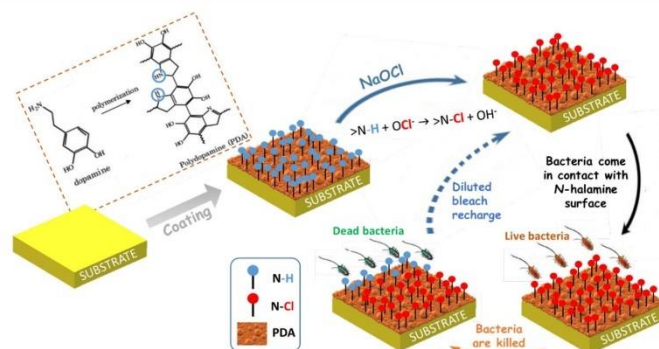


Figure 1. General strategy of formation and regeneration of an *N*-halamine coating based on polydopamine.

3,4-dihydroxy-*l*-phenylalanine (DOPA) and lysine-enriched proteins that are the key of the robust adhesion.²⁴ So, the presence of both catechol and amine groups appears to be a critical factor for efficient formation of a robust, strongly adhesive coating based on catechol chemistry applied from aqueous solution.²⁵ In solution, PDA films can be formed from a dopamine monomer under weak alkaline conditions through a spontaneous self-assembly and oxidative cross-linking process with dioxygen as the oxidant.^{21,26–28}

The advantage of polydopamine is that it can be easily deposited on virtually all types of inorganic and organic substrates, including superhydrophobic surfaces.^{29–31} Moreover, these bioinspired PDA films are chemically and structurally indistinguishable from eumelanins found in the human body providing excellent biocompatibility.³²

In the present work, the synthesis of PDA coating containing chloramine functions is studied in-depth for the first time. For this purpose, first, the PDA film formation on gold surfaces was performed by simple immersion of the substrate in a dopamine solution at pH 8.5. PDA film growth was monitored in situ by means of a quartz crystal microbalance (QCM). Then, the films were characterized by polarization modulation reflection absorption infrared spectroscopy (PM-RAIRS) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analyses and by scanning electron microscopy (SEM) observations. The chlorination of PDA films was performed by their immersion in a NaOCl aqueous solution (reaction R1) in order to immobilize Cl(+I), oxidative species, into the polymers. The whole functionalization process is illustrated in Figure 1. Finally, antibacterial assays toward *Escherichia coli* were conducted to establish the antiadhesive and bactericidal properties of such *N*-halamine PDA-based coatings. One can note that concomitantly to this work, Chien and Chiu have studied the antibacterial and regenerability properties of a chlorinated PDA film deposited on polyester fibers.³³

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Dopamine hydrochloride (98% purity), tris-(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), and phosphate buffer saline (PBS) were obtained from Sigma-Aldrich. A household bleach solution at 2.6% of active chlorine was diluted before being used for the chlorination of the PDA films. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system (Millipore, resistivity of $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) from EMD Millipore Corp. (Billerica, MA, USA).

Glass substrates (11 mm \times 11 mm) coated with a 5 nm-thick layer of chromium and a 200 nm-thick layer of gold were purchased from Arrandee (Werther, Germany). Before PDA coating, the gold-coated substrates were annealed in a butane flame to obtain a crystal reconstruction of the first atomic layers, and a UV–ozone cleaning procedure for 15 min was then applied prior to ultrapure water and absolute ethanol rinsing for a period of 10 min each.³⁴ Thermanox plastic coverslips (TMX) purchased from Thermo Scientific were used as reference substrates for antibacterial tests.

PDA Coating. For the polydopamine coating formation, the substrates were immersed into dopamine solution, prepared by dissolving 0.5 mg/mL dopamine hydrochloride in 10 mM Tris-HCl at pH 8.5, under stirring except for QCM experiments, which were performed under static conditions. Then, substrates were washed with deionized water for 5 min under sonication and then nitrogen-dried.

PDA Film Chlorination. For chlorination, PDA films were soaked in 1 mM NaOCl solution at pH 10, unless otherwise stated, at room temperature. After chlorination, the substrates were washed with deionized water thoroughly and nitrogen-dried. The PDA films used for this step were either obtained after 3 h or 24 h of immersion in the dopamine solution. Before chlorination, they are named PDA-3h and PDA-24h, respectively, and PDA-3h-Cl and PDA-24h-Cl, respectively, after chlorination.

Polarization Modulation Reflection Absorption Infrared Spectroscopy (PM-RAIRS). PM-RAIRS measurements were carried out on a Nicolet Nexus 5700 FT-IR spectrometer (Madison, WI, USA) equipped with a wide-band HgCdTe detector cooled with liquid nitrogen. Infrared spectra were obtained by coaddition of 128 scans at 8 cm^{-1} resolution. A ZnSe photoelastic modulator and a ZnSe grid polarizer were placed prior to the sample to modulate the incident beam between *p* and *s* polarizations (PM90, HINDS Instruments, Inc., Hillsboro, OR, USA), and the modulation frequency was 36 kHz. Interferograms (sum and difference) were processed via Fourier transformation to obtain the resulting PM-RAIRS signal, which is the differential reflectivity $\Delta R/R^0 = (R_p - R_s)/(R_p + R_s)$, with R_p and R_s being the signals perpendicular and parallel to the incident plane, respectively.

Ellipsometry. Ellipsometry measurements were performed using a monowavelength ellipsometer SENTECH SE 400 equipped with a He–Ne laser at $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, and the incident angle was 70° . All measurements are taken on nitrogen-dried samples in ambient air. The values of n_s and k_s used for the gold substrate were 0.2098 and 3.2852, respectively. For each sample, at least five measurements were performed in different zones. Therefore, the thickness values are given as the average over five values.

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). XPS analyses were performed using an Omicron Argus spectrometer (Taanusstein, Germany) equipped with a monochromated Al *K* α X-ray source ($h\nu = 1486.6 \text{ eV}$) working at an electron beam power of 300 W.

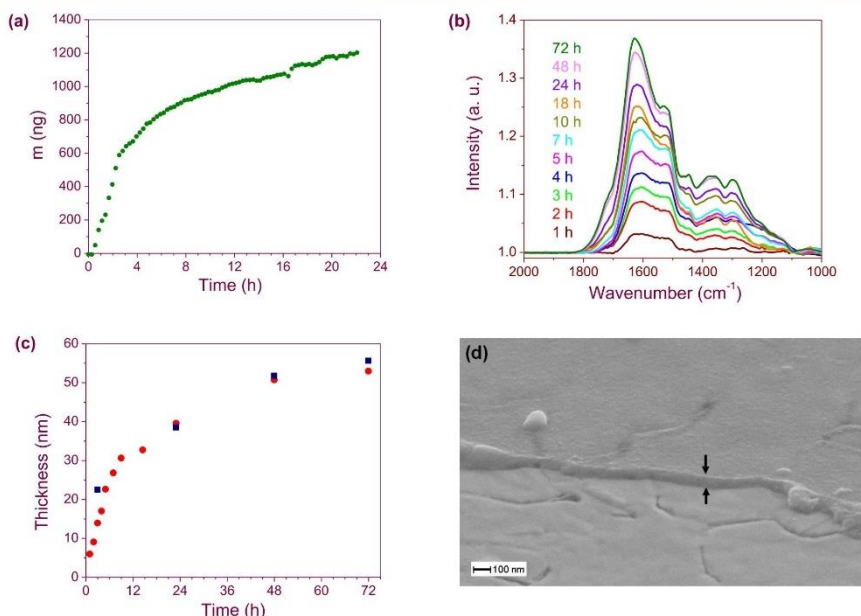


Figure 2. PDA coating formation in a 0.5 mg/mL dopamine solution. (a) QCM investigation of PDA coating formation in the dopamine solution (dopamine was added after 0.5 h in the Tris-HCl solution). (b) PM-RAIRS spectra of gold surfaces functionalized with a PDA film by immersion in the dopamine solution for various times. (c) PDA film thickness evaluated by ellipsometry (red circles) and SEM observations (blue squares). (d) SEM micrograph of a PDA coating on a gold substrate after 72 h of immersion in the dopamine solution.

Photoelectron emission was analyzed at a take-off angle of 45° . For angle-resolved XPS (AR-XPS), the other angles were 15° (grazing emission) and 90° (normal emission) with respect to the sample surface. The analyses were carried out under ultrahigh vacuum conditions ($\leq 10^{-10}$ Torr) after introduction via a load lock into the main chamber. Spectra were obtained by setting up a 100 eV pass energy for the survey spectra, and a pass energy of 20 eV was chosen for the high-resolution regions. Element peak intensities were corrected by Scofield factors.³⁵ CasaXPS software (Casa Software Ltd., UK) was used to decompose XPS spectra using a Gaussian/Lorentzian ratio of 70/30.

Quartz Crystal Microbalance (QCM). QCM measurements were performed using a lab-made QCM device under static conditions and a 9 MHz gold patterned quartz substrate ($S = 0.2 \text{ cm}^2$). The quartz were placed perpendicular to the bottom of the container. Frequency changes (Δf) of the quartz crystal resonator were monitored. The Δf was converted into the mass change (Δm) of the quartz crystal by applying the Sauerbrey equation³⁶

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \Delta m \quad (1)$$

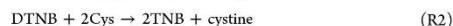
where A is the active surface of the gravimetric sensor, ρ_q is the quartz density, μ_q is the quartz shear modulus, and f_0 is the fundamental resonance frequency of the quartz.³⁷ We note

$$\Delta f = -C\Delta m \quad (2)$$

with C , the experimental sensitivity constant, equals $16.31 \times 10^7 \text{ Hz g}^{-1} \text{ cm}^2$ for 9 MHz.³⁷

Chloramine Function Quantification. The presence of chloramine functions was confirmed by measuring the bleaching of a 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) solution at 412 nm.³⁸ Fresh TNB

solution was produced before each experiment via addition of 2 equivalents of cysteine (Cys) to 1 equivalent of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) following the reaction



For this aim, in equal volumes, $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ cysteine and 10^{-3} M DTNB were mixed in 50 mM phosphate buffer solution (PBS) at pH 7.4, giving a highly colored yellow/orange solution.³⁹ Then, this stock solution was diluted 10-fold with 50 mM PBS, pH 7.4. The different substrates were immersed in this solution for 20 h. The yellow-colored TNB reacts with haloamine functions to regenerate colorless DTNB, according to Scheme S1.

The UV/visible absorbance measurements were carried out using a spectrometer with 1 cm path length cuvettes. According to Beer-Lambert's law, the density of chloramine functions (d_{Cl}), in at/cm^3 , was calculated according to the following equation

$$d_{\text{Cl}} = \frac{A_{\text{PDA}} - A_{\text{PDA-Cl}}}{2 \times \epsilon \times l \times V_{\text{coating}}} \times V_{\text{TNB}} \times N_A \quad (3)$$

where A_{PDA} and $A_{\text{PDA-Cl}}$ are the absorbance of the TNB solution containing the substrate with the PDA coating and with the chlorinated PDA coating, respectively, $\epsilon = 14,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $l = 1 \text{ cm}$, V_{coating} is the volume of the PDA film in cm^3 , V_{TNB} is the volume of the TNB solution in L , and N_A is Avogadro's constant.

SEM Observations. The surfaces or cross sections of the PDA films were examined under an Ultra55 Zeiss field emission gun scanning electron microscope (FEG-SEM), operating at 10 kV. For the cross-sectional observations, the samples were tilted (60°).

Bacterial Strain and Culture Conditions. Bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922 were used to investigate the antibacterial properties of the chlorinated PDA films. Bacterial suspensions were prepared

from frozen cultures incubated overnight (37 °C under agitation at 250 rpm) in Luria–Bertani (LB) broth (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA).

Evaluation of Bacterial Adhesion. Substrates were put into sterile Petri dishes in the presence of 20 mL of bacteria suspension at 10^6 CFU/mL in PBS, under stirring at room temperature for 17 h. After incubation, for evaluation of bacterial adhesion, an optical microscopy analysis was performed. For this, the samples were rinsed with PBS, stained for 5 min with 1 mL of crystal violet at 1% (w/w), rinsed under water flow until color loss, and dried. For each sample, the surface density of bacteria was determined by averaging 20 microscope fields under a 50X magnification. Results were expressed as a percentage of the attached bacterial cells onto the different PDA surfaces, as compared to TMX substrates.

Bacteria Growth Capacity (Cultivability of Adhered Bacteria). Bacterial growth capacity after contact with functionalized surfaces was determined performing killing tests. Before bacterial inoculation, the surfaces were sterilized by washing them five times with ethanol solution at 70%. The killing test was performed in sandwich configuration. For this, 20 μ L of the bacterial suspension in PBS media was deposited on a first plate; then, a second plate is placed onto the first one, on the coating side so that the bacterial suspension is sandwiched between the two substrates. After 3 h of contact at room temperature, surfaces were transferred into a tube containing 2 mL of sterile PBS solution and sonicated (Bandelin Sonorex RK 31, Berlin, Germany; $f = 35$ kHz and $P = 90$ W) for 2 min to recover the adhered bacteria without damaging them. After the sonication, SEM-FEG observations of the plates were performed to verify that most of the adhered bacteria were detached during the sonication process. The recovered bacteria suspensions were diluted 10 , 10^2 , 10^3 , and 10^4 times before deposition of 20 μ L of each dilution in triplicate on LB agar plates. The plates were incubated at 37 °C overnight before enumeration. Results were expressed in the number of attached and cultivable bacterial cells onto the different surfaces per mL (CFU/mL). Each test was done in triplicate, and the number of CFU/mL is the average of the results obtained for each sample.

RESULTS AND DISCUSSION

PDA Coating Elaboration. In solution, dopamine within the right conditions of pH is known to oxidize and self-polymerize, and this is evidenced by a change of solution color, from colorless to dark brown.⁴⁰ In this study, the bare gold surfaces were dipped into a dopamine solution in which Tris-HCl is added after a few minutes. The surface dopamine polymerization process was followed in situ using a quartz crystal microbalance and ex situ by means of PM-RAIRS as a function of the immersion time.

Figure 2a shows the QCM response, whereas Figure 2b presents the IR spectra obtained for gold surfaces immersed for different times ranging from 1 h up to 72 h. A broad IR massif is observed in the 1600 cm^{-1} region, where intensity increases as a function of immersion time. A second group of features is visible at lower wavenumbers. No other IR features are detected whatever the exposure time. All these features indicate the presence of a dopamine intermediate and a polydopamine film, with the main characteristic peaks observed at 1620 and 1515 cm^{-1} , assigned to $\nu_{\text{ring}}(\text{C}=\text{C})$ and $\nu(\text{N}-\text{H})$ vibrations,⁴¹ respectively. Secondary IR peaks are also observed at lower wavenumbers, namely, 1450 , 1350 , and 1290 cm^{-1} , assigned to the stretching vibration $\nu_{\text{ring}}(\text{CNC})$ but also to vibrations related to remaining catechol groups of free dopamine, $\nu(\text{C}-\text{O})$ and $\nu(\text{C}=\text{N})$.^{42–44} These IR features are consistent with those obtained for PDA in solution (data not shown), and thus, the PM-RAIRS analyses clearly indicate the formation of PDA coating on gold surfaces.

PDA film growth can be quantitatively investigated on the one hand using PM-RAIRS data, by integrating the peak areas as a function of immersion time, as presented in Figure S1 and on the other hand using QCM analysis as presented in Figure 2a. Meanwhile, data collected on the same samples by ellipsometry enabled us to obtain average thickness for the PDA films using an appropriate model for gold surfaces (Figure 2c). These values were confirmed by SEM observations of the cross section of the samples (Figure 2d).

PM-RAIRS analysis (Figure S1), QCM (Figure 2a), and thickness measurements (Figure 2c) show that the growth of the PDA film as a function of the substrate immersion time follows a logarithmic function, with a growth rate about 5 nm/h during the first hours (Figure 2c). The combination of the PDA mass obtained by QCM ($1.2\text{ }\mu\text{g}$ for 24 h of immersion) and its thickness obtained by ellipsometry and SEM observation (40 nm for 24 h of immersion) allowed us to estimate the density of the PDA film, i.e., 1.49 g cm^{-3} . This finding is in good agreement with the value reported in the literature.⁴⁵ Moreover, ellipsometry data show that the PDA thickness on gold substrates gradually reached a constant value of around 50 nm after 48 h of immersion, which is within the range of PDA film thicknesses reported in ref 21. This stationary phase is mainly due to the depletion of the dopamine monomer in the supernatant solution, being able to cross-link onto the PDA film, into the profit of the non-reactive quinone molecules.⁴⁶ For the characterizations, the chlorination experiments, and the biological tests of the PDA films, two synthesis times have been chosen: 3 and 24 h.

XPS analysis was thus performed on these two sets of the PDA-coated Au surface, and the survey spectra are presented in Figure 3. For the PDA-24h sample, the photopeaks C 1s

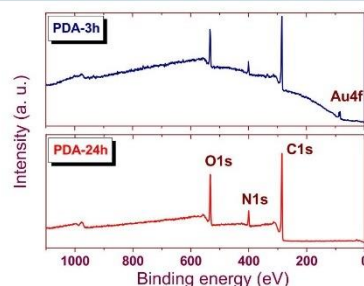


Figure 3. XPS survey spectra of gold surfaces coated with PDA films after 3 h (blue line, top spectrum) and 24 h (red line, bottom spectrum) of immersion in a 0.5 mg/mL dopamine solution.

(285 eV), O 1s (530 eV), and N 1s (400 eV) are observed, whereas the Au 4f contribution (84 eV) is not detected on the contrary to the sample coating with a PDA film formed for 3 h (Figure 3). For both samples, the chemical composition in carbon and nitrogen is close to the theoretical composition of polydopamine ($\text{N/C} = 0.125$) taking into account the carbon contamination, which slightly reduces the N/C ratio (Table 1), thus confirming the results obtained by PM-RAIRS (growth of a PDA film). Concerning the PDA film thickness evaluated from XPS data, they are in good agreement with those obtained by ellipsometry. Indeed, for PDA-24h coating, the XPS Au 4f signal is not detected, suggesting an equivalent

Table 1. Chemical Composition in at. % of PDA-Coated Gold Surfaces Obtained from XPS Data Presented in Figure S2 and Figure 5 and the Ratio between N and C and Cl_{198} and N^a

sample	C	N	O	Au	N/C	Cl_{198}	Cl_{200}	Cl_{200}/N
PDA-3h	76.3	7.2	16.2	0.3	0.094			
PDA-24h	75.5	7.2	17.3		0.095			
PDA-3h-Cl	69.3	5.7	19.4	1.1	0.082	0.6	3.9	0.68
PDA-24h-Cl	69.85	6.45	18.9		0.092	0.8	4.0	0.62

^a Cl_{198} corresponds to Cl^- and Cl_{200} to chloramine.

thickness higher than $3\lambda = 12$ nm representing 95% of the signal, λ being the inelastic mean free path of electrons in the organic PDA film; for electrons having a kinetic energy around 1400 eV (from the Au 4f atomic level), λ is estimated to be equal to 3.62 nm.⁴⁷ For PDA-3h coating, the Au 4f signal is weak but still visible (Figure 3), indicating an equivalent thickness close to 12 nm, again in good agreement with the value of 15 nm obtained by ellipsometry.

PDA Film Chlorination. The chlorination of the PDA films was performed by immersion of the sample in NaOCl solution. It is known that long contact time with acidic solution or alkaline solutions could denature the PDA films.^{48–50} Since the chlorination will take place in NaOCl solutions at pH around 10, it is possible that after a given time, the PDA film will start to degrade. In situ monitoring by a QCM was first conducted at different NaOCl concentrations: 0.2, 1, and 10 mM to evaluate the influence of the concentration in sodium hypochlorite and then estimate the time until which it is safe to put in contact the PDA films with the NaOCl solution. Tests were also done at pH 7. For this pH value, for a 1 mM NaOCl concentration, similar results (see Figure S3c) were obtained to that at pH 10 but with slower kinetics in good agreement with lower concentration of hypochlorite ions at pH 7 than at pH 10 ($\text{p}K_a(\text{HOCl}/\text{OCl}^-) = 7.5$). Note that at pH 5, no chlorination occurs, confirming that the species responsible for chlorination are OCl^- ions. These findings are summarized in Table 2.

Table 2. QCM Results^a

[Cl(+)] (mM)	0.2	1	1	1	10
pH	10	10	7	5	10
[OCl^-] (mM)	0.2	1	0.24	0	10
$t_{\Delta m \text{ max}}$ (min)	156	25	35	no mass variation	7
$t_{\text{degradation}}$ (min)	360	60	65	stable	11

^aTimes in minutes at which (i) the maximal mass increase is reached and (ii) the PDA film is entirely degraded (removed from the substrate surface) for PDA-24h films in contact with NaOCl solutions of various Cl(+1) (HOCl and/or OCl^-) concentrations, pH, and initial OCl^- concentration (data from Figure 4a and Figure S3).

The chlorination of a PDA-24h film in 1 mM NaOCl solution was studied using a QCM, and the response mass variation vs. contact time is shown in Figure 4a. The data obtained for other NaOCl concentrations are presented in Figure S3. Obviously, the mass increase has been ascribed to chlorine fixation on and into the PDA film (reaction R1). For solution at pH 10, whatever the sodium hypochlorite concentration, the shape of the mass variation (Δm) vs. time is the same. Namely, first, the film mass increases rapidly then progressively reaches an optimal mass increase corresponding to an optimal chlorination time in NaOCl solution. Actually, there are two kinetic regimes. We can assume that the first one,

at the beginning, corresponds to the chlorination of the PDA film surface with a kinetic limitation by the OCl^- diffusion in the bulk of the solution, whereas the second one, slower, corresponds to the chlorination of the film with a kinetic limitation by the OCl^- diffusion inside the polymer. One can notice that for pH 7, the response is different, and this can be due to an increase at the film/solution interface of the pH due to OH^- release (reaction R1) and therefore to an increase of the interfacial concentration of OCl^- ions.

After that, the mass decreases down to a value lower than the initial one. This finding can be explained by the degradation of the PDA coating upon long exposure to the NaOCl solution. In addition, the substitution mechanism of H by Cl(+1) (reaction R1) leads to the release of hydroxyl ions and thus to an increase of the interfacial pH, which could result in progressive degradation of the PDA film. For pH 10, the optimal time of chlorination is a function of the NaOCl concentration, and this time decreases with the increase in the concentration passing from 156 min for a concentration of 0.2 mM to 25 min for 1 mM and finally 7 min for 10 mM (Table 2). From Table 2, one can notice that the PDA film degradation/dissolution kinetics is also a function of the OCl^- ion concentration; the higher the anion concentration, the faster the degradation of the PDA film is.

For the present study, a NaOCl concentration of 1 mM was chosen. In this condition, as shown in Figure 4a, the maximal Δm is 1080 ng. Thus, the chlorine amount fixed into the PDA film is estimated to be 1.89×10^{16} atoms, and taking into account a film thickness of 40 nm (according to Figure 2c), a Cl atom density (d_{Cl}) equal to 2.3×10^{22} at. cm^{-3} is obtained (eq 4). If we compare this result with the theoretical N density in PDA that is 5.3×10^{21} at. cm^{-3} , an overestimation of the chlorine density is obtained with the QCM. Moreover, the N/Cl ratio obtained by XPS analysis (Table 3) is below 1, indicating that the number of Cl atoms is lower than the one of N atoms in the chlorinated PDA film. Since Na is detected by XPS at 1071 eV (Figure 5), even after rinsing the samples, it is obvious that the mass variation is not only due to H substitution by Cl (reaction R1). Therefore, in the present case, a quantification of N–Cl groups by a QCM is not possible.

$$d_{\text{Cl}} = \frac{\Delta m}{(M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}}) \times S \times \epsilon_{\text{PDA}}} \times N_{\text{A}} \quad (4)$$

where M is the molecular mass, S is the quartz surface (0.2 cm^2), and ϵ_{PDA} is the thickness of the PDA film.

To complete the study using a QCM, an ex situ study was carried out by PM-RAIRS for PDA-3h coating (Figure S4) and PDA-24h coating (Figure 4b). First, after chlorination, there is a change of the PDA IR spectrum. The spectrum reveals a sharp decrease in the peak at 1515 cm^{-1} attributed to the N–H group, which therefore suggests the creation of chloramine functions. A shift of the characteristic peak of the aromatic

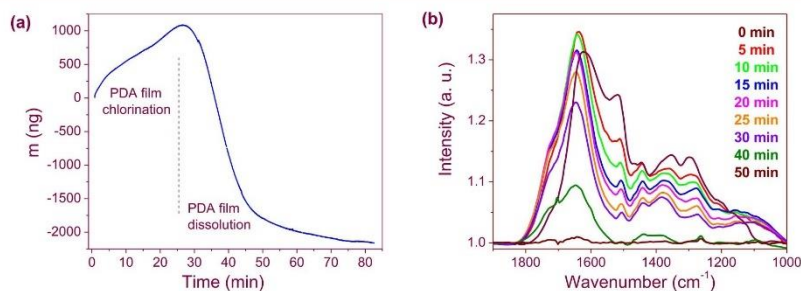


Figure 4. PDA film chlorination. (a) QCM investigation of the PDA-24h film chlorination in 1 mM NaOCl solution, pH = 10. Quartz surface: 0.2 cm². (b) PM-RAIRS spectrum of the gold surface coated with a PDA-24h film as a function of exposure time to a 1 mM NaOCl solution, pH = 10.

Table 3. The at. % Ratio between Cl₂₀₀ and N Obtained by XPS at Various Detection Angles (AR-XPS)^a

angle	PDA-3h-Cl			PDA-24h-Cl		
	15°	45°	90°	15°	45°	90°
Cl ₂₀₀ /N	0.69	0.67	0.59	0.61	0.62	0.69

^aAngles are defined with respect to the sample surface for chlorinated PDA-coated gold surfaces.

passing from 1620 to 1645 cm⁻¹ is also noticed. This shift can be a consequence of the grafting of chlorine atoms on nitrogen atoms located near the aromatic cycle modifying the chemical environment of the latter. Finally, the appearance of a shoulder around the 1720 cm⁻¹ that increases over chlorination time is

observed, and it could be due to the appearance of carboxylic functions due to the oxidation of the PDA coating.

Regarding the kinetic monitoring of chlorination, the results of the QCM study are confirmed. Namely, for a 1 mM NaOCl solution at pH 10, an optimal chlorination time around 25 min is determined, and indeed, after this time, a strong decrease in the intensity of the peaks characteristic of the PDA is observed until a complete disappearance after 50 min, revealing the complete degradation of the coating in agreement with the QCM results. As far as the PDA-3h coating is concerned, the optimal chlorination time was fixed at 15 min (see Figure S4).

The chemical composition of the chlorinated PDA-3h (15 nm thick) and PDA-24h (40 nm thick) film surface was then determined by XPS. In the survey spectra, chlorine contributions are detected at binding energy around 200 eV

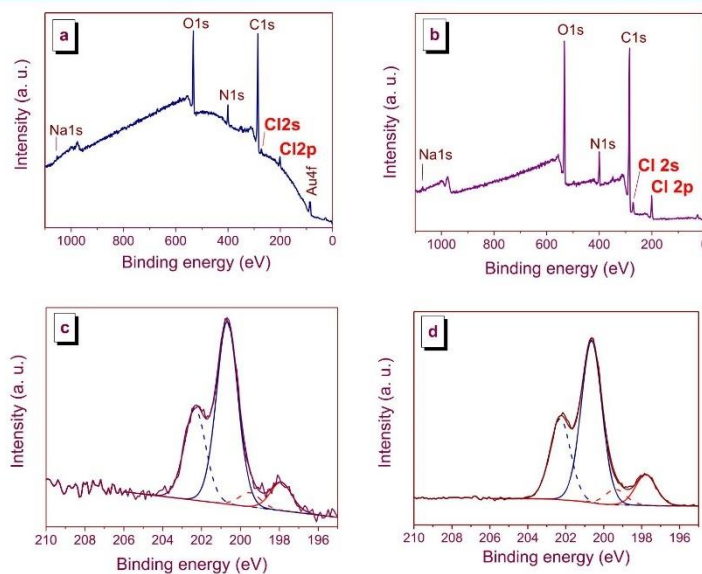


Figure 5. XPS characterizations of the gold surfaces coated with a PDA-3h (a, c) and a PDA-24h (b, d) film after immersion in 1 mM NaOCl solution: (a, b) survey spectra and (c, d) Cl 2p high-resolution region. Full line, 2p_{3/2} contribution; dashed line, 2p_{1/2} contribution.

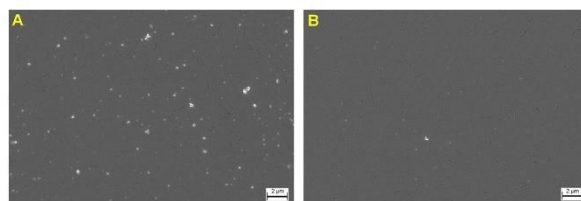
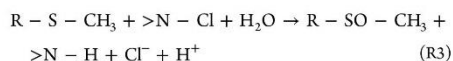


Figure 6. SEM micrographs of the PDA-24h films formed on gold substrates (A) before and (B) after immersion for 20 min in a 1 mM NaOCl solution at pH 10.

(Cl 2p) and 280 eV (Cl 2s) (Figure 5). High-resolution Cl 2p spectra for PDA-3h-Cl and PDA-24h-Cl coatings are depicted in Figure 5c and d, respectively, exhibiting two types of contributions. The most intense doublet is detected at binding energies (BE) of 200.5 and 202.1 eV (Cl 2p_{3/2} and Cl 2p_{1/2}, respectively), while the second doublet appears at lower BE, 197.6 and 199.2 eV. The detection of Cl 2p at binding energy around 200.5 eV, named Cl₂₀₀, could be ascribed to N–Cl. To confirm it, a methionine test has been performed on a chlorinated PDA-24h coating. The presence of chloramines can be evidenced by methionine (R–S–CH₃) that reacts with chloramines according to^{51,52}



After contact with methionine, the Cl 2p_{3/2} contribution at 200.5 eV has largely decreased (data not shown), confirming that this contribution is related to chloramine bonds.

Finally, the Cl₂₀₀/N 1s ratio for chlorinated PDA-3h and PDA-24h coatings (Table 1) reveals a similar amount of immobilized chlorine for both samples.

As a result of the XPS analysis, the grafting of chlorine within the PDA film is confirmed. XPS allows us to analyze a film thickness about 12 nm. However, by varying the angle of the electron collection, i.e., performing angle-resolved XPS (AR-XPS), it is possible to decrease this thickness in order to evaluate the homogeneity of the film in depth. This analysis was done for the chlorinated PDA films. The chemical composition of the films was determined at three different collecting angles (90, 45, and 15° with respect to the sample surface), a normal emission with bulk-sensitive and at grazing emissions with surface-sensitive. Table 3 shows that whatever the electron take-off angle is, the Cl₂₀₀/N ratios for chlorinated PDA-3h and PDA-24h coatings are similar, confirming that the PDA film chlorination occurs not only on the surface but also inside the film.

The effect of the chlorination on the PDA surface morphology was studied by SEM (Figure 6). There is an evolution of the surface after chlorination with a large decrease of the PDA nanoparticles strongly linked to the surface coating since they are not removed during the sonication step. Therefore, it seems that there is a less rough surface after chlorination due to the oxidative character of OCl[−] ions.

Finally, the presence of chloramines in PDA-3h-Cl and PDA-24h-Cl coatings was evidenced by the oxidation of TNB to the corresponding dimer (DTNB) (Scheme S1). This reaction is accompanied by a loss of absorbance at 412 nm (Table 4),³⁸ TNB solutions are shown in Figure S5. The amount of N–Cl bonds present into the PDA-24h-Cl film was

Table 4. TNB Solution Absorption at 412 nm after 24 h of Immersion of Various Samples, the Number of Chlorine Atoms, Density (Equation 3) of Chloramine in PDA-3h-Cl and PDA-24h-Cl Coatings Estimated by TNB Dosage, and the Cl/N Atomic Ratio Taking into Account a N Density of 5.3×10^{21} at. cm^{−3}

samples	A at 412 nm	Cl (at.)	d_{Cl} (at. cm ^{−3})	Cl/N
PDA-3h	1.38			
PDA-3h-Cl	0.90	2.0×10^{16}	3.15×10^{21}	0.59
PDA-24h	1.30			
PDA-24h-Cl	0.35	4.05×10^{16}	2.5×10^{21}	0.47

estimated, taking into account a PDA film thickness of 40 nm (according to Figure 2c), and the atom density d_{Cl} is equal to 2.5×10^{21} at. cm^{−3} (eq 3). For the PDA-3h-Cl film, d_{Cl} is equal to 3.15×10^{21} at. cm^{−3}, taking into account a film thickness of 15 nm (according to Figure 2c). The comparison of these densities with the N density in PDA, 5.3×10^{21} at. cm^{−3}, taking a PDA density of 1.49 g cm^{-3} , was performed; it is thus noted that between 50 and 60% of N atoms are chlorinated, and this finding confirms the XPS results (Tables 1 and 2).

Finally, after exposure in air or immersion in PBS solution (pH 7.4) for 7 days, XPS and IR analyses have revealed no change in the chemistry of the PDA-24h-Cl films. Notably, the atomic ratio Cl₂₀₀/N is not modified, indicating that in these conditions, the chlorinated PDA films are stable.

Antibacterial Properties of Chlorinated PDA Films. In order to evaluate the antibacterial/antiadhesive properties of the chlorinated PDA surfaces, a suspension of *Escherichia coli* cells was put in contact with these surfaces and compared to negative controls, composed of, first, a biocompatible neutral surface (Thermanox or TMX) and, second, the non-chlorinated PDA film.

Concerning the antiadhesive properties of chlorinated PDA films, the main results are summarized in Figure S6, and the average data are reported in Table 5. Adhesion results from *E. coli* toward different surfaces reveal an antiadhesive effect of the chlorinated PDA-3h and PDA-24h coatings compared to TMX with a bacterial adhesion of 55 and 53%, respectively, and compared to corresponding unchlorinated PDA, an adhesion of 55 and 67%, respectively. These results clearly show that after treatment of the PDA coatings in the presence of NaOCl, the bacterial densities on the film surface are lower. In conclusion, the PDA film chlorination provides an antiadhesive effect, up to a decrease of 45% for the best scenario.

In addition to this antiadhesive effect of the chlorinated PDA coating, the viability of bacteria that nevertheless adhered to the films was evaluated through a killing test. A given amount of bacteria in physiological media was deposited at

Table 5. Mean Number of *Escherichia coli* Counted with an Optical Microscopy Image (over 20 Fields) ($\times 50$), Standard Deviation (σ), and Calculated Bacterial Density on Various Samples after Incubation at Room Temperature for 17 h in the Presence of 10^6 CFU/mL

sample	TMX	PDA-3h	PDA-3h-Cl	PDA-24h	PDA-24h-Cl
bacterial density/cm ²	970	970	540	770	520
σ	78	76	59	75	51
% adhesion (ref: TMX)		100%	55%	79%	53%
% adhesion (ref: PDA-3h or PDA-24h)			55%		67%

room temperature onto different surfaces. Under these conditions, it is important to keep in mind that bacteria cannot grow, and therefore, the number of bacteria counted afterward on agar plates allows the evaluation of the viability upon contact with the surfaces. Again, a negative control was used to assess this bacterial viability, the inoculum or the non-chlorinated PDA films. The results are shown in Figure 7, and the average data are reported in Table S1. One can notice that both unchlorinated PDA samples, 3h and 24h, lead to a reduction of viable bacteria of 98% in comparison to the inoculum. Thus, the PDA coating exhibits an antibacterial activity; this property has already been reported by Su et al.⁵³ and Iqbal et al.⁵⁴ In addition to this antibacterial effect due to the unchlorinated coating, the chlorination gives an increase of 18% of the antimicrobial activity for the PDA-3h film and up to 34% for PDA-24h coating. The combination of the two antimicrobial effects leads to a bacterial viability reduction of more than 99.0% for the chlorinated PDA-3h coating and 99.5% for the chlorinated PDA-24h film in comparison with the inoculum.

CONCLUSIONS

In summary, we have demonstrated the possibility to elaborate a new antibacterial coating formed by a thin chlorinated polydopamine film. This film is obtained by dopamine monomer polymerization in weak alkaline aqueous solution followed by a treatment in a NaOCl solution. This treatment leads to the formation of chloramine functions on and inside the polymer. Chemical determinations enable to estimate the quantity of oxidative chlorine immobilized in the PDA film to be about 3×10^{21} at. cm⁻³, with a chlorination degree of N atoms between 50 and 60%, suggesting that in the PDA coating, 40–50% N atoms do not bear an H atom, which could be exchanged with oxidative chlorine. Finally, microbiological tests toward *Escherichia coli* bacteria show that chlorinated PDA coatings are able to reduce *E. coli* adhesion up to 45%

compared to uncoated surfaces, while at the same time, bacterial viability is reduced by 99% on chlorinated PDA coating.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.0c01856>.

Scheme of the reaction between TNB and haloamine; PM-RAIRS results (2 figures); XPS high-resolution spectra of a PDA film; chlorination followed by QCM ([NaOCl] = 0.2 mM, 10 mM at pH 10, and 1 mM at pH 7); TNB dosage; optical images of PDA after contact with *E. coli*; result of the killing test (table) (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Vincent Humblot – Sorbonne Université, Paris 75005, France; FEMTO-ST Institute, UMR CNRS 6174, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon Cedex 25030, France; orcid.org/0000-0002-6266-3956; Email: vincent.humblot@femto-st.fr

Catherine Debiemme-Chouvy – Sorbonne Université, Paris 75005, France; orcid.org/0000-0001-7171-6039; Email: catherine.debiemme-chouvy@sorbonne-universite.fr

Author

Nadia Nazi – Sorbonne Université, Paris 75005, France

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.0c01856>

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir program under reference ANR-11-IDEX-0004-02 and more specifically within the framework of the Cluster of Excellence MATISSE, which provided experimental support funding for N.N.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge IPCM (Institut Parisien de Chimie Moléculaire, UMR8232), M. Laurens, for providing access and information to their ellipsometry apparatus and IMPC (Institut des Matériaux de Paris Centre, FR2482) and the C'Nano

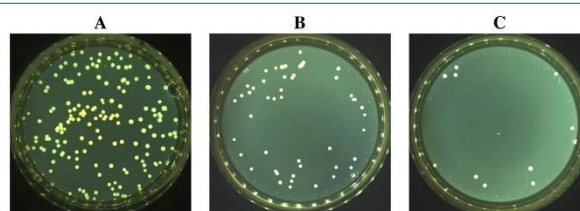


Figure 7. Optical photographs of agar plates presenting the killing test results of (A) *E. coli* inoculum, (B) PDA-24h, and (C) PDA-24h-Cl coatings, after 3 h in contact with 20 μ L of an *Escherichia coli* suspension at a concentration of 2.5×10^5 CFU/mL.

project of Region Ile-de-France, for Omicron XPS apparatus funding.

REFERENCES

- (1) Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **1999**, *284*, 1318–1322.
- (2) Hall-Stoodley, L.; Stoodley, P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* **2009**, *11*, 1034–1043.
- (3) Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 95–108.
- (4) Anderson, G. G.; O'Toole, G. A., Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms. In *Bacterial Biofilms*; Romeo, T., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008, pp. 85–105.
- (5) Kaplan, J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 205–218.
- (6) de Vos, W. M. Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. *NPJ biofilms microbiomes* **2015**, *1*, 15005–15005.
- (7) Kenawy, E. R.; Worley, S. D.; Broughton, R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1359–1384.
- (8) Hui, F.; Debiemme-Chouvy, C. Antimicrobial N-halamine polymers and coatings: a review of their synthesis, characterization, and applications. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 585–601.
- (9) Dong, A.; Wang, Y. J.; Gao, Y.; Gao, T.; Gao, G. Chemical Insights into Antibacterial N-Halamines. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 4806–4862.
- (10) Debiemme-Chouvy, C.; Cachet, H. Electrochemical (pre)-treatments to prevent biofouling. *Curr. Opin. Electrochem.* **2018**, *11*, 48–54.
- (11) Demir, B.; Broughton, R. M.; Qiao, M.; Huang, T. S.; Worley, S. D. N-Halamine Biocidal Materials with Superior Antimicrobial Efficacies for Wound Dressings. *Molecules* **2017**, *22*, 1582.
- (12) Barnela, S. B.; Worley, S. D.; Williams, D. E. Syntheses and antibacterial activity of new N-halamine compounds. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 245–247.
- (13) Worley, S. D.; Sun, G. Biocidal Polymers. *Trends Polym. Sci.* **1996**, *4*, 364–370.
- (14) Bai, R.; Zhang, Q.; Li, L.; Li, P.; Wang, Y.-J.; Simalou, O.; Zhang, Y.; Gao, G.; Dong, A. N-Halamine-Containing Electrospun Fibers Kill Bacteria via a Contact/Release Co-Determined Antibacterial Pathway. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 31530–31540.
- (15) Gottardi, W.; Debbav, D.; Nagl, M. N-chloramines, a promising class of well-tolerated topical anti-infectives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 1107–1114.
- (16) Ye, Q.; Zhou, F.; Liu, W. Bioinspired catecholic chemistry for surface modification. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4244–4258.
- (17) Cao, Z.; Sun, Y. Polymeric N-Halamine Latex Emulsions for Use in Antimicrobial Paints. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1*, 494–504.
- (18) Kocer, H. B.; Cerkez, I.; Worley, S. D.; Broughton, R. M.; Huang, T. S. N-Halamine Copolymers for Use in Antimicrobial Paints. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 3189–3194.
- (19) Postma, T. M.; Albericio, F. Immobilized N-Chlorosuccinimide as a Friendly Peptide Disulfide-Forming Reagent. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16*, 160–163.
- (20) Wang, F.; Liu, M.; Ding, R.; Liang, M.; Huang, L.; Yu, J.; Si, Y. Rechargeable Antibacterial Polysulfonamide-Based N-Halamine Nanofibrous Membranes for Bioprotective Applications. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 3668–3677.
- (21) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science* **2007**, *318*, 426–430.
- (22) Liu, Y.; Ai, K.; Lu, L. Polydopamine and its derivative materials: synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5057–5115.
- (23) Ball, V. Physicochemical perspective on “polydopamine” and “poly(catecholamine)” films for their applications in biomaterial coatings. *Biointerphases* **2014**, *9*, No. 030801.
- (24) Waite, J. H.; Qin, X. Polyphosphoprotein from the Adhesive Pads of *Mytilus edulis*. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2887–2893.
- (25) Lin, Q.; Gourdon, D.; Sun, C.; Holten-Andersen, N.; Anderson, T. H.; Waite, J. H.; Israelachvili, J. N. Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 3782–3786.
- (26) Lee, B. P.; Messersmith, P. B.; Israelachvili, J. N.; Waite, J. H. Mussel-Inspired Adhesives and Coatings. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2011**, *41*, 99–132.
- (27) Ball, V.; Del Frari, D.; Michel, M.; Buehler, M. J.; Toniazio, V.; Singh, M. K.; Gracio, J.; Ruch, D. Deposition Mechanism and Properties of Thin Polydopamine Films for High Added Value Applications in Surface Science at the Nanoscale. *Bionanoscience* **2012**, *2*, 16–34.
- (28) Delparastan, P.; Malollari, K. G.; Lee, H.; Messersmith, P. B. Direct Evidence for the Polymeric Nature of Polydopamine. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 1077–1082.
- (29) Wei, Q.; Zhang, F.; Li, J.; Li, B.; Zhao, C. Oxidant-induced dopamine polymerization for multifunctional coatings. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1430.
- (30) Yang, H.-C.; Luo, J.; Lv, Y.; Shen, P.; Xu, Z.-K. Surface engineering of polymer membranes via mussel-inspired chemistry. *J. Membr. Sci.* **2015**, *483*, 42–59.
- (31) Ding, Y. H.; Floren, M.; Tan, W. Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization. *Biosurf. biotribology* **2016**, *2*, 121–136.
- (32) Luo, R.; Tang, L.; Zhong, S.; Yang, Z.; Wang, J.; Weng, Y.; Tu, Q.; Jiang, C.; Huang, N. In Vitro Investigation of Enhanced Hemocompatibility and Endothelial Cell Proliferation Associated with Quinone-Rich Polydopamine Coating. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 1704–1714.
- (33) Chien, H.-W.; Chiu, T.-H. Stable N-halamine on polydopamine coating for high antimicrobial efficiency. *Eur. Polym. J.* **2020**, *130*, 109654.
- (34) Humblot, V.; Yala, J.-F.; Thebault, P.; Boukerma, K.; Héquet, A.; Berjeaud, J.-M.; Pradier, C.-M. The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3503–3512.
- (35) Scofield, J. H. Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1976**, *8*, 129–137.
- (36) Sauerbrey, G. Verwendung von schwingquarzen zur wagung dünner schichten und zur mikrowagung. *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206–222.
- (37) Bizet, K.; Gabrielli, C.; Perrot, H. Immunodetection by quartz crystal microbalance - A new approach for direct detection of rabbit IgG and peroxidase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *89*, 139–150.
- (38) Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B. Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Anal. Biochem.* **1979**, *94*, 75–81.
- (39) Debiemme-Chouvy, C.; Haskouri, S.; Folcher, G.; Cachet, H. An Original Route to Immobilize an Organic Biocide onto a Transparent Tin Dioxide Electrode. *Langmuir* **2007**, *23*, 3873–3879.
- (40) Ding, Y.; Weng, L.-T.; Yang, M.; Yang, Z.; Lu, X.; Huang, N.; Leng, Y. Insights into the Aggregation/Deposition and Structure of a Polydopamine Film. *Langmuir* **2014**, *30*, 12258–12269.
- (41) Zangmeister, R. A.; Morris, T. A.; Tarlov, M. J. Characterization of Polydopamine Thin Films Deposited at Short Times by Autoxidation of Dopamine. *Langmuir* **2013**, *29*, 8619–8628.
- (42) Chen, T.-P.; Liu, T.; Su, T.-L.; Liang, J. Self-Polymerization of Dopamine in Acidic Environments without Oxygen. *Langmuir* **2017**, *33*, 5863–5871.
- (43) Zheng, W.; Fan, H.; Wang, L.; Jin, Z. Oxidative Self-Polymerization of Dopamine in an Acidic Environment. *Langmuir* **2015**, *31*, 11671–11677.

- (44) Jiang, J.; Zhu, L.; Zhu, L.; Zhu, B.; Xu, Y. Surface characteristics of a self-polymerized dopamine coating deposited on hydrophobic polymer films. *Langmuir* **2011**, *27*, 14180–14187.
- (45) Schneider, A.; Hemmerle, J.; Allais, M.; Didierjean, J.; Michel, M.; d'Ischia, M.; Ball, V. Boric Acid as an Efficient Agent for the Control of Polydopamine Self-Assembly and Surface Properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 7574–7580.
- (46) Alfieri, M. L.; Panzella, L.; Oscurato, S. L.; Salvatore, M.; Avolio, R.; Errico, M. E.; Maddalena, P.; Napolitano, A.; D'Ischia, M. The Chemistry of Polydopamine Film Formation: The Amine-Quinone Interplay. *Biomimetics* **2018**, *3*, 26.
- (47) Tanuma, S.; Powell, C. J.; Penn, D. R. Calculation of electron inelastic mean free paths (IMFPs) VII. Reliability of the TPP-2M IMFP predictive equation. *Surf. Interface Anal.* **2003**, *35*, 268–275.
- (48) Xu, L.; Zuo, Y. Y. Reversible Phase Transitions in the Phospholipid Monolayer. *Langmuir* **2018**, *34*, 8694–8700.
- (49) Yang, W.; Liu, C.; Chen, Y. Stability of Polydopamine Coatings on Gold Substrates Inspected by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Langmuir* **2018**, *34*, 3565–3571.
- (50) Del Frari, D.; Bour, J.; Ball, V.; Toniazio, V.; Ruch, D. Degradation of polydopamine coatings by sodium hypochlorite: A process depending on the substrate and the film synthesis method. *Polym. Degrad. Stab.* **2012**, *97*, 1844–1849.
- (51) Pattison, D. I.; Davies, M. J. Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1453–1464.
- (52) Peskin, A. V.; Winterbourn, C. C. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 572–579.
- (53) Su, L.; Yu, Y.; Zhao, Y.; Liang, F.; Zhang, X. Strong Antibacterial Polydopamine Coatings Prepared by a Shaking-assisted Method. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24420.
- (54) Iqbal, Z.; Lai, E. P. C.; Avis, T. J. Antimicrobial effect of polydopamine coating on *Escherichia coli*. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 21608.