



**HAL**  
open science

# Biopolymère amphiphile pour surface antibiofilm

Alexandra Morgane Guennec

► **To cite this version:**

Alexandra Morgane Guennec. Biopolymère amphiphile pour surface antibiofilm. Chimie organique. Université de Bretagne Sud, 2022. Français. NNT : 2022LORIS636 . tel-04048968

**HAL Id: tel-04048968**

**<https://theses.hal.science/tel-04048968>**

Submitted on 28 Mar 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE BRETAGNE SUD

ECOLE DOCTORALE N° 598  
*Sciences de la Mer et du littoral*  
Spécialité : *Chimie Macromoléculaire*

Par

**Alexandra GUENNEC**

**Biopolymère amphiphile pour surface anti-biofilm**

**Thèse présentée et soutenue à Lorient, le 03 novembre 2022**

**Unité de recherche : Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines – EA3884 - Lorient**

**Thèse N° : 636**

## **Rapporteurs avant soutenance :**

Christine Bressy          Professeur des Universités, MAPIEM, Université de Toulon

Romain Briandet          Directeur de recherche, MICALIS, INRAE, Jouy-en-Josas

## **Composition du Jury :**

Examineurs : Valérie Langlois          Professeur des Universités, ICMPE, Université de Paris Est Créteil

Ali Tahrioui          Maître de conférences, CBSA, Université de Rouen Normandie

Dir. de thèse : Karine Vallée-Réhel          Professeur des Universités, LBCM, Université Bretagne Sud

Co-dir. de thèse : Christelle Simon-Colin          Chargé de recherche, LM2E, IFREMER, IUEM



*Quand on veut, on peut...*



## REMERCIEMENTS

*Me voilà face à cette page blanche que j'ai tant appréhendé de devoir remplir... La rédaction de ces remerciements signifie pour moi la fin de cette merveilleuse aventure qu'est la thèse mais rend également mon départ du LBCM imminent... Mais comme toutes les bonnes choses ont une fin, alors allons-y...*

Je tiens, tout d'abord, à remercier le Professeur **Christine Bressy**, le Professeur **Valérie Langlois**, le Directeur de recherche **Romain Briandet** et le Maître de Conférences **Ali Tahrioui**, pour le temps consacré à l'évaluation de ces travaux de recherche. En espérant que la lecture de mon manuscrit vous sera agréable. Un grand merci à vous quatre.

**Karine**, je n'aurai jamais vécu cette thèse de la même manière sans toi, sans ta confiance, sans ta bienveillance. Merci pour tout ce que tu m'as apporté. Merci d'avoir fait de moi une « physico-chimiste junior » et de m'avoir suivi dans mes idées farfelues de biologiste ! Tu es sans conteste un véritable mentor et un bel exemple à suivre dans tous les domaines...

Un grand merci à toi aussi, **Christelle**. Merci pour ton accueil chaleureux au sein des locaux du LM2E, merci pour toutes les connaissances et le savoir-faire que tu m'as transmis sur les PHA. Merci à toutes les deux pour vos précieux conseils et pour le temps que vous m'avez consacré.

Un grand merci, **Éric**, pour ton aide précieuse dans la caractérisation des revêtements, pour ton expertise en AFM ainsi que pour nos nombreuses et riches discussions scientifiques.

Merci également à toi, **Isabelle**, pour ta gentillesse sans égale. Merci aussi pour la relecture de ce manuscrit.

Qu'aurait été cette thèse sans vous les filles... Toi, **Marie**, la définition parfaite d'une relation de travail ayant évolué vers l'une de mes plus belles amitiés. Ce petit bout de femme capable de déplacer des montagnes et étant une véritable force de travail. Tes nombreuses qualités humaines et professionnelles t'emmèneront très loin, j'en suis persuadée, mais ne t'oublie pas en chemin ;-)  
**Flore**, future doyenne des thésards, je te passe le flambeau sans nul doute que tu brilleras dans cette mission ! A ce séminaire que nous avons, pour mon plus grand bonheur, partagé et qui restera gravé dans tous les sens du terme ;-)  
**Aissata**, toi qui as

toujours rempli le bureau de ta bonne humeur et de ton rire communicatif. Et **Amandine**, reine de la répartie et de l'humour ! Je vous souhaite à toutes les quatre, une thèse aussi magique que la mienne ! A vous de jouer maintenant ;-)

Ces travaux, je n'aurai pu les accomplir sans la formation de qualité que j'ai reçu au sein du LBCM. **Émilie**, merci de m'avoir inculqué ta rigueur et ton savoir-faire de microbiologiste. **Fabrice**, ou celui qui a essayé de faire de moi une « pseudo-polymériste », merci pour ta patience et pour nos discussions. **Alexis**, grand maître de la biologie moléculaire (profites-en bien je ne le dirai qu'une fois dans ma vie !), merci pour tes conseils avisés et pour la lecture des chapitres de biologie. **Sophie**, merci pour tes conseils, ta gentillesse et pour la lecture des chapitres de biologie également. Un grand merci à **Alain** qui m'a donné la chance de réaliser mon stage de M2 au LBCM. A toi aussi, **Florence**, merci pour ta gentillesse et pour nos discussions de fashionista ;-)

Sans oublier les autres membres du LBCM, **Dalyal, Laure, Fabienne, Gaël, Clément**, etc. auprès de qui j'ai passé trois superbes années.

Je tiens également à remercier **Gwenola** et **Florence** pour les agréables moments que nous avons passés ensemble en salle de TP.

Cette thèse, je ne l'aurai jamais réalisé si tu n'avais pas été là, **Maman**. Toi qui m'as toujours soutenue et poussée vers le haut. Toi qui m'encourages depuis toutes ces années, je ne pourrai jamais te remercier à la hauteur de ce que tu as fait pour moi. Alors, j'espère qu'à la lecture de ce manuscrit, tu seras fière de ce qu'a accompli ta grande fille.

Ma fratrie, mes loulous, **Vyc, Beyn, Greyg, Megguy, Heyctor**, mes soutiens sans faille, merci d'être vous et de composer notre joyeuse famille.

Et enfin, merci à mon plus fidèle allié, celui qui a partagé ma vie ces trois dernières années et qui m'apporte un si bel équilibre. Merci de m'avoir fait vivre tous ces jolis moments qui ont, sans aucun doute, participé à la réussite de cette thèse. Merci à toi mon amour. Je t'aime.

## TABLES DES MATIERES

Avant-propos	9
<b>Chapitre 1. Introduction bibliographique</b>	<b>11</b>
<u>Partie 1 – Prévention de la biocontamination des surfaces</u>	17
<b>I. Le biofilm</b>	<b>17</b>
1. Qu'est-ce que le biofilm ?	17
2. Quelles sont les conséquences de ce biofilm ?	18
<b>II. La formation du biofilm</b>	<b>21</b>
1. Le conditionnement de surface	21
2. L'adhésion	22
3. La maturation	26
4. La dispersion	27
<b>III. Facteurs influençant la bioadhésion</b>	<b>28</b>
1. Hydrophobie / Hydrophilie	28
2. Rugosité	29
3. Élasticité	30
<b>IV. Quelques stratégies anti-biofilm à base de polymères</b>	<b>31</b>
1. Historique des revêtements antifouling	31
2. De la nature aux revêtements biomimétiques	32
3. Les revêtements antiadhésifs	38
4. Les revêtements anti-encrassements	40
5. Les stratégies combinées	43
<u>Partie 2 – Les poly(hydroxyalcanoates)</u>	50
<b>V. Présentation générale des PHA</b>	<b>50</b>
<b>VI. Structure et diversité des PHA</b>	<b>51</b>
<b>VII. Biosynthèse des PHA</b>	<b>55</b>
<b>VIII. Production des PHA</b>	<b>58</b>
1. Biotechnologie industrielle actuelle	58
2. Biotechnologie industrielle de nouvelle génération	59
3. Commercialisation	60
<b>IX. Propriétés des PHA</b>	<b>60</b>
1. Cristallinité	61
2. Propriétés thermiques	61
3. Propriétés mécaniques	62
4. Biocompatibilité	63
5. Biodégradabilité	64
<b>X. Références bibliographiques</b>	<b>69</b>
<b>Chapitre 2. Synthèse, formulation et caractérisation des revêtements</b>	<b>83</b>
<b>I. Le copolymère PHBHHx-PEG</b>	<b>89</b>
1. Synthèse	89
2. Caractérisation	89
<b>II. Le poly(hydroxyalcanoate) à moyennes chaînes</b>	<b>92</b>
1. Production	92



2. Caractérisation	93
<b>III. Formulation des revêtements</b>	<b>96</b>
1. Les revêtements à base de PHA	98
2. Les revêtements à base de PDMS	98
<b>IV. Caractérisation des revêtements</b>	<b>99</b>
1. Hydrophile	99
2. Energie de surface selon Owen-Wendt-Kaeble	102
3. Caractérisation mécanique par microscopie à force atomique	105
<b>V. Partie expérimentale</b>	<b>115</b>
<b>VI. Références bibliographiques</b>	<b>121</b>
<b>Chapitre 3. Étude de l'activité anti-bioadhésion</b>	<b>125</b>
<b>I. Mise en place d'un protocole d'adhésion</b>	<b>129</b>
1. Microorganismes étudiés	129
2. Protocole d'adhésion	134
<b>II. Biocontamination d'origine marine</b>	<b>137</b>
1. Adhésion avec <i>Bacillus</i> 4J6	137
2. Adhésion avec <i>Navicula perminuta</i> et <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	139
<b>III. Biocontamination d'origine médicale</b>	<b>145</b>
1. Adhésion avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	145
2. Adhésion avec <i>Staphylococcus aureus</i>	147
<b>IV. Partie expérimentale</b>	<b>152</b>
<b>V. Références bibliographiques</b>	<b>157</b>
<b>Chapitre 4. Étude de l'activité anti-biofilm, de la capacité fouling-release et analyse transcriptomique</b>	<b>159</b>
<b>I. Étude de la capacité anti-biofilm des revêtements</b>	<b>163</b>
1. La phase d'adhésion	165
2. La formation du biofilm	167
<b>II. Étude de la capacité fouling-release des revêtements</b>	<b>170</b>
1. L'effet fouling-release	170
2. Les résultats obtenus en fonction des revêtements	174
<b>III. Récapitulatif des capacités anti-biofilm et fouling-release des revêtements</b>	<b>176</b>
<b>IV. Corrélation avec les paramètres physiques, chimiques et mécaniques</b>	<b>177</b>
<b>V. Analyse transcriptomique</b>	<b>180</b>
1. Les gènes ciblés	180
2. Effet du copolymère PEG sur l'expression des gènes ciblés	185
3. Corrélation avec les capacités anti adhésives et anti-biofilm	191
<b>VI. Partie expérimentale</b>	<b>194</b>
<b>VII. Références bibliographiques</b>	<b>199</b>
<b>Conclusion générale et Perspectives</b>	<b>203</b>
<b>Annexes</b>	<b>208</b>

## AVANT-PROPOS

Toute surface en contact avec un milieu aqueux va rapidement être colonisée par des microorganismes (bactéries, microalgues, champignons) ; c'est ce que l'on appelle le biofilm. Cette structure, très bien organisée, est leur mode de vie privilégié. Sous cette forme, ils sont beaucoup moins sensibles aux variations du milieu (pH, salinité, UV, température) ce qui leur assure une meilleure survie. Toutefois, cette résistance a des conséquences dans de nombreux domaines.

En ce qui concerne le milieu marin, la colonisation massive des coques des navires, par exemple, entraîne deux difficultés principales. La première concerne les usagers de la mer puisque le biofilm présent sur la coque va, en augmentant les forces de frottement, diminuer la vitesse du navire. Pour compenser, le navire augmente sa consommation de carburant entraînant d'une part, un surcoût considérable, et d'autre part une augmentation des émissions de CO<sub>2</sub>. La deuxième difficulté concerne la dissémination des espèces. Avec le transport maritime mondial, nombreuses sont les espèces non-endémiques à générer des perturbations auprès des espèces indigènes provoquant parfois leur extinction. Autre domaine a également été touché par la persistance des biofilms : le milieu médical. Avec l'utilisation massive des dispositifs médicaux (cathéters, prothèses, implants), l'apparition de biofilm met en danger la vie des patients concernés.

Des stratégies de contrôle existent, *via* l'utilisation d'agents chimiques, mais leur efficacité et leur impact posent question. La résistance des microorganismes aux désinfectants et antibiotiques ne permet pas une éradication complète des biofilms. Quant aux molécules biocides utilisées dans le domaine marin, elles sont désormais d'un usage contrôlé en raison de leur impact environnemental catastrophique. La recherche s'est alors concentrée sur des stratégies alternatives. Parmi elles, on retrouve les systèmes fouling-release (FR). L'un de ces systèmes est composé d'une matrice hydrophobe de polydiméthylsiloxane (PDMS) et d'un additif hydrophile de polyéthylène glycol (PEG) ; c'est ce que l'on appelle les revêtements amphiphiles. Bien qu'efficace contre la bioadhésion, ce système interroge la communauté scientifique quant à l'origine pétrochimique du PDMS.

Les travaux de cette thèse consistent à substituer ce composé par des biopolymères, les poly(hydroxyalcanoates) (PHA). Issus des bactéries, ces polymères ont l'avantage d'être biodégradables et biocompatibles et donc utilisables pour de nombreuses applications. Il existe plusieurs PHA et la longueur de leurs chaînes carbonées déterminent leurs propriétés viscoélastiques. Plus leur chaîne carbonée est courte (PHA<sub>scl</sub>) plus ils auront tendance à être rigides, à l'inverse plus leur chaîne carbonée est longue (PHA<sub>mcl</sub> ou PHA<sub>lcl</sub>) plus ils seront souples. Or, la littérature décrit des comportements anti-adhésion différents selon les propriétés viscoélastiques. Ainsi, deux PHA différents ont donc été choisis pour constituer la matrice hydrophobe (un PHA<sub>scl</sub> et un PHA<sub>mcl</sub>). A cette matrice a été ajouté un additif hydrophile, PHA-PEG afin d'obtenir nos systèmes amphiphiles

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre est scindé en deux parties. La première apporte des éléments de contexte sur la biocontamination de surfaces et ses enjeux économiques et sanitaires. Elle présente le déroulement de la formation d'un biofilm avec un descriptif détaillé des connaissances sur les mécanismes d'adhésion ainsi que les principales stratégies mises en place pour protéger les surfaces de la biocontamination. La seconde partie présente la famille des poly(hydroxyalcanoates) et ses principales caractéristiques.

Le second chapitre traite de la stratégie de synthèse utilisée pour la préparation du copolymère et du PHA<sub>mcl</sub>, puis de la formulation des systèmes amphiphiles. La caractérisation physique, chimique et mécanique des revêtements formulés est également abordée dans ce second chapitre.

Le troisième chapitre présente une étude de la bioadhésion des plusieurs microorganismes sur les différentes surfaces préparées : deux pathogènes opportunistes, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, et trois microorganismes marins, deux diatomées benthiques : *Phaeodactylum tricornutum* et *Navicula perminuta* et une bactérie marine, *Bacillus* 4J6.

Enfin le quatrième chapitre s'intéresse, dans un premier temps, à la capacité anti-biofilm et fouling-release des revêtements formulés puis dans un second temps, à la régulation des gènes impliqués dans la formation de biofilm. Ce travail a été réalisé avec la bactérie pathogène opportuniste *Staphylococcus aureus*.

# Chapitre 1

## Introduction bibliographique



## Table des matières

<u>Partie 1 – Prévention de la biocontamination des surfaces</u>	17
<b>I. Le biofilm</b>	<b>17</b>
1. Qu'est-ce que le biofilm ?	17
2. Quelles sont les conséquences de ce biofilm ?	18
a) En milieu marin	18
b) En milieu médical	19
<b>II. La formation du biofilm</b>	<b>21</b>
1. Le conditionnement de surface	21
2. L'adhésion	22
a) L'adhésion réversible : interactions physicochimiques	22
b) L'adhésion irréversible : maturation de l'ancrage	25
3. La maturation	26
4. La dispersion	27
<b>III. Facteurs influençant la bioadhésion</b>	<b>28</b>
1. Hydrophobie / Hydrophilie	28
2. Rugosité	29
3. Élasticité	30
<b>IV. Quelques stratégies anti-biofilm à base de polymères</b>	<b>31</b>
1. Historique des revêtements antifouling	31
2. De la nature aux revêtements biomimétiques	32
a) La microtopographie de surface	33
(i) La feuille de lotus	34
(ii) Les organismes marins	34
b) Chimie de surface	35
(i) Les peptides	35
(ii) Les polysaccharides	37
3. Les revêtements antiadhésifs	38
a) Le PEG linéaire en brosse	38
b) Les polymères en brosse cyclique	39
4. Les revêtements anti-encrassements	40
a) Les fluoropolymères	41
b) Les silicones	42
5. Les stratégies combinées	43
a) Les revêtements synergiques	43
(i) Les revêtements résistants et libérant la salissure	43
(ii) Les revêtements résistants et dégradant la salissure	45
(iii) Les revêtements antiadhésifs, anti-encrassement et dégradant la salissure	45
b) Les revêtements sensibles aux stimuli	46
(i) Les revêtements thermosensibles	46
(ii) Les revêtements sensibles à la salinité	47

<u>Partie 2 – Les poly(hydroxyalcanoates)</u>	50
<b>V. Présentation générale des PHA</b>	<b>50</b>
<b>VI. Structure et diversité des PHA</b>	<b>51</b>
<b>VII. Biosynthèse des PHA</b>	<b>55</b>
<b>VIII. Production des PHA</b>	<b>58</b>
1. Biotechnologie industrielle actuelle	58
2. Biotechnologie industrielle de nouvelle génération	59
3. Commercialisation	60
<b>IX. Propriétés des PHA</b>	<b>60</b>
1. Cristallinité	61
2. Propriétés thermiques	61
3. Propriétés mécaniques	62
4. Biocompatibilité	63
5. Biodégradabilité	64
<b>X. Références bibliographiques</b>	<b>69</b>

## Table des illustrations

### Partie 1 – Prévention de la biocontamination des surfaces

#### Figures

- Figure 01.** Illustration schématique des différentes salissures marines pouvant être retrouvées sur la coque des navires et leurs impacts négatifs sur l'industrie maritime. (p.19)
- Figure 02.** Sites d'infections primaire et secondaire des infections liées au biofilm. (p.20)
- Figure 03.** Processus de formation du biofilm. (p.21)
- Figure 04.** Les interactions de Lifshitz-van der Waals. (p.23)
- Figure 05.** Formation de la double couche électronique. (p.24)
- Figure 06.** Évolution de l'interaction globale entre un microorganisme et une surface résultant des interactions de Lifshitz-van der Waals et électrostatiques. (p.25)
- Figure 07.** Mécanisme général de l'adhésion d'un microorganisme sur une surface abiotique. (p.26)
- Figure 08.** Schéma décrivant les étapes de formation d'un biofilm en milieu marin. (p.27)
- Figure 09.** Représentation schématique du mécanisme antisalissures des surfaces hydrophiles. (p.28)
- Figure 10.** Historique des revêtements antifouling. (p.32)
- Figure 11.** Images MEB de surfaces microtexturées naturelles et biomimétiques. (p.33)
- Figure 12.** Peptoïde antifouling (PMP1). (p.36)
- Figure 13.** Effets du greffage de PMP1 sur du titane. (p.36)
- Figure 14.** Polysaccharides utilisés en surface de revêtement. (p.37)
- Figure 15.** Adsorption des protéines sur des brosses polymères. (p.40)
- Figure 16.** Synthèse du PEOXA cyclique. (p.40)
- Figure 17.** Dimensions moléculaires d'un polymère fluorocarboné et du poly(diméthylsiloxane). (p.41)
- Figure 18.** Représentation schématique d'un copolymère fluoré/siloxane en surface dans une matrice PDMS. (p.42)
- Figure 19.** Représentation schématique du revêtement PDMS/PU avec incorporation d'huile de silicone. (p.43)
- Figure 20.** Fixation des chaînes latérales PDMS-OH et/ou PEG-OH pour former des copolymères à blocs amphiphiles mixtes. (p.44)
- Figure 21.** Adhésion des spores d'*Ulva* et de la diatomée *Navicula* sur différents revêtements. (p.44)
- Figure 22.** Représentation schématique du copolymère greffé PEG-b-AMP dégradant et libérant les salissures. (p.45)
- Figure 23.** Représentation schématique du mélange des trois stratégies avec l'utilisation de brosses TOB-fluoropolymères. (p.46)



**Figure 24.** Représentation schématique de PNIPAAm-QAS thermosensible et de PNIPAAm-Van. (p.47)

**Figure 25.** Représentation schématique du fonctionnement des brosses à base de polyVBIPS. (p.48)

### Tableaux

**Tableau 01.** Métabolites secondaires antimicrobiens provenant de bactéries marines. (p.35)

**Tableau 02.** Propriétés physiques des polymères fluorés et des élastomères de silicone. (p.41)

## Partie 2 – Les poly(hydroxyalcanoates)

### Figures

**Figure 01.** Image de microscopie électronique de *Ferrobacillus ferrooxidans* en condition d'accumulation intracellulaire de P(3HB). (p.50)

**Figure 02.** Modèle de formation des granules de PHB. (p.52)

**Figure 03.** Structure générale des poly(3-hydroxyalcanoates). (p.53)

**Figure 04.** Diversité de structures des polyhydroxyalcanoates. (p.55)

**Figure 05.** Principales voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse de PHA. (p.55)

**Figure 06.** Valeurs moyennes de la biodégradation du PHA dans l'environnement marin. (p.66)

**Figure 07.** Représentation schématique des revêtements formulés dans ce projet de thèse et de leur potentiel mode d'action. (p.67)

### Tableaux

**Tableau 01.** Liste non-exhaustive de souches microbiennes productrices de PHA disponibles dans les collections de cultures. (p.51)

**Tableau 02.** Liste des facteurs de stress et des microorganismes dans lesquels des fonctions protectrices en lien avec la présence de granules de PHA ont été décrites. (p.53)

**Tableau 03.** Nomenclature des PHA<sub>scl</sub> et PHA<sub>mcl</sub>. (p.54)

**Tableau 04.** Enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse I, II et III. (p.56)

**Tableau 05.** Diversité des PHA. (p.57)

**Tableau 06.** Comparaison de la productivité des organismes selon les stratégies de production. (p.59)

**Tableau 07.** Liste non-exhaustive de PHA commercialisés. (p.60)

**Tableau 08.** Températures de transition vitreuse (T<sub>g</sub>) et de fusion (T<sub>m</sub>) des PHA synthétisés par différents organismes lorsqu'ils sont cultivés avec différents substrats. (p.62)

## Partie 1 – Prévention de la biocontamination des surfaces

### I. Le biofilm

#### 1. Qu'est-ce qu'un biofilm ?

De façon générale, le biofilm se définit comme étant une communauté de cellules microbiennes fixées sur un support et intégrées dans une matrice. Constituée de substances polymériques extracellulaires (EPS), cette matrice joue un rôle clé, structural et fonctionnel, dans l'émergence et la persistance du biofilm (Flemming *et al.*, 2016). De nombreuses biomolécules composent ces EPS ; parmi elles, on retrouve des polysaccharides (1-2%), des acides nucléiques (ADNe et ARNe, < 1%), des protéines (< 1-2%) et des lipides (< 1%). Ces biomolécules favorisent, dans un premier temps, l'adhésion microbienne aux surfaces biotiques et abiotiques (Karygianni *et al.*, 2020) puis, dans un second temps, forment une matrice qui maintient les cellules à proximité les unes des autres. Cette proximité permet des interactions intercellulaires et fournit des micro-environnements mécaniquement stables et chimiquement complexes (Koo *et al.*, 2016). Ainsi, ce mode de vie sessile, très différent de celui des cellules planctoniques, est l'un des plus répandus et des plus efficaces sur Terre (Stoodley *et al.*, 2002).

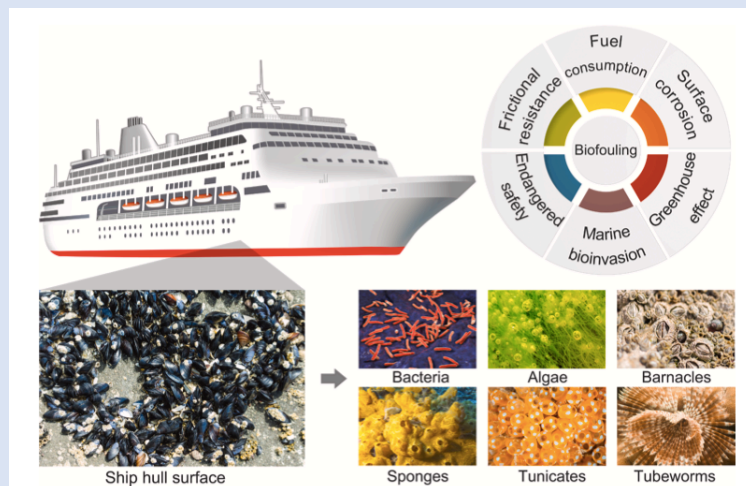
Cependant cette efficacité pose de sérieux problèmes d'ordre sanitaire, économique et écologique et ce dans de nombreux domaines. L'institut national de la santé (NIH) estime que les biofilms bactériens sont impliqués dans 65% des maladies d'origine microbienne et dans plus de 80% des infections chroniques (Jamal *et al.*, 2018). En cause, la haute résistance des cellules sessiles aux agents antimicrobiens et aux cellules immunitaires (Dragos *et al.*, 2017 ; Koo *et al.*, 2017). Loin d'être le seul secteur touché par le biofilm, on retrouve également le domaine du transport maritime avec ses 150 milliards de dollars de dépenses par an uniquement liés à la réparation et à l'entretien des coques colonisées (Nurioglu *et al.*, 2015). De même que pour le secteur médical, la matrice confère aux biofilms une telle résistance que les agents chimiques utilisés usuellement peinent à les éradiquer.

## 2. Quelles sont les conséquences de ce biofilm ?

### a) En milieu marin

Dans le milieu marin, la colonisation spontanée des surfaces immergées par des microorganismes (bactéries, microalgues, champignons) et des macroorganismes (macroalgues, balanes, moules) est plus connu sous le nom de biofouling (**Figure 01**). Cet encrassement biologique impacte plusieurs activités industrielles telles que le transport maritime, les structures offshore, les systèmes de purification d'eau ou encore les procédés de dessalement (Silva *et al.*, 2019). Sa présence et surtout sa persistance sont responsables de surcoût économique, d'impact environnemental et de risques sanitaires. Plusieurs facteurs sont susceptibles d'influer sur le taux d'encrassement biologique notamment le cycle de service d'un navire (période d'immobilité, vitesse, durée du trajet et schéma de déplacement) et les conditions environnementales (salinité, nutriments, température) (Koboevic *et al.*, 2019). Les communautés de salissures présentes sur les navires diffèrent également en fonction de ce cycle de service. Ainsi, les porte-conteneurs, qui ont une vitesse relativement élevée et des périodes d'immobilisation courtes, ont tendance à être faiblement recouverts par des macro-salissures à la différence des navires ayant de longues périodes d'immobilisation, tels que les navires de forage ou les navires de guerre, qui sont non seulement encrassés par des micro-salissures mais aussi par des macro-salissures (Davidson *et al.*, 2009). Toutefois, certaines zones des navires appelées « niches », étant protégées des contraintes hydrodynamiques les plus fortes, restent universellement encrassées et ce quel que soit le cycle de service, la région d'exploitation ou encore la vitesse (Coutts & Taylor, 2004). Par exemple, l'encrassement biologique de l'hélice a un impact significatif sur les caractéristiques de propulsion des navires. Cette détérioration des performances entraîne une perte d'efficacité propulsive globale et conduit à une augmentation de la consommation de carburant pour maintenir une vitesse constante (IMO, 2011). L'impact financier pour les compagnies maritimes est alors relativement conséquent sachant que le coût du carburant représente 60 à 70% de l'ensemble des coûts opérationnels (Farkas *et al.*, 2020). Au-delà de cet aspect économique, cette biomasse, présente sur les coques et transitant aux quatre coins du globe, peut être responsable de l'introduction de nouvelles espèces. Aux Etats-Unis, 200 espèces ont été transportées par voie maritime et signalées comme étant non-indigènes. Parmi elles, 30% ont été attribués uniquement au biofouling (Ruiz *et al.*, 2015). Compte-tenu des conditions de vie inadaptées

aux espèces exogènes (salinité, température, pH), seule une petite proportion d'organismes réussit à envahir un nouvel habitat. Dès lors que l'envahisseur est établi, il devient quasiment impossible de l'éliminer (Molnar *et al.*, 2008). Seule l'éradication de plusieurs espèces de moules envahissantes a été couronnée de succès en Australie dans les années 2000 moyennant une dépense de 2,2 millions d'euros (Bax *et al.*, 2003).



**Figure 01.** Illustration schématique des différentes salissures marines pouvant être retrouvées sur la coque des navires et leurs impacts négatifs sur l'industrie maritime. D'après Jin *et al.*, 2022.

## b) En milieu médical

Nombreuses sont les interventions chirurgicales ayant pour objectif l'introduction de dispositifs médicaux. Qu'il s'agisse de cathéters, de prothèses articulaires ou encore de valves cardiaques, tous ces dispositifs peuvent voir leurs fonctions et leur sécurité compromises par la présence de biofilm microbien (Arciola *et al.*, 2018) (**Figure 02**). Les infections liées à ces biomatériaux surviennent soit immédiatement après l'intervention chirurgicale soit en post-opératoire (Veerachamy *et al.*, 2014). Elles sont dues à la présence de bactéries sur la peau des patients tels que des staphylocoques, en particulier *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermis*, des streptocoques, des bacilles à Gram négatif, des entérocoques et des bactéries à Gram positif anaérobies comme *Propionibacterium acnes* (Shiono *et al.*, 2016 ; Chen *et al.*, 2013). Le traitement de ces infections par des techniques conventionnelles telles que l'antibiothérapie à court et à long terme s'avère souvent inefficace (Paharik & Horswill, 2016). En cause, la haute organisation du biofilm bactérien. Des chirurgies en deux étapes sont alors pratiquées, la première ayant pour objectif le retrait du dispositif infecté et l'antibiothérapie du patient et la

seconde consiste à installer un nouveau dispositif (Hanssen & Spangehl, 2004 ; Pitto & Spika, 2004). Au-delà du coût économique engendré par ces interventions, les risques de décès ou de complications sont importants, qu'ils soient liés à l'acte chirurgical en lui-même ou bien à l'infection chronique, notamment chez les patients âgés ou immunodéprimés. Les dispositifs médicaux ne sont pas les seuls responsables de ces infections à base de biofilm, les tissus mous peuvent aussi en être la cible. C'est le cas notamment pour les patients atteints de mucoviscidose. Cette maladie génétique, ayant pour particularité la présence de mutations sur le gène codant la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), induit un dysfonctionnement des canaux chlorure. Cela provoque une diminution de l'eau présente au niveau des muqueuses et par conséquent une inflammation et un épaissement du mucus qui les recouvre. Les cellules mucociliaires ne peuvent ainsi plus remplir leur rôle et n'assurent plus l'élimination des corps étrangers dans les voies respiratoires. Cette défaillance rend possible la colonisation des poumons et ce notamment par une souche mucoïde de *Pseudomonas aeruginosa* (Moreau-Marquis *et al.*, 2008). Lors de la formation du biofilm, cette souche produit une matrice très visqueuse majoritairement composée d'EPS de type alginate la protégeant de toutes tentatives d'éradication par antibiothérapie (Leid *et al.*, 2005 ; Yoon *et al.*, 2002). C'est alors que l'infection chronique s'installe chez le patient et qu'elle peut lui être fatale.

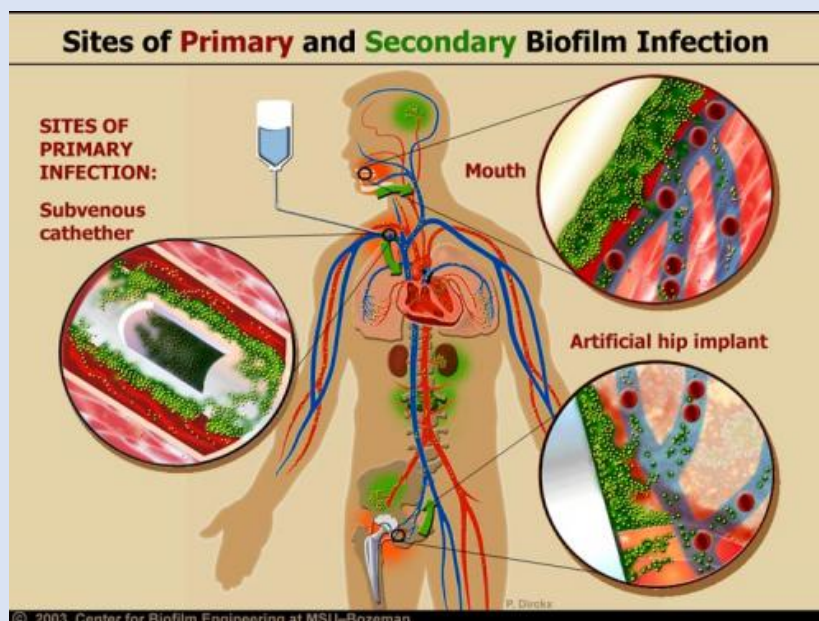


Figure 02. Sites d'infections primaires et secondaires des infections liées au biofilm. D'après Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozoman, 2003.

## II. La formation du biofilm

De façon générale, la formation de biofilm est classiquement considérée comme un processus en quatre étapes : (i) le conditionnement de surface ; (ii) l'attachement initial des cellules bactériennes et l'agrégation des cellules en couches cellulaires multiples ; (iii) la maturation du biofilm et (iv) le détachement des cellules du biofilm pour initier un nouveau cycle de formation de biofilm (Costerton *et al.*, 2005 ; Mack *et al.*, 2004) (**Figure 03**).

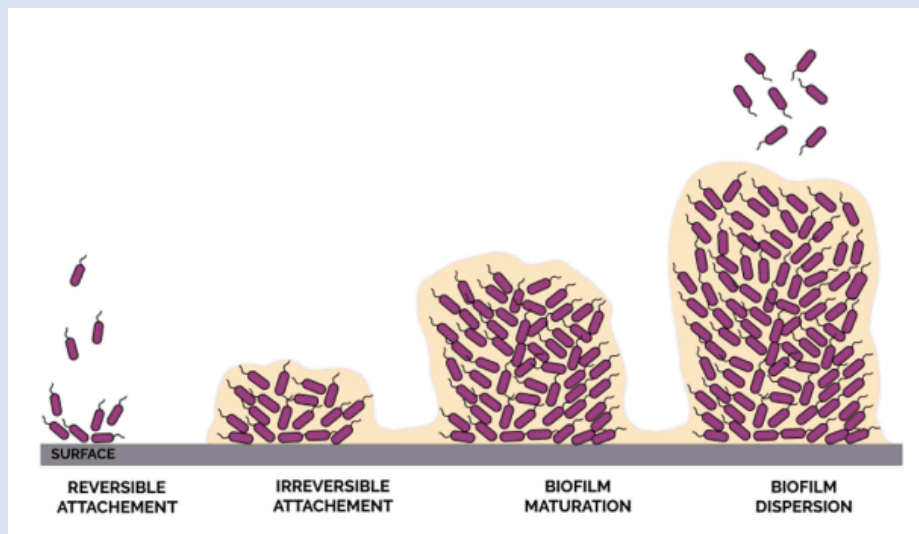


Figure 03 : Processus de formation du biofilm. D'après Uneputty *et al.*, 2022.

### 1. Le conditionnement de surface

Cette étape, aussi rapide soit-elle, régit les conditions d'adhésion des cellules sur une surface *via* la formation d'un film de conditionnement. La nature de ces films peut être très différente selon le type d'environnement auquel la surface est exposée (eau de mer, liquide physiologique etc) (Loeb & Neihof, 1975 ; Mittelman, 1996). De manière générale, ils sont formés par l'adsorption de différentes molécules sur le substrat telles que des molécules organiques ou inorganiques mais aussi des macromolécules (protéines, biopolymères). La présence de ces films modifie les propriétés de la surface telles que son énergie, sa charge mais aussi sa rugosité (Lorite *et al.*, 2011).

## 2. L'adhésion

En milieu aqueux, la plupart des micro-organismes sont regroupés en amas mobiles et sont animés par des mouvements Browniens. Les micro-organismes sont ainsi dépourvus de toute attache à une surface : on parle d'état planctonique. Dès lors qu'une surface est présente, des processus de transports passifs et/ou actifs tendent à amener les micro-organismes à proximité de la surface. Ces mécanismes peuvent être liés à des forces physiques telles que les forces hydrodynamiques, gravitationnelles ou encore les mouvements Browniens. Mais ils peuvent également être liés à la motilité de certaines bactéries qui, par le biais de signaux chimiques dans l'environnement, vont nager vers la surface. C'est à ce moment que la transition de l'état planctonique à l'état sessile se déclenche. S'en suit le processus d'adhésion à la surface qui se compose de deux étapes. La première est rapide et est appelée phase d'adhésion réversible. Au cours de cette phase, les interactions cellules-substrat sont faibles et le détachement des micro-organismes est alors possible même sous de faibles contraintes. La seconde étape est plus lente mais les forces d'adhésion qui entrent en jeu sont bien plus importantes qualifiant cette phase d'adhésion irréversible.

### a) L'adhésion réversible : interactions physicochimiques

Au cours de cette étape, des interactions non spécifiques vont avoir lieu entre les bactéries et la surface, c'est ce qui est qualifié d'attachement initial. L'adhésion bactérienne pouvant être modélisée par l'interaction d'une particule colloïdale avec une surface, la théorie de la stabilité des colloïdes introduite par DeJarguin, Landau, Verwey et Overbeek peut être appliquée. Cette théorie DVLO, du nom de ces auteurs (Hermansson, 1999) combine, à la fois, les interactions de Lifshitz-van der Waals (LW) et les interactions électrostatiques (Churaev *et al.*, 2013 ; Verwey *et al.*, 1947).

Qu'elles possèdent ou non un moment dipolaire permanent (molécule polaire), les molécules sont polarisables et sont donc toutes susceptibles de posséder un moment dipolaire induit (molécule apolaire). Les interactions attractives entre ces moments dipolaires, permanents ou induits, sont à l'origine de la cohésion des liquides : ce sont les interactions de van der Waals.

Suivant la nature des moments dipolaires concernés, on distingue trois types d'interactions de van der Waals (**Figure 04**) :

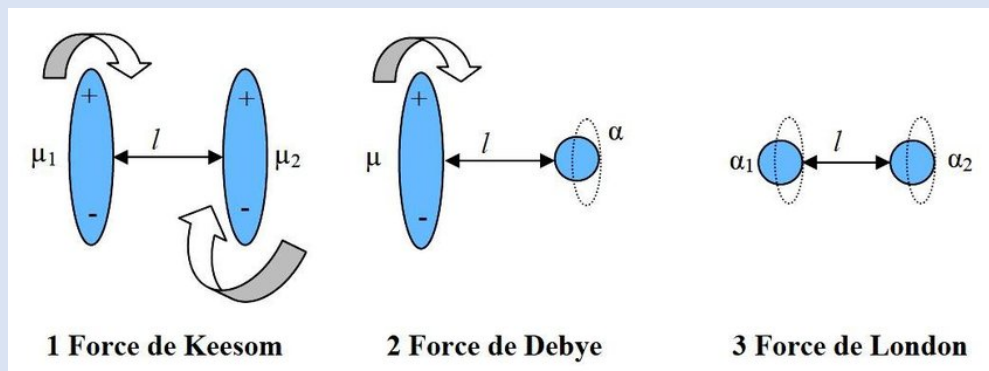
- L'interaction de van der Waals-Keesom s'exerce entre molécules polaires (Keesom, 1921),
- L'interaction de van der Waals-Debye concerne l'attraction entre une molécule polaire et une molécule apolaire (Debye, 1921),
- L'interaction de van der Waals-London s'exerce entre deux molécules apolaires (London, 1937).

Les trois types d'interactions intermoléculaires de van der Waals sont attractifs et ont la même décroissance en  $1/r^6$  avec la distance  $r$  intermoléculaire. On peut donc les inclure dans un même potentiel d'interactions de van der Waals (Israelachvili, 1991). Ainsi pour deux molécules (i) et (j), l'énergie libre d'interaction de van der Waals s'écrit :

$$u(r) = -\frac{c_{ij}}{r^6}$$

Où la constante  $c_{ij}$  d'interactions de van der Waals entre les molécules (i) et (j) est la somme de trois contributions respectivement dues aux interactions de Keesom, de Debye, et de London.

Ces interactions de van der Waals sont des interactions de faible intensité (entre 10 et 50 kJ/mol) et sont effectives à des distances comprises entre 10 et 100 nm.

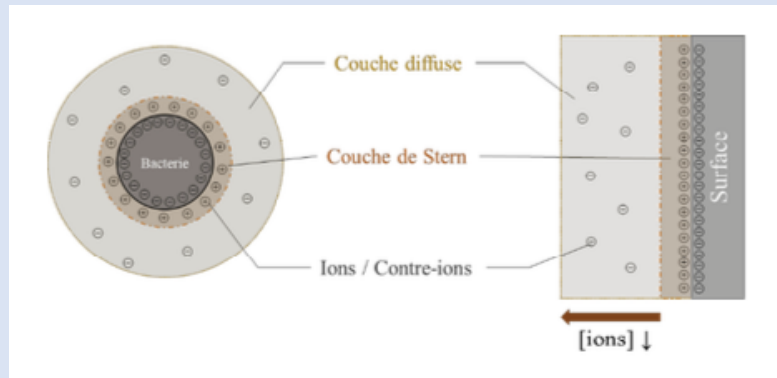


**Figure 04.** Les interactions de Lifshitz-van der Waals. D'après Boutaleb et al., 2017.

En plus des interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques sont également prises en compte dans la théorie DVLO. Ces interactions sont le résultat du rapprochement de deux entités chargées électriquement. Dans le cas de deux entités de charge similaire, l'interaction est dite répulsive alors qu'elle est dite attractive entre deux entités de charges



différentes. Dans le cas de l'adhésion bactérienne, les ions présents dans le milieu créent une double couche électronique à la fois sur la surface et sur la membrane cellulaire. Cette double couche est composée d'une première couche dite de Stern et d'une seconde couche, dite diffuse, car la concentration ionique diminue avec la distance (**Figure 05**).



**Figure 05.** Formation de la double couche électronique. *D'après Scalabrini, 2019.*

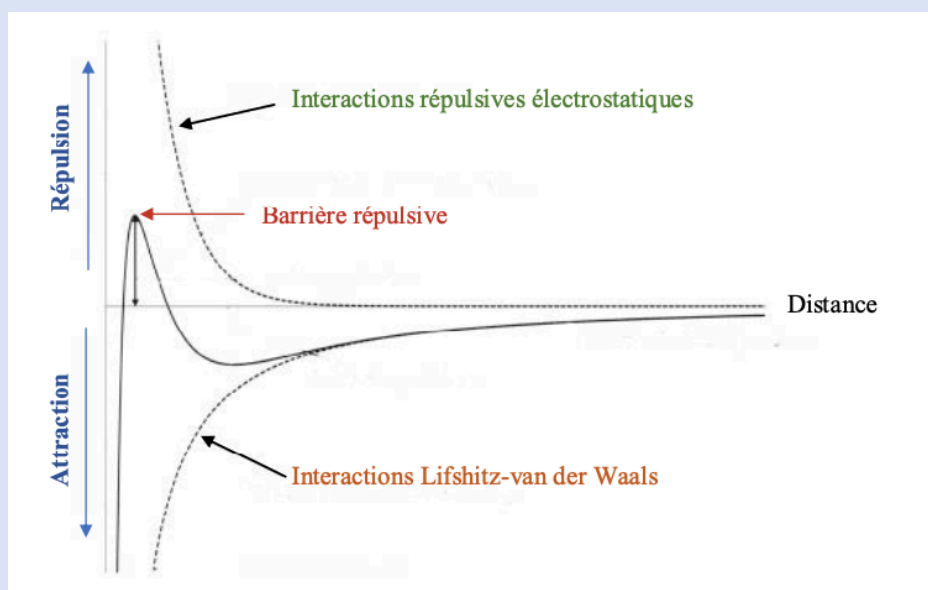
L'épaisseur de la double couche électronique est fortement influencée par la concentration ionique du milieu : plus la force ionique est élevée, plus la double couche est fine. La nature de la charge étant liée au pH, on considère généralement qu'à pH neutre, bactéries et surfaces sont chargées négativement produisant ainsi une interaction répulsive (van Loosdrecht *et al.*, 1989).

Toutefois, la théorie DVLO « classique » ne prend pas en compte les possibles échanges de particules (électrons, protons) permettant ce que l'on appelle les interactions courte distance. En effet, surfaces et micro-organismes ne sont pas des entités chimiques inertes et peuvent donc interagir *via* la présence de sites acides et/ou basiques. De ce fait, la théorie DLVO a été complétée par Van Oss *et al.* en introduisant les interactions acide-base de Lewis (AB). C'est ce que l'on appelle la théorie XDLVO ou DLVO étendue (Van Oss, 2008).

Les interactions acide-base (AB) résultent d'un échange d'électrons ou de protons entre un groupement donneur d'électrons (acide de Lewis) ou accepteur d'hydrogène (base selon Brönsted) et un groupement accepteur d'électrons (base de Lewis) ou donneur d'hydrogène (acide selon Brönsted). Parmi ces interactions AB on retrouve les liaisons hydrogène qui, par le biais d'un atome donneur d'électrons (O, N, F) transfèrent partiellement un électron célibataire sur un atome d'hydrogène accepteur d'électrons. Ces liaisons s'établissent sur de courtes distances et peuvent être intra ou intermoléculaires. En milieu aqueux, la membrane cellulaire

possède généralement un caractère donneur d'électrons ainsi face à une surface aux propriétés similaires l'interaction est considérée comme répulsive alors que, si la surface a un caractère accepteur d'électrons l'interaction sera attractive.

L'apparition de ces interactions acide-base demande une courte distance entre la bactérie et la surface or les interactions électrostatiques limitent l'approche des bactéries à la surface. Le franchissement d'une barrière énergétique répulsive est donc nécessaire afin de consolider leur ancrage par des interactions courtes distances (**Figure 06**). Pour cela, les microorganismes vont opérer des modifications phénotypiques et transcriptionnelles, première étape vers l'adhésion irréversible.

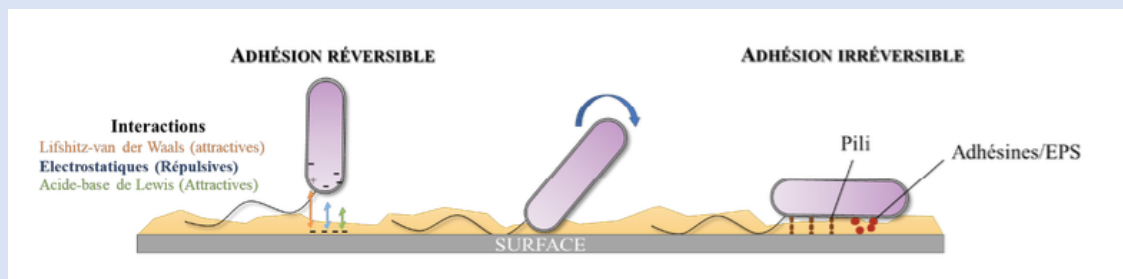


**Figure 06.** Évolution de l'interaction globale entre un microorganisme et une surface résultant des interactions de Lifshitz-van der Waals et électrostatiques. *D'après Scalabrini, 2019.*

#### b) L'adhésion irréversible : maturation de l'ancrage

À la différence de l'étape précédente, l'adhésion irréversible est le fait d'interactions spécifiques. Cette étape, dite « de verrouillage », est le résultat de liaisons entre des molécules spécifiques et la surface. Pour cela des changements phénotypiques et transcriptionnels vont être opérés par le microorganisme entraînant, d'une part, la sécrétion d'exopolysaccharides (EPS) et, d'autre part, sa réorganisation spatiale afin de maximiser la formation de liaisons hydrogène (Bruzard *et al.*, 2015 ; Gibiansky *et al.*, 2010) (**Figure 07**). Ces modifications phénotypiques et transcriptionnelles sont induites en réponse à des mécanosenseurs, tels que les flagelles et les pili, dont l'un des rôles est d'établir un premier contact avec la surface à

coloniser (Dunne *et al.*, 2002 ; Palmer *et al.*, 2007). Ces flagelles sont des filaments protéiques ancrés sur la membrane bactérienne pouvant mesurer jusqu'à 15  $\mu\text{m}$  de long et dont le nombre varient suivant la nature bactérienne. Les pili, quant à eux, sont également des structures protéiques mais plus petites (0,5 à quelques  $\mu\text{m}$  de long) et réparties tout autour de la bactérie. Ces assemblages protéiques possèdent de nombreuses fonctions dont la motilité, l'adhésion et la formation de biofilm. Si l'on prend le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, la présence de pili de type IV à sa surface lui permet de se déplacer par un phénomène dynamique d'extrusion et de rétractation, le *twitching* (Burrows, 2012). Sans ces pili, l'adhésion de cette bactérie est fortement perturbée révélant ainsi l'importance de ces structures protéiques dans ce phénomène (O'Toole *et al.*, 1998). Le verrouillage de l'adhésion passe également par la production de la matrice EPS. Majoritairement composée de polysaccharides et de biomolécules telles que les protéines et les acides nucléiques, elle est indispensable au mode de vie à l'état sessile. Elle assure, d'une part un rôle structural et protecteur, mais également fonctionnel puisque des canaux permettent la circulation des nutriments et de l'oxygène au sein même du réseau matriciel. Comme l'ont montré Tsuneda *et al.* une faible production d'EPS ne permet pas aux microorganismes de s'établir efficacement et durablement sur une surface (Tsuneda *et al.*, 2003).



**Figure 07.** Mécanisme général de l'adhésion d'un microorganisme sur une surface abiotique. D'après Scalabrini, 2019.

### 3. La maturation

Cette troisième étape concerne la multiplication cellulaire. Chaque bactérie ayant initialement adhéré à une surface va se diviser jusqu'à l'apparition de micro-colonies. Le rassemblement de toutes ces micro-colonies va créer un tapis bactérien dense. La production de matrice EPS est continue durant cette phase de prolifération et va aboutir à la formation d'un réseau

tridimensionnel dont les caractéristiques dépendent de plusieurs facteurs (environnement, espèces bactériennes, quorum sensing, etc). En milieu marin, le biofilm formé par les microorganismes va servir de base pour l'attachement de macroorganismes tels que les balanes, les algues ou les invertébrés marins (Figure 08).

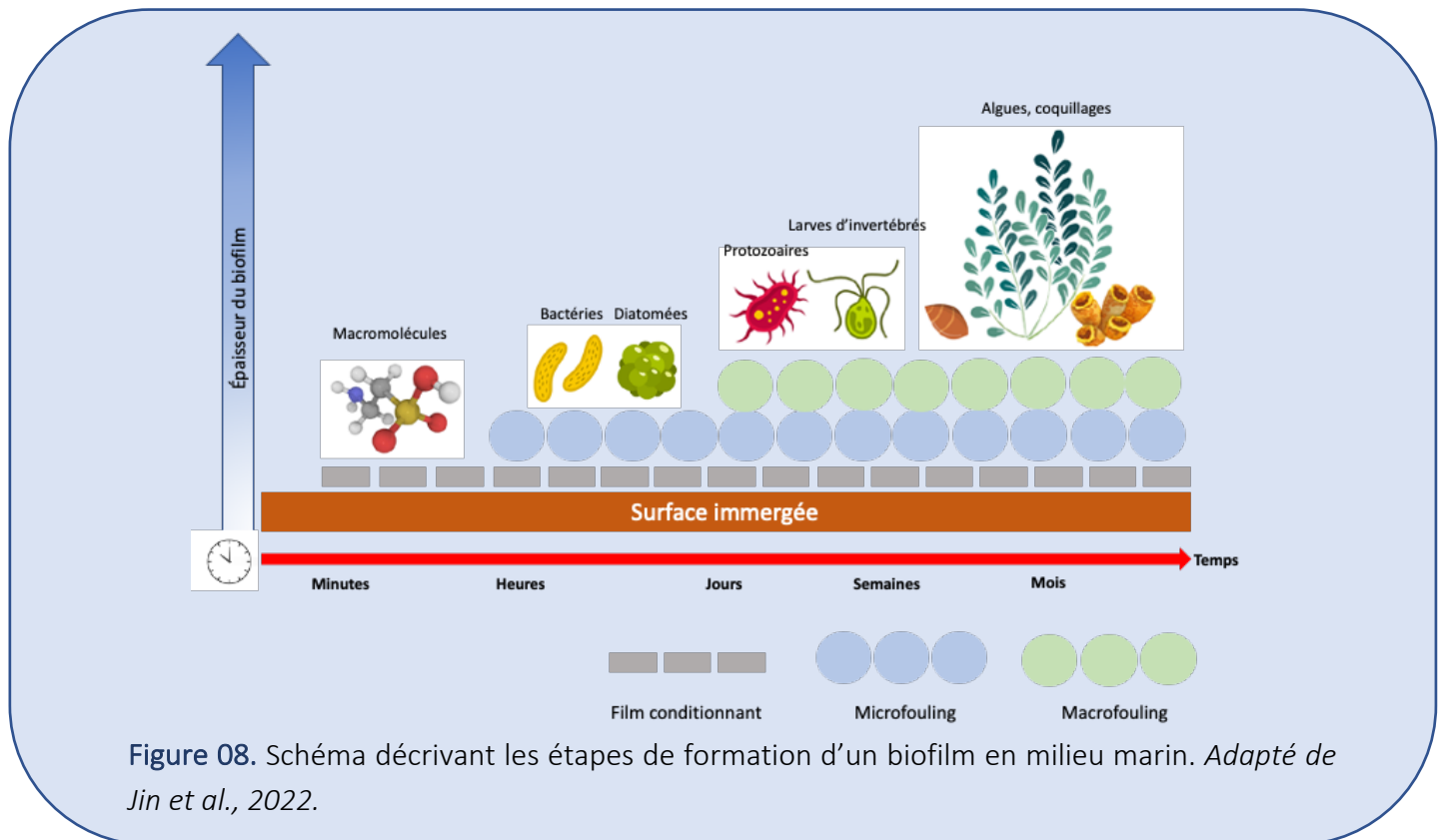


Figure 08. Schéma décrivant les étapes de formation d'un biofilm en milieu marin. Adapté de Jin et al., 2022.

#### 4. La dispersion

Ce phénomène est lié à un retour des microorganismes vers l'état planctonique, même s'il est possible qu'il se produise de façon passive par contrainte mécanique (force de cisaillement), il reste intimement lié à l'impact biochimique des molécules régissant la croissance du biofilm (quorum sensing ou quorum quenching). Cette régulation est dépendante, d'une part, de l'environnement moléculaire mais aussi de l'environnement physico-chimique du biofilm. Un déficit d'apport en nutriments, des fluctuations de concentration locale en oxygène ou encore l'augmentation de monoxyde d'azote (NO) au sein du biofilm peuvent être la cause du phénomène de dispersion. Une fois décrochés, les microorganismes se dispersent et peuvent coloniser une autre surface, le cycle de formation du biofilm se répète ainsi sans fin.

### III. Facteurs influençant la bioadhésion

De nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer l'adhésion de microorganismes. Dans cette introduction, il a été choisi de se focaliser sur trois d'entre eux : hydrophobie, rugosité et élasticité de surface.

#### 1. Hydrophobie / Hydrophilie

Le caractère hydrophobe ou hydrophile d'une surface influe sur sa capacité anti-adhésive et/ou de libération de l'encrassement (encore appelée fouling-release). Une surface hydrophobe permet de favoriser l'élimination des organismes salissant la surface par réduction de l'énergie d'interaction entre l'organisme et la surface. On parle alors d'effet « autonettoyant » ou d'effet « lotus ». A l'inverse, les surfaces hydrophiles peuvent résister au processus initial d'encrassement biologique : l'adhésion. Des stratégies hybrides ont été mises au point en modifiant des surfaces afin de les rendre plus hydrophiles *via* l'addition de longues chaînes polaires qui s'organisent en brosse. Leur forte affinité pour l'eau induit la formation d'une couche d'hydratation dense et structurée (Figure 09). Ainsi, lorsqu'un microorganisme se rapproche de la surface, la couche hydratée agit comme une barrière stérique. L'augmentation de la distance bactérie-surface réduit les interactions non spécifiques et la pression osmotique qui s'exerce à l'interface ralentit et repousse le microorganisme tel un effet « trampoline » (Selim *et al.*, 2017).

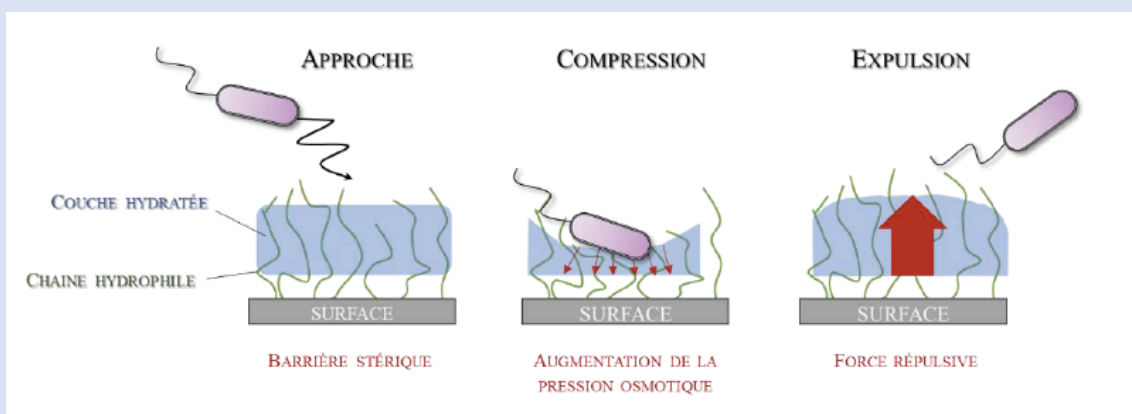


Figure 09. Représentation schématique du mécanisme antisalissures des surfaces hydrophiles. D'après Scalabrini, 2019.

Toutefois, l'efficacité de ces systèmes dépend de deux paramètres : l'épaisseur de la couche hydrophile et la densité des chaînes (Halperin, 1999). Une épaisseur trop fine ne permettra pas de réduire suffisamment la distance microorganisme-substrat et donc d'éviter les interactions. Si la densité des chaînes hydrophiles est trop faible, l'hydratation de la couche ne sera pas suffisamment structurée pour avoir l'effet répulsif escompté. Plusieurs polymères hydrophiles, dont le polyéthylène glycol (PEG), les polymères zwitterioniques et les hydrogels ont démontré une activité antisalissure lors de différents tests (Selim *et al.*, 2017).

## 2. Rugosité

L'effet de la rugosité de surface sur l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms a largement été étudié. La rugosité de la surface augmente la surface disponible pour la fixation des microorganismes et fournit un support pour l'adhésion (Yoda *et al.*, 2019). De plus, les surfaces rugueuses peuvent protéger les microorganismes adhérents des forces de cisaillement empêchant ainsi leur libération (Bollen *et al.*, 1996). Par conséquent, le consensus général est que lorsque la rugosité de la surface augmente, l'adhésion et la formation de biofilms augmentent également (Xing *et al.*, 2015 ; Yu *et al.*, 2016). Par exemple, l'adhésion de trois bactéries (*S. epidermis*, *P. aeruginosa*, *R. picketti*) sur des surfaces plus rugueuses était remarquablement plus élevée par rapport aux surfaces plus lisses (James *et al.*, 2019). En ce qui concerne la formation de biofilm, une étude *in vivo* réalisée sur des disques en titane de rugosité différente (de 29 à 214 nm) a montré une accumulation de biofilm proportionnelle à l'augmentation de la rugosité de surface (Xing *et al.*, 2015). Certaines études ont proposé l'idée d'un seuil de rugosité (Ra) de 0,2  $\mu\text{m}$  telle que celle menée sur l'adhésion de *S. mutans* et *S. sobrinus*. Les résultats ont montré que les valeurs seuils de rugosité pour l'adhésion de ces deux bactéries étaient estimées entre 0,15 et 0,35  $\mu\text{m}$  (Park *et al.*, 2019). Cependant, d'autres études réfutent l'existence d'un tel seuil à l'image de Yu *et al.* qui ont montré une augmentation de l'adhésion bactérienne proportionnelle à la rugosité de surface et ce même dans la gamme inférieure au seuil proposé (0,2  $\mu\text{m}$ ). En effet, une augmentation de la rugosité des disques de zircone (allant de 11,89 à 23,94 nm) était positivement corrélée à la force d'adhésion et au nombre de bactéries fixées (Yu *et al.*, 2016). L'existence d'un seuil de rugosité est donc discutable. Bien que la rugosité de surface soit souvent corrélée positivement avec le degré d'adhésion bactérienne et la formation de biofilms, une rugosité de surface plus élevée a

entraîné, dans certains cas, une réduction de l'adhésion bactérienne (Wu *et al.*, 2018 ; Matalon *et al.*, 2020). Par exemple, l'adhésion de *P. aeruginosa* et *S. aureus* sur des échantillons d'acier inoxydable d'une rugosité de 172,5 nm a diminué de manière significative par rapport aux échantillons plus lisses (ayant une rugosité allant de 45,2 à 84,4 nm) (Wu *et al.*, 2018). La composition des milieux utilisés dans les expériences peut *via* la présence de protéines, modifier la chimie de surface (Puckett *et al.*, 2010). Toutes ces variables doivent être prises en compte pour évaluer précisément l'effet de la rugosité de la surface sur l'adhésion bactérienne.

### 3. Élasticité

L'élasticité est un facteur important qui affecte l'adhésion bactérienne et la formation du biofilm. Le module de Young, qui est défini par le rapport entre la contrainte et la déformation, est un paramètre couramment utilisé pour représenter l'élasticité. Un faible module de Young indique que le matériau est plus souple et plus élastique. Des études antérieures ont tenté de tester la relation entre l'adhésion bactérienne et l'élasticité de la surface. En utilisant du poly(éthylène glycol) diméthacrylate (PEGDMA) et des hydrogels d'agar comme surface et *E. coli* et *S. aureus* comme bactéries modèles, Kolewe *et al.* ont constaté que l'adhésion bactérienne augmentait avec la rigidité du matériau, indépendamment de la chimie de l'hydrogel ou du mécanisme d'action (Kolewe *et al.*, 2015). Une autre étude utilisant des hydrogels d'agarose a également démontré une corrélation positive entre l'adhésion et la rigidité (Guegan *et al.*, 2014). Cependant, les études utilisant du polydiméthylsiloxane (PDMS) ont pour la plupart montré une corrélation négative entre la rigidité et l'adhésion (Song & Ren, 2014 ; Song *et al.*, 2015 ; Straub *et al.*, 2019). Seule une étude a montré une tendance inverse (Liang *et al.*, 2019). Dans l'étude de Song & Ren, des surfaces de PDMS dont le module de Young variait entre 0,1 et 2,6 MPa ont été testées. Les résultats ont montré qu'en plus de l'adhésion bactérienne, la taille des cellules bactériennes est également corrélée négativement avec la rigidité, indépendamment de la chimie de surface, de la rugosité et des forces électrostatiques (Song & Ren, 2014). Des résultats intéressants rapportés par Siddiqui *et al.* ont montré que le taux de rétention et la force d'adhésion étaient plus élevés sur les surfaces plus souples lorsqu'elles étaient exposées à une contrainte de cisaillement externe et ce bien que des taux d'adhésion bactériens initiaux similaires sur PDMS aient été observés (Siddiqui *et al.*, 2019). Certaines études ont comparé l'effet de la rigidité de la surface sur des bactéries Gram-

positives et Gram-négatives, ce qui a donné lieu à des conclusions contrastées. Une corrélation positive entre l'adhésion et la rigidité a été observée pour les bactéries Gram-positives *S. epidermis* et Gram-négatives *E. coli* sur des films PEM préparés à partir de poly(alkylamine) hydrochloride (PAH) et de poly(acrylic acid) (PAA) (Lichter *et al.*, 2008). En revanche, une corrélation négative est observée pour *E. coli* sur des films de PEM photoréticulés plus rigides et les PEM non réticulés plus souples. Enfin, aucune corrélation n'a été observée pour la bactérie à Gram-positif *Lactococcus lactis* sur le même matériau (Monge *et al.*, 2013). Un tel contraste est probablement dû à la gamme différente de module élastique choisi pour les matériaux en question. Le groupe de Litcher a choisi un intervalle de 1 à 100 MPa, tandis que Monge *et al.* ont testé des modules élastiques allant de 30 à 150 kPa. Les deux études ont toutefois attribué ces différences à la mécano sélectivité des bactéries. En effet, la présence d'appendices de surface telles que les flagelles et les fimbriae (pili) font défaut à *L. lactis* qui ne réagit pas à la rigidité. De plus, Monge *et al.* ont également proposé une explication quant à une réduction de la mécano sélectivité due à la structure de peptidoglycane épaisse et rigide entourant une bactérie Gram-positive par rapport à une bactérie Gram-négative (Monge *et al.*, 2013).

#### IV. Quelques stratégies anti-biofilm à base de polymères

##### 1. Historique des revêtements antifouling

Très tôt, l'Homme a cherché à développer des technologies de protection des navires contre les salissures biologiques. Vers 200 avant J.-C., les coques en bois étaient enduites de poix chaude, de goudron et de graisse puis, il y a 2000 ans, de fines plaques de plomb étaient utilisées pour prévenir l'encrassement biologique (Amara *et al.*, 2018). A l'époque des voiliers, après avoir constaté que le biofouling nuisaient à la vitesse, du cuivre et du laiton étaient utilisés pour gainer les navires (Bingeman *et al.*, 2000). A la fin du XVIIIe siècle, d'autres substances toxiques, telles que l'arsenic, le soufre ou encore le mercure, ont été utilisées de façon à protéger les coques de navire pour une durée allant de 6 à 12 mois (Dafforn *et al.*, 2011). En 1926, la marine américaine a développé un revêtement à base de colophane contenant de l'oxyde de cuivre et de l'oxyde mercurique capable de résister au biofouling pendant 18 mois (Almeida *et al.*, 2007). Dans les années 1950, une révolution a eu lieu dans le domaine des revêtements antisalissures avec la découverte par une équipe de recherche



néerlandaise des propriétés antisalissures du tributylétain (TBT) (Van Kerk & Lujten, 1954). Son efficacité redoutable a entraîné sa popularité dans le monde entier mais sa toxicité a été dénoncée dans les années 1970. De plus, les effets de bioaccumulation du TBT ont été ressentis durant plusieurs années et ont notamment conduit à la destruction de parcs ostréicoles du bassin d’Arcachon dans les années 1980 (Alzieu *et al.*, 1986). Face à la multiplication de ce type d’évènements, une prise de conscience collective a vu le jour et l’Organisation maritime internationale (OMI) a interdit, en 2001, l’utilisation des peintures à base de TBT à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2008. Au cours des dernières décennies, les recherches se sont, de ce fait, orientées vers des stratégies antisalissures plus respectueuses de l’environnement avec notamment la mise au point de revêtements (i) résistant à la salissure (fouling-résistant), (ii) libérant la salissure (fouling-release) ou encore (iii) dégradant la salissure (fouling-dégradant) (Figure 10).

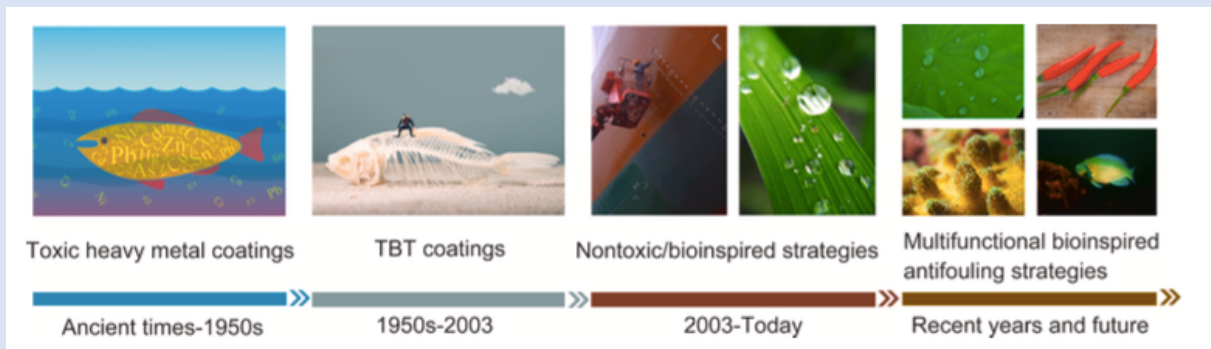


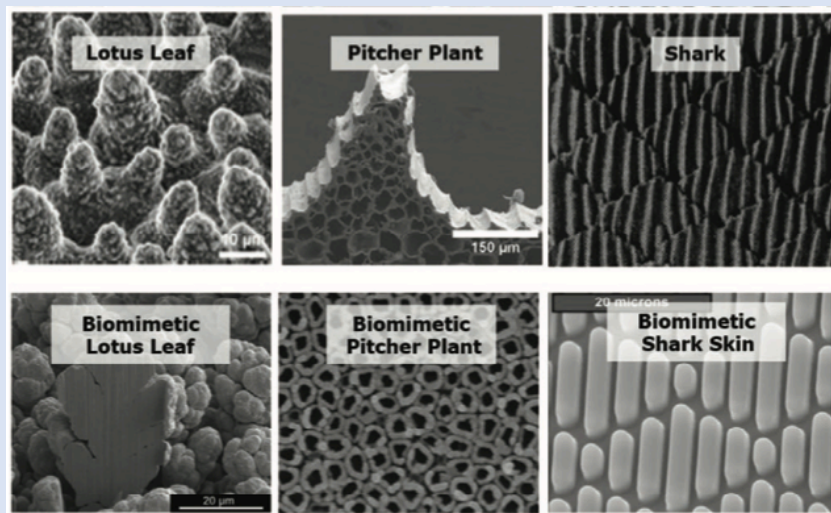
Figure 10. Historique des revêtements antifouling. D’après Jin *et al.*, 2022.

## 2. De la nature aux revêtements biomimétiques

En raison de la complexité de l’encrassement biologique, la nature a mis au point des combinaisons astucieuses de stratégies physiques et chimiques pour minimiser l’adhésion *via* des sécrétions chimiques, des microtextures ou encore des méthodes d’auto-nettoyage (Bixler & Bhushan, 2012 ; Delauney *et al.*, 2010). Inspirés par ces systèmes naturels, les chercheurs ont mis au point de nouvelles stratégies antisalissures efficaces, plus durables et plus respectueuses de l’environnement que les stratégies conventionnelles telles que les peintures toxiques contenant des métaux lourds (Bixler & Bhushan, 2012). Cette bioinspiration a donné lieu à deux stratégies principales : la modification physique ou la modification chimique de la surface (Damodaran & Murthy, 2016).

### a) La microtopographie de surface

Les surfaces aux topographies complexes, telles que celles qui imitent la peau des requins ou encore la surface des feuilles de lotus (**Figure 11**), possèdent souvent d'excellentes propriétés antisalissures et /ou autonettoyantes. La taille des motifs de surface (longueur, hauteur et largeur des nanostructures), leur distribution (aléatoire ou ordonnée) ainsi que leur forme peuvent ainsi affecter de façon impressionnante le comportement final de la surface ainsi que ses propriétés physico-chimiques (Carve *et al.*, 2019). La présence de ces microstructures peut conférer à la surface un caractère soit superhydrophile, soit superhydrophobe selon la nature chimique du matériau utilisé. En effet, si l'on prend le cas d'un matériau hydrophobe, sa surface va être constituée d'un ensemble de petites structures entre lesquelles l'air va être piégé, aboutissant ainsi une surface superhydrophobe inhospitalière à l'adhésion des microorganismes (Damodaran & Murthy, 2016). Si l'on prend le cas d'un matériau hydrophile, les nanostructures le composant peuvent établir des liaisons si fortes avec l'eau qu'aucune salissure ne peut venir s'y fixer fermement (Cao *et al.*, 2010). De plus, la création de nanostructure influe également sur le nombre de points d'attache que le microorganisme peut établir avec la surface minimisant ainsi leur adhésion (Cao *et al.*, 2010 ; Bers & Wahl 2004)



**Figure 11.** Images MEB de surfaces microtexturées naturelles (en haut) et biomimétiques (en bas). A gauche, la feuille de lotus, au milieu la plante sarracénie, et à droite, la peau de requin. D'après Damadoran and Murthy, 2016; Haghdoost and Pitchumani, 2014; Chung *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019.

(i) La feuille de lotus

Le caractère bien connu et hautement hydrophobe de la feuille de lotus résulte de sa double structuration de surface, l'une à l'échelle microscopique, l'autre à l'échelle nanoscopique. (**Figure 11**). En effet, sa surface est constituée d'éléments coniques de 10  $\mu\text{m}$ , chacun contenant de nombreux poils cireux de taille nanométrique. L'air emprisonné à l'intérieur des cavités, situées entre les cônes de forme convexe, empêche la pénétration de l'eau minimisant ainsi le mouillage et l'adhésion. Cette propriété, combinée aux poils cireux, rend la surface de la feuille superhydrophobe. De nombreuses structures superhydrophobes ont été développées sur la base de la feuille de lotus (Bhushan & Jung, 2011 ; Latthe *et al.*, 2014 ; Bhushan *et al.*, 2009) malheureusement elles présentent souvent plusieurs limites. On peut citer notamment l'effet répulsif uniquement pour les liquides à haute tension de surface, la faible stabilité mécanique ou encore la faible stabilité sous-marine y compris à court terme (Li *et al.*, 2019).

(ii) Les organismes marins

La peau de requin est constituée d'écailles ayant une topographie particulière composée de crêtes microscopiques (**Figure 11**). Cette structure rugueuse unique lui confère une protection physique contre l'adhésion (Magin *et al.*, 2010 ; Kim, 2014 ; Dundar *et al.*, 2018). Inspirés par cette structure, Carman *et al.* ont mis au point le célèbre revêtement antifouling « Sharklet » (**Figure 11**). La microstructure composée de crêtes bien ordonnées est adaptée aux dimensions des organismes encrassants défavorisant ainsi leur nombre de points d'attache (Chung *et al.*, 2007 ; Carman *et al.*, 2006). Ce revêtement a depuis été amélioré notamment en intégrant un gradient de hauteur permettant ainsi d'empêcher l'installation d'organismes à l'intérieur des interstices (Munther *et al.*, 2018). L'efficacité souhaitée n'est toutefois pas atteinte avec ce type de revêtement puisqu'en plus de ses écailles particulières, le requin sécrète un mucus lubrifiant en permanence, lui assurant un haut niveau antiadhésif. De plus, les performances antisalissures de ces revêtements biomimétiques ne sont obtenues que dans des environnements dynamiques (Damodaran *et al.*, 2016).

Bien que la modification physique de la microtopographie de surface constitue une approche non toxique et facile à mettre en œuvre pour minimiser l'encrassement biologique, son effet

est souvent trop faible et de courte durée pour pouvoir fournir une protection efficace à long terme (Bers & Wahl, 2004). En effet, chaque microorganisme est différent quant à sa taille et ses préférences d'adhésion, les surfaces microstructurées ne parviennent donc pas à prévenir l'encrassement lorsqu'elles sont exposées à diverses communautés microbiennes (Cao *et al.*, 2010 ; Bers *et al.*, 2010). La microtopographie seule est insuffisante pour prévenir l'encrassement c'est pourquoi la nature a recours à d'autres stratégies pour préserver les surfaces *via* la sécrétion de mucus ou de cires par exemple (Pu *et al.*, 2016). De nombreuses biomolécules naturelles présentent également des propriétés antisalissures telles que les peptides et les polysaccharides. La modification chimique des surfaces basées sur ces substances naturelles représente donc une autre approche intéressante pour inhiber les interactions entre le substrat et les organismes

## b) Chimie de surface

### (i) Les peptides

Les peptides sont constitués d'une chaîne de 2 à 50 acides aminés, ils peuvent agir en tant qu'hormones, facteurs de croissance, enzymes mais également agents antimicrobiens. En effet, certains peptides ont montré des propriétés antisalissures, y compris plusieurs métabolites produits par des bactéries marines (Habbu *et al.*, 2016) (**Tableau 01**).

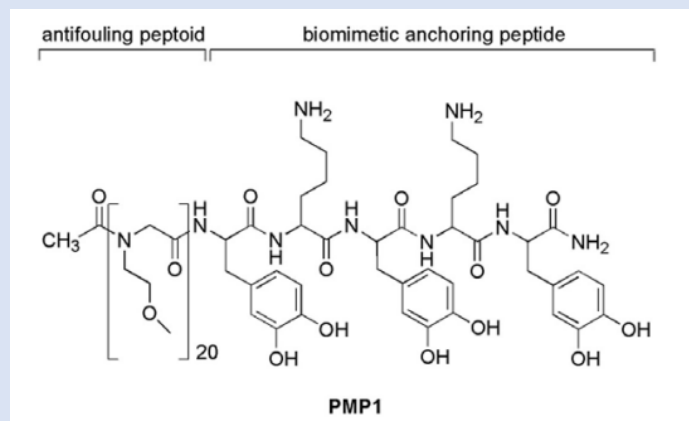
**Tableau 01.** Métabolites secondaires antimicrobiens provenant de bactéries marines. (Liste non-exhaustive).

Espèces bactériennes	Métabolites secondaires	Référence
<i>Streptomyces sp.</i>	Fijimycins A-C Etamycin A	<i>Sun et al., 2011</i>
<i>Pseudomonas UJ-6</i>	1-acetyl-beta-carboline	<i>Lee et al., 2013</i>
<i>Bacillus sp. 091D194</i>	Macrolactin W	<i>Mojid et al., 2011</i>
<i>Streptomyces sp. BCC 45596</i>	Urdamycinone E-G Dehydroxyaquamycine	<i>Sun et al., 2011</i>
<i>Brevibacillus laterosporus PNG276</i>	Tauramamide	<i>Desjardine et al., 2007</i>

Des revêtements ont ainsi été formulés en ancrant des peptides à une surface en or par l'intermédiaire d'unités cystéine disulfure (Chen *et al.*, 2009 ; Ederth *et al.*, 2019). Ces surfaces

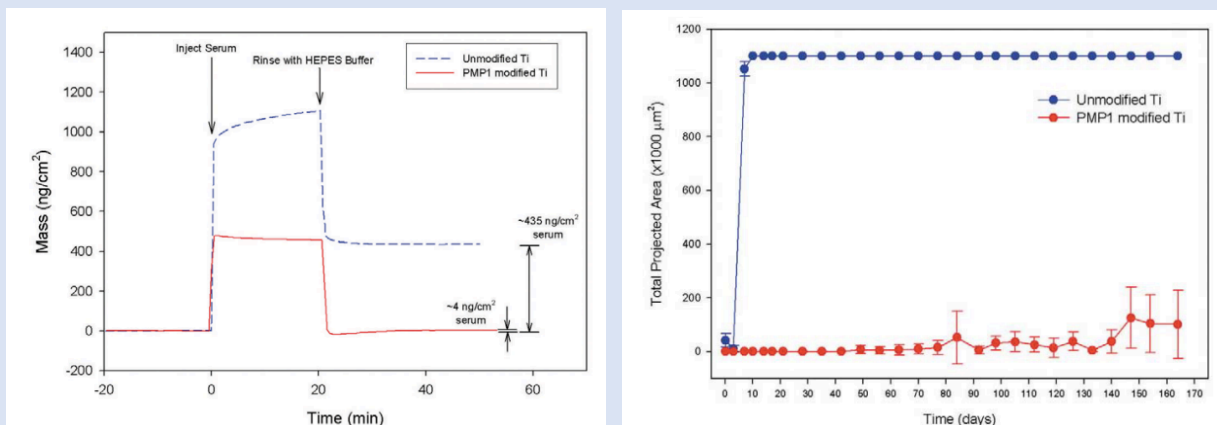
étaient constituées d'acides aminés chargés négativement et positivement, donnant lieu à une couche fortement hydratée. Bien que résistant à l'adsorption des protéines ils sont toutefois facilement dégradés par les protéases.

Une alternative biomimétique existe pour contrer cette biodégradabilité : l'utilisation des peptoïdes (**Figure 12**). Ces derniers ont un squelette similaire à celui des peptides mais sont dépourvus de liaisons hydrogène donneuses d'électrons. Cela leur confère une stabilité protéolytique accrue par rapport aux peptides naturels (Banerjee *et al.*, 2011).



**Figure 12.** Peptoïde antifouling (PMP1). D'après Statz *et al.*, 2005.

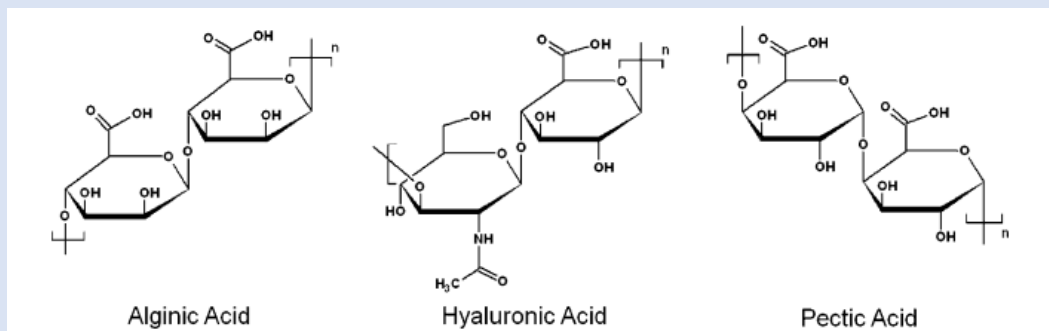
Le greffage de ces peptoïdes PMP1 sur du titane a été réalisé par Dalsin & Messersmith et les résultats ont montré une forte résistance à l'encrassement par des protéines sériques et à l'attachement des cellules (Dalsin & Messersmith, 2005) (**Figure 13**).



**Figure 13.** Effets du greffage de PMP1 sur du titane. A droite, sur la résistance à l'encrassement par des protéines sériques, à gauche sur la résistance à l'attachement de fibroblastes. D'après Dalsin & Messersmith, 2005.

(ii) Les polysaccharides

Grands responsables de la formation de biofilm, les polysaccharides extracellulaires sont les médiateurs de la plupart des interactions cellule-cellule et cellule-surface, nécessaires à la formation, cohésion et stabilisation des biofilms. Cependant, des études récentes ont identifié plusieurs polysaccharides bactériens capables d'inhiber ou de déstabiliser la formation de biofilm (Rendueles *et al.*, 2013). La résistance à l'encrassement de trois polysaccharides immobilisés de manière covalente sur du verre, a été testée par Cao *et al.* : l'acide hyaluronique (HA), l'acide alginique et l'acide pectique (Cao *et al.*, 2009) (**Figure 14**). Les résultats ont montré que la répulsion stérique liée à l'hydratation rend les surfaces résistantes à l'adhésion de cellules mammifères, de certaines bactéries et d'organismes marins (Cao *et al.*, 2009). Toutefois, leur performance antifouling dépend fortement des conditions environnementales. En effet, une fois immergés dans l'eau de mer, les polysaccharides sont capables de fixer des ions divalents (calcium, magnésium) ce qui diminue l'hydratation de la surface des revêtements. Par conséquent, les revêtements sont rendus plus attractifs, favorisant la bioadhésion. Ces derniers ont donc une résistance réduite à l'encrassement lorsqu'ils sont utilisés dans des environnements marins (Cao *et al.*, 2009).



**Figure 14.** Polysaccharides utilisés en surface de revêtement : acide alginique, acide hyaluronique et acide pectique. D'après Cao *et al.*, 2009.

En résumé, la formulation de revêtements biomimétiques a permis de mettre en avant l'importance de la chimie et de la topographie de surface dans les phénomènes de bioadhésion. Les propriétés antiadhésives exceptionnelles de nombreuses surfaces dans la nature sont le résultat de la combinaison de composition chimique et de structures particulières. Cet effet

synergique a été proposé comme alternative intéressante pour améliorer les propriétés antiadhésives à long terme des surfaces antifouling synthétiques.

### 3. Les revêtements antiadhésifs

Les revêtements antiadhésifs empêchent l'installation de protéines, bactéries et algues (Magin *et al.*, 2010 ; Thérien-Aubin *et al.*, 2011 ; Damodaran & Murthy, 2016 ; Sakala & Reches, 2018) en se reposant principalement sur la modification de la chimie de surface. Il s'agit le plus souvent de surface hautement hydratée, où les couches de molécules d'eau très structurées et l'énergie interfaciale empêchent toute possibilité d'attachement des salissures. La formulation de polymère en brosse est un outil largement utilisé pour ajuster ou modifier ces propriétés. En plus d'hydrater la surface, ces structures peuvent permettre l'incorporation de groupes fonctionnels ayant des propriétés anti-adhésion, antimicrobiennes ou anticorrosion afin de combiner les modes d'actions. De plus, du fait de leur haute densité, ces surfaces en brosse agissent comme une barrière physique pour maintenir les organismes encrassants à distance. Le principal polymère utilisé pour la formulation de ces surfaces en brosse est le polyéthylène glycol (PEG), la plupart des autres technologies en brosse étant issues de cette découverte (Yang *et al.*, 2014 a; Burkert *et al.*, 2010)

#### a) Le PEG linéaire en brosse

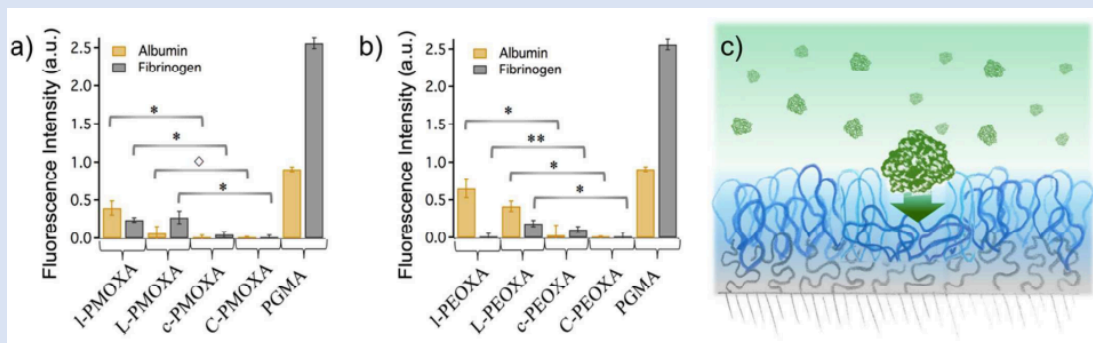
Actuellement, le greffage de polyéthylène glycol (PEG) sur des surfaces (aussi appelé PEGylation) afin de développer des brosses linéaires de PEG est la stratégie standard pour résister à l'adsorption de nombreuses molécules (Greene *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2019). Les avantages du PEG sont nombreux : solubilité dans l'eau, absence de toxicité, flexibilité, biocompatibilité, faible immunogénicité, ce qui explique sa large utilisation (Currie *et al.*, 2003). Les raisons de la répulsion efficace des salissures par les brosses de PEG sont liées à la couche d'hydratation étendue, aux changements rapides de conformation et à la répulsion stérique (Tao *et al.*, 2008 ; Freij-Larsson *et al.*, 1996 ; Chu *et al.*, 2017). Bien que cette méthode antifouling soit la plus populaire pour contrôler l'encrassement biologique, des études ont montré que le PEG est facilement soumis à une dégradation oxydante et à un clivage enzymatique dans la plupart des environnements biochimiques. Cette stabilité à court terme du PEG limite donc sa capacité de résistance aux protéines sur des périodes prolongées (Chen

*et al.*, 2010. Chen & Cao, 2009 ; Dalsin & Messersmith, 2005 ; Nguyen *et al.*, 2011). D'autre part, d'un point de vue pratique, il reste difficile de greffer le PEG à divers substrats chimiquement différents et il faut souvent recourir à une chimie de surface complexe, qui peut devenir très coûteuse lors de la mise à l'échelle industrielle (Greene *et al.*, 2015 ; Lin *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2019). Il est notamment difficile de maîtriser le taux de greffage étant donné que peu de méthodes de caractérisation sont disponibles actuellement. Enfin, les revêtements à base de PEG présentent une résistance aux protéines affaiblie à des températures élevées (>35°C), qui sont des températures usuelles pour de nombreuses applications biomédicales (Lee *et al.*, 1989 ; Li *et al.*, 2012 ; Freij-Larsson *et al.*, 1996). C'est pourquoi de nombreuses équipes se sont lancées dans la recherche d'alternatives notamment *via* l'utilisation de polyoxazolines (Divandari *et al.*, 2017 ; Morgese *et al.*, 2016), de polyvinylpyrrolidone (PVP) (Wang *et al.*, 2019) ou encore de polymères zwitterioniques (Zhang *et al.*, 2006 ; Knowles *et al.*, 2017 ; Nguyen *et al.*, 2011).

#### b) Les polymères en brosse cyclique

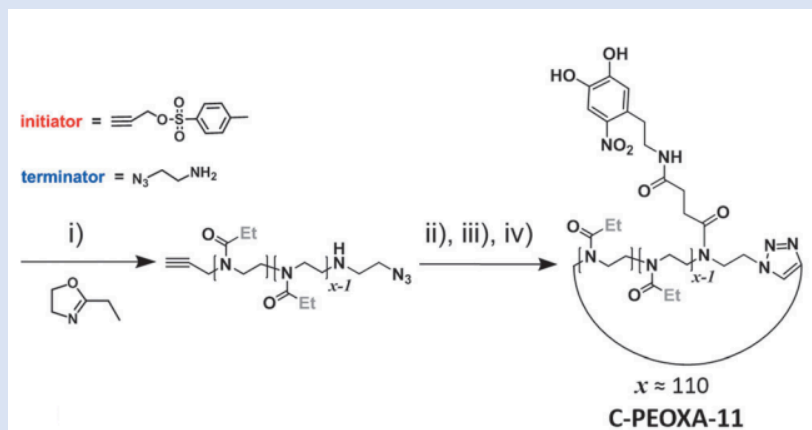
En règle générale les polymères avec des architectures contraignantes telles que les boucles et les cycles peuvent générer des brosses plus denses et ainsi présenter de meilleures propriétés de résistance aux protéines par rapport à leurs analogues linéaires (Wang *et al.*, 2019b). Cela a été confirmé par Divandari *et al.* lorsqu'ils ont étudié des brosses polymères à base de poly(2-alkyl-2-oxazoline) (PMOXA) ou de poly(2-éthyl-2-oxazoline) (PEOXA) et ce, sous les deux formes, linéaire et cyclique (Divandari *et al.*, 2018) (**Figure 15**). Plusieurs raisons expliquent la différence d'efficacité : le rayon hydrodynamique plus petit des brosses cycliques permet une fabrication de brosses hautement étirées et compactes et l'absence d'extrémités de chaînes pendantes supprime le risque d'intercalation lorsque deux surfaces fonctionnalisées par des brosses sont cisailées l'une contre l'autre (Divandari *et al.*, 2018 ; Morgese *et al.*, 2016 ; Morgese *et al.*, 2018).





**Figure 15.** Adsorption des protéines sur des brosses polymères à base de a) poly(2-alkyl-2-oxazoline) (PMOXA) ou b) poly(2-éthyl-2-oxazoline) (PEOXA), sous les deux formes, linéaire et cyclique. (c) Représentation schématique de protéines s'approchant d'une interface composée de brosses cycliques. D'après Divandari *et al.*, 2018.

Malgré ces caractéristiques uniques, l'obtention de ces polymères en brosses cycliques en grande quantité reste très coûteuse et complexe limitant leur application à grande échelle (Figure 16).



**Figure 16.** Synthèse du PEOXA cyclique. D'après Morgese *et al.* 2016.

#### 4. Les revêtements anti-encrassements

Alors que l'effet recherché chez les revêtements antiadhésifs est d'empêcher complètement la fixation des organismes, une faible adhésion est toujours tolérée en ce qui concerne les revêtements anti-encrassement (aussi appelé fouling-release) (Yang *et al.*, 2014b). En effet, l'effet recherché pour ce type de revêtement est de minimiser les interactions avec la surface de façon à éliminer la salissure par cisaillement hydrodynamique ou par une simple étape de nettoyage mécanique. Classiquement, cette approche repose sur l'utilisation de surfaces hydrophobes mais des technologies plus avancées sont basées sur des revêtements amphiphiles ou encore des composites.

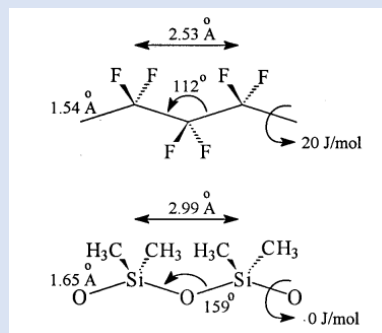
Les revêtements antisalissures hydrophobes efficaces sont généralement basés sur des matériaux qui ont une faible énergie de surface, un faible module et qui forment une surface lisse (**Tableau 02**). Les polymères fluorés et les élastomères de silicone répondent très bien à ces exigences et leurs propriétés antifouling ont beaucoup été étudiées.

**Tableau 02.** Propriétés physiques des polymères fluorés et des élastomères de silicone.

Polymère	Energie de surface (mN/m)	Module élastique (GPa)
Poly(hexafluoropropylène)	16,2	0,5
Poly(tetrafluoroéthylène)	18,6	0,5
Poly(diméthylsiloxane)	21,2	0,002

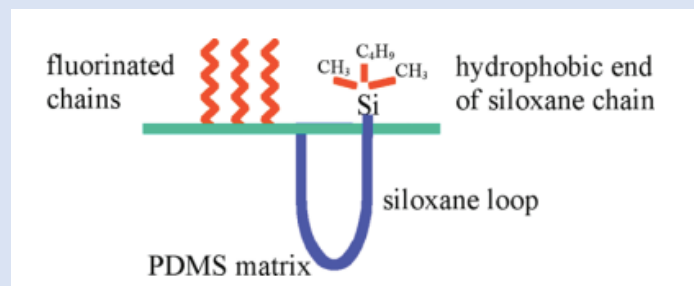
a) Les fluoropolymères

Les fluoropolymères forment des surfaces non poreuses et lisses avec une tension de surface faible (16,2 mN/m pour le poly(hexafluoropropylène)) et de bonnes performances anti-adhésives. En effet, cette faible tension de surface permet de perturber la fixation des salissures et de les éliminer par application d'une contrainte de cisaillement. Malgré ces qualités, ce sont des matériaux durs et vitreux dont la température de transition vitreuse (environ 120°C) dépasse la température ambiante. Appliqués en couche mince (75 µm) et ayant un module plus élevé que le silicone, les fluoropolymères nécessitent d'appliquer des forces de cisaillement élevées afin de libérer les organismes responsables de l'encrassement biologique. Les propriétés mécaniques de ces matériaux s'expliquent par la présence d'atomes de fluor qui forment une structure moléculaire rigide (Brady, 1999). A l'inverse, les chaînes silicones sont très flexibles ce qui leur confèrent un caractère élastomère (**Figure 17**).



**Figure 17.** Dimensions moléculaires d'un polymère fluorocarboné (en haut) et du poly(diméthylsiloxane) (en bas).

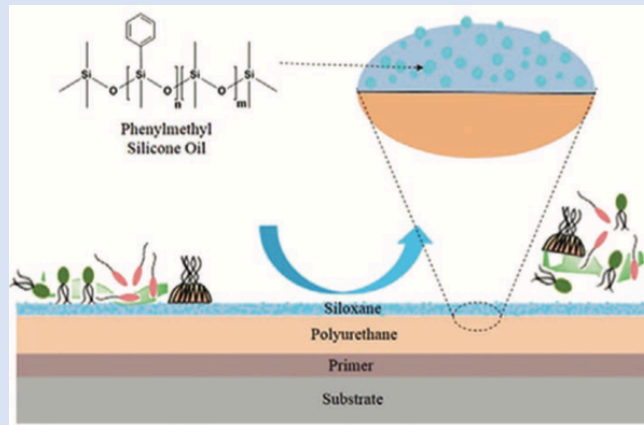
Pour tenter de modifier ces revêtements, des composés fluorés peuvent être mélangés aux revêtements à base de silicone. Grâce à sa tension superficielle inférieure à celle du silicone (21,2 mN/m), la fraction fluorée va migrer à la surface et réduire la tension superficielle du revêtement lui conférant alors une grande stabilité chimique en milieu aqueux (**Figure 18**) (Mielczarski *et al.*, 2010 ; Berglin *et al.*, 2003).



**Figure 18.** Représentation schématique d'un copolymère fluoré/siloxane en surface dans une matrice PDMS. D'après Mielczarski *et al.*, 2010.

#### b) Les silicones

Les très faibles énergies de rotation de Si-O (< 0,8 kJ/m) et de Si-CH<sub>3</sub> (6,7 kJ/m) du PDMS lui confère une grande mobilité structurelle en comparaison des fluoropolymères (**Figure 17**). Sa faible température de transition vitreuse (environ -120°C) (Pestunovich *et al.*, 1978) et sa faible énergie de surface (environ 20 mN/m) lui confèrent des caractéristiques supérieures en matière d'encrassement et d'hydrophobie (Yilgor *et al.*, 1988). Les revêtements élastomères PDMS présentent toutefois une faible stabilité mécanique ainsi qu'une faible adhérence aux substrats. Pour résoudre ce problème, des recherches ont été menées sur des revêtements hybrides siloxane-polyuréthane (PDMS/PU) qui contenaient jusqu'à 30% de PU. Le PU offrait ainsi une meilleure résistance et une meilleure adhérence au substrat tandis qu'une couche de PDMS se formait spontanément en surface due à l'autostratification, conférant des performances de libération des salissures comparables aux systèmes commerciaux existants (Majumdar & Webster, 2005 ; Sommer *et al.*, 2011). D'autres stratégies ont été développées afin d'améliorer les propriétés antifouling via l'incorporation d'huiles de silicone (1% seulement pour une forte efficacité) (**Figure 19**). Cette lubrification de la surface réduit l'adhésion et améliore la libération de macrofouleurs tels que les macroalgues, les balanes et les moules (Galhenage *et al.*, 2016).



**Figure 19.** Représentation schématique du revêtement PDMS/PU avec incorporation d'huile de silicone. D'après Galhenage *et al.*, 2016.

## 5. Les stratégies combinées

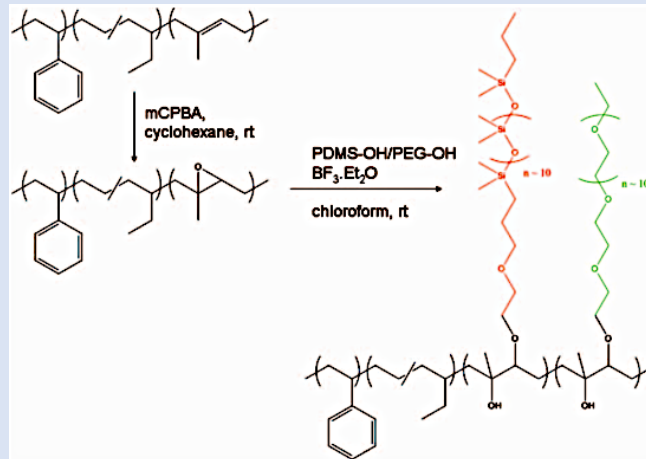
Les revêtements antiadhésifs, anti-encrassement ou encore dégradant la salissure sont des stratégies importantes pour repousser, libérer ou tuer les organismes encrassants. Bien que ces revêtements soient efficaces, l'encrassement biologique reste inévitable à long terme. De nouvelles stratégies ont alors développé des revêtements synergiques, c'est-à-dire présentant une combinaison des stratégies présentées ci-dessus afin de garantir une efficacité des revêtements à long terme (Shivapooja *et al.*, 2015).

### a) Les revêtements synergiques

#### (i) Les revêtements résistants et libérant la salissure

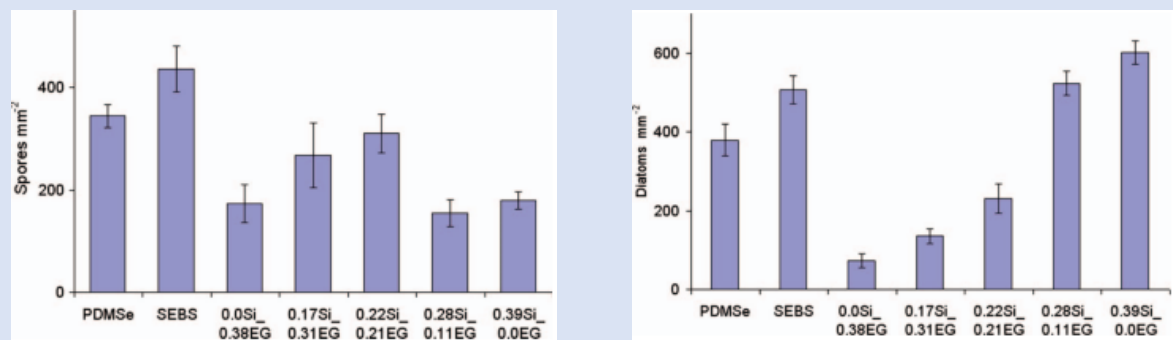
Malgré l'absence d'interactions polaires, certains organismes comme les diatomées parviennent à adhérer fortement aux surfaces hydrophobes et sont difficilement éliminables, même sous l'action de forces de cisaillement (Sundaram *et al.*, 2011 ; Holberg *et al.*, 2020). Pour pallier ce problème, de nouvelles surfaces ont été développées : les surfaces amphiphiles. L'inclusion de fractions hydrophiles dans un revêtement hydrophobe déstabilise ainsi la fixation des organismes établissant des interactions avec les surfaces purement hydrophobes. Ces surfaces amphiphiles permettent de réduire l'adhésion initiale et d'améliorer les propriétés d'élimination des salissures. Sur ce modèle, de nombreux revêtements ont été développés en combinant des fluoropolymères avec du PEG (Gudipati *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2011) ou bien même en générant des revêtements hybrides à base de fluoropolymère, de siloxane et de PEG (Martinelli *et al.*, 2016). Plus récemment, Galhenage *et al.* ont développé des revêtements

amphiphiles PDMS/PU modifiés par du PEG en faisant réagir un prépolymère PU avec du PEG et du PDMS fonctionnalisé en bout de chaîne. Avec seulement 10% de PEG/PDMS incorporé, ces revêtements ont montré d'excellentes propriétés d'élimination des salissures et ce contre un large spectre d'organismes (Galhenage *et al.*, 2017).



**Figure 20.** Fixation des chaînes latérales PDMS-OH et/ou PEG-OH pour former des copolymères à blocs amphiphiles mixtes. D'après Sundaram *et al.*, 2011.

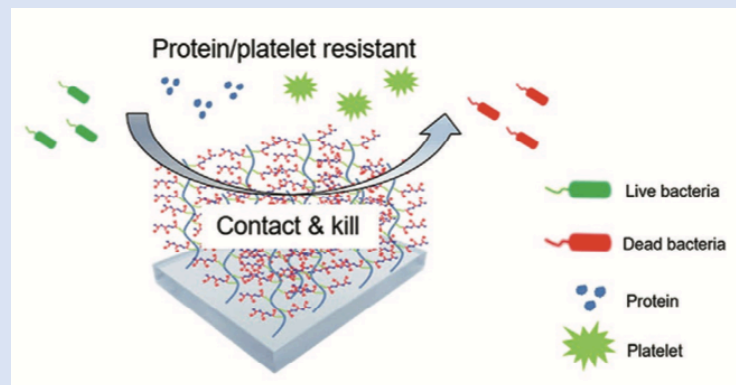
D'autres combinaisons ont également été testées, notamment *via* la formation de copolymères séquencés. Ainsi des systèmes non toxiques sans fluor à base de PDMS et de PEG ont été formulés (Figure 20) et ont démontré une meilleure performance antisalissure que les revêtements conventionnels à base de résine de silicone pure (Figure 21) (Sundaram *et al.*, 2011). Malgré ces très bonnes performances, il est difficile de faire passer ces matériaux du stade de laboratoire à celui de produits commercialisés compte tenu des étapes de préparation de ces copolymères séquencés.



**Figure 21.** Adhésion des spores d'*Ulva* à gauche et de la diatomée *Navicula*, à droite sur différents revêtements. PDMS<sub>e</sub> étant un PDMS commercial (Silastic1 T2), SEBS (Polystyrène-poly(éthylène-ran-butylène)-polystyrène) étant la couche d'accroche seule, et ensuite les cinq revêtements PDMS-PEG synthétisés en fonction du ratio de PEG greffés (0 ; 0,11 ; 0,21 ; 0,31 ; 0,38). D'après Sundaram *et al.*, 2011.

(ii) Les revêtements résistants à la salissure et dégradant la salissure

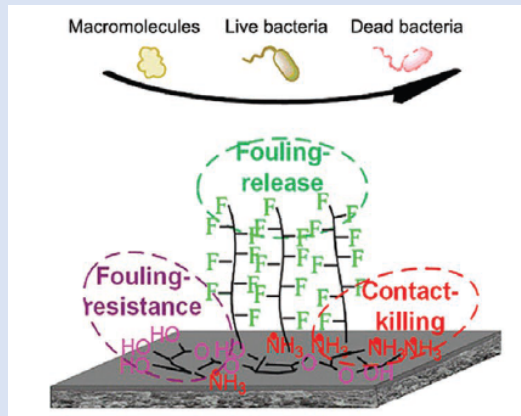
Un autre revêtement synergique implique la combinaison de propriétés de résistance et de dégradation de la salissure. Une telle stratégie permet à une surface de tuer les bactéries puis de libérer les débris *via* l'action de groupements résistants à l'encrassement, permettant ainsi de maintenir une activité antisalissure à long terme (Wang *et al.*, 2017). Sur ce modèle, Gao *et al.* ont développé des revêtements contenant des polypeptides antimicrobiens cationiques (AMP) et des segments de PEG greffés à une surface méthacrylate (**Figure 22**). Les unités AMP ont assuré l'activité biocide en interagissant avec les membranes cellulaires des bactéries tandis que les chaînes PEG ont réduit l'adhésion des protéines et empêcher les débris bactériens de se fixer à la surface (Gao *et al.*, 2017).



**Figure 22.** Représentation schématique du copolymère greffé PEG-b-AMP dégradant et libérant les salissures. D'après Gao *et al.*, 2017.

(iii) Les revêtements antiadhésifs, anti-encrassement et dégradant la salissure

Une équipe de recherche est même parvenue à doter des membranes ayant des caractéristiques anti-adhérentes, auto-nettoyantes et antimicrobiennes. Ils ont modifié les surfaces de membranes en polysulfone en les greffant avec des brosses de fluoropolymère à faible énergie de surface (libération de la salissure) combinés avec des segments de tobramycine (TOB) hydrophiles et bactéricides (résistance et dégradation de la salissure) (**Figure 23**). Cette triple stratégie a présenté les meilleures propriétés antisalissures et a nettement surpassé les membranes vierges ou modifiées qui ne présentaient qu'une ou deux stratégies antisalissure (Wang *et al.*, 2018).



**Figure 23.** Représentation schématique du mélange des trois stratégies avec l'utilisation de brosses TOB-fluoropolymères. D'après Wang *et al.*, 2018.

## b) Les revêtements sensibles aux stimuli

Les revêtements sensibles aux stimuli peuvent modifier leurs propriétés interfaciales rapidement et de manière réversible en fonction de changements dans l'environnement tels que la température ou le pH (Burkert *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 2013). Cette réactivité au stimuli associée à des propriétés antisalissures pourrait s'avérer être une stratégie précieuse pour la régénération de surface. De cette façon, un simple déclencheur (pH, température, sel) permettrait d'éliminer les salissures et de récupérer les propriétés antisalissures de la surface du revêtement.

### (i) Les revêtements thermosensibles

Les revêtements qui font appel à un polymère thermosensible poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) sont capables de combiner des caractéristiques de résistance et de dégradation de la salissure. En effet, le PNIPAAm subit une transition de phase brusque et réversible de l'état soluble, gonflé, hydraté et répulsif à un état insoluble, déshydraté et adhésif au-dessus de sa température critique (Lower Critical Solution Temperature, 32°C) (Burkert *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2017 ; Huber *et al.*, 2003 ; Zheng *et al.*, 2016). Ainsi Yu *et al.* ont tiré parti de cette thermosensibilité pour développer un matériau multifonctionnel capable d'attacher, de tuer et de libérer les bactéries de manière contrôlable. Pour cela, ils ont incorporé un sel d'ammonium quaternaire biocide (QAS) au PNIPAAm (Figure 24). Au-dessus de la LCST, les chaînes polymères facilitent la fixation des bactéries et exposent les fragments

de QAS ce qui permet de tuer les bactéries fixées. En réduisant la température ( $< LCST$ ), l'hydratation et le gonflement des chaînes favorisent la libération des débris de bactéries (67%) (Yu *et al.*, 2013). Bien que cette étude ait montré la possibilité de faire passer le revêtement PNIPAAm d'un revêtement bactéricide à un revêtement antiadhésif en diminuant la température, cela est contraire aux exigences des dispositifs médicaux. Ceux-ci doivent, en effet être bactéricide à température ambiante (20°C) mais bio répulsifs dans des conditions physiologiques (37°C). Ainsi, Wang *et al.* ont développé un revêtement constitué d'une couche supérieure thermosensible en poly(N-isopropylacrylamide-co-2-carboxyéthylacrylate) P(NIPAAm-co-CEA) greffée sur une couche inférieure en poly(méthacrylate de sulfobetaine) (PSBMA). De plus, des groupements glycopeptidiques de vancomycine (Van) ont été attachés de manière covalente aux brosses de P(NIPAAm-co-CEA) (Figure 24). Ainsi, à température ambiante ( $<LCST$ ), la couche supérieure est hydratée facilitant la destruction par contact des bacilles par la vancomycine (88,6%). A température physiologique ( $>LCST$ ), la couche supérieure déshydratée entraîne l'enfouissement des groupements glycopeptidiques de Van et la rupture des liaisons hydrogène entre la vancomycine et les bactéries. Les brosses hydrophiles PSBMA de la couche inférieure sont alors exposées et facilitent le détachement des débris bactériens (Wang *et al.*, 2017).

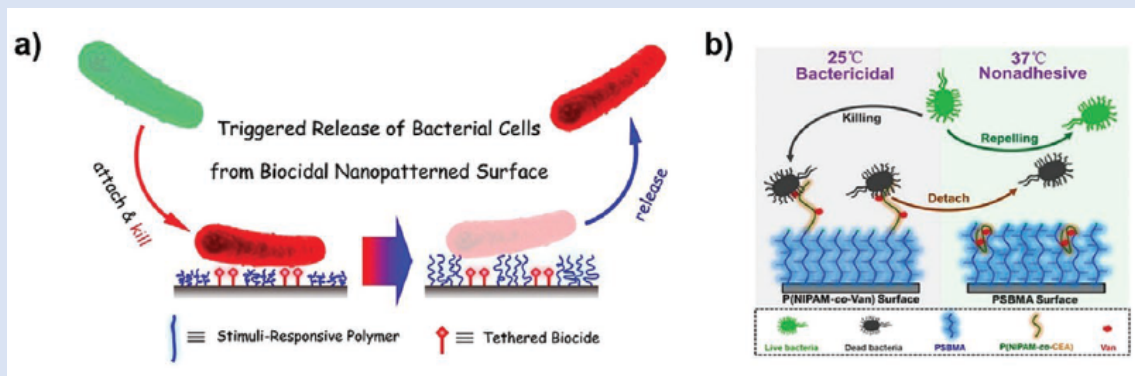


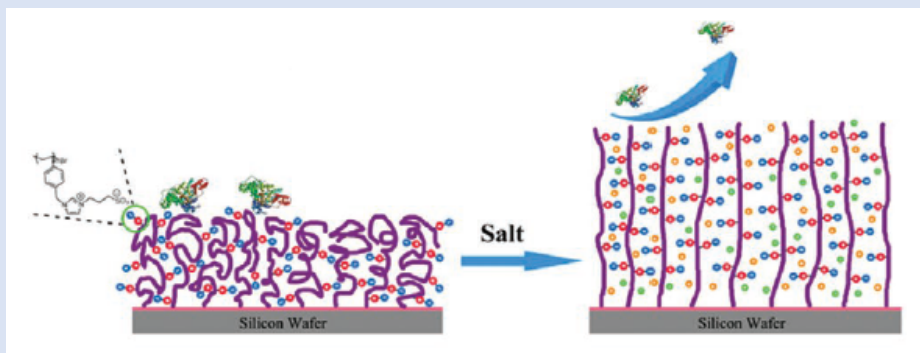
Figure 24. Représentation schématique de a) un PNIPAAm-QAS thermosensible et de b) un PNIPAAm-Van. D'après Yu *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2017.

(ii) Les revêtements sensibles à la salinité

Une autre approche antisalissure a été développée par Yang *et al.* en greffant une brosse zwitterionique de poly(3-(1-(4-vinylbenzyl)-1H-imidazol-3-ium-3-yl) propane-1-sulfonate)



(polyVBIPS) sur une surface en or. À de faibles concentrations ioniques, les brosses de polyVBIPS ont adopté une conformation de chaîne effondrée, favorable à la bioadhésion (l'adsorption des protéines ayant atteint  $900 \text{ ng.cm}^{-2}$ ). Une fois les forces ioniques plus élevées (1M NaCl), les chaînes s'étendent et l'effet antiadhésif est obtenu. L'adsorption des protéines a été réduite à  $100 \text{ ng.cm}^{-2}$  et a même été inférieure à  $0,3 \text{ ng.cm}^{-2}$  après lavage. Cette introduction de sel a donc bien conduit à la désorption des protéines par les brosses en polyVBIPS (Yang *et al.*, 2015 ; Zheng *et al.*, 2016) (Figure 25).



**Figure 25.** Représentation schématique du fonctionnement des brosses à base de polyVBIPS. D'après Zheng *et al.*, 2016.

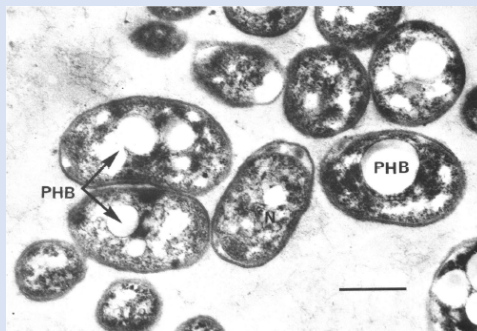
En raison de toutes les exigences attendues, il est très difficile de mettre au point un protocole rentable, facile à appliquer et polyvalent pour la fabrication de revêtements antisalissures efficaces et durables. Aucune stratégie n'a encore été identifiée comme stratégie de revêtement universelle et cela semble être un objectif inatteignable. La combinaison de plusieurs stratégies antisalissures est une approche intéressante. Ainsi, la combinaison de moyens chimiques (par exemple, des groupements antisalissures) et physiques (par exemple, la microtopographie) est très prometteuse comme l'ont montré les nombreux exemples existant dans la nature. Outre la chimie et la structure de surface, de nouvelles techniques de modification de surface doivent être mises au point pour que ces revêtements puissent être utilisés avec succès dans des applications commerciales à grande échelle. Dans l'ensemble, un revêtement antisalissure efficace doit remplir de nombreuses conditions : il doit être durable, fiable, facile à appliquer, stable, rentable, écologique et indépendant du substrat. Les nombreuses recherches menées, dont ce projet de thèse, permettent de se rapprocher, petit à petit, de cet objectif de revêtement antifouling idéal.

Dans cette étude, un intérêt particulier a été porté aux systèmes combinés et notamment aux revêtements amphiphiles. Comme décrit précédemment, ces systèmes, bien qu'efficaces, sont très souvent composés d'une matrice hydrophobe pétrosourcée dont la dégradation génère une pollution dans l'environnement, ils ne répondent donc pas aux préoccupations écologiques actuelles. L'objectif de ce projet de thèse a été de substituer cette matrice par un biopolymère. Le choix s'est porté sur une famille de polyesters bactériens : les poly-(3-hydroxyalcanoates). La suite de ce chapitre se concentrera sur la présentation de cette famille de polymères, allant de leur synthèse à leurs diverses propriétés.

## Partie 2 – Les poly(3-hydroxyalcanoates)

### V. Présentation générale des PHA

Au début du siècle dernier, Maurice Lemoigne fut le premier à mettre en évidence, qu'en absence d'oxygène, la bactérie à GRAM positif, *Bacillus megaterium*, semblait accumuler une substance particulière sous forme d'inclusions intracellulaires (Lemoigne, 1926 ; Lemoigne, 1927). Il fallut attendre 40 ans pour que des travaux de recherches, (Lundgren *et al.* 1964, 1965 ; Wang & Lundgren, 1969) affirment que certaines souches étaient bien capables de synthétiser un polymère naturel intracellulaire qui fut identifié comme étant du poly-(3-hydroxybutyrate) ou P(3HB) (**Figure 01**). Ce polyester semi cristallin constitue le premier membre de la famille des poly(hydroxyalcanoates) ou PHA (Dawes and Senior, 1973 ; Braunegg *et al.*, 1978).



**Figure 01.** Image de microscopie électronique de *Ferrobacillus ferrooxidans* en condition d'accumulation intracellulaire de P(3HB). Barre d'échelle = 500 nm. D'après Wang et Lundgren (1969).

Plus tard, de nouveaux PHA ont été identifiés tels que les copolymères contenant des unités 3-hydroxyvalérate (3HV) (Wallen, 1974), 3-hydroxyoctanoate (3HO) (De Smet *et al.*, 1983) ou encore 3-hydroxyhexanoate (3-HHX) (Lageveen *et al.*, 1988). L'identification de ces nouvelles unités a eu un impact majeur sur la recherche et l'intérêt commercial porté à ces polymères de réserve bactériens. Les années 80 ont ainsi été tournées vers le développement du clonage et de la caractérisation des gènes impliqués dans le processus de biosynthèse des PHA, le but étant de faire produire des PHA par des organismes génétiquement modifiés de façon à augmenter la productivité, à comprendre les mécanismes de biosynthèse et à obtenir des structures variées.

## VI. Structure et diversité des PHA

Les PHA sont synthétisés par des microorganismes à partir de diverses sources de carbone dont les sucres (fructose, maltose, lactose, xylose, arabinose, etc.), les *n*-alcanes (hexane, octane, dodécane, etc.), les acides *n*-alcanoïques (acide acétique, acide propionique, acide butyrique, acide valérique, acide laurique, acide oléique, etc.), les *n*-alcools (méthanol, éthanol, octanol, glycérol, etc.) ou encore les gaz (méthane et dioxyde de carbone) (Anderson, 1990 ; Verlinden, 2007). Outre les sources carbonées listées précédemment, on peut également citer les déchets et résidus issus d'activités industrielles qui constituent des ressources de carbone renouvelables à bas coût qui peuvent être utilisées pour la production de PHA (huile de cuisson usagée, flux de déchets provenant de la production de biocarburants, surplus de lactosérum issu de l'industrie laitière, etc.) (Koller *et al.*, 2010 ; Chen, 2010) Le **Tableau 01** présente une liste non-exhaustive de microorganismes producteurs de PHA déposés en collection, ainsi que la source carbonée utilisée et le type de PHA produit.

**Tableau 01.** Liste non-exhaustive de souches microbiennes productrices de PHA disponibles dans les collections de cultures. *D'après Tan et al., 2014.*

Microorganismes	Numéro de collection <sup>a</sup>	Source de carbone	Type de PHA	Référence
<b>Bactéries Gram négatives</b>				
<i>Cupriavidus necator</i> H16	ATTC 17699 DSM 428 KCTC 22496 NCIB 10442	Fructose, glucose, acide 4-hydroxyhexanoïque Huile de maïs, acide oléique, huile d'olive, huile de palme CO <sub>2</sub>	P3HB	Gomez <i>et al.</i> , 1996 Valentin <i>et al.</i> , 1994 Fukui <i>et al.</i> , 1998 Sonnleitner <i>et al.</i> , 1979
		Acide acétique, acide butyrique, acide lactique, acide propionique	P3HB3HV	Chakraborty <i>et al.</i> , 2009
<i>Cupriavidus necator</i>	DSM 518	Acide 4-hydroxyhexanoïque	P3HB	Valentin <i>et al.</i> , 1994
<i>Cupriavidus necator</i>	ATTC 17697 DSM 531	Acide 4-hydroxyhexanoïque, CO <sub>2</sub>	P3HB	Valentin <i>et al.</i> , 1994 Ishizaki <i>et al.</i> , 1991
<i>Cupriavidus necator</i>	CECT 4623 KCTC 2649 NCIMB 11599	Glucose Fécule de pomme de terre	P3HB	Kim <i>et al.</i> , 1994 Haas <i>et al.</i> , 2008
<i>Cupriavidus necator</i>	DSM 545	Mélasse Déchets de glycérol	P3HB	Haas <i>et al.</i> , 2008 Cavalheiro <i>et al.</i> , 2009
		Glucose, acide propionique	P3HB3HV	Du <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	ATTC 47085	Huile et cire issues de la pyrolyse du polyéthylène (PE)	PHAmcl	Guzik <i>et al.</i> , 2014
<b>Bactéries Gram positives</b>				
<i>Bacillus megaterium</i>	DSM 90	Acide citrique, glucose, acide succinique	P3HB	Pantazaki <i>et al.</i> , 2009
<i>Bacillus megaterium</i>	CCM 1464 DSM 509 IFO 12109 NBRC 12109	Acide citrique, glucose, glycérol, acide succinique, acide octanoïque	P3HB PHAscl PHAmcl	Shahid <i>et al.</i> , 2013
<b>Archaea</b>				
<i>Haloferax mediterranei</i>	ATTC 33500 CCM 3361 DSM 1411	Protéines hydrolysées, glycérol provenant de la production de biocarburants	P3HB3HV	Koller <i>et al.</i> , 2008 Hermann-Krauss <i>et al.</i> , 2013

<sup>a</sup> ATCC: American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) ; CGM: Collection tchèque de micro-organismes (Université Masaryk, Brno, République Tchèque) ; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Burjassot, Espagne) ; DSM: German Collection of DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Allemagne) ; IFO: Institute for Fermentation, Osaka (Yodogawa-ku, Osaka, Japan (collection transférée au NBRC)) ; KCTC: Centre coréen de culture de micro-organismes (Département d'ingénierie alimentaire, Yonsei Univ., Japon) ; NBRC: NITE Biological Resource Center (Département de biotechnologie, Institut national de technologie et d'évaluation, Kisarazu, Chiba, Japon) ; NGB: National Collection of Industrial Bacteria (Torry Research Station, NCIB, National Collection of Industrial Bacteria (Torry Research Station, Aberdeen, Scotland, UK (incorporated with NCIMB)) ; NCIMB: National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria (Aberdeen, Scotland, UK).

Les conditions requises pour l'accumulation de PHA diffèrent selon les bactéries. Alors que certaines accumulent les PHA en condition limitante de nutriments et en présence d'un excès de source carbonée (*Cupriavidus necator*, *Protomonas extorquens*) (Ojumu *et al.*, 2004 ; Lee 1996 ; Dawes & Senior 1973), d'autres accumulent les PHA durant leur phase de croissance sans exiger de limitation en nutriments essentiels (*Escherichia coli* recombinant, *Alcaligenes latus*) (Muhammadi & Hameed, 2015 ; Keeshavarz & Roy, 2010). Les PHA sont stockés sous forme de granules intracellulaires, dont le nombre et la taille dépendent des conditions de culture (Volova *et al.*, 2013) et de la souche bactérienne. Une étude a montré que ces granules de PHA peuvent représenter jusqu'à 90% du poids cellulaire sec (Obruca *et al.*, 2014). Les granules de PHA ont longtemps été considérés comme des polyesters amorphes dont l'unique rôle était d'assurer la survie bactérienne en fournissant les besoins énergétiques cellulaires essentiels. Bien que ce rôle soit considéré comme primaire, les granules de PHA fournissent aux cellules bactériennes des avantages secondaires très importants tels qu'une meilleure résistance et une augmentation de leur taux de survie lorsqu'elles sont exposées à diverses conditions de stress environnemental (Obruca *et al.*, 2020). Parmi les différents rôles décrits on peut citer la limitation de l'altération des composants cellulaires, l'amélioration de la résistance à la dessiccation, aux chocs thermiques et osmotiques ou aux irradiations UV (Tableau 02). En somme, bien des fonctions physiologiques peuvent être attribuées aux PHA et les découvertes n'en sont qu'à leur début. Il est ainsi apparu trop limitant de n'attribuer aux granules de PHA qu'un simple rôle de stockage, et c'est la raison pour laquelle les granules de PHA sont aussi qualifiés de « carbonosomes » illustrant le caractère multifonctionnel de ces structures intracellulaires (Jendrossek & Pfeiffer, 2014 ; Jendrossek *et al.*, 2009) (Figure 02).

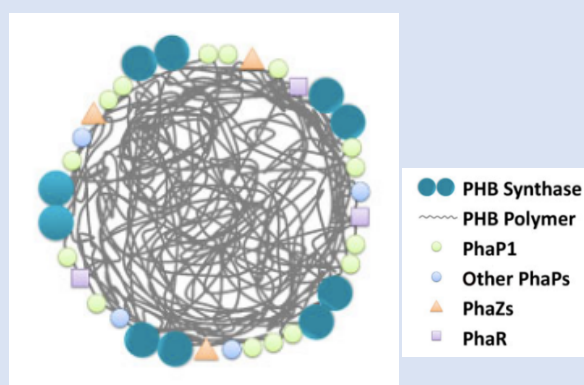
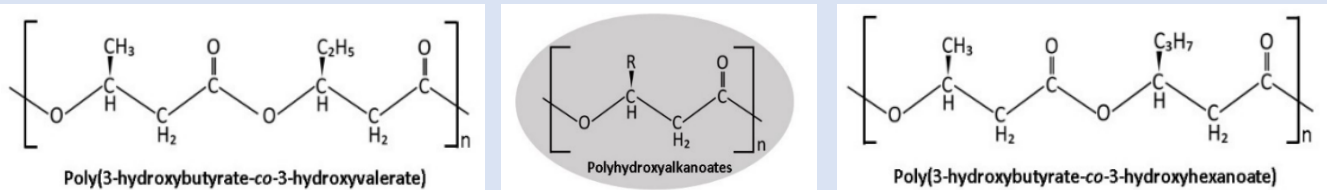


Figure 02. Modèle de formation des granules de PHB. D'après Jendrossek and Pfeiffer, 2014.

**Tableau 02.** Liste des facteurs de stress et des microorganismes dans lesquels des fonctions protectrices en lien avec la présence de granules de PHA ont été décrites. *D'après Obruca et al., 2020.*

Facteur de stress	Microorganismes	Référence
Basse température et congélation	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Pseudomonas extremaustralis</i> <i>Sphingopyxis chilensis</i>	Zhao <i>et al.</i> 2007 Tribelli & Lopez 2011 Pavez <i>et al.</i> 2009 ; Obruca <i>et al.</i> 2016 ; Nowroth <i>et al.</i> 2016
Choc thermique	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Azospirillum brasilense</i>	Zhao <i>et al.</i> 2007 Kadouri <i>et al.</i> 2003
Choc osmotique	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Azospirillum brasilense</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Cupriavidus necator</i>	Zhao <i>et al.</i> 2007 Kadouri <i>et al.</i> 2003 Wang <i>et al.</i> 2009 Obruca <i>et al.</i> 2017
Pression oxydative	<i>Halomonas halophila</i> <i>Rhizobium spp.</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Azospirillum brasilense</i>	Sedlacek <i>et al.</i> 2019 Breedveld <i>et al.</i> 1993 Zhao <i>et al.</i> 2007 Kadouri <i>et al.</i> 2003
Irradiation UV	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> <i>Herbaspirillum seropedicae</i> <i>Delftia hydrophila</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Azospirillum brasilense</i>	Ayub <i>et al.</i> 2009 Batista <i>et al.</i> 2018 Goh <i>et al.</i> 2014 Zhao <i>et al.</i> 2007 Kadouri <i>et al.</i> 2003
Métaux lourds	<i>Cupriavidus necator</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas extremaustralis</i> <i>Cupriavidus taiwanensis</i> <i>Azospirillum brasilense</i>	Obruca <i>et al.</i> 2017 Wang <i>et al.</i> 2009 Tribelli <i>et al.</i> 2019 Chien <i>et al.</i> 2014 Kamnev <i>et al.</i> 2005

Avec plus de 150 monomères décrits à ce jour dans la littérature, les PHA peuvent présenter des structures très diversifiées (Torregrosa-Crespo & Martinez-Espinosa, 2016) dont certaines sont illustrées dans la **Figure 03**. Leur masse molaire peut varier de  $5 \cdot 10^5$  à  $3 \cdot 10^6$  Da, avec un indice de polydispersité de l'ordre de 1,6 à 2,2 (Sudesh *et al.*, 2000 ; Mohammadi *et al.*, 2015 ; Chen, 2010). Les PHA sont des polymères constitués d'unités monomériques d'acides gras hydroxylés reliées entre elles par une liaison ester. Chaque monomère possède une chaîne latérale R dont le nombre d'atomes de carbone varie selon la souche et/ou la nature des sources carbonées fournies (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016 ; Williams & Patricia, 2018) et porte un groupement hydroxyle OH, situé le plus souvent, sur le C3, d'où le nom de poly 3-hydroxyalcanoates.



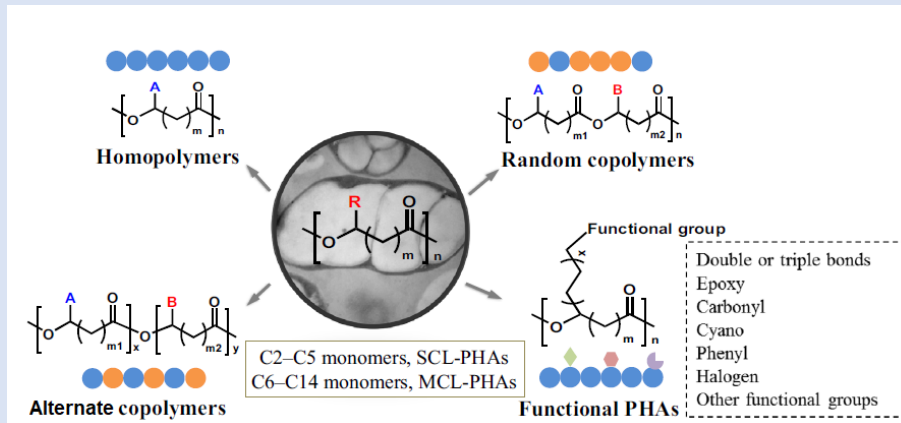
**Figure 03.** Structure générale des poly(3-hydroxyalcanoates) (PHA), du poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBHV) et du poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx).

Structurellement, trois types de PHA peuvent être différenciés en fonction du nombre d'atomes de carbone présents au sein de la chaîne latérale de chaque monomère constitutif. On peut, tout d'abord, citer les PHA<sub>scl</sub> (short chain length, à courtes chaînes) qui possèdent de 1 à 2 atomes de carbone sur leur chaîne latérale. Parmi les plus connus, on peut citer le poly (3-hydroxyvalérate) (PHV) et le poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) (**Tableau 03**). On retrouve ensuite les PHA<sub>mcl</sub> (medium chain length, à moyennes chaînes) qui possèdent de 3 à 12 atomes de carbone sur leur chaîne latérale et enfin les PHA<sub>lcl</sub> (long chain length, à longues chaînes) avec au minimum 12 atomes de carbone.

**Tableau 03.** Nomenclature des PHA<sub>scl</sub> et PHA<sub>mcl</sub>.

Chaîne latérale			PHA
PHA <sub>scl</sub>	Méthyle	CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxybutyrate
	Éthyle	CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxyvalérate
PHA <sub>mcl</sub>	Propyle	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxhexanoate
	Butyle	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxyheptanoate
	Pentyle	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxyoctanoate
	Héxyle	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxynonanoate
	Heptyle	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxydécanoate
	Octyle	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxyundécanoate
	Nonyle	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxydodécanoate
	Décyle	(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxytridécanoate
	Undécyle	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxytetradécanoate
	Dodécyle	(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxypentadécanoate
	Tridécyle	(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly-3-Hydroxyhexadécanoate

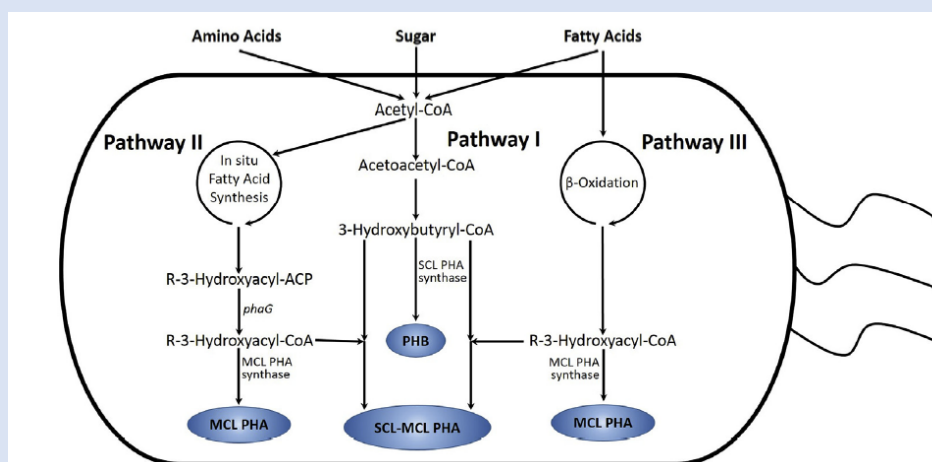
Les PHA peuvent être synthétisés en homopolymères ou en copolymères, aléatoires ou à blocs. Ils peuvent porter des groupements fonctionnels comme des doubles ou triples liaisons ou encore des groupes époxy, carbonyle, cyano ou phényle, sur leur chaîne latérale R (Zheng *et al.*, 2020 ; Ke *et al.*, 2017) (**Figure 04**). Ces combinaisons offrent une grande diversité de structures, de fonctions et de propriétés et permettent d'envisager des réactions de modifications par voie chimique (Sudesh *et al.*, 2000 ; Bugnicourt, 2014).



**Figure 04.** Diversité de structures des PolyHydroxyalcanoates (PHA) comprenant la diversité des monomères, les homopolymères, les copolymères aléatoires et séquencés ainsi que les polymères fonctionnels et leurs diverses combinaisons. *D'après Tan et al., 2021*

## VII. Biosynthèse des PHA

Les voies de biosynthèse des PHA sont intimement liées aux voies métaboliques centrales de la bactérie. Ainsi, la diversité des PHA est générée par l'ingénierie des trois voies de synthèse de base : la voie de l'acétoacétyl-CoA (voie I), la synthèse *in situ* des acides gras (voie II) et le cycle de  $\beta$ -oxydation (voie III) (Chen *et al.*, 2015) (**Figure 05**). D'autres voies métaboliques mineures ont été décrites comme pouvant être impliquées dans la biosynthèse des PHA telles que le cycle de Krebs, le catabolisme des acides aminés, le cycle de Calvin et la voie de biosynthèse de la sérine (Lu *et al.*, 2009 ; Madison & Huisman, 1999 ; Rothermich *et al.*, 2000 ; Peplinski *et al.*, 2010 ; Shimizu *et al.*, 2013 ; Yamane, 1993). Au total, quatorze voies ont été signalées comme conduisant à la formation de PHA (Meng *et al.*, 2012 et 2017).



**Figure 05.** Principales voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse de PHA. *D'après Chen et al., 2015.*



Ces voies sont aujourd’hui bien connues grâce à diverses études ayant utilisé des souches sauvages et des souches recombinantes (Chen & Hajnal, 2015 ; Eggers & Steinbüchel, 2014 ; Khanna & Srivastava, 2005). Il a ainsi été montré que la production de PHA<sub>scl</sub> ou PHA<sub>mcl</sub> dépend du type de PHA synthase (PhaC) impliqué et des substrats utilisés (Chen, 2010 ; Lu *et al.*, 2009 ; Madison & Huisman, 1999 ; Khosravi-Darani *et al.*, 2013). En effet, la spécificité de la PHA synthase est l’élément majeur déterminant la composition monomérique des PHA (Zou *et al.*, 2017). On peut citer par exemple, la PHA synthase de *Ralstonia eutropha* qui polymérise exclusivement des monomères composés de trois à cinq carbones, formant ainsi les PHA<sub>scl</sub>, alors que la PHA synthase de nombreux *Pseudomonas* spp. va, quant à elle, polymériser des monomères composés de six à quatorze carbones formant ainsi les PHA<sub>mcl</sub> (Sudesh *et al.*, 2000 ; Huisman *et al.*, 1989) (**Tableau 04**). Seules quelques bactéries ont été décrites comme étant capables de polymériser des monomères allant de quatre à quatorze carbones et de former, à l’issue, des copolymères scl-mcl (Loo *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2006).

**Tableau 04.** Enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse I, II et III.

Voies	Abréviation	Enzyme	Espèces	Références
Voie I	PhaA PhaB PhaC	$\beta$ -Ketothiolase NADPH dependent acetoacetyl-CoA reductase PHA synthase	<i>Ralstonia Eutrophia</i>	Slater <i>et al.</i> , 1988
Voie II	PhaG FadD	3-Hydroxyacyl-ACP-CoA transferase Malonyl-CoA-ACP transacylase	<i>Pseudomonas mendocina</i> <i>Recombinant Escherichia coli</i>	Klinke <i>et al.</i> , 1999 Verwoert <i>et al.</i> , 1992
Voie III	PhaJ FabG	(R)-Enoyl-CoA hydratase 3-Ketoacyl-CoA reductase Acyl-CoA oxidase, putative	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas putida</i> KT2442	Mittendorf <i>et al.</i> , 1998 Shen & Byers, 1996

L’obtention de copolymères aléatoires composés de 3-hydroxyoctanoate (3HO), 3-hydroxydécanoate (3HD) et 3-hydroxydodécanoate (3HDD) a été observée lorsqu’un acide gras est ajouté aux milieux de culture des *Pseudomonads* (Huisman *et al.*, 1989). L’explication vient du fait que la  $\beta$ -oxydation chez les *Pseudomonas* spp. raccourcit systématiquement les acides gras C12 en C10, C8 et C6 (Fiedler *et al.*, 2002), c’est-à-dire de 2 carbones à chaque tour de cycle. Toutefois, des recherches ont montré que le cycle de  $\beta$ -oxydation chez *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas entomophila* permet l’utilisation efficace d’acides gras pour la production de monomère de PHA (C3-C7) (Chung *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2011 ; Tripathi *et al.*,

2013). On peut ainsi obtenir des homopolymères, des copolymères aléatoires ou des copolymères séquencés dont la composition est ajustable (**Tableau 05**). Il est également possible d'introduire, par biosynthèse, un ou plusieurs groupements fonctionnels au sein des chaînes de PHA tels que des doubles ou triples liaisons, des époxydes, des carbonyles, des cyano, des phényles et des halogènes (Olivera *et al.*, 2010). Par ailleurs, la présence de groupements fonctionnels au sein des PHA permet de greffer, *a posteriori* et par voie chimique, d'autres molécules et ainsi de synthétiser des copolymères greffés présentant des propriétés originales (**Tableau 05**).

**Tableau 05.** Diversité des PHA.

Diversité des PHA	Structures des polymères	Références
Homopolymères	P3HB P3HP P(4HB) P(3HV) P3HHx P3HHp P3HO P3HD P3HDD P3HPhV	Chung <i>et al.</i> , 2011 Liu <i>et al.</i> , 2011 Andreessen <i>et al.</i> , 2010 Lemoigne 1926 Steinbüchel <i>et al.</i> , 1994  Kawada <i>et al.</i> , 2003 Shen <i>et al.</i> , 2014 Olivera <i>et al.</i> , 2010 Jagoda <i>et al.</i> , 2011
Copolymères aléatoires	P(3HB-co-3HV) P(3HB-co-4HB) P(3HB-co-3HHx) P(3HP-co-4HB) P(3HB-co-3HP) P(3HB-co-mcl-3HA) P(3HHx-co-3HO-3HD-3HDD)	Chen, 2009 Li <i>et al.</i> , 2010 Meng <i>et al.</i> , 2012 Yang <i>et al.</i> , 2013 Wang <i>et al.</i> , 2013 Loo <i>et al.</i> , 2005 Chen, 2006.
Copolymères à blocs	P3HB-b-P3HBV P3HB-b-4HB P3HP-b-4HB P3HB-b-3HHx P3HB-b-3HP P3HHx-b-P(3HD3HDD)	Huisman <i>et al.</i> , 1989 Jung <i>et al.</i> , 2010 Tripathi <i>et al.</i> , 2013 Pederson <i>et al.</i> , 2006 Hu <i>et al.</i> , 2011 Tripathi <i>et al.</i> , 2012 ; Wang <i>et al.</i> , 2013.
Polymères greffés obtenus par voie chimique	PS-g-PHA PMMA-g-PHA PHA-g-PAA PHB-g-AA/starch PHA-g-AA-CS PHA-g-AA-COS PEG-g-PHA PEGMA-g-PHO VI-g-PHO, GDD-g-PHO PHOU-g-Jeffamine PHOU-g-POSS PHBV-g-PVK PHBV-g-PA	Yalpani <i>et al.</i> , 1991 Domenek <i>et al.</i> 2007 Kim <i>et al.</i> , 2005  Renard <i>et al.</i> , 2003  Kim <i>et al.</i> , 2008 Ishida <i>et al.</i> , 2012  Park <i>et al.</i> , 1999 Yeol Lee, 1997

Abréviations : 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HP, 3-hydroxypropionate; 4HB, 4-hydroxybutyrate; 3HV, 3-hydroxyvalérate; PTE, polythioester; PLA, polylactide; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HHp, 3-hydroxyheptanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydécanoate; 3HDD, 3-hydroxydodécanoate; 3HPhV, 3-hydroxy-5-phénylvalérate; 3HPE, 3-hydroxy-4-penténoïque; PHU, polyhydroxyundécanoate; 3HGPhx, 3-hydroxy-6-phénylhexanoate; PS-g-PHA, poly(styrène peroxyde)-g-PHA; PMMA-g-PHA, poly(méthyl méthacrylate peroxyde)-g-PHA; PHA-g-PAA, PHA-g-poly(acrylique); PHB-g-AA/starch, acrylique greffée poly(3-hydroxybutyrique)/starch; PHA-g-AA-CS, PHA-g-AA-chitosane; PHA-g-AA-COS, PHA-g-AA-chitoooligosaccharide; PEG-g-PHA, poly(éthylène glycol)-g-PHA; PEGMA-g-PHO, monoacrylate-poly(éthylène glycol)-g-PHO; PLA-g-PHA, poly(lactide)-g-PHA; VI-g-PHO, Vinylimidazole greffée poly(3-hydroxyoctanoate); GDD-g-PHO, Glycerol 1,3-diglycérol diacrylate-g-PHO; PHOU-g-Jeffamine, PHOU-g-a-amino-v-méthoxy poly(oxyéthylène-co-oxypropylène), (Jeffamine1)-g-PHO; PHOU-g-POSS, PHOU-g-poly(hydroxyl oligomère silsesquioxane); PHBV-g-PVK, PHBV-g-poly(phényl vinyl cétone); PHBV-g-PA, PHBV-g-poly(acrylamide).

## VIII. Production des PHA

La diversité de structure des PHA a, d'ores et déjà, été explorée pour de nombreuses applications telles que les bioplastiques jetables, les biocarburants, l'impression 3D, les matériaux intelligents ainsi que pour des applications médicales (Chen & Patel, 2012 ; Jiang *et al.*, 2019). Toutes ces possibilités ont rendu les PHA très attractifs auprès de la communauté scientifique et les PHA font aujourd'hui l'objet de nombreuses études (Tan *et al.*, 2017). La création de nouvelles technologies de production s'est donc avérée nécessaire afin de réduire les coûts de production, notamment à l'échelle industrielle.

### 1. Biotechnologie industrielle actuelle

Passer d'une production en laboratoire à une production industrielle de PHA a nécessité une mise à l'échelle en plusieurs étapes majeures dont le développement de souches, l'optimisation des conditions de culture ou encore la mise au point de fermenteur pilote (Chen, 2009). Outre ces ajustements, l'utilisation de bactéries modifiées génétiquement a permis de considérablement augmenter la production industrielle de PHA depuis les années 1980 (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Ces super producteurs, tels que *R. eutropha* et *E.coli* recombinants, sont largement utilisés du fait de la forte densité cellulaire obtenue (poids sec cellulaire de 232 g/L pour *R.eutropha*) et/ou de leur importante productivité volumétrique (4,63 g/L/h pour *E.coli*) (Choi *et al.*, 1998 ; Ryu *et al.* 1997) (**Tableau 06**). Toutefois, malgré ce succès de production à l'échelle industrielle, les procédures de stérilisation et de maîtrise de la contamination rendent le processus complexe (Chen & Wan, 2017). Commercialement, le PHA se heurte à la concurrence des plastiques pétrosourcés, puisque son prix reste cinq à dix fois supérieur (6 à 10 \$/kg) (Tan *et al.*, 2017). Ce prix élevé s'explique en partie par l'augmentation constante du coût des substrats de base tels que le glucose (Tanadchangsang & Yu, 2012), la grande consommation d'eau douce (Chen, 2012) et à l'aération énergivore (Yu *et al.*, 2019).

**Tableau 06.** Comparaison de la productivité des organismes selon les stratégies de production. D'après Tan *et al.*, 2019.

Souches	PHA produits	Stratégie de production	Substrat	Poids sec cellulaire (g/L)	Teneur en PHA (wt%)	Productivité volumétrique (g/L/h)	Références
<i>Escherichia coli</i>	PHA variés	Biotechnologie industrielle actuelle	Glucose	141,6	73	4,63	Choi <i>et al.</i> , 1998
<i>Ralstonia eutropha</i>	PHA <sub>scl</sub> PHA <sub>mcl</sub> PHBHHx	Biotechnologie industrielle actuelle	Glucose, acides gras	232	80	3,14	Ryu <i>et al.</i> , 1997
<i>Halomonas</i> spp.	PHA <sub>scl</sub>	Biotechnologie industrielle de nouvelle génération	Glucose	100	60-92	1,67-3,2	Zhao <i>et al.</i> , 2017 Ling <i>et al.</i> , 2019 Ye <i>et al.</i> 2018

## 2. Biotechnologie industrielle de nouvelle génération

Récemment, l'intérêt s'est porté sur des bactéries extrêmophiles, en particulier les bactéries du genre *Halomonas* spp. halophiles, qui permettent de réduire les coûts et de produire des PHA en masse. Cette nouvelle approche est appelée biotechnologie nouvelle génération (Chen & Jiang, 2018).

Cette technologie est basée sur l'utilisation de bactéries extrêmophiles telles que *Halomonas* sp. (Zhao *et al.*, 2017 ; Ling *et al.*, 2019 ; Ye *et al.*, 2018). Ces bactéries se développent en milieu salin à hypersalin ce qui limite fortement le risque de contamination et permet l'utilisation de systèmes ouverts et continus, économes en énergie et en eau douce (Chen & Jiang, 2018). Leur processus de croissance peut être géré par intelligence artificielle (Dumorné *et al.*, 2017 ; Yu *et al.*, 2019). Cela a deux avantages, le premier est de s'affranchir des processus de manipulation et de surveillance qui sont particulièrement chronophages et le second est de garantir une répétabilité de processus d'un lot à l'autre garantissant ainsi la qualité du produit obtenu. En termes de production volumétrique, cette biotechnologie nouvelle génération nécessite encore une optimisation puisqu'elle est inférieure (1.67 à 3.2 g/L/h) (Zhao *et al.*, 2017 ; Ling *et al.*, 2019 ; Ye *et al.* 2018) à celle obtenue pour *R.eutropha* et *E.coli* recombinants en système de production « traditionnel » (4,63 et 3,14 g/L/h respectivement) (Choi *et al.*, 1998 ; Ryu *et al.*, 1997). Toutefois, le coût de production des PHA avec cette biotechnologie nouvelle génération est inférieur à la biotechnologie traditionnelle (1,68\$/kg vs 2,3\$/kg) (Ye *et al.*, 2018 ; Li *et al.*, 2014).

### 3. Commercialisation

La Chine, précurseur de l'interdiction de production et d'utilisation de sacs en plastique (2008), a vu naître les entreprises pionnières de production de PHA dont la plus ancienne, TianAn, qui existe depuis plus de 20 ans. La plupart des entreprises existant aujourd'hui utilisent la biotechnologie traditionnelle. Toutefois, compte tenu du contexte économique difficile, les entreprises les plus récentes se tournent vers la biotechnologie nouvelle génération afin de produire des PHA à faible coût. De manière générale et de façon à être davantage compétitifs, les producteurs exploitent divers substrats (déchets de cuisine, déchets forestiers, déchets agricoles...) à la recherche du meilleur compromis coût/productivité (**Tableau 07**).

**Tableau 07.** Liste non-exhaustive de PHA commercialisés.

Compagnie	Type de PHA	Souche ou substrats utilisées	Échelle (tonne/an)
PhaBuilder, Chine	Tous types	<i>Halomonas</i> spp. (NGIB)	1000 - 10 000
Medpha, Chine	P(3HB-4HB)	<i>Halomonas</i> spp. (NGIB)	100
COFOCO, Chine	P3HB	<i>Halomonas</i> spp. (NGIB)	1000
Bluepha, Chine	P(3HB-3HHx)	<i>R.eutropha</i>	1000
TianAn Biopolymer, Chine	P(3HB-3HV)	<i>R. eutropha</i>	2000
GreenBio, Chine	P(3HB-4HB)	<i>Escherichia coli</i>	10 000
Danimer Scientific, USA	P(3HB-3HHx)	<i>R.eutropha</i>	10 000
Metabolix, USA	P(3HB-4HB)	<i>E.coli</i>	5000
Biocycle, Brésil	P3HB	<i>Bacillus</i> spp	100
Biomer, Allemagne	P3HB	<i>Aliccaligenes latus</i>	NC
Nafigate, France	P3HB	Déchets toxiques comme substrat	NC
BOSK Bioproducts, Canada	PHA*	Déchets forestiers comme substrat	NC
SABIO srl, Italy	PHA*	Déchets organiques comme substrat	NC

\* Type de PHA non connu

NC : non communiqué

NGIB : Next-generation industrial biotechnology (Biotechnologie industrielle de nouvelle génération)

## IX. Propriétés des PHA

Les PHA sont biosourcés, entièrement biodégradables, biocompatibles et présentent une grande diversité structurale. Pour toutes ces raisons, ils peuvent être utilisés dans de nombreuses applications et notamment dans le domaine biomédical. En effet, des études ont

montré que leur utilisation est possible comme biomatériaux pour l'élaboration de dispositifs orthopédiques, cardio-vasculaires, pour des pansements ou encore des systèmes de libération contrôlée de médicaments (Tanadchangsang, 2014 ; Rai *et al.*, 2011 ; Bear *et al.*, 1999 ; Deng *et al.*, 2002 ; Williams *et al.*, 1999 ; Niaounakis, 2015 ; Kalia, 2019). Les propriétés mécaniques et thermiques peuvent être contrôlées de façon à obtenir un polymère en adéquation avec l'application recherchée (Leong *et al.*, 2014 ; Verlinden *et al.*, 2007 ; Lopez-Cuellar *et al.*, 2011).

## 1. Cristallinité

La longueur de la chaîne latérale influe de manière significative sur le mécanisme de cristallisation. En effet, elle peut limiter la capacité du polymère à cristalliser. Il existe donc des différences entre les degrés de cristallinité des PHA<sub>scl</sub> et des PHA<sub>mcl</sub>. Les PHA<sub>mcl</sub> présentent une moindre cristallinité par rapport aux PHA<sub>scl</sub>. En effet, le P(3HB) a une cristallinité élevée allant jusqu'à 55-70% (Kim *et al.*, 2000), alors que le P(3HO) a une cristallinité d'environ 30% (Sanchez *et al.*, 2003). Si l'on prend le cas des copolymères, deux situations sont possibles. Une étude sur le copolymère P(3HB-co-3HV) montre que les unités 3HB et 3HV sont co-cristallisées dans le même réseau cristallin. Ce phénomène est dû à l'isomorphisme des unités 3HB et 3HV (Grigore *et al.*, 2019). En revanche pour le P(3HB-co-3HHx), des études montrent que la présence des unités 3HHx, n'influent que très peu sur les paramètres cristallographiques suggérant une exclusion de ces unités de la phase cristalline du P(3HB). Toutefois la présence de ces unités 3HHx réduit significativement le degré de cristallinité mais aussi la vitesse de cristallisation en comparaison à l'homopolymère P(3HB) (Padermshoke *et al.*, 2004).

## 2. Propriétés thermiques

De manière générale, les propriétés thermiques des polymères dépendent principalement de leur structure et de leur masse molaire. Ainsi, les PHA à courtes chaînes et à moyennes chaînes ont des propriétés bien différentes. Étant des polymères semi cristallins, leurs propriétés thermiques sont exprimées en température de transition vitreuse (T<sub>g</sub>) pour la phase amorphe et en température de fusion (T<sub>m</sub>) pour la phase cristalline. En règle générale, la T<sub>g</sub> diminue avec la longueur de la chaîne latérale (Gopi *et al.*, 2018). Par ailleurs, des études ont montré que la longueur de cette chaîne latérale n'est pas le seul paramètre influençant la température de transition vitreuse (T<sub>g</sub>). En effet, lors de la production de PHA<sub>mcl</sub> par *P.putida*, un

changement de température de transition vitreuse a été observé en fonction de la source carbonée. Alors que la Tg était de  $-61,7^{\circ}\text{C}$  pour les PHA<sub>mcl</sub> produits à partir d'acides gras issus d'huile de lin, elle était de  $-43,7^{\circ}\text{C}$  pour la production à partir d'acides gras issus de la noix de coco (Rai *et al.*, 2011). Ces résultats sont explicables par la différence de composition monomérique des deux PHA obtenus, et notamment la présence d'insaturations au sein du PHA<sub>mcl</sub> produit à partir d'acide linoléique. D'autres études ont également mis en avant ce phénomène montrant le rôle clé des substrats utilisés sur la composition des PHA et par conséquent sur leurs propriétés thermiques (Tableau 08).

**Tableau 08.** Températures de transition vitreuse (Tg) et de fusion (Tm) des PHA synthétisés par différents organismes lorsqu'ils sont cultivés avec différents substrats. D'après Grigore *et al.*, 2019.

Microorganismes	Substrats utilisés pour la production de PHA	PHA (monomère majeur)	Tg (°C)	Tm (°C)	Références
<i>P. putida</i> LS46123	Acide hexanoïque	C6	-28,7	138	Sharma <i>et al.</i> , 2017
	Acide octanoïque	C4	-32,6	162	
	Acide nonanoïque	C7	-30,2	158	
	Acide décanoïque	C6, C4	-31	166	
<i>P. aeruginosa</i>	Octanoïque-Mg	C8	1,7	-	Rai <i>et al.</i> , 2011
<i>P. stutzeri</i> 1317	Glucose	C10, C8	-52	50	Rai <i>et al.</i> , 2011
<i>Aeromonas caviae</i>	Huiles végétales	C1, C3	-7	150	Tsuge, 2002

### 3. Propriétés mécaniques

Étant très différents d'un point de vue cristallinité, il est évident que les propriétés mécaniques des PHA diffèrent également. De manière générale, les PHA<sub>mcl</sub> sont plus flexibles et élastiques dû à leur faible cristallinité (30%) tandis que les PHA<sub>scl</sub> sont rigides et cassants en raison de leur taux de cristallinité élevé (60-80%) (Anjum *et al.*, 2016 ; Meng & Chen, 2017). Par ailleurs, des différences existent entre deux types de PHA<sub>scl</sub> notamment selon la position du groupement OH. Ainsi, le P3HB et le P4HB ont tous les deux le même nombre d'atomes de carbone dans leurs chaînes latérales et ont pourtant des propriétés mécaniques très différentes. Alors que le P3HB présente une résistance à la traction de 40 MPa et un allongement à la rupture de 6%, le P4HB montre une résistance à la traction et un allongement à la rupture nettement supérieurs (104 MPa et 1000%). Le positionnement du groupe R dans la chaîne est donc responsable de la modification de la structure tridimensionnelle du polymère et par conséquent de ses

propriétés mécaniques (Ke *et al.*, 2017 ; Sanhueza *et al.*, 2019 ; Zhang *et al.*, 2018). Concernant les hétéropolymères tels que le P(3HB-co-3HHx), une étude a montré que leurs propriétés mécaniques dépendent essentiellement du pourcentage d'unités 3HHx. Par exemple, en ce qui concerne le module d'indentation, le P(3HB-co-3HHx) contenant la fraction molaire de 3HHx la plus élevée a présenté la valeur de module d'indentation la plus faible (155,5 MPa) et inversement. L'impact de la composition d'un mélange de PHA sur les propriétés mécaniques a également été étudié notamment avec le mélange P(3HB-co-3HHx) /P3HB et les résultats ont montré une nette amélioration de la flexibilité du polymère avec l'augmentation de la teneur en P(3HB-co-3HHx) (Liao, 2010).

#### 4. Biocompatibilité

La capacité d'un matériau à exister en contact avec les tissus du corps humain sans provoquer de réaction de l'organisme est un facteur important pour être membre de la famille des biomatériaux. Actuellement, ces derniers sont utilisés dans diverses applications médicales telles que l'ingénierie tissulaire, l'administration de médicaments et les nanotechnologies (Williams, 2008 ; Degeratu *et al.*, 2019 ; Kovalcik *et al.*, 2019). En ce qui concerne les PHA, l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) en 2007 pour l'utilisation du P(4HB) dans le cadre de suture chirurgicale a suscité l'intérêt de nombreuses équipes de recherches. Depuis, l'utilisation de cette famille de polymères pour une variété d'applications médicales a considérablement augmenté. Certains monomères composant les PHA sont présents naturellement dans le sang, c'est le cas de l'acide 3-hydroxybutyrique (3HB) qui est un métabolite présent à des concentrations de 3 à 10 mg pour 100 mL de sang chez un adulte en bonne santé. Plusieurs études ont également permis de démontrer l'hémocompatibilité du P(3HB) et du P(3HB-co-3HHx) puisqu'aucun phénomène de thrombose, de réponse antigénique ou de destruction de composants sanguins n'a été observé (Rai, 2010 ; Shrivastav *et al.*, 2013 ; Zinn *et al.*, 2001). D'autres recherches ont également été menées notamment sur l'attachement et la prolifération de cellules et les résultats ont montré une adhésion équivalente entre les films de P(3HB-co-3HHx) et les plaques de culture de tissus utilisées comme témoin (Qu *et al.*, 2006). Enfin, cette biocompatibilité est encore améliorée lorsque le P(3HB) est combiné avec du polyéthylène glycol (PEG), polymère largement utilisé dans le



domaine médical. En effet ce dernier permet d'augmenter la furtivité du biomatériau vis-à-vis du système immunitaire (Butt *et al.*, 2018).

## 5. Biodégradabilité

Les PHA sont biodégradables c'est-à-dire qu'ils ont la capacité d'être dégradés sous l'action de microorganismes naturellement présents dans l'environnement. Ces microorganismes sont capables de sécréter des enzymes (PHA dépolymérase, lipases, autres enzymes hydrolytiques) permettant de dégrader les PHA en oligomères et monomères qu'ils utilisent pour leur métabolisme, et en molécules de base (eau, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>). Lorsque les PHA sont utilisés comme biomatériaux sous forme d'implants médicaux dans l'organisme humain par exemple, ils subissent une dégradation sous l'action d'enzymes de type lipases et d'autres enzymes hydrolytiques, qui vont hydrolyser les PHA et en libérer très progressivement les monomères dans l'organisme. Qu'il s'agisse de dégradation dans l'environnement ou au sein de l'organisme humain, la vitesse de dégradation des PHA dépend de nombreux facteurs comme la nature des enzymes impliquées (Mok *et al.*, 2016), les caractéristiques environnementales telles que la température, l'exposition aux UV, la quantité de nutriments, les forces de cisaillement, la flore bactérienne, le pH ou encore le niveau d'oxygène (Deroiné *et al.*, 2014 ; Laycock *et al.*, 2017 ; Woolnough *et al.*, 2013), mais également des propriétés intrinsèques aux PHA telles que la cristallinité, le poids moléculaire, ou encore la longueur des chaînes latérales (Chuah *et al.*, 2013). Par exemple, le P(3HB) est moins favorable à la dégradation comparée au P(4HB) (Wu *et al.*, 2009). Il a également été constaté que la dégradation des PHA fait intervenir des processus d'érosion de surface (Guerin *et al.*, 2010 ; Laycock *et al.*, 2017) et qu'elle est beaucoup plus rapide dans la région amorphe de la chaîne polymère (Marchessault *et al.*, 1994 ; Ying *et al.*, 2008 ; Kumagai *et al.*, 1992). Par ailleurs, la présence de co-monomères au sein des PHA induit une diminution de la cristallinité globale (Doi *et al.*, 1995) et favorise ainsi la biodégradation des PHA. Ainsi, pour un même degré de cristallinité, la dégradation des copolymères est généralement plus rapide que celles des homopolymères. Il a également été démontré que l'étendue et la topographie de surface des PHA joue un rôle important dans les processus de dégradation (Wang *et al.*, 2004). Ainsi, plus la surface est accessible aux attaques enzymatiques plus sa perte de masse sera rapide (Doi *et al.*, 1992 ; Mergaert *et al.*, 1995 ; Rutkowska *et al.*, 2008 ; Sashiwa *et al.*, 2018 ; Tsuji & Suzuyoshi, 2002). De plus, au fur et à

mesure de la dégradation, la surface du polymère se modifie, pouvant entrainant la formation de pores et le mécanisme de dégradation peut alors évoluer vers une dégradation en masse et une hydrolyse autocatalytique (Ho *et al.*, 2002 ; Laycock *et al.*, 2017 ; Tsuji & Suzuyoshi, 2002). Dès 1992, des études fondamentales ont ainsi porté sur la biodégradation des PHA dans l'eau de mer (Doi *et al.*, 1992 ; Mergaert *et al.* 1995 ; Kasuya *et al.*, 1998 ; Thellen *et al.*, 2008 ; Deroine *et al.*, 2014). Les auteurs ont découvert que le mécanisme de biodégradation des PHA dans l'eau de mer était similaire à celui rapporté pour le sol et le compost mais qu'il était significativement plus lent. En effet, Rutkoska *et al.* (2008) ont montré que des films de PHBV (0,115 mm d'épaisseur) se sont complètement dégradés dans le compost en six semaines alors qu'ils n'ont présenté qu'une perte de masse de 60% en eau de mer sur la même période, phénomène lié certainement à une présence plus abondante de microorganismes dans le compost. D'autres études ont également démontré que la dégradation des PHA est étroitement liée à leur composition monomérique. En effet, l'étude de films de PHB et de P(3HB-co-3HV) (0,1 mm) immergés dans l'eau de mer pendant 160 jours a montré que la perte de masse du film était de 33% et 13% respectivement (Volova *et al.*, 2011). La dégradation du PHB est donc, dans ces conditions, plus rapide que celle du P(3HB-co-3HV). La composition monomérique n'est pas le seul paramètre à influencer sur la dégradation, l'épaisseur du film est également impliquée puisque cette même étude a montré des pertes de masse de 58 % pour le PHB et de 54 % pour le P(3HB-co-3HV) lorsque l'épaisseur était réduite à 0,005 mm (Volova *et al.*, 2011).

Plus récemment, Dilkes-Hoffman *et al.* (2017) ont étudié le taux de biodégradation des PHA dans l'environnement marin de façon à estimer la durée de vie des produits à base de PHA. Le taux de dégradation moyen a été déterminé comme étant de 0,04-0,09 mg/jour/cm. Toutefois ce taux est fortement dépendant de l'épaisseur. A titre d'exemple, des sacs de 0,035 mm d'épaisseur se sont complètement dégradés entre 25 jours et 2 mois tandis que des bouteilles de 0,8 mm d'épaisseur nécessitait un temps de dégradation d'un an et demi (**Figure 06**).

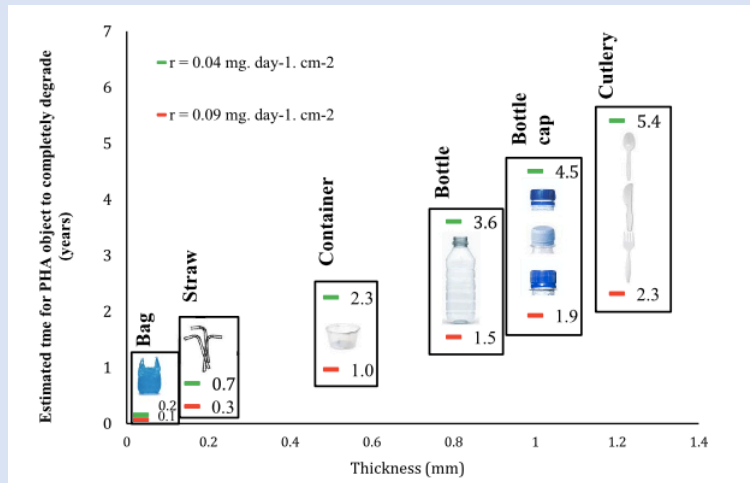


Figure 06. Valeurs moyennes de la biodégradation du PHA dans l'environnement marin. D'après Dilkes-Hoffman et al., 2019.

La présentation, d'une part, des différentes stratégies limitant la biocontamination de surfaces et, d'autre part, des poly(3-hydroxyalcanoates) permet de situer le contexte du projet de cette thèse. Ce dernier vise, rappelons-le, à élaborer un système amphiphile à base de PHA (hydrophobe) et de copolymère contenant du PEG (hydrophile) dont le but est de limiter la biocontamination. Le principe de ce système réside en une hypothèse selon laquelle, les molécules hydrophiles situées en surface du revêtement permettent la création d'une couche d'hydratation perturbant ainsi le processus d'adhésion des microorganismes (Figure 07). De plus, au-delà de limiter cette bioadhésion, les revêtements formulés doivent également répondre à des exigences en termes de capacité anti-biofilm. Les connaissances actuelles en la matière ont permis d'établir un lien entre propriétés physiques, chimiques et mécaniques et capacité antiadhésive et/ou antibiofilm. De ce fait, le premier chapitre de cette thèse se consacrera à l'étude de ces propriétés dans le but (i) de caractériser les revêtements formulés et (ii) de corrélérer ou non ces propriétés avec les capacités antiadhésives et/ou antibiofilm des systèmes formulés.

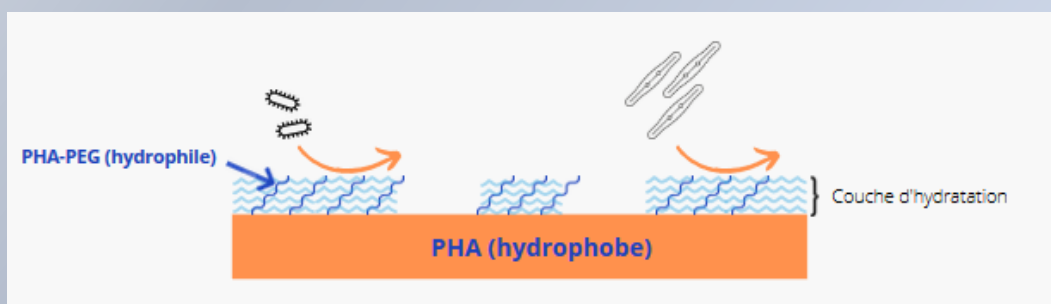


Figure 07. Représentation schématique des revêtements formulés dans ce projet de thèse et de leur potentiel mode d'action.



## X. Références bibliographiques

- Almeida, E; Diamantino, T.C; de Sousa, O. Marine paints: the particular case of antifouling paints. (2007). *Progress in Organic Coatings*, 59 (1), 2-20.
- Alzieu, C.L; Sanjuan, J; Deltreil, J.P; Borel, M. Tin contamination in Arcachon Bay: effects on oyster shell anomalies. (1986). *Marine pollution bulletin*, 17 (11), 494-498.
- Amara, I; Miled, W; Slama, R.B; Ladhari, N. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. (2018) *Environmental toxicology and pharmacology*, 57, 115-130.
- Anderson, A. J., Haywood, G. W., Dawes, E. A. (1990). Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates). *International journal of biological macromolecules*, 12(2), 102-105.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *International journal of biological macromolecules*, 89, 161-174.
- Arciola, C.R; Campoccia, D, Montanaro, L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. (2018). *Nature Reviews Microbiology*, 16, 397-409.
- Ayub, N. D., Tribelli, P. M., López, N. I. (2009). Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles*, 13(1), 59-66.
- Banerjee, I; Pangule, R.C; Kane, R.S. Antifouling coatings: recent developments in the design of surface that prevent fouling by proteins, bacteria and marine organisms. (2011). *Advanced materials*, 23 (6), 690-718.
- Batista, M. B., Teixeira, C. S., Sfeir, M. Z., Alves, L. P., Valdameri, G., Pedrosa, F. D. O., ... & Müller-Santos, M. (2018). PHB biosynthesis counteracts redox stress in *Herbaspirillum seropedicae*. *Frontiers in microbiology*, 9, 472.
- Bax, N; Williamson A; Agüero, M; Gonzalez, E; Geeves, W. Marine invasive alien species: a threat to global diversity. (2003). *Marine Policy*, 27 (4), 313-323.
- Bear, M. M., Mallarde, D., Langlois, V., Randriamahefa, S., Bouvet, O., Guerin, P. (1999). Natural and artificial functionalized biopolyesters. II. Medium-chain length polyhydroxyoctanoates from *Pseudomonas* strains. *Journal of environmental polymer degradation*, 7(4), 179-184.
- Berglin, M; Wynne, K.J; Gatenholm, P. Fouling-release coatings prepared from  $\alpha,\omega$ -dihydroxypoly(dimethylsiloxane) cross-linked with (heptadecafluoro-1,1,2-tetrahydrodecyl) triethoxysilane. (2003). *Journal of colloid and interface science*, 257 (2), 383-391.
- Bers, A.V; Diaz, E.R; Da Gama, B.A.P; Vieira-Silva, F; Dobretsov, S; Valdivia, N; Wahl, M. Relevance of mytilid shell microtopographies for fouling defence – a global comparison. (2010). *Biofouling*, 26 (3), 367-377.
- Bers, A.V; Wahl, M. The influence of natural surface microtopographies on fouling. (2004). *Biofouling*, 20 (1), 43-51.
- Bhushan, B; Jung, Y.C. Natural and biomimetic artificial surfaces for superhydrophobicity, self-cleaning, low adhesion, and drag reduction. (2011). *Progress in Materials Science*, 56 (1), 1-108.
- Bhushan, B. Biomimetics. (2009) *Phil. Trans. R. Soc. A*, 367, 1433-1444.
- Bingeman, J.M; Bethell, J.P; Goodwin, P; Mack, A.T. Cooper and other sheathing in the Royal Navy. (2000). *The International Journal of Nautical Archaeology*, 29 (2), 218-229.
- Bixler, G.D; Bhushan, B. Biofouling: lessons from nature. (2012). *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 370 (1967), 2381-2417.
- Bollen, C.M; Papaioanno, W; Van Eldere, J; Schepers, E; Quirynen, M; Van Steenberghe, D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. (1996). *Clinical oral implants research*, 7 (3), 201-211.
- Boutaleb, N. Étude de la formation de biofilms sur les surfaces des matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. (2007). *Thèse de l'Université Bretagne Sud*, 174p.
- Brady Jr, R.F. Properties which influence marine fouling resistance in polymers containing silicon and fluorine. (1999). *Progress in organic coatings*, 35 (1-4), 31-35.
- Braunegg, G., Sonnleitner, B. Y., Lafferty, R. M. (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 6(1), 29-37.
- Breedveld, M. W., Cremers, H. C., Batley, M., Posthumus, M. A., Zevenhuizen, L. P., Wijffelman, C. A., Zehnder, A. J. (1993). Polysaccharide synthesis in relation to nodulation behavior of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of bacteriology*, 175(3), 750-757.

Bruzaud, J; Tarrade, J; Coudreuse, A; Canette, A; Herry, J.M; de Givenchy, E.T; Bellon-Fontaine, M.N. Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. (2015). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 131, 59-66.

Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V. A. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *eXPRESS Polymers Letters*, 8 (11), 791-808.

Burkert, S., Bittrich, E., Kuntzsch, M., Müller, M., Eichhorn, K. J., Bellmann, C., ... & Stamm, M. Protein resistance of PNIPAAm brushes: application to switchable protein adsorption. (2010). *Langmuir*, 26(3), 1786-1795.

Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual review of microbiology*, 66(1), 493-520.

Butt, F. I., Muhammad, N., Hamid, A., Moniruzzaman, M., Sharif, F. (2018). Recent progress in the utilization of biosynthesized polyhydroxyalkanoates for biomedical applications—review. *International journal of biological macromolecules*, 120, 1294-1305.

Cao, S; Whang, J; Chen, H; Chen, D. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. (2010). *Chinese Science Bulletin*, 56 (7), 598-612.

Cao, X; Pettit, M.E; Conlan, S.L; Wagner, W; Ho, A.D; Clare, A.S; Rosenhahn, A. Resistance of polysaccharide coatings to proteins, hematopoietic cells and marine organisms. (2009) *Biomacromolecules*, 10 (4), 907-915.

Carman, M.L; Estes, T.G; Feinberg, A.W Schumacher, J.F; Wilkerson, W; Wilson, L.H; Brennan, A.B. Engineer antifouling microtopographies-correlating wettability with cell attachment. (2006). *Biofouling*, 22 (1), 11-21.

Carve, M; Scardino, A; Shimeta, J. Effects of surface texture and interrelated properties on marine biofouling: a systematic review. (2019). *Biofouling*, 35 (6), 597-617.

Cavalheiro, J. M., de Almeida, M. C. M., Grandfils, C., Da Fonseca, M. M. R. (2009). Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process biochemistry*, 44(5), 509-515.

Chakraborty, P., Gibbons, W., Muthukumarappan, K. (2009). Conversion of volatile fatty acids into polyhydroxyalkanoate by *Ralstonia eutropha*. *Journal of applied microbiology*, 106(6), 1996-2005.

Chen, F.H; Zhang, L.M; Chen, Q.T; Zhang, Y; Zhang, Z.J. Synthesis of a novel magnetic drug delivery system composed of doxorubicin-conjugated  $Fe_3O_4$  nanoparticle cores and a PEG-functionalized porous silica shell. (2010). *Chemical Communications*, 46 (45), 8633-8635.

Chen, G. Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. *Chemical society reviews*, 38(8), 2434-2446.

Chen, G. Q. (2010). Industrial production of PHA. In *Plastics from bacteria* (121-132). Springer, Berlin, Heidelberg.

Chen, G. Q., & Hajnal, I. (2015). PHAome. *Trends in biotechnology*.

Chen, G. Q., Jiang, X. R. (2018). Engineering microorganisms for improving polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*, 53, 20-25.

Chen, G. Q., Patel, M. K. (2012). Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review. *Chemical reviews*, 112(4), 2082-2099.

Chen, G. Q., Hajnal, I., Wu, H., Lv, L., Ye, J. (2015). Engineering biosynthesis mechanisms for diversifying polyhydroxyalkanoates. *Trends in biotechnology*, 33(10), 565-574.

Chen, H., Yang, J., Xiao, S., Hu, R., Bhaway, S. M., Vogt, B. D., ... & Zheng, J. (2016). Salt-responsive polyzwitterionic materials for surface regeneration between switchable fouling and antifouling properties. *Acta biomaterialia*, 40, 62-69.

Chen, J. Y., Liu, T., Zheng, Z., Chen, J. C., Chen, G. Q. (2006). Polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas stutzeri* 1317 had different substrate specificities. *FEMS microbiology letters*, 234(2), 231-237.

Chen, J. Y., Song, G., Chen, G. Q. (2006). A lower specificity PhaC2 synthase from *Pseudomonas stutzeri* catalyses the production of copolyesters consisting of short-chain-length and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(1), 157-167.

Chen, M; Yu, Q; Sun, H. Novel Strategies for the Prevention and Treatment of Biofilm Related Infections. (2013). *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (9), 18488-18501.

Chen, Z., Wan, C. (2017). Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73, 610-621.

Chien, C. C., Wang, L. J., Lin, W. R. (2014). Polyhydroxybutyrate accumulation by a cadmium-resistant strain of *Cupriavidus taiwanensis*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(4), 1164-1169.

Choi, J. I., Lee, S. Y., & Han, K. (1998). Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 64(12), 4897-4903.

Chu, T., Jiang, X. Q., Hou, J., Hui-Ming, W., & Kong, L. (2017). Construction of multiple-rate LDPC codes using modified PEG. In *2017 9th International Conference on Wireless Communications and Signal Processing (WCSP)* (pp. 1-5). IEEE.

Chuah, J. A., Yamada, M., Taguchi, S., Sudesh, K., Doi, Y., Numata, K. (2013). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing 5-hydroxyvalerate units: effects of 5HV units on biodegradability, cytotoxicity, mechanical and thermal properties. *Polymer degradation and stability*, 98(1), 331-338.

Chung, A. L., Jin, H. L., Huang, L. J., Ye, H. M., Chen, J. C., Wu, Q., Chen, G. Q. (2011). Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxydodecanoate) by  $\beta$ -oxidation inhibited mutant of *Pseudomonas entomophila* L48. *Biomacromolecules*, 12(10), 3559-3566.

Chung, K.K; Schumacher, J.F; Sampson, E.M; Burne, R.A; Antonelli, P.J; Brennan, A.B. Impact of engineered surface microtopography on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. (2007). *Biointerphases*, 2 (2), 89-94.

Churaev, N.V; Derjaguin, B.V; Muller, V.M. *Surfaces forces* (2013).

Costerton, J.W; Montanaro, L; Arciola, C.R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. (2005). *Int. J. Artif. Organs*, 28 (11), 1062-8.

Coutts, A.D; Taylor, M.D. A preliminary investigation of biosecurity risks associated with biofouling on merchant vessels in New Zealand. (2004). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 38 (2), 215-229.

Currie, E.P.K; Norde, W; Stuart, M.C. Tethered polymer chains: surface chemistry and their impact on colloidal and surface properties. (2003). *Advances in colloid and interface science*, 100, 205-265.

Dafforn, K.A; Lewis, J.A; Johnston, E.L. Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts, and mitigation. (2011). *Marine pollution bulletin*, 62 (3), 453-465.

Dalsin, J. L., Messersmith, P. B. (2005). Bioinspired antifouling polymers. *Materials today*, 8(9), 38-46.

Damodaran, V.B; Murthy, N.S. Bio-inspired strategies for designing antifouling biomaterials. (2016). *Biomaterials research*, 20 (1), 1-11.

Davidson, I.C; Brown C.W; Sytsma M. D; Ruiz, G.M. The role of containerships as transfer mechanisms of marine biofouling species. (2009). *Biofouling*, 25, 645-655.

Dawes, E. A., Senior, P. J. (1973). The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Advances in microbial physiology*, 10, 135-266.

De Smet, M. J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J., Wynberg, H. (1983). Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *Journal of bacteriology*, 154(2), 870-878.

Debye, P. Molecular forces, and their electrical interpretation. (1921). *Physikalische Zeitschrift*, 22, 302-308.

Degeratu, C. N., Mabilieu, G., Aguado, E., Mallet, R., Chappard, D., Cincu, C., & Stancu, I. C. (2019). Polyhydroxyalkanoate (PHBV) fibers obtained by a wet spinning method: good in vitro cytocompatibility but absence of in vivo biocompatibility when used as a bone graft. *Morphologie*, 103(341), 94-102.

Delauney, L; Compere, C; Lehaitre, M. Biofouling protection for marine environmental sensors. (2010). *Ocean Science*, 6 (2), 503-511.

Deng, Y., Zhao, K., Zhang, X. F., Hu, P., Chen, G. Q. (2002). Study on the three-dimensional proliferation of rabbit articular cartilage-derived chondrocytes on polyhydroxyalkanoate scaffolds. *Biomaterials*, 23(20), 4049-4056.

Derjaguin, B. V., Muller, V. M., Toporov, Y. P. (1975). Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *Journal of Colloid and interface science*, 53(2), 314-326.

Deroine, M., Le Duigou, A., Corre, Y. M., Le Gac, P. Y., Davies, P., César, G., Bruzard, S. (2014). Seawater accelerated ageing of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Polymer degradation and stability*, 105, 237-247.

Desjardine, K., Pereira, A., Wright, H., Matainaho, T., Kelly, M., Andersen, R. J. (2007). Tauramamide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: structure elucidation and synthesis. *Journal of natural products*, 70(12), 1850-1853.

Dilkes-Hoffman, L. S., Lant, P. A., Laycock, B., Pratt, S. (2019). The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 15-24.

Divandari, M; Morgese, G; Trachsel, L; Romio, M; Deghani, E.S; Rosenboom, J.G; Benetti, E.M. Topology effects on the structural and physicochemical properties of polymer brushes. (2017). *Macromolecules*, 50 (19), 7760-7769.

Divandari, M; Trachsel, L; Yan, W; Rosenboom, J.G; Spencer, N.D; Zenobi-Wong M; Benetti, E.M. Surface density variation within cyclic polymer brushes reveals topology effects on their nanotribological and biopassive properties. (2018). *ACS Macro Letters*, 7 (12), 1455-1460.

Doi, Y., Kawaguchi, Y., Koyama, N., Nakamura, S., Hiramitsu, M., Yoshida, Y., Kimura, H. (1992). Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 9(2-4), 103-108.

Doi, Y., Kitamura, S., Abe, H. (1995). Microbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, 28(14), 4822-4828.

Domenek, S., Langlois, V., Renard, E. (2007). Bacterial polyesters grafted with poly (ethylene glycol): behaviour in aqueous media. *Polymer degradation and stability*, 92(7), 1384-1392.

Dragos, A; Kovacs, A.T. The Peculiar Functions of the Bacteria Extracellular Matrix. (2017). *Trends in Microbiology*, 25 (4), 257-266.



Du, G., Si, Y., Yu, J. (2001). Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acids on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Ralstonia eutropha*. *Biotechnology letters*, 23(19), 1613-1617.

Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., Renganathan, P. (2017). Extremozymes: a potential source for industrial applications.

Dundar Arisoy, F; Kolewe, K.W; Homyak, B; Kurtz, I.S; Schiffman, J.D; Watkins, J.J. Bioinspired photocatalytic shark-skin surfaces with antibacterial and antifouling activity via nanoimprint lithography. (2018). *ACS applied materials & interfaces*, A0 (23), 20055-20063.

Dunne Jr, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? (2002). *Clinical microbiology reviews*, 15 (2), 155-166.

Ederth, T; Lerm, M; Orihuela, B; Rittschof, D. Resistance of zwitterionic peptide monolayers to biofouling. (2018). *Langmuir*, 35 (5), 1818-1827.

Eggers, J., & Steinbüchel, A. (2014). Impact of *Ralstonia eutropha*'s poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerases and phasins on PHB storage in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 80(24), 7702-7709.

Farkas, A; Degiuli, N; Martic, I. An investigation into the effect of hard fouling on the ship resistance using CFD. (2020). *Applied Ocean Research*, 100, 102-205.

Fiedler, S., Steinbüchel, A., & Rehm, B. H. (2002). The role of the fatty acid  $\beta$ -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the fadBA operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes phaJ from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*. *Archives of microbiology*, 178(2), 149-160.

Flemming, HC; Wingender, J; Szewzyk, U; Steinberg, P; Rice, S; Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 563-575.

Freij-Larsson, C; Nylander, T; Jannasch, P; Wesslen, B. Adsorption behaviour of amphiphilic polymers at hydrophobic surfaces: effects on protein adsorption. (1996). *Biomaterials*, 17 (22), 2199-2207.

Fukui, T. (1998). Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(3), 333-336.

Galhenage, T, P; Hoffman, D; Silbert, S.D; Stafslie, S.J; Daniels, J; Milijakovic, T; Webster, D.C. Fouling-release performance of silicon oil-modified siloxane-polyurethane coatings. (2016). *ACS applied materials & interfaces*, 8 (42), 29025-29036.

Galhenage, T. P., Webster, D. C., Moreira, A., Burgett, R. J., Stafslie, S. J., Vanderwal, L., ... & Clare, A. S. Poly (ethylene) glycol-modified, amphiphilic, siloxane-polyurethane coatings and their performance as fouling-release surfaces. (2017). *Journal of Coatings Technology and Research*, 14(2), 307-322.

Gao, S., Huang, J., Li, S., Liu, H., Li, F., Li, Y., ... & Lai, Y. Facile construction of robust fluorine-free superhydrophobic TiO<sub>2</sub>@ fabrics with excellent anti-fouling, water-oil separation and UV-protective properties. (2017). *Materials & Design*, 128, 1-8.

Gibiansky, M.L; Conrad, J.C; Jin, F; Gordon, V.D; Motto, D.A; Mathewson, M.A; Wong, G.C. Bacteria use type IV pili to walk upright and detach from surfaces. (2010). *Science*, 330 (6001), 197-197.

Goh, L. K., Purama, R. K., Sudesh, K. (2014). Enhancement of stress tolerance in the polyhydroxyalkanoate producers without mobilization of the accumulated granules. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(3), 1585-1598.

Gomez, J. G. C., Rodrigues, M. F. A., Alli, R. C. P., Torres, B. B., Netto, C. L., Oliveira, M. S., Da Silva, L. F. (1996). Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(6), 785-791.

Gopi, S., Kontopoulou, M., Ramsay, B. A., Ramsay, J. A. (2018). Manipulating the structure of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (MCL-PHA) to enhance thermal properties and crystallization kinetics. *International journal of biological macromolecules*, 119, 1248-1255.

Green, E; Fullwood, E; Selden, J; Zharov, I. Functional membranes via nanoparticle self-assembly. (2015). *Chemical Communications*, 51 (37), 7770-7780.

Grigore, M. E., Grigorescu, R. M., Iancu, L., Ion, R. M., Zaharia, C., Andrei, E. R. (2019). Methods of synthesis, properties, and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(9), 695-712.

Gudipati, C.S; Finlay, J.A; Callow, J.A; Callow, M.E; Wooley, K.L. The antifouling and fouling-release performance of hyperbranched fluoropolymer (HBFP)-poly (ethylene glycol) (PEG) composite coatings evaluated by adsorption of biomacromolecules and the green fouling alga *Ulva*. (2005). *Langmuir*, 21 (7), 3044-3053.

Guegan, C; Garderes, J; Le Pennec, G; Gaillard, F; Fay, F; Linossier, I; Réhel, K. Alteration of bacterial adhesion induced by the substrate stiffness. (2014). *Colloids and Surface B : Biointerfaces*, 114, 193-200.

Guerin, P., Renard, E., & Langlois, V. (2010). Degradation of natural and artificial poly [(R)-3-hydroxyalkanoate]: From biodegradation to hydrolysis. In *Plastics from Bacteria* (pp. 283-321). Springer, Berlin, Heidelberg.

Guzik, M. W., Kenny, S. T., Duane, G. F., Casey, E., Woods, T., Babu, R. P., ... & O'Connor, K. E. (2014). Conversion of post-consumer polyethylene to the biodegradable polymer polyhydroxyalkanoate. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(9), 4223-4232.

Haas, R., Jin, B., Zepf, F. T. (2008). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(1), 253-256.

Habbu, P; Warad, V; Shastri, R; Madagundi, S; Kulkarni, V.H. Antimicrobial metabolites from marine microorganisms. (2016). *Chinese journal of natural medicines*, 14 (2), 101-116.

Haghdoust, A; Pitchumani, R. Fabricating superhydrophobic surfaces via a two-step electrodeposition technique. (2014). *Langmuir*, 30 (14), 4183-4191.

Halperin, A. Polymer brushes that resist adsorption of model proteins: design parameters. (1999) *Langmuir*, 15 (7), 2525-2533.

Hanssen, A; Spangehl, M. Practical Applications of Antibiotic-Loaded Bone Cement for Treatment of Infected Joint Replacements. (2004). *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 427, 79-85.

Hermann-Krauss, C., Koller, M., Muhr, A., Fasl, H., Stelzer, F., Braunegg, G. (2013). Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co-and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products. *Archaea*.

Hermansson, M. The DLVO theory in microbial adhesion. (1999). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1999, 14 (1-4), 105-119.

Ho, Y. H., Gan, S. N., Tan, I. K. (2002). Biodegradation of a medium-chain-length polyhydroxyalkanoate in tropical river water. *Applied biochemistry and biotechnology*, 102(1), 337-347.

Holberg, S; Losada, R; Blaikie, F.H; Hansen, H.H; Soreau, S; Onderwater, R.C. Hydrophilic silicone coatings as fouling release: Simple synthesis, comparison to commercial, marine coatings and application on fresh water-cooled heat exchangers. (2020). *Materials Today Communication*, 22, 100750.

Hsu, S.M; Jing, Y; Zhao, F. Self-adaptive surface texture design for friction reduction across the lubrication regimes. (2015). *Surface Topography: Metrology and Properties*, 4 (1), 014004.

Hu, D., Chung, A. L., Wu, L. P., Zhang, X., Wu, Q., Chen, J. C., Chen, G. Q. (2011). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate block copolymer P3HB-b-P4HB. *Biomacromolecules*, 12(9), 3166-3173.

Huber, D. L., Manginell, R. P., Samara, M. A., Kim, B. I., & Bunker, B. C. Programmed adsorption and release of proteins in a microfluidic device. (2003). *Science*, 301(5631), 352-354.

Huisman, G. W., de Leeuw, O. L. A. V., Eggink, G., Witholt, B. (1989). Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Applied and environmental microbiology*, 55(8), 1949-1954.

Ishida, K., Hortensius, R., Luo, X., Mather, P. T. (2012). Soft bacterial polyester-based shape memory nanocomposites featuring reconfigurable nanostructure. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 50(6), 387-393.

Ishizaki, A., Tanaka, K., Taga, N. (2001). Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO<sub>2</sub>. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(1), 6-12.

Israelachvili, J. Intermolecular and Surfaces Forces. (1991). *Academic Press, London*.

Jagoda, A., Ketikidis, P., Zinn, M., Meier, W., Kita-Tokarczyk, K. (2011). Interactions of biodegradable poly ([R]-3-hydroxy-10-undecenoate) with 1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine lipid: a monolayer study. *Langmuir*, 27(17), 10878-10885.

Jamal, M; Ahmad, W; Andleeb, S; Jalil, F; Imran, M; Nawaz, M.A; Hussain, T; Ali, M; Rafiq, M; Kamil, M.A. Bacterial biofilm and associated infections. (2018). *Journal of the Chinese Medical Association*, 81 (1), 7-11.

James, G.A; Boegli, L; Hancock, J; Bowersock, L; Parker, A; Kinney, B.M. Bacterial adhesion and biofilm formation on textured breast implant shell materials. (2019). *Aesthetic plastic surgery*, 43 (2), 490-497.

Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of bacteriology*, 191(10), 3195-3202.

Jendrossek, D., Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly (3-hydroxybutyrate). *Environmental microbiology*, 16(8), 2357-2373.

Jiang, L., Luo, Z., Loh, X. J., Wu, Y. L., & Li, Z. (2019). PHA-based thermogel as a controlled zero-order chemotherapeutic delivery system for the effective treatment of melanoma. *ACS Applied Bio Materials*, 2(8), 3591-3600.

Jin, H; Tian, L; Bing, W; Zhao, J; Ren, L. Bioinspired marine antifouling coatings: Status, prospects, and future. (2022). *Progress in Materials Science*, 124, 1008-1089.

Jung, Y. K., Lee, S. Y., Tam, T. T. (2010). Towards systems metabolic engineering of PHA producers. In *Plastics from bacteria* (pp. 63-84). Springer, Berlin, Heidelberg.

Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y. (2003). Involvement of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3244-3250.

Kalia, V. C., Ray, S., Patel, S. K., Singh, M., Singh, G. P. (2019). The dawn of novel biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates. In *Biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates* (pp. 1-11). Springer, Singapore.

Kamnev, A. A., Tugarova, A. V., Antonyuk, L. P., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., Gardiner, P. H. (2005). Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: comparison of endophytic and non-endophytic strains of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(1), 91-95.

Karygianni, L.; Ren, Z; Koo, H; Thurnheer, T. (2020) Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28 (8), 668-681.

Kasuya, K. I., Takagi, K. I., Ishiwatari, S. I., Yoshida, Y., Doi, Y. (1998). Biodegradabilities of various aliphatic polyesters in natural waters. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 327-332.

Kawada, J., Lütke-Eversloh, T., Steinbüchel, A., Marchessault, R. H. (2003). Physical properties of microbial polythioesters: characterization of poly (3-mercaptoalkanoates) synthesized by engineered *Escherichia coli*. *Biomacromolecules*, 4(6), 1698-1702.

Ke, Y., Zhang, X. Y., Ramakrishna, S., He, L. M., Wu, G. (2017). Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: Preparation and biomedical application. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 1107-1119.

Keesom, W.H. The cohesion forces in the theory of Van der Waals. (1921). *Proceedings*, 23 (2), 943-948.

Khanna, S., Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process biochemistry*, 40(2), 607-619.

Khosravi-Darani, K., Mokhtari, Z. B., Amai, T., Tanaka, K. (2013). Microbial production of poly (hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(4), 1407-1424.

Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., Woo, S. I. (1994). Production of poly (3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(7), 556-561.

Kim, H. W., Chung, M. G., Kim, Y. B., Rhee, Y. H. (2008). Graft copolymerization of glycerol 1, 3-diglycerolate diacrylate onto poly (3-hydroxyoctanoate) to improve physical properties and biocompatibility. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(3), 307-313.

Kim, M., Cho, K. S., Ryu, H. W., Lee, E. G., Chang, Y. K. (2003). Recovery of poly (3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. *Biotechnology letters*, 25(1), 55-59.

Kim, T. K., Vo, M. T., Shin, H. D., Lee, Y. H. (2005). Molecular structure of the PHA synthesis gene cluster from new mcl-PHA producer *Pseudomonas putida* KCTC1639. *Journal of microbiology and biotechnology*, 15(5), 1120-1124.

Kim, T.W. Assessment of hydro/oleophobicity for shark skin replica with riblets. (2014). *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14 (10), 7562-7568.

Klinke, S., Ren, Q., Witholt, B., Kessler, B. (1999). Production of medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 540-548.

Knowles, B.R; Wagner, P; Maclaughlin, S; Higgins, M.J; Molino, P. Silica nanoparticles functionalized with zwitterionic sulfobetaine siloxane for application as a versatile antifouling coating system. (2017). *ACS applied materials & interfaces*, 9 (22), 18584-18594.

Kobojevic, Z; Bebic, D; Kurtela, Z. New approach to monitoring hull condition of ships as objective for selecting optimal docking period (2019). *Ships and Offshore Structures*, 14 (1), 95-103.

Kolewe, K.W; Peyton, S.R; Schiffman, J.D. Fewer bacteria adhere to softer hydrogels. (2015) *ACS applied materials & interfaces*, 7 (35), 19562-19569.

Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., Braunegg, G. (2010). Microbial PHA production from waste raw materials. In *Plastics from bacteria* (pp. 85-119). Springer, Berlin, Heidelberg.

Koller, M., Atlić, A., Gonzalez-Garcia, Y., Kutschera, C., Braunegg, G. (2008). Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from whey lactose. In *Macromolecular symposia* (Vol. 272, No. 1, pp. 87-92). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.

Koo H, Yamada, K, M. Dynamic cell-matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments (2016). *Current Opinion in Cell Biology*, 42, 102-112.

Koo, H; Allan, R.N; Howlin, R.P; Stoodley, P; Hall-Stoodley, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. (2017). *Nature Reviews Microbiology*, 15, 740-755.

Kovalcik, A., Obruca, S., Fritz, I., Marova, I. (2019). Polyhydroxyalkanoates: their importance and future. *BioResources*, 14(2), 2468-2471.

Kumagai, Y., Kanesawa, Y., Doi, Y. (1992). Enzymatic degradation of microbial poly (3-hydroxybutyrate) films. *Die Makromolekulare Chemie*, 193(1), 53-57.

Lageveen, R. G., Huisman, G. W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., Witholt, B. (1988). Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkanoates. *Applied and environmental microbiology*, 54(12), 2924-2932.

Latthe, S.S; Terashima, C; Nakata, K; Fujishima, A. Superhydrophobic surfaces developed by mimicking hierarchical surface morphology of lotus leaf. (2014). *Molecules*, 19 (4), 4256-4283.

Laycock, B., Nikolić, M., Colwell, J. M., Gauthier, E., Halley, P., Bottle, S., George, G. (2017). Lifetime prediction of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 71, 144-189.

Lee, D.S; Eom, S.H; Jeong, S.Y; Shin, H.J; Je, J.Y; Lee, E.W; Lee, M.S. Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) substance from the marine bacterium *Pseudomonas* sp. UJ-6. (2013). *Environmental toxicology and pharmacology*, 35 (2), 171-177.

Lee, S. Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and bioengineering*, 49(1), 1-14.

Leid, J; Wilson, C; Shirtliff, E; Hassett, D; Parsek M., Jeffers, A. The Exopolysaccharid Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- $\gamma$ - Mediated Macrophage Killing. (2005). *The Journal of Immunology*, 175 (11), 7512-7518.

Lemoigne, M. Études sur l'autolyse microbienne origine de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique formé par autolyse. (1927). *Ann. Inst. Pasteur*, 41, 148.

Lemoigne, M. Products of dehydration and of polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. (1926). *Bull Soc Chem Biol*, 8, 770-782.

Leong, Y. K., Show, P. L., Ooi, C. W., Ling, T. C., & Lan, J. C. W. (2014). Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: insights from the recombinant *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 180, 52-65.

Li, S; Jiang, K ; Wang, J ; Zuo, C ; Jo, Y.H, He, D ; Xue, Z. Molecular brush with dense PEG side chains: design of a well-defined polymer electrolyte for lithium-ion batteries. (2019). *Macromolecules*, 52 (19), 7234-7243.

Li, T., Chen, X. B., Chen, J. C., Wu, Q., Chen, G. Q. (2014). Open and continuous fermentation: products, conditions, and bioprocess economy. *Biotechnology journal*, 9(12), 1503-1511.

Li, Z. J., Shi, Z. Y., Jian, J., Guo, Y. Y., Wu, Q., Chen, G. Q. (2010). Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 12(4), 352-359.

Liang, X; Peng, L.H; Zhang, S; Zhou, S; Yoshida, A; Osatomi, K; Yang, J.L. Polyurethane epoxy resin and polydimethylsiloxane altered biofilm formation and mussel settlement. (2019) *Chemosphere*, 218, 599-608.

Liao, Q. (2010). Biodegradable poly(hydroxyalkanoates): melt, solid, and foam. Stanford University.

Lichter, J.A; Thompson, M.T; Delgadillo, M; Nishikawa, T; Rubner, M; Van Vliet, K.J. Substrata mechanical stiffness can regulate adhesion of viable bacteria. (2008). *Biomacromolecules*, 9 (6), 1571-1578.

Lin, Y., He, D., Hu, H., Yi, P., Liu, X., Huang, J., ... & Li, G. (2019). Preparation and properties of polydimethylsiloxane (PDMS)/polyethylene glycol (PEG)-based amphiphilic polyurethane elastomers. *ACS Applied Biomaterials*, 2(10), 4377-4384.

Ling, C., Qiao, G. Q., Shuai, B. W., Song, K. N., Yao, W. X., Jiang, X. R., & Chen, G. Q. (2019). Engineering self-flocculating *Halomonas campaniensis* for wastewaterless open and continuous fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 116(4), 805-815.

Liu, Q., Luo, G., Zhou, X. R., & Chen, G. Q. (2011). Biosynthesis of poly (3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by  $\beta$ -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metabolic engineering*, 13(1), 11-17.

Loeb, G; Neihof, R. Marine conditioning Films. (1975). *Advances in Chemistry*, 16, 319-335.

London, F. The general theory of molecular forces. (1937) *Transactions of the Faraday Society*, 33, 8b-26.

Loo, C. Y., Lee, W. H., Tsuge, T., & Sudesh, K. (2005). Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnology letters*, 27(18), 1405-1410.

Lopez-Cuellar, M. R., Alba-Flores, J., Rodríguez, J. G., & Pérez-Guevara, F. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *International journal of biological macromolecules*, 48(1), 74-80.

Lorite, G; Rodrigues, C; de Souza, A; Kranz, C; Mizaikoff, B; Cotta, M. Ther role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. (2011). *Journal of Colloid and Interface Science*, 359, 289-295.

Lu, J., Tappel, R. C., & Nomura, C. T. (2009). Mini review: biosynthesis of poly (hydroxyalkanoates). *Journal of Macromolecular Science®, Part C: Polymer Reviews*, 49(3), 226-248.

Lundgren, D. G., Alper, R., Schnaitman, C., & Marchessault, R. H. (1965). Characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate extracted from different bacteria. *Journal of Bacteriology*, 89(1), 245-251.

Lundgren, D. G., Pfister, R. M., & Merrick, J. M. (1964). Structure of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules. *Microbiology*, 34(3), 441-446.

Mack, D; Becker, P; Chatterjee, I; Dobinsky, S; Knobloch, J; Peters, G; Rohde, H; Hermann, M. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits and adaptive responses. (2004). *International Journal of Medical Microbiology*, 294 (2-3), 203-212.

Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(1), 21-53.

Magin, C.M; Cooper, S.P; Brennan, A.B. Non-toxic antifouling strategies. (2010). *Materials today*, 13 (4), 36-44.

Majumdar, P; Webster, D.C. Preparation of siloxane-urethane coatings having spontaneously formed stable biphasic microtopographical surfaces. (2005). *Macromolecules*, 38 (14), 5857-5859.

Marchessault, R. H., Monasterios, C. J., Jesudason, J. J., Ramsay, B., Saracovan, I., Ramsay, J., & Saito, T. (1994). Chemical, enzymatic and microbial degradation of bacterial and synthetic poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates. *Polymer degradation and stability*, 45(2), 187-196.

Martinelli, E., Hill, S. D., Finlay, J. A., Callow, M. E., Callow, J. A., Glisenti, A., & Galli, G. Amphiphilic modified-styrene copolymer films: Antifouling/fouling release properties against the green alga *Ulva linza*. (2016). *Progress in Organic Coatings*, 90, 235-242.

Matalon, S., Safadi, D., Meirowitz, A., & Ormianer, Z. (2021). The effect of aging on the roughness and bacterial adhesion of lithium Disilicate and Zirconia ceramics. *Journal of Prosthodontics*, 30(5), 440-446.

Meng, D. C., & Chen, G. Q. (2017). Synthetic biology of polyhydroxyalkanoates (PHA). *Synthetic biology–metabolic engineering*, 147-174.

Meng, D. C., Shi, Z. Y., Wu, L. P., Zhou, Q., Wu, Q., Chen, J. C., & Chen, G. Q. (2012). Production and characterization of poly (3-hydroxypropionate-co-4-hydroxybutyrate) with fully controllable structures by recombinant *Escherichia coli* containing an engineered pathway. *Metabolic engineering*, 14(4), 317-324.

Mergaert, J., Wouters, A., Swings, J., & Anderson, C. (1995). In situ biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(13), 154-159.

Mielczarski, J.A; Mielczarski, E; Galli, G; Morelli, A; Martinelli, E; Chiellini, E. The surface-segregated nanostructure of fluorinated copolymer-poly(dimethylsiloxane) blend films. (2010). *Langmuir*, 26 (4), 2871-2876.

Mittelman, M. Adhesion to Biomaterials. (1996). *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, 89-127.

Mittendorf, V., Robertson, E. J., Leech, R. M., Krüger, N., Steinbüchel, A., & Poirier, Y. (1998). Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13397-13402.

Mojid Mondol, M.A; Shahidullah Tareq, F; Hye Kim, J; Ah Lee, M; Lee, H.S; Seok Lee, J; Jae Shin, H. (2011). New antimicrobial compounds from a marine-derived *Bacillus* sp. *The Journal of Antibiotics*, 66 (2), 89-95.

Mok, P. S., Ch'ng, D. H. E., Ong, S. P., Numata, K., & Sudesh, K. (2016). Characterization of the depolymerizing activity of commercial lipases and detection of lipase-like activities in animal organ extracts using poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) thin film. *AMB Express*, 6(1), 1-14.

Molnar, J.L; Gamboa R.L; Revenga, C; Spalding M, D. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. (2008). *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6 (9), 485-492.

Monge, C; Saha, N; Boudou, T; Pozos-Vasquez, C; Dulong, V; Glinel, K ; Picart, C. Rigidity-patterned polyelectrolyte films to control myoblast cell adhesion and spatial organization. (2013). *Advanced functional materials*, 23 (27), 3432-3442.

Moreau-Marquis, S; Stanton, B; O'Toole, G. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. (2008). *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 21 (4), 595-599.

Morgese, G; Trachsel; Romio, M; Divandari, M; Ramakrishna, S.N; Benetti, E.M. Topological polymer chemistry enters surface science: linear versus cyclic polymer brushes. (2016) *Angewandte Chemie*, 128 (50), 15812-15817.

Morgese, G; Verbraeken, B; Ramakrishna, S.N; Gombert, Y; Cavalli, E; Rosenboom, J.G; Benetti, E.M. Chemical Design of Non-Ionic Polymer Brushes as Biointerfaces: Poly (2-oxazine) Outperform Both Poly (2-oxazoline) and PEG. (2018). *Angewandte Chemie International Edition*, 57 (36), 11667-11672.

Mozejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271-282.

Muhammadi, Shabina, Afzal, M., & Hameed, S. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3-4), 56-77.

Munther, M; Palma, T; Angeron I.A; Salari, S; Ghassemi, H; Vasefi, M; Davami, K. Microfabricated Biomimetic placoid Scale-inspired surfaces for antifouling applications. (2018). *Applied Surface Science*, 453, 166-172.

Nguyen, A.T; Baggerman, J; Paulusse, J.M; van Rijn, C.J; Zuilhof, H. Stable protein-repellent zwitterionic polymer brushes grafted from silicon nitride (2011). *Langmuir*, 27 (6), 2587-2594.

Niaounakis, M. (2015). *Biopolymers: applications and trends*. William Andrew.

Nowroth, V., Marquart, L., & Jendrossek, D. (2016). Low temperature-induced viable but not culturable state of *Ralstonia eutropha* and its relationship to accumulated polyhydroxybutyrate. *FEMS Microbiology Letters*, 363(23).

Nurioglu, A.G; Esteves, A.C; De With, G. Non-toxic, non-biocide-release antifouling coatings based on molecular structure design for marine applications. (2015). *J. Mater. Chem.*, 3, 6547-6570.

O'Toole, G.A; Kolter, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple convergent signaling pathways: a genetic analysis. (1998). *Molecular microbiology*, 28 (3), 449-461.

Obruca, S., Benesova, P., Petrik, S., Oborna, J., Prikryl, R., & Marova, I. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process biochemistry*, 49(9), 1409-1414.

Obruca, S., Sedlacek, P., Krzyzanek, V., Mravec, F., Hrubanova, K., Samek, O., ... & Marova, I. (2016). Accumulation of poly (3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS one*, 11(6), e0157778.

Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F., Krzyzanek, V., Nebesarova, J., Samek, O., ... & Marova, I. (2017). The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New biotechnology*, 39, 68-80.

Obruca, S., Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., ... & Koller, M. (2020). Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(11), 4795-4810.

Ojumu, T. V., Yu, J., & Solomon, A. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African journal of Biotechnology*, 3(1), 18-24.

Olivera, E. R., Arcos, M., Naharro, G., & Luengo, J. M. (2010). Unusual PHA biosynthesis. In *Plastics from bacteria* (pp. 133-186). Springer, Berlin, Heidelberg.

Padermshoke, A., Katsumoto, Y., Sato, H., Ekgasit, S., Noda, I., & Ozaki, Y. (2004). Surface melting and crystallization behavior of polyhydroxyalkanoates studied by attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Polymer*, 45(19), 6547-6554.

Paharik, A.E; Horswill A.R. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. (2016). *Microbiol. Spectr.*, 4(2), 10.1128.

Palmer, J; Flint, S; Brooks, J. Bacterial cell attachment the beginning of a biofilm. (2007). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34 (9), 577-588.

Pantazaki, A. A., Papaneophytou, C. P., Pritsa, A. G., Liakopoulou-Kyriakides, M., & Kyriakidis, D. A. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry*, 44(8), 847-853.

Park, J.W; An, J.S; Lim, W.H, Lim, B.S; Ahn, S.J. Microbial changes in biofilms on composite resins with different surface roughness: An in vitro study with a multispecies biofilm model. (2019). *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 122 (5), 493-e1.

Park, W. H., Lenz, R. W., & Goodwin, S. (1999). Epoxidation of bacterial polyesters with unsaturated side chains: IV. Thermal degradation of initial and epoxidized polymers. *Polymer degradation and stability*, 63(2), 287-291.

Pavez, P., Castillo, J. L., González, C., & Martínez, M. (2009). Poly-β-hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Current microbiology*, 59(6), 636-640.

Pederson, E. N., McChalicher, C. W., & Srienc, F. (2006). Bacterial synthesis of PHA block copolymers. *Biomacromolecules*, 7(6), 1904-1911.

Peplinski, K., Ehrenreich, A., Döring, C., Bömeke, M., Reinecke, F., Hutmacher, C., & Steinbüchel, A. (2010). Genome-wide transcriptome analyses of the 'Knallgas' bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiology*, 156(7), 2136-2152.

Pestunovich, V.A; Tandura, S.N; Voronkov, M.G; Baryshok, V.P; Zelchan, G.I; Glukhikh, V.I; Witanowski, M. The influence on NMR Parameters of Silicon Penta Coordination in Silatranes. (1978). *Spectroscopy Letters*, 11 (5), 339-344.

Pitto, R.P; Spika, I.A. Antibiotic-loaded bone cement in two-stage management of infected total knee arthroplasty. (2004). *International Orthopaedics*, 28, 129-133.

Pu, X; Li, G; Huang, H. Preparation, anti-biofouling and drag-reduction properties of a biomimetic shark skin surface. (2016). *Biology open*, 5 (4), 389-396.

Puckett, S.D; Taylor, E; Raimondo, T; Webster, T.J. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. (2010). *Biomaterials*, 31 (4), 706-713.

Qu, X. H., Wu, Q., Zhang, K. Y., Chen, G. Q. (2006). In vivo studies of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and tissue reactions. *Biomaterials*, 27(19), 3540-3548.

Rai, R. (2010). *Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and its medical applications* (Doctoral dissertation, University of Westminster).

Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R., Roy, I. (2011). Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 72(3), 29-47.

Renard, E., Tanguy, P. Y., Samain, E., Guerin, P. (2003). Synthesis of novel graft polyhydroxyalkanoates. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 197, No. 1, pp. 11-18). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.

Rendueles, O; Kaplan, J.B; Ghigo, J.M. Antibiofilm polysaccharides. (2013). *Environmental microbiology*, 15 (2), 334-346.

Rothermich, M. M., Guerrero, R., Lenz, R. W., Goodwin, S. (2000). Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuation of poly (hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4279-4291.

Ruiz, G.M; Fofonoff, W; Steves, P; Carlton T. Invasion history and vector dynamics in coastal marine ecosystems: A North American perspective. (2015). *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 18 (3), 299-311.

Rutkowska, M., Krasowska, K., Heimowska, A., Adamus, G., Sobota, M., Musioł, M., ... & Kowalczyk, M. (2008). Environmental degradation of blends of atactic poly [(R, S)-3-hydroxybutyrate] with natural PHBV in Baltic Sea water and compost with activated sludge. *Journal of Polymers and the Environment*, 16(3), 183-191.

Ryu, H. W., Hahn, S. K., Chang, Y. K., Chang, H. N. (1997). Production of poly (3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnology and bioengineering*, 55(1), 28-32.

Sakala, G.P; Reches, M. Peptide-based approaches to fight biofouling. (2018). *Advanced Materials Interfaces*, 5 (18), 1800073.

Sanchez, R. J., Schripsema, J., da Silva, L. F., Taciro, M. K., Pradella, J. G., Gomez, J. G. C. (2003). Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHA<sub>mcl</sub>) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. *European Polymer Journal*, 39(7), 1385-1394.

Sanhueza, C., Acevedo, F., Rocha, S., Villegas, P., Seeger, M., Navia, R. (2019). Polyhydroxyalkanoates as biomaterial for electrospun scaffolds. *International journal of biological macromolecules*, 124, 102-110.

Sashiwa, H., Fukuda, R., Okura, T., Sato, S., Nakayama, A. (2018). Microbial degradation behavior in seawater of polyester blends containing poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx). *Marine drugs*, 16(1), 34.

Scalabrini, M. Etude de l'activité anti-bioadhésion de surfaces de verres greffées avec des sucres furanosidiques rares. (2019). *Thèse de l'Université Bretagne Sud*, 223p.

Sedlacek, P., Slaninova, E., Enev, V., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., ... & Obruca, S. (2019). What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(4), 1905-1917.

Selim, M.S; Shenashen, M.A; El-Safty, S.A; Higazy, S.A; Selim, M.M; Isago, H; Elmarakbi, A. Recent progress in marine foul-release polymeric nanocomposite coatings. (2017) *Progress in Materials Science*, 87, 1-32.

Shahid, S., Mosrati, R., Ledauphin, J., Amiel, C., Fontaine, P., Gaillard, J. L., Corroler, D. (2013). Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. *Journal of bioscience and bioengineering*, 116(3), 302-308.

Sharma, P. K., Munir, R. I., Blunt, W., Dartailh, C., Cheng, J., Charles, T. C., Levin, D. B. (2017). Synthesis and physical properties of polyhydroxyalkanoate polymers with different monomer compositions by recombinant *Pseudomonas putida* LS46 expressing a novel PHA synthase (PhaC116) enzyme. *Applied sciences*, 7(3), 242.

Shen, R., Cai, L., Meng, D., Wu, L., Guo, K., Dong, G., ... & Chen, G. (2014). Benzene containing polyhydroxyalkanoates homo-and copolymers synthesized by genome edited *Pseudomonas entomophila*. *Science China Life Sciences*, 57(1), 4-10.

Shen, Z., Byers, D. M. (1996). Isolation of *Vibrio harveyi* acyl carrier protein and the *fabG*, *acpP*, and *fabF* genes involved in fatty acid biosynthesis. *Journal of bacteriology*, 178(2), 571-573.

Shimizu, R., Chou, K., Orita, I., Suzuki, Y., Nakamura, S., Fukui, T. (2013). Detection of phase-dependent transcriptomic changes and Rubisco-mediated CO<sub>2</sub> fixation into poly (3-hydroxybutyrate) under heterotrophic condition in *Ralstonia eutropha* H16 based on RNA-seq and gene deletion analyses. *BMC microbiology*, 13(1), 1-15.

Shiono, Y; Ishii, K; Nagai, S; Kakinuma, H; Sasaki, A; Funao, H; Kuramoto, T; Yoshioka, K; Ishihama, H; Isogai, N; Takeshima, K; Tsuji, T; Okada, Y; Koyasu, S; Nakamura, M; Toyama, Y; Aizawa, M; Matsumoto, M. (2016). Delayed *Propionibacterium acnes* surgical site infections occur only in the presence of an implant. *Scientific Reports*, 6, 32758.

Shivapooja, P; Yu, Q; Orihuela, B; Mays, R; Rittschof, D; Genzer, J; Lopez, G.P. Modification of silicon elastomer surfaces with zwitterionic polymers: short-term fouling resistance and triggered biofouling release. (2015). *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7 (46), 25586-25591.

Shrivastav, A., Kim, H. Y., Kim, Y. R. (2013). Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed research international*, 2013.

Siddiqui, S; Chandrasekaran, A; Lin, N; Tufenkji, N; Moraes, C. Microfluidic shear assay to distinguish between bacterial adhesion and attachment strength on stiffness-tunable silicone substrates. (2019). *Langmuir*, 35 (26), 8840-8849.

Silva, E.R; Ferreira, O; Ramalho, P.A; Azevedo, N.F; Bayon, R; Igartua, A; Bordado, J.C; Calhorda, M.J. Eco-friendly non-biocide-release coatings for marine biofouling prevention. (2019). *Science of The Total Environment*, 650 (2), 2499-2511.

Slater, S., Houmiel, K. L., Tran, M., Mitsky, T. A., Taylor, N. B., Padgett, S. R., Gruys, K. J. (1998). Multiple  $\beta$ -ketothiolases mediate poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *Journal of bacteriology*, 180(8), 1979-1987.

Sommer, S.A. Siloxane-polyurethane fouling-release coatings based on PDMS macromers. *North Dakota University* (2011).

Song, F; Ren, D; Koo, H. Effects of materials properties on bacterial adhesion and biofilm formation. (2015). *Journal of dental research*, 94 (8), 1027-1034.

Song, F; Ren, D. Stiffness of cross-linked poly (dimethylsiloxane) affects bacterial adhesion and antibiotic susceptibility of attached cells. (2014). *Langmuir*, 30 (34), 10354-10362.

Sonnleitner, B., Heinzle, E., Braunegg, G., Lafferty, R. M. (1979). Formal kinetics of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H 16 and *Mycoplana rubra* R 14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 7(1), 1-10.

Statz, A.R; Meagher, R.J; Barron, A.E; Messersmith, P.B. New peptidomimetic polymers for antifouling surfaces. (2005). *Journal of the American Chemical Society*, 127 (22), 7972-7973.

Steinbüchel, A., Valentin, H. E., Schönebaum, A. (1994). Application of recombinant gene technology for production of polyhydroxyalkanoic acids: biosynthesis of poly (4-hydroxybutyric acid) homopolyester. *Journal of environmental polymer degradation*, 2(2), 67-74.

Stoodley, P; Sauer, K; Davies, D.G; Costerton, J.W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. (2002). *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 187-209.

Straub, H; Bigger, C.M; Pan, F; Valentin, J; Abt, D; Qin, X.H; Ren, Q. Mechanism of Bacteria Interaction with Soft Polydimethylsiloxane Surfaces: Tentacle-like Interface. (2019) *eCM Welcomes you to davos*.

Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in polymer science*, 25(10), 1503-1555.

Sun, P., Maloney, K. N., Nam, S. J., Haste, N. M., Raju, R., Aalbersberg, W., ... & Fenical, W. (2011). Fijimycins A–C, three antibacterial etamycin-class depsipeptides from a marine-derived *Streptomyces* sp. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(22), 6557-6562

Sundaram, H.S; Cho, Y; Dimitrou, M.D; Weinman, C.J; Finlay, J.A; Cone, G; Ober, C.K. Fluorine-free mixed amphiphilic polymers based on PDMS and PEG side chains for fouling release applications. (2011). *Biofouling*, 27 (6), 589-602.

Tan, D., Wang, Y., Tong, Y., Chen, G. Q. (2021). Grand challenges for industrializing polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Trends in biotechnology*, 39(9), 953-963.

Tan, D., Yin, J., Chen, G. Q. (2017). Production of polyhydroxyalkanoates. In *Current developments in biotechnology and bioengineering* (pp. 655-692). Elsevier.

Tan, G. Y. A., Chen, C. L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., ... & Wang, J. Y. (2014). Start research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. *Polymers*, 6(3), 706-754.

Tanadchangsang, N. (2014). Structure, chemomechanical properties and degradability of polyhydroxyalkanoates: A review. *Bull. Health Sci. Technol*, 12, 9-21.

Tanadchangsang, N., Yu, J. (2012). Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: gluconeogenesis, molecular weight, and material properties of biopolyester. *Biotechnology and bioengineering*, 109(11), 2808-2818.

Tao, S. L., Popat, K. C., Norman, J. J., Desai, T. A. (2008). Surface modification of SU-8 for enhanced biofunctionality and nonfouling properties. *Langmuir*, 24(6), 2631-2636.

Thellen, C., Coyne, M., Froio, D., Auerbach, M., Wirsén, C., Ratto, J. A. (2008). A processing, characterization and marine biodegradation study of melt-extruded polyhydroxyalkanoate (PHA) films. *Journal of Polymers and the Environment*, 16(1), 1-11.

Torregrosa-Crespo, J., Martínez-Espinosa, R. M., Esclapez, J., Bautista, V., Pire, C., Camacho, M., ... & Bonete, M. J. (2016). Anaerobic metabolism in *Haloferax* genus: denitrification as case of study. *Advances in microbial physiology*, 68, 41-85.

Tribelli, P. M., López, N. I. (2011). Poly (3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles*, 15(5), 541-547.



Tribelli, P. M., Lujan, A. M., Pardo, A., Ibarra, J. G., Fernández Do Porto, D., Smania, A., López, N. I. (2019). Core regulon of the global anaerobic regulator Anr targets central metabolism functions in *Pseudomonas* species. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.

Tripathi, L., Wu, L. P., Chen, J., Chen, G. Q. (2012). Synthesis of Diblock copolymer poly-3-hydroxybutyrate-block-poly-3-hydroxyhexanoate [PHB-b-PHHx] by a  $\beta$ -oxidation weakened *Pseudomonas putida* KT2442. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 1-11.

Tripathi, L., Wu, L. P., Dechuan, M., Chen, J., Wu, Q., Chen, G. Q. (2013). *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions. *Bioresource technology*, 142, 225-231.

Tsuge, T. (2002). Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *Journal of bioscience and bioengineering*, 94(6), 579-584.

Tsuji, H., Suzuyoshi, K. (2002). Environmental degradation of biodegradable polyesters 1. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone), poly [(R)-3-hydroxybutyrate], and poly (L-lactide) films in controlled static seawater. *Polymer Degradation and Stability*, 75(2), 347-355.

Tsuneda, S; Aikawa, H; Hayashi H; Yuasa, A; Hirata, A. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surfaces. (2003). *FEMS microbiology letters*, 223 (2), 287-292.

Uneputty, A; Davila-Lezama, A; Garibo, D; Oknianska, A; Bogdanchikova, N, Hernandez-Sanchez, J.F; Susarrey-Arce, A. Strategies applied to modify structured and smooth surfaces: A step closer to reduce bacterial adhesion and biofilm formation. (2022). *Colloid and Interface Science Communications*, 46, 100560.

Valentin, H. E., Steinbüchel, A. (1994). Application of enzymatically synthesized short-chain-length hydroxy fatty acid coenzyme A thioesters for assay of polyhydroxyalkanoic acid synthases. *Applied microbiology and biotechnology*, 40(5), 699-709.

Van Kerk, G.D; Luijten, J.G.A. Investigations on organo-tin compounds. III. The biocidal properties of organo-tin compounds. (1954). *Journal of Applied Chemistry*, 4 (6), 314-319.

Van Loosdrecht, M.C.M; Lyklema, J; Norde, W; Zehnder, A.J.B. Bacterial adhesion: A physicochemical approach. (1989). *Microbial Ecology*, 17, 1-15.

Van Oss, C.J. The properties of water and their role in colloidal and biological systems. (2008). *Academic Press*, 16.

Veerachamy, S; Yarlagadda, Y; Manivasagam, G; Yarlagadda, P. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants – A review. (2014). *Proc. Inst. Mech. Eng. H.*, 228 (10), 1083-1099.

Verlinden, R. A., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of applied microbiology*, 102(6), 1437-1449.

Verwey, E. J. W. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. (1947). *J. Phys. Chem.*, 51 (3), 631-636.

Verwoert, I. I., Verbree, E. C., Van der Linden, K. H., Nijkamp, H. J., Stuitje, A. R. (1992). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Escherichia coli* fabD gene, encoding malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase. *Journal of bacteriology*, 174(9), 2851-2857.

Volova, T. G., Boyandin, A. N., Vasil'ev, A. D., Karpov, V. A., Kozhevnikov, I. V., Prudnikova, S. V., ... & Gitel'Zon, I. I. (2011). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in the South China Sea and identification of PHA-degrading bacteria. *Microbiology*, 80(2), 252-260.

Volova, T. G., Kiselev, E. G., Shishatskaya, E. I., Zhila, N. O., Boyandin, A. N., Syrvacheva, D. A., ... & Peterson, I. V. (2013). Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646. *Bioresource technology*, 146, 215-222.

Wallen, L. L., & Rohwedder, W. K. (1974). Poly-. beta. -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environmental science & technology*, 8(6), 576-579.

Wang, D., Chen, Y., Zheng, X., Li, X., & Feng, L. (2013). Short-chain fatty acid production from different biological phosphorus removal sludges: the influences of PHA and gram-staining bacteria. *Environmental science & technology*, 47(6), 2688-2695.

Wang, H. H., Li, X. T., & Chen, G. Q. (2009). Production and characterization of homopolymer polyhydroxyheptanoate (P3HHp) by a fadBA knockout mutant *Pseudomonas putida* KTOY06 derived from *P. putida* KT2442. *Process Biochemistry*, 44(1), 106-111.

Wang, J; Nakata, T; Liu, H. Development of mixed flow fans with bio-inspired grooves. (2019). *Biomimetics*, 4 (4), 72.

Wang, J; Peng, C; Chen, Z; Sun, S; Shi, Z; Jin, L; Zhao, C. Engineering antimicrobial and biocompatible electrospun PLGA fibrous membranes by irradiation grafting polyvinylpyrrolidone and periodate. (2019). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 918-926.

Wang, M., Hu, B., Yang, C., Zhang, Z., He, L., Fang, S., ... & Zhang, Q. Electrochemical biosensing based on protein-directed carbon nanospheres embedded with SnO<sub>x</sub> and TiO<sub>2</sub> nanocrystals for sensitive detection of tobramycin. (2018). *Biosensors and Bioelectronics*, 99, 176-185.

Wang, W. S., Lundgren, D. G. (1969). Poly-beta-hydroxybutyrate in the chemolithotrophic bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 97(2), 947-950.

Wang, Y. N., Tang, C. Y. Protein fouling of nanofiltration, reverse osmosis, and ultrafiltration membranes—the role of hydrodynamic conditions, solution chemistry, and membrane properties. (2011). *Journal of Membrane Science*, 376(1-2), 275-282.

Wang, Y. W., Mo, W., Yao, H., Wu, Q., Chen, J., Chen, G. Q. (2004). Biodegradation studies of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Polymer degradation and stability*, 85(2), 815-821.

Wang, Z., Lin, S. Membrane fouling and wetting in membrane distillation and their mitigation by novel membranes with special wettability. (2017). *Water research*, 112, 38-47.

Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.

Williams, H., Patricia, K. (2018). Polyhydroxyalkanoates. *Biosynthesis, Chemical Structures and Applications*.

Williams, S. F., Martin, D. P., Horowitz, D. M., & Peoples, O. P. (1999). PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 25(1-3), 111-121.

Woolnough, C. A., Yee, L. H., Charlton, T. S., Foster, L. J. R. (2013). A tuneable switch for controlling environmental degradation of bioplastics: addition of isothiazolinone to polyhydroxyalkanoates. *Plos one*, 8(10), e75817.

Wu, Q., Wang, Y., Chen, G. Q. (2009). Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 37(1), 1-12.

Wu, S; Zhang, B; Liu, Y; Suo, X; Li, H. Influence of surface topography on bacterial adhesion: A review. (2018) *Biointerphases*, 13 (6), 060801.

Xing, R; Lyngstadaas, S.P; Ellingsen, J.E; Taxt-Lamolle, S; Haugen, H.J. The. Influence of surface nanoroughness, texture and chemistry of TiZr implant abutment on oral biofilm accumulation. *Clinical oral implants research* 2015, 26 (6), 649-656.

Yalpani, M., Marchessault, R. H., Morin, F. G., Monasterios, C. J. (1991). Synthesis of poly (3-hydroxyalkanoate) (PHA) conjugates: PHA-carbohydrate and PHA-synthetic polymer conjugates. *Macromolecules*, 24(22), 6046-6049.

Yamane, T. (1993). Yield of poly-D (-) -3-hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study. *Biotechnology and bioengineering*, 41(1), 165-170.

Yang, C., Zhang, W., Liu, R., Zhang, C., Gong, T., Li, Q., ... & Song, C. (2013). Analysis of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase gene and PHA-producing bacteria in activated sludge that produces PHA containing 3-hydroxydodecanoate. *FEMS microbiology letters*, 346(1), 56-64.

Yang, J., Chen, H., Xiao, S., Shen, M., Chen, F., Fan, P., ... & Zheng, J. Salt-responsive zwitterionic polymer brushes with tunable friction and antifouling properties. (2015). *Langmuir*, 31(33), 9125-9133.

Yang, Q; Jones, S.W; Parker, C.L; Zamboni, W.C; Bear, J.E; Lai, S.K. Evading immune cell uptake and clearance requires PEG grafting at densities substantially exceeding the minimum for brush conformation. (2014). *Molecular pharmaceutics*, 11 (4), 1250-1258.

Yang, W.J; Neoh, K.G; Kang, E.T; Teo, S.L.M; Rittschof, D. Polymer brush coatings for combating marine biofouling. (2014). *Progress in Polymer Science*, 39 (5), 1017-1042.

Ye, J., Hu, D., Che, X., Jiang, X., Li, T., Chen, J., ... & Chen, G. Q. (2018). Engineering of *Halomonas* bluephagenesis for low-cost production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose. *Metabolic engineering*, 47, 143-152.

Yeol Lee, E., Yong Choi, C. (1997). Structural identification of polyhydroxyalkanoic acid (PHA) containing 4-hydroxyalkanoic acids by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and its application to bacteria screening. *Biotechnology techniques*, 11(3), 167-171.

Yilgor, I; McGrath, J.E. Polysiloxane containing copolymers: a survey of recent developments. (1988). *Polysiloxane copolymers/anionic polymerization*, 1-86.

Ying, T. H., Ishii, D., Mahara, A., Murakami, S., Yamaoka, T., Sudesh, K., ... & Iwata, T. (2008). Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response. *Biomaterials*, 29(10), 1307-1317.

Yoda, I; Koseki, H; Tomita, M; Shida, T; Horiuchi, H; Sakoda, H; Osaki, M. Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermis* adhesion. (2019). *BMC microbiology*, 14 (1), 1-7.

Yoon, S. M., Jung, J. K., Lee, S. B., Lee, T. (2002). Treatment of female urethral syndrome refractory to antibiotics. *Yonsei Medical Journal*, 43(5), 644-651.

Yu, F., Tang, X., Pei, M. Facile synthesis of PDMAEMA-coated hollow mesoporous silica nanoparticles and their pH-responsive controlled release. (2013). *Microporous and mesoporous materials*, 173, 64-69.

Yu, L. P., Zhang, X., Wei, D. X., Wu, Q., Jiang, X. R., Chen, G. Q. (2019). Highly efficient fluorescent material based on rare-earth-modified polyhydroxyalkanoates. *Biomacromolecules*, 20(9), 3233-3241.

Yu, Q; Li, J; Zhang, Y; Wang, Y; Liu, L; Li, M. Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells. **(2016)**. *Scientific Reports*, 6 (1), 1-14.

Zhang, J., Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., da Silva, L. F., Chen, G. Q. **(2018)**. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering: C*, 86, 144-150.

Zhang, W; Guo, Y.W; Krohn, K. Macropodumines A-C: Novel Pentacyclic Alkaloids with an Unusual Skeleton or zwitterion Moiety from *Daphniphyllum macropodum*. **(2006)**. *Miq. Chemistry-A European Journal*, 12 (19), 5122-5127.

Zhao, H., Zhang, H. M., Chen, X., Li, T., Wu, Q., Ouyang, Q., Chen, G. Q. **(2017)**. Novel T7-like expression systems used for *Halomonas*. *Metabolic engineering*, 39, 128-140.

Zhao, Y. H., Li, H. M., Qin, L. F., Wang, H. H., Chen, G. Q. **(2007)**. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS microbiology letters*, 276(1), 34-41.

Zheng, G., Wang, C., Pei, A., Lopez, J., Shi, F., Chen, Z., ... & Cui, Y. High-performance lithium metal negative electrode with a soft and flowable polymer coating. **(2016)**. *ACS Energy Letters*, 1(6), 1247-1255.

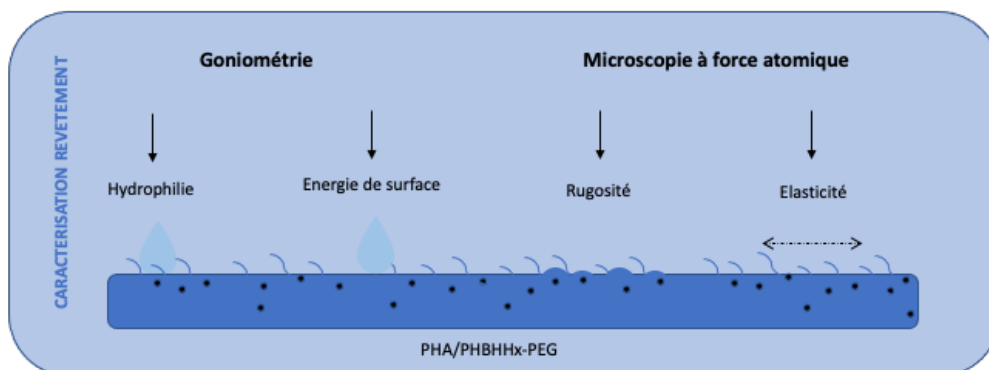
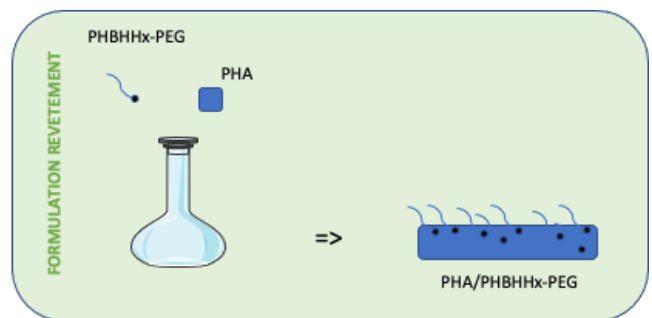
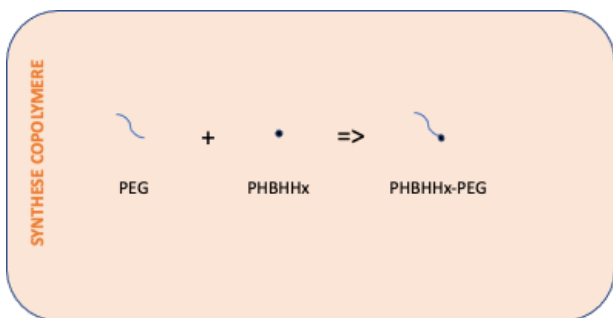
Zheng, Y., Chen, J. C., Ma, Y. M., Chen, G. Q. **(2020)**. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic engineering*, 58, 82-93.

Zinn, M., Witholt, B., Egli, T. **(2001)**. Occurrence, synthesis, and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced drug delivery reviews*, 53(1), 5-21.

Zou, H., Shi, M., Zhang, T., Li, L., Li, L., Xian, M. **(2017)**. Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(20), 7417-7426.

# Chapitre 2

## Synthèse, formulation et caractérisation des revêtements





## Table des matières

<b>I. Le copolymère PHBHHx-PEG</b>	<b>89</b>
1. Synthèse	89
2. Caractérisation	89
<b>II. Le poly(hydroxyalcanoate) à moyennes chaînes</b>	<b>92</b>
1. Production	92
2. Caractérisation	93
a) Composition	93
(i) Résonance magnétique nucléaire du proton	93
(ii) Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	94
(iii) Chromatographie par perméation de gel	95
b) Propriétés thermiques par analyse enthalpique différentielle	95
<b>III. Formulation et dépôt des revêtements</b>	<b>96</b>
1. Les revêtements à base de PHA	98
2. Les revêtements à base de PDMS	98
<b>IV. Caractérisation des revêtements</b>	<b>99</b>
1. Hydrophile	99
2. Energie de surface selon Owen-Wendt-Kaeble	102
3. Caractérisation mécanique par microscopie à force atomique	105
a) La rugosité	106
b) L'élasticité	111
<b>V. Partie expérimentale</b>	<b>115</b>
<b>VI. Références bibliographiques</b>	<b>121</b>

## Table des illustrations

### Figures

- Figure 01.** Spectre RMN <sup>1</sup>H PHBHHx (A), du PHBHHx insaturé (B) et du copolymère PHBHHx-PEG. (p.90)
- Figure 02.** Chromatogramme du PHBHHx (A1), du PHBHHx insaturé (A2), du copolymère PHBHHx-PEG (B3) et du PEG (B4). (p.91)
- Figure 03.** Spectre DRX du PHBHHx avec terminaison alkyle (A), du PEGSH (B) et du copolymère PHBHHx-PEG (C). (p.92)
- Figure 04.** Spectre RMN du PHA<sub>mcl</sub> produit par la souche *Pseudomonas raguenessi* à partir d'huile de coprah à 10g/L. (p.93)
- Figure 05.** Schéma de fragmentation obtenu en CG/SM à partir d'esters méthyliques triméthylsilylés de 3-hydroxyalcanoates. (p.94)
- Figure 06.** Spectre de fragmentation de l'ester méthylique triméthylsilylé de 3-hydroxyoctanoate (3HO). (p.95)
- Figure 07.** Analyse enthalpique différentielle du PHA<sub>mcl</sub>. (p.96)
- Figure 08.** Photographie d'un film de PHBHV sur une lame de verre 18X18X1mm. (p.98)
- Figure 09.** Illustration schématique de la définition d'un angle de contact statique. (p.100)
- Figure 10.** Les différents états d'une goutte en contact avec une surface plane. (p.100)
- Figure 11.** Angle de contact avec l'eau des revêtements étudiés. (p.101)
- Figure 12.** Schéma montrant la modélisation des forces de cohésion entre les molécules à la surface et au sein d'un liquide. (p.102)
- Figure 13.** Image AFM 3D (en mode hauteur) de la surface d'un revêtement de PHBHV montrant les structures cristallines en forme de sphérulites (20 μm x 20 μm). (p.107)
- Figure 14.** Image AFM 3D (en mode hauteur) de la surface de (A) un revêtement PHBHV (5 μm x 5 μm), (B) un revêtement PDMS (1 μm x 1 μm) et (C) un revêtement PHA<sub>mcl</sub> (5 μm x 5 μm). (p.108)
- Figure 15.** Image AFM 3D (en mode hauteur) et son profil de hauteur pour (A) PHBHV/PHBHHx-PEG, (B) PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG et (C) PDMS/PDMS-PEG. (p.109)
- Figure 16.** Évolution de la rugosité en fonction de l'aire scannée pour les différents revêtements. (p.110)
- Figure 17.** Images AFM en mode module et son profil de module correspondant pour la surface de (A) PHBHV (5μm x 5μm), (B) PDMS (1μm x 1μm) et (C) PHA<sub>mcl</sub> (2,5μm x 2,5μm). L'échelle des modules est exprimée en (A) GPa et (B) (C) MPa. (p.112)
- Figure 18.** Évolution du module d'élasticité (MPa) en fonction des différents revêtements étudiés. (p.113)

## Tableaux

- Tableau 01.** Caractéristiques du PHBHHx, du PEGSH et du PHBHHx-PEG déterminés par  $^1\text{H}$  RMN<sup>a</sup>, SEC<sup>b</sup> et DSC<sup>c</sup>. (p.91)
- Tableau 02.** Récapitulatif des données sur les matériaux utilisés. (p.96)
- Tableau 03.** Origine commerciale des polymères ou copolymères utilisés dans cette étude. (p.96)
- Tableau 04.** Noms et compositions des revêtements formulés. (p.97)
- Tableau 05.** Energie de surface, composantes dispersives, polaires, acide et basique de l'eau et du diiodométhane. (p.103)
- Tableau 06.** Récapitulatif contenant les énergies de surface des revêtements étudiés selon la méthode d'Owens-Wendt avec des combinaisons de solvants différentes. (p.104)
- Tableau 07.** Récapitulatif des résultats obtenus en RMS et  $h_{\text{max}}$  à différentes aires pour les revêtements étudiés. (p.110)
- Tableau 08.** Récapitulatif des données physiques obtenues pour les systèmes étudiés dans cette étude ainsi que pour les systèmes décrits dans la littérature. (p.113)
- Tableau 09.** Récapitulatif des données obtenues dans ce chapitre en fonction des différents revêtements. (p.114)

## Schéma

- Schéma 01.** Synthèse du copolymère PHBHHx-PEG. (p.89)





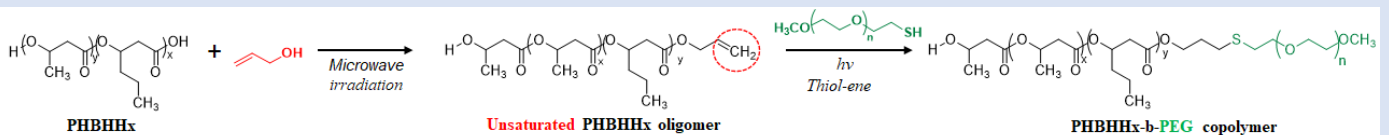
Les objectifs de ce chapitre sont (i) de synthétiser un copolymère PHA-PEG, (ii) de formuler des revêtements en intégrant ce copolymère et (iii) de caractériser les revêtements en fonction des principaux paramètres connus pour être impliqués dans la bioadhésion, à savoir l'hydrophilie, l'énergie de surface, la rugosité et l'élasticité.

## I. Le copolymère PHBHHx-PEG

### 1. Synthèse

L'intégralité de cette partie a été réalisée à l'Institut de Chimie des Matériaux de Paris Est (ICMPE). Pour la synthèse du copolymère PHA-PEG, il a été choisi d'utiliser le PHBHHx (poly-3(hydroxybutyrate)-co-3-(hydroxyhexanoate)). Ce dernier, ayant une structure intermédiaire entre les PHA<sub>scf</sub> (courtes chaînes) et les PHA<sub>mcl</sub> (moyennes chaînes), permet une meilleure compatibilité avec les matrices PHA utilisées dans cette étude (PHBHV et PHA<sub>mcl</sub>). De ce fait, les revêtements PHA seront formulés avec un seul et même copolymère.

La synthèse de l'oligomère PHBHHx ayant un groupe terminal alcène est réalisée en une étape, par une réaction de transestérification en présence d'alcool allylique sous irradiation micro-ondes pendant 15 min (**Schéma 01**).

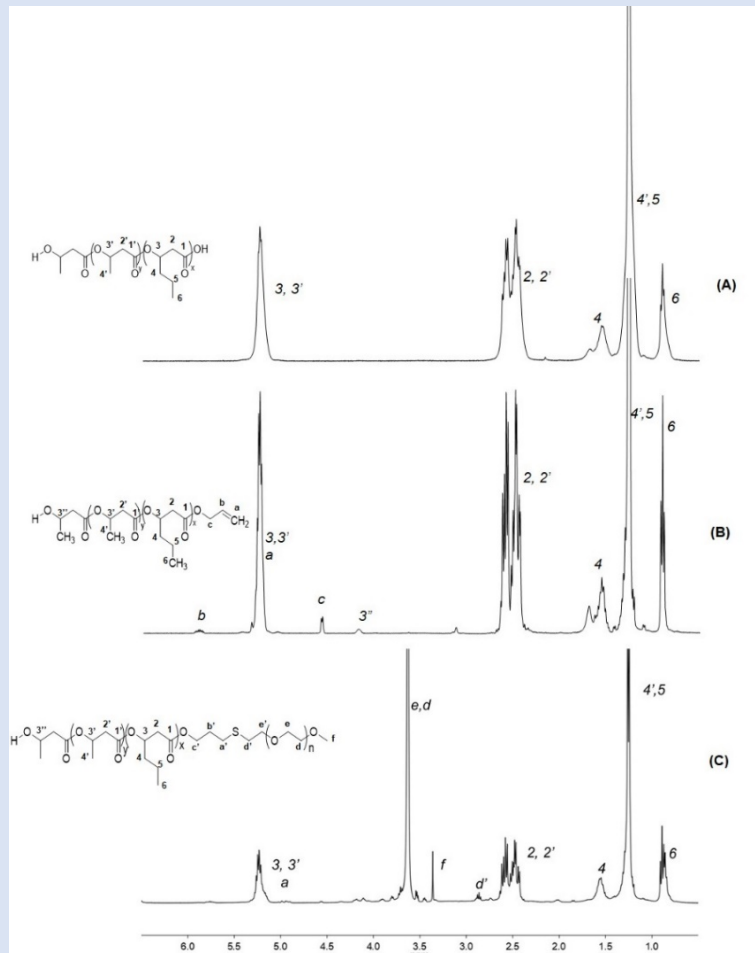


**Schéma 01.** Synthèse du copolymère PHBHHx-PEG.

### 2. Caractérisation

La présence du groupe insaturé sur l'oligomère PHBHHx a été confirmée par <sup>1</sup>H NMR dans du CDCl<sub>3</sub> (**Figure 01**). Les signaux à 4,5 ppm et 5,8 ppm sont caractéristiques du méthylène (H<sub>c</sub>) et du méthine (H<sub>b</sub>) du groupe terminal insaturé. La présence de ces signaux caractéristiques de l'éthylène glycol permet de confirmer la présence de la fonction alcène à l'extrémité du PHBHHx. La masse molaire du PHBHHx insaturé est déterminée en utilisant le rapport des intégrations des signaux à 2,5 ppm (2, 2') caractéristiques de CH<sub>2</sub> et à 5,8 ppm =CH ; elle est

d'environ  $5\ 600\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Ensuite, le copolymère PHBHx-PEG a été synthétisé par une réaction thiol-ène en utilisant du PEG thiolé (PEGSH) ( $2000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) en présence d'acétate de médroxyprogestérone (DMPA) en tant que photoinitiateur et du 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophène en tant que photoamorceur.



**Figure 01.** Spectre RMN 1H PHBHx (A), du PHBHx insaturé (B) et du copolymère PHBHx-PEG.

Les masses molaires ont également été déterminées par SEC (**Figure 02, Tableau 01**). La masse molaire des oligomères déterminée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est légèrement plus élevée que la masse molaire déterminée par RMN. Ceci a été précédemment observé dans le cas des polyhydroxyalcanoates en raison de l'étalonnage à base de standards polystyrène qui surestime leurs masses molaires. La masse molaire du copolymère PHBHx-*b*-PEG est plus importante que la masse molaire de l'oligomère attestant de la formation du copolymère. Néanmoins, les chromatogrammes ont montré la présence de PEG libre même après la purification par dialyse. Le spectre du PHBHx-*b*-PEG a révélé la présence des groupes

méthylène et méthyle du PEG à 3,6 ppm ( $H_{e,d}$ ) et méthoxy à 3,4 ppm ( $H_f$ ) respectivement (Figure 01c).

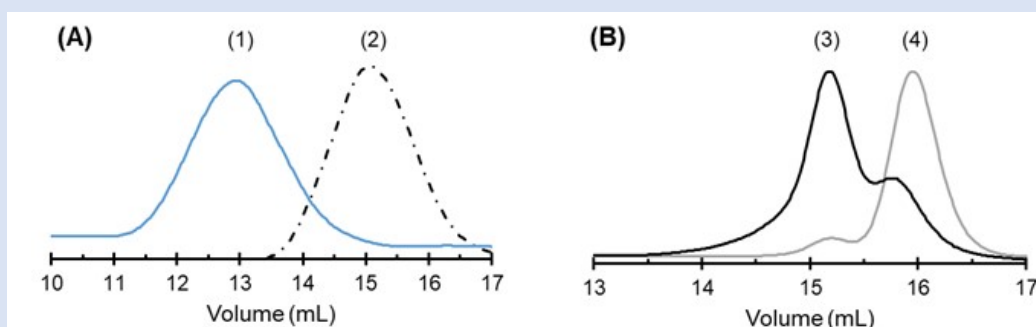
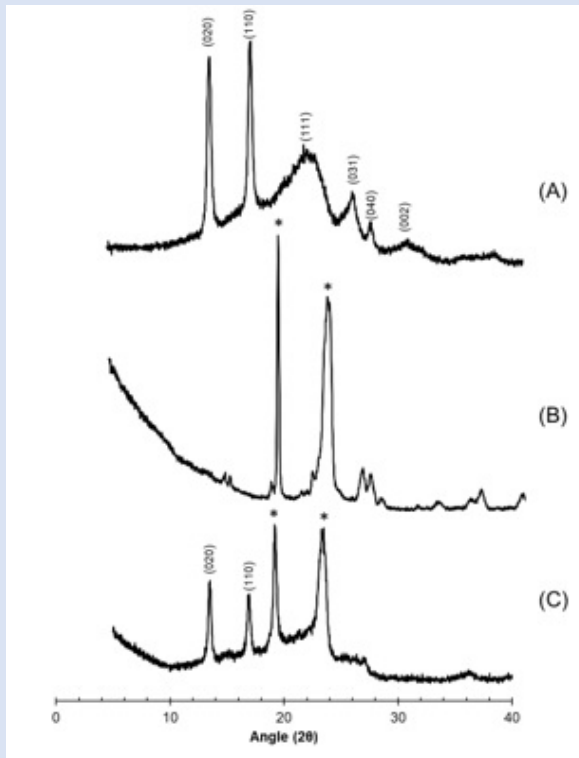


Figure 02. Chromatogramme du PHBHHx (A1), du PHBHHx insaturé (A2), du copolymère PHBHHx-PEG (B3) et du PEGSH (B4).

La disparition du groupe terminal insaturé des oligomères de PHBHHx confirme qu'il n'y a plus d'oligomères libres de PHBHHx. L'interaction entre le PEGSH libre et le copolymère semble être assez forte pour garder une partie du PEGSH piégé dans le copolymère. Par conséquent, le processus de dialyse n'est pas suffisant pour éliminer toutes les chaînes de PEGSH libres qui interagissent certainement avec le bloc PEG du copolymère. En comparant les intégrations du pic  $H_f$  à 3,4 ppm et 2, 2' à 2,5 ppm, la quantité de PEGSH libre est d'environ 30% w/w. La température de transition vitreuse du copolymère a été mesurée à  $-10,4^\circ\text{C}$  (Tableau 01) et la structure cristalline a été confirmée par analyse de diffraction des rayons X (Figure 03). L'oligomère de PHBHHx est semi-cristallin de structure orthorhombique ( $P2_12_12_1$ ) avec  $a = 5,68 \text{ \AA}$ ,  $b = 13,03 \text{ \AA}$  et  $c = 5,90 \text{ \AA}$  (Padermshoke *et al.* 2004). Le PEGSH étant également un polymère semi-cristallin, le copolymère PHBHHx-PEG présente les structures cristallines des deux blocs (Figure 03).

Tableau 01. Caractéristiques du PHBHHx, du PEGSH et du PHBHHx-PEG déterminés par  $^1\text{H}$  RMN<sup>a</sup>, SEC<sup>b</sup> et DSC<sup>c</sup>. D'après Guennec *et al.*, 2021.

	$M_n(\text{g}\cdot\text{mol}^{-1})^a$	$M_n(\text{g}\cdot\text{mol}^{-1})^b$	$I_p^b$	$T_g(^{\circ}\text{C})^c$	$T_m(^{\circ}\text{C})^c$	$\Delta H(\text{J}\cdot\text{g}^{-1})^c$
PHBHHx	5 600	7 200	1.7	-10.8	91.0	51.1
PEGSH	2 130	3 750	1.2	not detected	54.0	178.3
PHBHHx-b-PEG	-	9 230	1.6	-10.4	91.2 52.1	11.8 84.0



**Figure 03.** Spectre DRX du PHBHHx avec terminaison alkyle (A), du PEGSH (B) et du copolymère PHBHHx-PEG (C).

## II. Le poly(hydroxyalcanoate) à moyennes chaînes

L'intégralité de ce travail a été réalisée dans le cadre de la co-direction de thèse avec le laboratoire de microbiologie des environnements extrêmes (LM2E) de l'IFREMER sur le site de Plouzané.

### 1. Production

Le PHA<sub>mcl</sub> utilisé dans cette étude a été produit par fermentation bactérienne à l'aide de la souche *Pseudomonas ragueressi* cultivée en présence d'huile de coprah à 10 g/L (Simon-Colin *et al.*, 2012). Le descriptif précis des conditions expérimentales est présenté dans la partie expérimentale de ce chapitre.

## 2. Caractérisation

### a) Composition

#### (i) Résonance magnétique nucléaire du proton (RMN $^1\text{H}$ )

L'analyse RMN  $^1\text{H}$  du polymère produit par la souche TE9 à partir d'un mélange d'huile de coprah permet de caractériser un PHA<sub>mcl</sub> saturé (Figure 04). Les signaux de résonance du multiplet centré sur 2,5 ppm sont attribués aux protons méthylènes ( $\text{CH}_2$ ) et le signal à 5,17 ppm correspond au proton méthine ( $\text{CH}$ ) de la chaîne principale. Le signal situé à 1,58 ppm est caractéristique des protons méthylènes ( $\text{CH}_2$ ) proches du carbone C4 des chaînes latérales. Le signal intense à 1,25 ppm est attribué aux autres protons méthylènes ( $\text{CH}_2$ ) constitutifs des chaînes latérales des PHA. Le triplet à 0,88 ppm est attribué aux protons du groupe méthyle terminal ( $\text{CH}_3$ ) des chaînes latérales.

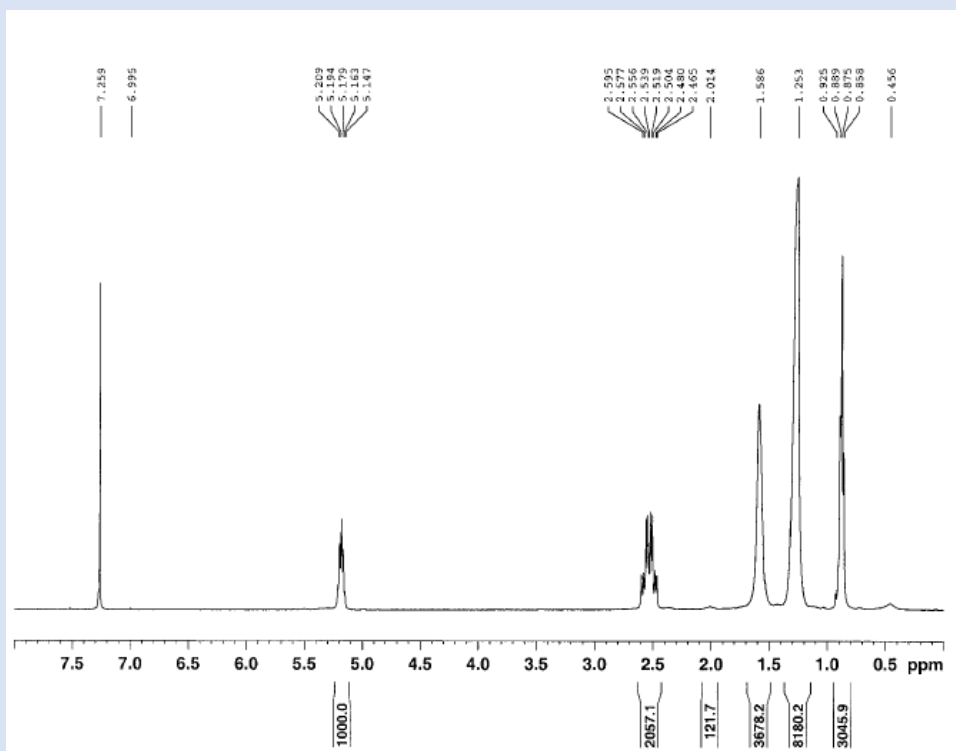
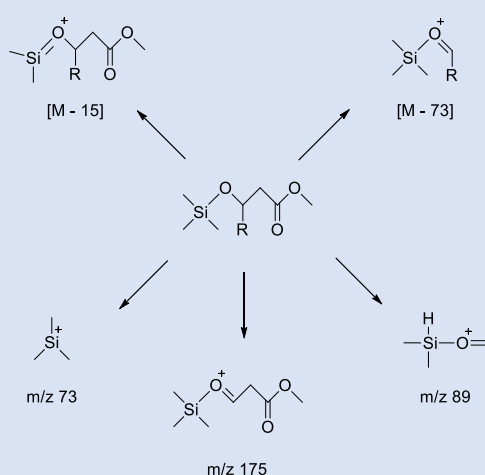


Figure 04. Spectre RMN du PHA<sub>mcl</sub> produit par la souche *Pseudomonas raguenessi* à partir d'huile de coprah à 10g/L.

(ii) Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

L'analyse par CG/SM permet de déterminer la composition monomérique des PHA. Les spectres de masse des esters méthyliques triméthylsilylés présentent les fragments caractéristiques  $[(CH_3)_3SiO^+=CHCH_2CO_2CH_3]$  à  $m/z$  175 et  $[RCH=O^+Si(CH_3)_3]$  à  $m/z$   $[M\bullet+73]$  résultant du clivage en  $\alpha$  du groupement hydroxyl triméthylsilylé. Les esters méthyliques triméthylsilylés ne présentent généralement pas d'ion moléculaire mais le fragment lié à l'ion moléculaire à  $m/z$   $[M\bullet+15]$  est assez intense et peut être utilisé pour déterminer la longueur de chaîne des monomères (**Figure 05**) (Simon-Colin *et al.*, 2012).



**Figure 05.** Schéma de fragmentation obtenu en CG/SM à partir d'esters méthyliques triméthylsilylés de 3-hydroxyalcanoates.

D'autres fragments de masses inférieures sont également caractéristiques du groupe fonctionnel 3-hydroxyle et facilement attribuables :  $m/z$  73  $[(CH_3)_3Si^+]$ ,  $m/z$  89  $[(CH_3)_3SiO^+]$ ,  $m/z$  131  $(C_5H_{11}SiO_2)^+$ ,  $m/z$  133  $(C_5H_{13}SiO_2)^+$  et  $m/z$  159  $(C_6H_{11}SiO_3)^+$  (**Figure 06**).

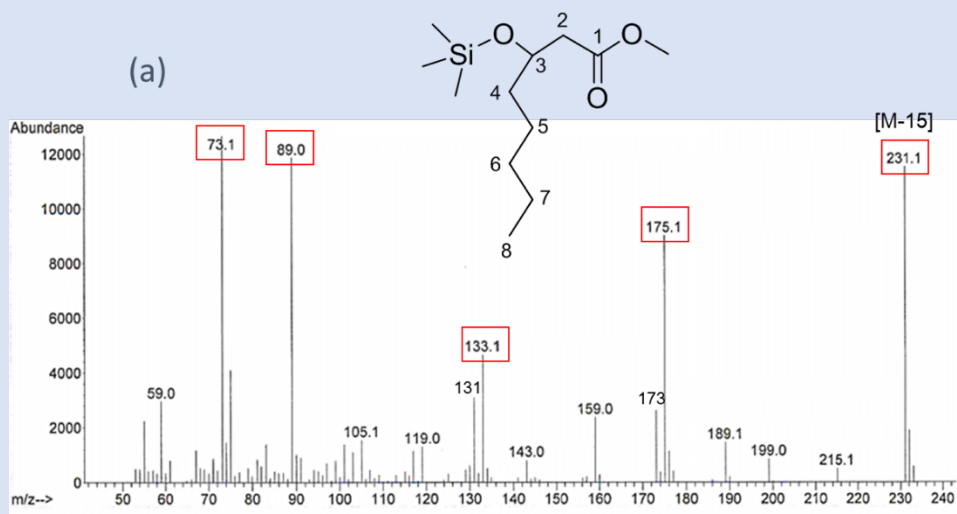


Figure 06. Spectre de fragmentation de l'ester méthylique triméthylsilylé de 3-hydroxyoctanoate (3HO).

Les analyses CG/SM ont donc permis de déterminer la composition monomérique suivante pour le PHA<sub>mcl</sub> produit par la souche *Pseudomonas raguenessi* cultivée en présence d'huile de coprah : 1,7 % 3-hydroxyhexanoate (3HHx), 48,8% 3-hydroxyoctanoate (3HO), 36% 3-hydroxydecanoate (3HD), et 13,5% 3-hydroxydodecanoate (3HDD).

(iii) Chromatographie par perméation de gel (CPG)

L'analyse en Size Exclusion Chromatography Multi-Angle Laser Light Scattering (SEC-MALLS) du PHA<sub>mcl</sub> a permis de déterminer un poids moléculaire de 360 000 g.mol<sup>-1</sup> et un indice de polydispersité de 1,4.

b) Propriétés thermiques par analyse enthalpique différentielle (AED)

Les expériences d'analyse enthalpique différentielle montrent le caractère moins cristallin du PHA<sub>mcl</sub> dont le point de fusion  $T_m$  est de 45-50°C, la température de transition vitreuse  $T_g$  autour de -45°C et le  $\Delta H \approx 15$  J/g.



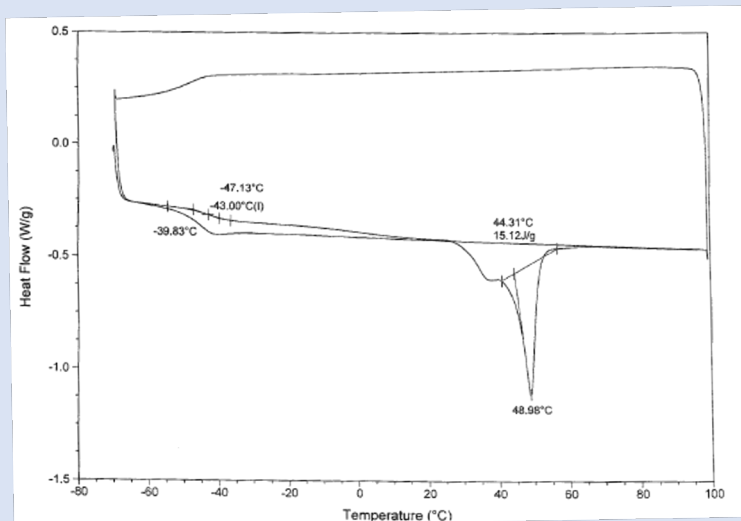


Figure 07. Analyse enthalpique différentielle du PHA<sub>mcl</sub>.

### III. Formulation des revêtements

Pour la formulation des revêtements étudiés dans ce travail, d'autres polymères ont été utilisés : le PHBHV, le PDMS et le copolymère PDMS-PEG. Ces derniers sont des polymères commerciaux, leur origine et données sont présentées dans les **Tableaux 02 et 03**.

**Tableau 02.** Origine commerciale des polymères ou copolymères utilisés dans cette étude.

	PHBHV	PDMS	PDMS-PEG
Origine et / ou composition	Pacific Biotech 70% HB 30% HV	Momentive performance materials RTV-615	Momentive performance materials Coatosil 7602

**Tableau 03.** Récapitulatif des données sur les matériaux utilisés.

Matériaux	Source	Mw (g.mol <sup>-1</sup> )	I	Tg (°C)	% XC (ΔH) (J/g)
PDMS	Momentive performance materials	-	-	- 100	-
PHBHV	Pacific Biotech	-	-	0	-
PHA <sub>mcl</sub>	LM2E (IFREMER)	360 000	1,4	-45	15,12

Neuf revêtements différents ont été préparés et étudiés dans ce travail : trois revêtements à base de PDMS (PDMS, PDMS/PEG et PDMS/PDMS-PEG), trois revêtements à base de PHBHV (PHBHV, PHBHV/PEG et PHBHV/PHBHHx-PEG) et trois revêtements à base de PHA<sub>mcl</sub> (PHA<sub>mcl</sub>, PHA<sub>mcl</sub>/PEG et PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG).

La même proportion, en masse, de PEG (libre ou sous sa forme copolymère) a été introduite dans chaque revêtement modifié à base de PHA, comme présenté dans le **Tableau 04**. Cette proportion a été déterminée expérimentalement de façon que, d'une part, l'ajout de PEG n'affecte pas les capacités filmogènes des revêtements et d'autre part, en tenant compte de la faible disponibilité du copolymère PHBHHx-PEG.

**Tableau 04.** Noms et compositions des revêtements formulés.

	PHBHV (% masse)	PEG (% masse)	PHBHHx-PEG (%masse)
PHBHV	10	-	-
PHBHV/PEG	10	0,3	-
PHBHV/PHBHHx-PEG	10	-	0,1
	PHA <sub>mcl</sub> (% masse)	PEG (% masse)	PHBHHx-PEG (% masse)
PHA <sub>mcl</sub>	10	-	-
PHA <sub>mcl</sub> /PEG	10	0,3	-
PHA <sub>mcl</sub> /PHBHHx-PEG	10	-	0,1

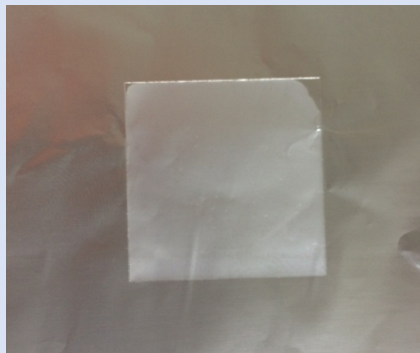
	PDMS (% masse)	PEG (% masse)	PDMS-PEG (% masse)
PDMS	50	-	-
PDMS/PEG	50	0,1	-
PDMS/PDMS-PEG	50	-	0,01

En ce qui concerne la proportion de PEG au sein des matrices PDMS, elle a été déterminée, d'une part expérimentalement et d'autre part, à l'aide des données décrites dans la littérature (Hawkins *et al.*, 2014 ; Lu *et al.*, 2019).

L'extrait sec de PHBHV et de PHA<sub>mcl</sub> a été limité à 10% puisqu'au-delà les capacités filmogènes étaient altérées (présence de microfissures sur le film).

### 1. Les revêtements à base de PHA

Les PHA ont été dissous dans du dichlorométhane (10%) sous reflux pendant 2h à 65°C. À l'issue, environ 500 µL de la solution obtenue ont été coulés sur une lame de verre précédemment nettoyée à l'éthanol. Le dépôt a été effectué manuellement à l'aide d'une micropipette. Chaque lame a ensuite été recouverte d'un couvercle de boîte de Pétri afin d'éviter une évaporation de solvant trop rapide. Après 1 semaine de séchage à T° ambiante, les lames contenant les revêtements ont été récupérées afin de réaliser les analyses décrites dans les différents chapitres de ce manuscrit.



**Figure 08.** Photographie d'un film de PHBHV sur une lame de verre 18X18X1mm.

### 2. Les revêtements à base de PDMS

Le PDMS commercial RTV-615 (Momentive performance materials) est composé de deux solutions A et B. La solution A constitue le réseau élastomère tandis que la solution B permet la réticulation du réseau. Ces deux solutions (1/10<sup>ème</sup> de solution B pour 1 de solution A) sont dissoutes dans du dichlorométhane (50%) sous agitation à T° ambiante pendant 1 heure. Environ 500 µL de la solution obtenue sont coulés sur lame de verre précédemment nettoyée

à l'éthanol. Le dépôt est également effectué manuellement à l'aide d'une micropipette. De la même façon que pour les revêtements à base de PHA, un couvercle de boîte de Pétri est placé sur chaque lame de verre de façon à éviter une évaporation trop rapide du solvant. Les revêtements à base de PDMS sont récupérés après 1 semaine de séchage à T° ambiante.

L'épaisseur des revêtements a été mesurée sur film sec par ultrasons (Elcometer® 456) et a permis d'estimer une épaisseur moyenne des revêtements formulés : 50 µm pour les revêtements à base de PHA et 100 µm pour les revêtements à base de PDMS.

#### IV. Caractérisation des revêtements

Comme vu dans la partie bibliographique, l'hydrophilie, l'énergie de surface, la rigidité et la rugosité d'une surface sont des paramètres essentiels qui déterminent les propriétés anti-adhésion d'un revêtement (Agrawal *et al.*, 2017 ; Lejars *et al.*, 2012). La caractérisation des propriétés mécaniques et physico-chimiques (énergie interfaciale et rugosité) est donc nécessaire pour mieux comprendre le comportement anti-adhésif ou fouling-release (FR) des revêtements.

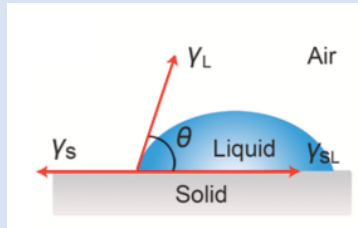
##### 1. Hydrophilie

Ainsi, dans un premier temps, l'hydrophobie/hydrophilie des différents revêtements a été étudiée par mesures d'angle de contact avec l'eau.

La mouillabilité est la propriété d'une surface à interagir avec un liquide donné (Berg, 1993). Elle peut être évaluée par la mesure d'angles de contact entre des liquides et une surface. Young a relié l'angle de contact aux énergies interfaciales  $\gamma$  (ou tension de surface) mises en jeu selon l'équation (Young, 1805) (**Figure 09**) :

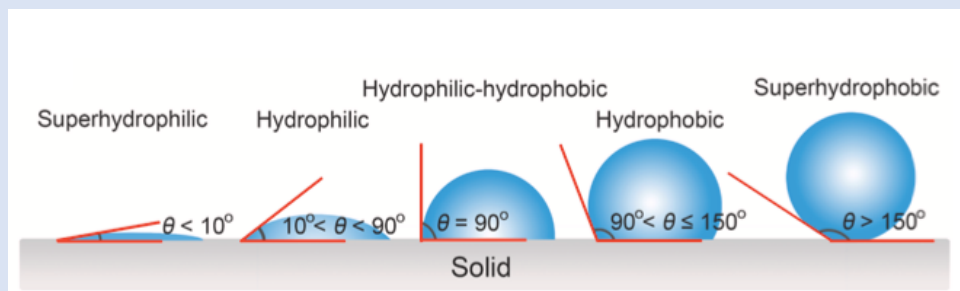
$$(1) \quad \cos \theta = \frac{\gamma_S - \gamma_{SL}}{\gamma_L}$$

Où  $\gamma_S$ ,  $\gamma_{SL}$  et  $\gamma_L$  sont les tensions de surface solide/gaz, solide/liquide et liquide/gaz respectivement ;  $\theta$  est l'angle de contact.



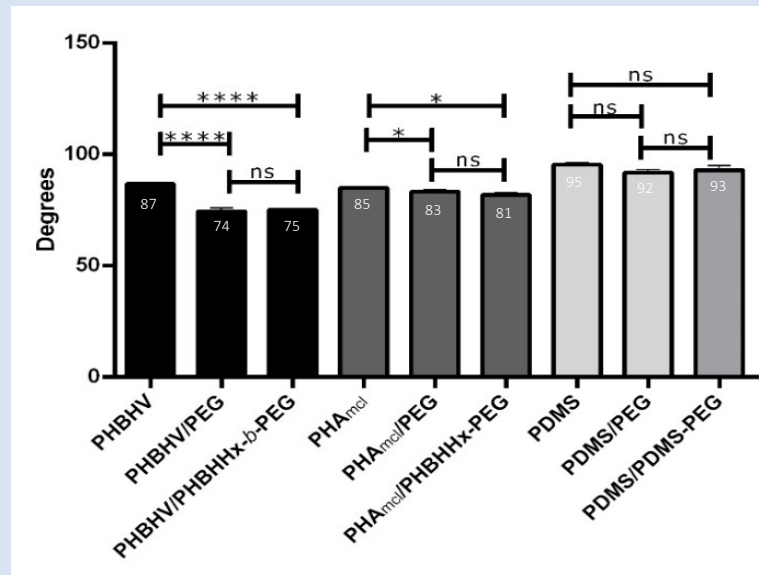
**Figure 09.** Illustration schématique de la définition d'un angle de contact statique. Avec  $\gamma_S$ ,  $\gamma_{SL}$  et  $\gamma_L$  sont les tensions de surface solide/gaz, solide/liquide et liquide/gaz respectivement ;  $\theta$  est l'angle de contact.

La **Figure 10** montre cinq configurations d'une goutte d'eau en contact avec des surfaces planes. Il est communément admis que si l'angle de contact est inférieur à  $10^\circ$ , la surface est définie comme superhydrophile, s'il est compris entre  $10^\circ$  et  $90^\circ$ , la surface est considérée comme hydrophile, s'il est compris entre  $90^\circ$  et  $150^\circ$ , la surface est hydrophobe et au-delà de  $150^\circ$  la surface est dite superhydrophobe (Israelachvili, 2011).



**Figure 10.** Les différents états d'une goutte d'eau en contact avec une surface plane.

Les mesures d'angles de contact avec l'eau pour les neuf revêtements étudiés sont présentées dans la **Figure 11**. On observe que les revêtements à base de PHBHV et  $PHA_{mcl}$ , avec un angle de contact de  $87^\circ$  et  $85^\circ$  respectivement, sont légèrement moins hydrophobes que les revêtements de PDMS (angle de contact de  $95^\circ$ ). Ces mesures sont en accord avec les données de la littérature pour les deux polymères (Insomphum *et al.* 2017 ; Gillet *et al.* 2018). Pour les revêtements à base de PHBHV et de  $PHA_{mcl}$ , l'ajout de PEG, que ce soit sous sa forme libre ou sous sa forme copolymère, réduit l'angle de contact avec l'eau entre 5 et  $10^\circ$ , avec un effet plus marqué sur le PHBHV. Aucune différence statistique d'angle de contact avec l'eau ne peut être notée entre les revêtements contenant le PEG sous forme libre et le PEG sous forme de copolymère (PHBHHx-PEG).

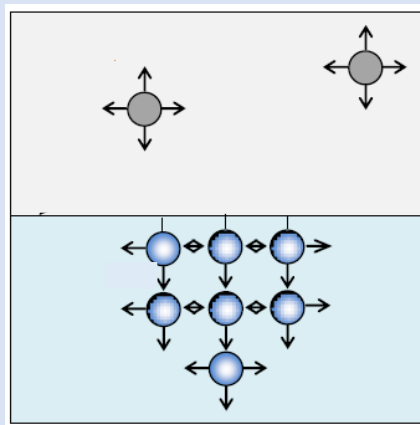


**Figure 11.** Angle de contact avec l'eau des revêtements étudiés. Mesuré par la méthode de la goutte sessile. n = 20. \*\*\*\* indique p < 0,0001 et ns indique non-significatif.

En ce qui concerne les revêtements PDMS, l'ajout de PEG libre ou de copolymère PDMS-PEG, ne modifie pas statistiquement l'angle de contact avec l'eau, par rapport au revêtement PDMS. Les résultats obtenus permettent d'observer, d'une part, un caractère moins hydrophobe du PHA par rapport au PDMS et d'autre part, un caractère hydrophile des systèmes après l'ajout de PEG et ce uniquement pour les matrices PHA. Les résultats ont également montré une différence d'amphiphilie entre les deux systèmes PHA ; l'effet amphiphile étant plus marqué avec le PHBHV plutôt qu'avec le PHA<sub>mcl</sub>. L'une des raisons pouvant expliquer ce phénomène réside dans la différence de cristallinité des deux PHA utilisés. En effet, une étude a montré que le PEG co-cristallisait avec le PHBHV, conduisant à la formation de sphérolites concentriques (Liu *et al.*, 2013). Cela pourrait donc expliquer la raison pour laquelle davantage de PEG semble présent en surface du revêtement PHBHV par rapport au PHA<sub>mcl</sub>.

## 2. Energie de surface selon Owen-Wendt-Kaeble

Les forces de cohésion entre les molécules d'un liquide sont responsables de la tension de surface. Les molécules au sein du liquide sont en effet soumises à des forces attractives égales (en moyenne) dans toutes les directions, alors que celles situées à la surface du liquide échangent moins d'interactions (**Figure 12**) Ce déficit de liaisons est à l'origine de la tension de surface d'un liquide et de l'augmentation de l'énergie de sa surface (Bouasse, 1924 ; Poincaré, 1895).



**Figure 12.** Schéma montrant la modélisation des forces de cohésion entre les molécules à la surface et au sein d'un liquide. *D'après Yanpeng, 2014.*

En considérant l'ensemble des interactions moléculaires entre le liquide et la surface, plusieurs modèles ont été proposés et permettent de diviser l'énergie de surface d'un matériau en différentes composantes (dispersives, non dispersives, Lifshitz-van der Waals ou acide-base). Cette énergie interfaciale, ou tension de surface, peut être déduite des mesures par angle de contact avec différents liquides de référence.

Dans le modèle d'Owen-Wendt-Kaeble, les énergies de surfaces des liquides et des solides sont séparées en deux composantes, l'une dite dispersive  $\gamma^d$  et l'autre polaire  $\gamma^p$  telle que :

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p$$

L'énergie interfaciale est la somme des composantes dispersives et polaires et peut s'écrire comme une moyenne géométrique de ces composants.

$$(2) \quad \gamma_L \cdot (1 + \cos(\theta)) = 2\sqrt{\gamma_L^d \cdot \gamma_S^d} + 2\sqrt{\gamma_L^p \cdot \gamma_S^p}$$

Les composantes polaires et dispersives de la phase solide sont calculées à partir de mesures d'angle de contact réalisées à l'aide d'au moins deux liquides dont les composantes polaires et dispersives sont connues et très différentes. Très souvent, l'eau ou le formamide sont utilisés en tant que solvant polaire et le diiodométhane en tant que solvant apolaire. Selon le nombre et les liquides utilisés, des différences d'énergie interfaciales peuvent apparaître. C'est la raison pour laquelle, dans notre étude, nous avons testé différents liquides, ainsi que différentes associations de liquides, afin de se placer dans les mêmes conditions que celles décrites dans la littérature. L'objectif étant de pouvoir comparer et discuter les résultats obtenus lorsque cela est possible.

Les calculs d'énergie de surface ont été effectués dans ce travail avec différentes combinaisons de ces trois solvants : l'eau, le formamide, et le diiodométhane. Les composantes dispersives et polaires de ces trois solvants sont données dans le **Tableau 05**. Ces données permettent de résoudre l'équation (2) et de déterminer l'énergie de surface des revêtements étudiés (**Tableau 06**).

**Tableau 05.** Energie de surface, composantes dispersives, polaires, acide et basique de l'eau et du diiodométhane. *D'après Good, 1992.*

	Composante de l'énergie de surface (mJ/m <sup>2</sup> )				Energie libre de surface (mJ/m <sup>2</sup> )
	Composante polaire $\gamma_p$	Composante dispersive $\gamma_d$	Composante acide $\gamma^+$	Composante basique $\gamma^-$	
Eau	51	21,8	25,5	25,5	72,8
Diiodométhane	0	50,8	0	0	50,8
Formamide	19	39	2,28	39,6	58



**Tableau 06.** Récapitulatif contenant les énergies de surface des revêtements étudiés selon la méthode d'Owens-Wendt avec des combinaisons de solvants différentes.

	Energie de surface selon Owens-Wendt (mN/m)			
	Eau Diiodométhane	Formamide Diiodométhane	Eau Diiodométhane Formamide	
				$R^2$
PHBHV	47	46	42	0,80
PHBHV/PEG	51	47	43	0,85
PHBHV/PHBHHx-PEG	51	47	43	0,85
PHA <sub>mcl</sub>	39	37	30	0,74
PHA <sub>mcl</sub> /PEG	41	41	31	0,70
PHA <sub>mcl</sub> /PHBHHx-PEG	39	37	30	0,75
PDMS	31	36	22	0,54
PDMS/PEG	32	36	22	0,59
PDMS/PDMS-PEG	38	38	38	0,99

Comme attendu, des variations de l'énergie de surface sont observées en fonction d'une part, des solvants utilisés et d'autre part de la combinaison de solvants utilisés. En effet, alors qu'une légère différence (entre 0 et 5 mN/m) est obtenue entre le couple eau/diiodométhane et formamide/diiodométhane, une différence plus importante est observée lorsque l'on combine les trois solvants (entre 4 et 14 mN/m). Cette différence peut s'expliquer par la méthode de calcul puisqu'une régression linéaire est effectuée dans le cas de l'utilisation de trois solvants. Le coefficient de régression linéaire varie de 0,54 à 0,99 selon les revêtements testés (**Tableau 06**). Ces résultats obtenus questionnent sur la validité des résultats obtenus par régression linéaire lorsque le coefficient de corrélation s'éloigne fortement de 1 (cas des revêtements à base de PDMS).

L'obtention de ces données nous permet de comparer nos résultats à ceux obtenus dans la littérature. En ce qui concerne les PHA, Ji *et al.* ont obtenu des valeurs de 47 mN/m pour le PHBHV (5% HV,  $M_w$  400 kDa) et de 38 mN/m pour le PHBHHx (12% HHx,  $M_w$  440 kDa) en

utilisant le couple de solvant eau/diiodométhane. Si l'on compare avec nos résultats on constate que la valeur obtenue pour le PHBHV est la même (47 mN/m) et que celle obtenue pour le PHA<sub>mcl</sub> est quasi similaire à celle obtenue par Ji *et al.* pour le PHBHHx (39 mN/m) (Ji *et al.*, 2008). Sachant que le PHBHHx est considéré comme étant à la limite entre PHA à courtes chaînes et PHA à moyennes chaînes, cela semble cohérent que notre valeur obtenue pour le PHA<sub>mcl</sub> se rapproche de celle du PHBHHx.

En ce qui concerne les systèmes à base de PDMS, nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus dans la littérature puisque des études ont obtenu des valeurs de 20-22 mN/m (Majhy *et al.*, 2021 ; Wu *et al.*, 2019) pour le couple de solvants eau/diiodométhane. Cette différence s'explique par le fait que leurs valeurs d'angles de contact avec l'eau et le diiodométhane sont différentes de celles obtenues dans notre étude (85° vs 95° pour l'eau et 70° vs 58° pour le diiodométhane, respectivement). Il est important de souligner que ces différences de résultats peuvent être obtenus en raison des diverses méthodes de dépôt utilisés ainsi que par rapport aux différents degrés de réticulation des systèmes étudiés.

L'ajout de PEG au sein de nos revêtements n'a que très peu d'impact sur l'énergie de surface (+/- 4 mN/m) sauf en ce qui concerne le résultat obtenu pour le revêtement PDMS/PDMS-PEG avec les trois solvants (+ 16 mN/m). Cette différence s'explique par le fait que l'intégration du formamide dans le système de résolution d'équation modifie les composantes de l'énergie de surface.

Les calculs d'énergie de surface ont également été réalisés avec la méthode de Van Oss-Chaudury toutefois des résultats aberrants ont été obtenus, montrant que ce modèle n'est pas adapté aux systèmes formulés dans cette étude.

### 3. Caractérisation par microscopie à force atomique

La caractérisation mécanique des matériaux est fondamentale pour obtenir des informations sur leurs possibles applications. La dureté, l'élasticité, la plasticité et la résistance à la rupture sont des caractéristiques mécaniques couramment mesurées. Des techniques bien établies telles que les essais de traction, les essais de dureté ou l'analyse mécanique dynamique sont utilisées pour les déterminer (Fields & Wiederhorn, 2006). Cependant, étant donné que ces techniques nécessitent des échantillons de tailles importantes, elles ne peuvent pas être

réalisées sur nos films de polymères de quelques micromètres d'épaisseur. La microscopie à force atomique (AFM), avec le développement du mode Peak Force Quantitative Nanomechanical Measurements (PFQNM®), (Bruker, USA) a permis au début des années 2010 de sonder mécaniquement et à une échelle nanométrique toute sorte de matériaux sous forme de films, épais ou minces comme des polymères (Dokukin & Sokolov, 2012 ; Pittenberg *et al.*, 2010). Au cours de la dernière décennie, plusieurs études pionnières utilisant la cartographie nanomécanique AFM sur les polymères ont été publiées (Wang & Russell, 2018). Le module élastique est le paramètre le plus mesuré avec des valeurs variant dans une large gamme, de quelques kPa, par exemple, pour les hydrogels d'acide hyaluronique hydraté, à plusieurs GPa, par exemple, pour le polyméthacrylate de méthyle, le polyéthylène naphthalate, ou les polyimides oxydés (Passeri *et al.*, 2013 ; Suriano *et al.*, 2014). L'AFM est également utilisée pour l'étude mécanique de la microstructure des biopolymères et plus particulièrement des polyhydroxyalcanoates bactériens (PHA) (Nguyen *et al.*, 2016 ; Munir *et al.*, 2015 ; Jaggietto *et al.*, 2020 ; Rodriguez-Castellanos *et al.*, 2015 ; Bagatella *et al.*, 2022).

#### a) La rugosité

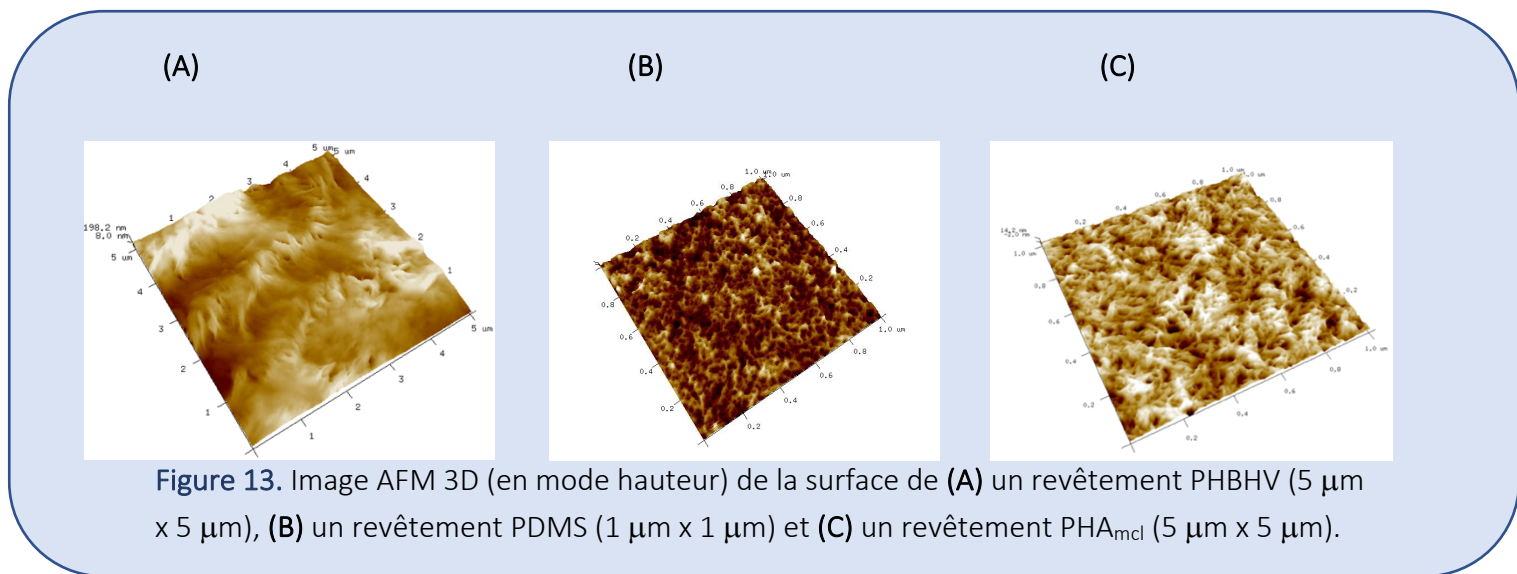
L'effet de la rugosité de surface sur l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms a largement été étudié. La rugosité de la surface augmente la surface disponible pour la fixation des microorganismes et fournit un support pour l'adhésion (Yoda *et al.*, 2014). De plus, les surfaces rugueuses peuvent protéger les microorganismes adhérents des forces de cisaillement empêchant ainsi leur libération (Bollen *et al.*, 1996). Par conséquent, le consensus général est que lorsque la rugosité de la surface augmente, l'adhésion et la formation de biofilms augmentent également (Xing *et al.*, 2015 ; Yu *et al.*, 2016 ; Yao *et al.*, 2020). Il est également important de rappeler que la rugosité peut impacter les mesures d'angle de contact en modifiant la forme de la goutte.

La rugosité de nos revêtements a été obtenue à partir des images AFM topographique. Préalablement à la mesure, les images sont soumises à un traitement (plane fit, ordre 1) afin de ramener l'image dans un plan horizontal (logiciel Nanoscope Bruker, USA). Les rugosités, moyennes (Ra) et quadratiques (RMS) sont ensuite obtenues selon les équations :

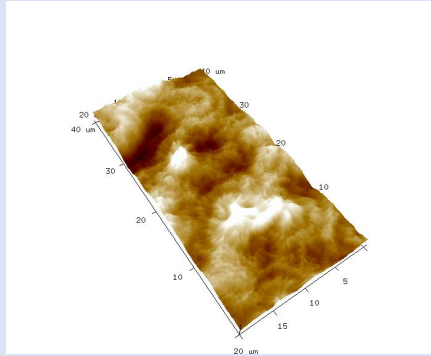
$$(8) \quad Rq(N,M) = \sqrt{\frac{1}{NM} \sum_{x=1}^N \sum_{y=1}^M (z(x,y) - \bar{z}(N,M))^2}$$

$$(9) \quad Ra(N,M) = \frac{1}{NM} \sum_{x=1}^N \sum_{y=1}^M (z(x,y) - \bar{z}(N,M))$$

Les paramètres de rugosité ont été déterminés pour des zones couvrant de 1 à 100  $\mu\text{m}^2$ . Les images obtenues en mode hauteur montrent des différences significatives de structure des polymères pour les trois types de revêtements (**Figure 13**).



Les revêtements de PHBHV présentent des caractéristiques bien différentes des deux autres revêtements étudiés. En effet, les images AFM, à grande échelle (10  $\mu\text{m}^2$  ou plus) révèlent que les macromolécules sont organisées en grandes sphérolites concentriques, comme décrit par Nguyen et Prud'homme (2018) (**Figure 14**).



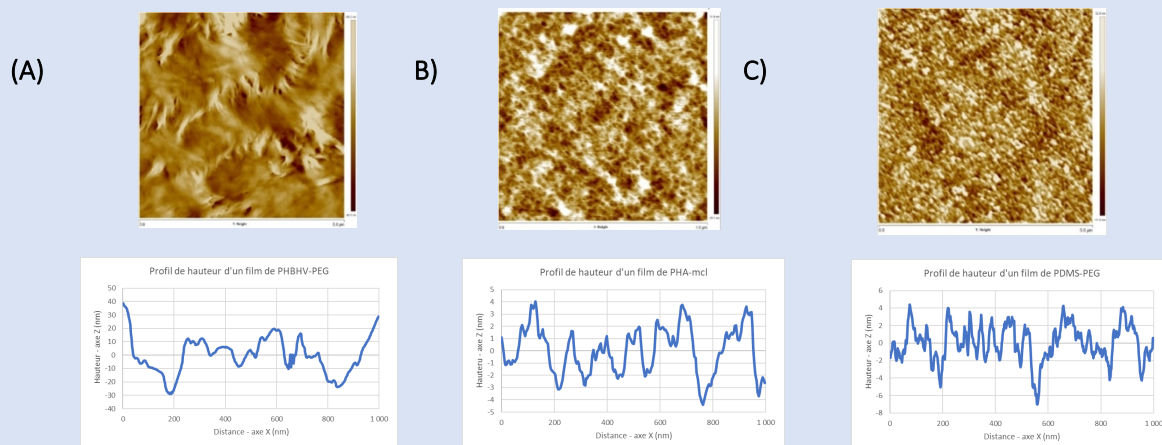
**Figure 14.** Image AFM 3D (en mode hauteur) de la surface d'un revêtement de PHBHV montrant les structures cristallines en forme de sphérolites (20  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$ ).

À partir de ces images, on observe que les diamètres des sphérolites varient entre 15 et 20  $\mu\text{m}$ , avec un espacement d'une crête à l'autre d'environ 2  $\mu\text{m}$ . Entre ces crêtes, les macromolécules de PHBHV sont organisées en longs cristallites avec des branches se développant dans une direction radiale (**Figure 14**).

Les revêtements de PDMS sont lisses, et montre une structure typique en forme de maille qui correspond à l'enchevêtrement des chaînes de PDMS. Les tailles de pores sont estimées entre 15-18 nm, en bon accord avec les valeurs de la littérature (Drebezghova *et al.* 2020) (**Figure 13B**). Enfin, les images AFM de la topographie des revêtements à base de PHA<sub>mcl</sub> montrent l'existence de structures cristallines, plus petites que pour le PHBHV, et formant un réseau organisé homogène.

Les données des revêtements contenant du PEG sont similaires à celles des revêtements de polymère brut, indiquant que l'ajout de PEG n'influence pas la topographie de surface des revêtements, à ces échelles et lorsqu'ils sont observés à l'état sec et dans des conditions ambiantes (50% RH, 23°C).

Ces différences de topographie de surface induisent inévitablement des différences en termes de rugosité de surface. Si l'on observe le profil de hauteur de la surface du revêtement à base de PHBHV, on constate que la présence des sphérolites induit des différences de hauteur pouvant atteindre 80 nm pour une surface de 25  $\mu\text{m}^2$  (**Figure 15A**). Les profils de hauteur de la surface des revêtements à base de PDMS et de PHA<sub>mcl</sub> sont très différents puisque les variations de hauteur sur les mêmes surfaces ne sont que de l'ordre de 10 nm (**Figure 15B et 15C**).



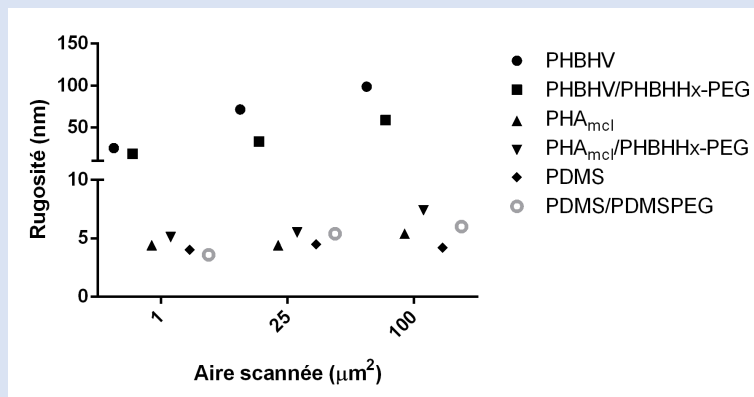
**Figure 15.** Image AFM 3D (en mode hauteur) et son profil de hauteur pour (A) PHBV/PHBHHx-PEG, (B) PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG et (C) PDMS/PDMS-PEG.

Le **Tableau 07** présente les rugosités des différents revêtements étudiés dans ce travail. On observe que les revêtements PHBV présentent une rugosité d'environ 25 nm à 1  $\mu\text{m}^2$  et jusqu'à 100 nm pour une aire de 100  $\mu\text{m}^2$ . Les valeurs de hauteur maximale varient également selon l'aire de la surface scannée et sont comprises entre 171 et 934 nm (pour 1 et 100  $\mu\text{m}^2$  respectivement). Ces variations de rugosité et de hauteur s'expliquent par la présence de cristallites de tailles importantes sur le PHBV. Les variations de rugosité, selon l'aire balayée, s'explique par les zones plus ou moins cristallisées observées. Ces variations de rugosité, en fonction de l'aire observée, ne sont pas observées sur les autres échantillons, démontrant ainsi l'homogénéité des films de PHA<sub>mcl</sub> et de PDMS (**Figure 16**). Pour les surfaces de PHA<sub>mcl</sub> et de PDMS, les rugosités des revêtements sont d'environ 3-6 nm sur des zones allant jusqu'à 100  $\mu\text{m}^2$ . De façon surprenante, le PHA<sub>mcl</sub>, bien que montrant des structures cristallines, présente une rugosité similaire au PDMS. Avec des rugosités de l'ordre de 5 nm, ces deux revêtements montrent des films plats et homogènes. Ces données sont en accord avec celle trouvée dans la littérature pour le PDMS (Drebezghova *et al.*, 2020).

**Tableau 07.** Récapitulatif des résultats obtenus en RMS et  $h_{\max}$  à différentes aires pour les revêtements étudiés.

Scan area ( $\mu\text{m}^2$ )	PHBHV		PHA <sub>mcl</sub>		PDMS	
	RMS (nm)	$h_{\max}$ (nm)	RMS (nm)	$h_{\max}$ (nm)	RMS (nm)	$h_{\max}$ (nm)
100	98,6 $\pm$ 19,1	934,2	5,4 $\pm$ 1,8	55,8	4,2 $\pm$ 0,2	40
25	71,4 $\pm$ 7,9	476	4,4 $\pm$ 1,5	37,1	4,5 $\pm$ 0,2	40
1	25,2 $\pm$ 5,6	171,2	4,4 $\pm$ 0,7	36,5	4 $\pm$ 0,2	40

Scan area ( $\mu\text{m}^2$ )	PHBHV/PHBHHx-PEG		PHA <sub>mcl</sub> /PHBHHx-PEG		PDMS/PDMS-PEG	
	RMS (nm)	$h_{\max}$ (nm)	RMS (nm)	$h_{\max}$ (nm)	RMS (nm)	$h_{\max}$ (nm)
100	58,6 $\pm$ 19,3	427	7,4 $\pm$ 0,8	101	6 $\pm$ 0,6	69,7
25	33 $\pm$ 6,5	263	5,5 $\pm$ 1,3	47,8	5,4 $\pm$ 0,4	49,8
1	18,5 $\pm$ 4	129	5,1 $\pm$ 1,1	41,3	3,6 $\pm$ 0,2	69,7



**Figure 16.** Évolution de la rugosité en fonction de l'aire scannée pour les différents revêtements.

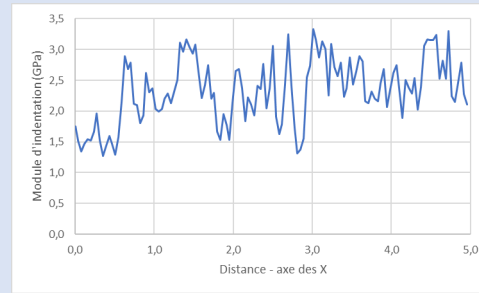
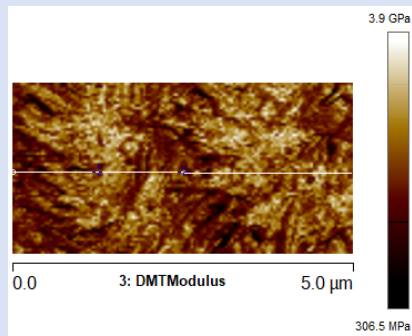
## b) L'élasticité

L'élasticité est un facteur important qui affecte l'adhésion bactérienne et la formation du biofilm (Brady *et al.*, 2000). Des études antérieures ont tenté de tester la relation entre l'adhésion bactérienne et l'élasticité de la surface. En utilisant du poly(éthylène glycol) diméthacrylate (PEGDMA) et des hydrogels d'agar comme surface et *E.coli* et *S.aureus* comme bactéries modèles, Kolewe *et al.* ont constaté que l'adhésion bactérienne augmentait avec la rigidité du matériau (Kolewe *et al.*, 2015). Une autre étude utilisant des hydrogels d'agarose a également démontré une corrélation positive entre l'adhésion et la rigidité (Guegan *et al.*, 2014). Cependant, des études utilisant du polydiméthylsiloxane (PDMS) ont, pour la plupart, montré une corrélation négative entre la rigidité et l'adhésion (Song & Ren, 2014 ; Song *et al.*, 2017 ; Song *et al.*, 2018 ; Straub *et al.*, 2019 ; Arias *et al.*, 2020) sauf l'étude menée par Peng et ses collaborateurs (Peng *et al.*, 2019). A ce jour, ces résultats restent limités et contradictoires. Les difficultés dans les études citées proviennent notamment des interférences de différents paramètres comme l'énergie interfaciale, la rugosité ou le module mécanique sur l'adhésion bactérienne. Pour mieux comprendre les propriétés de nos revêtements, les caractéristiques nanomécaniques ont été déterminées à l'état sec par Peak Force Quantitative Nanomechanical (PF-QNM).

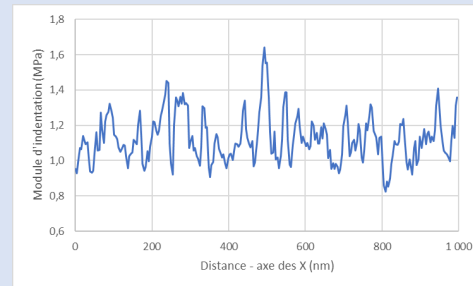
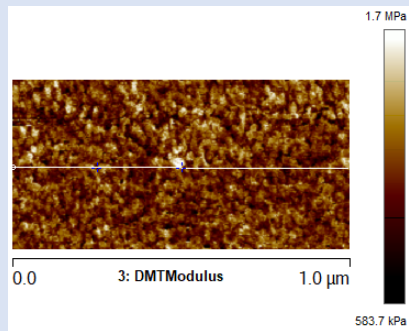
Les images AFM ainsi que le profil de module d'élasticité correspondant sont représentées dans la **Figure 17**. Les données obtenues à partir de ces images montrent une différence importante entre le module d'indentation des revêtements PHBHV d'une part et celui du PHA<sub>mcl</sub> et du PDMS d'autre part. En effet, les revêtements à base de PDMS ont un module d'indentation autour de 1 MPa, en bon accord avec les données de la littérature (Gökaltun *et al.* 2019). Les revêtements à base de PHA<sub>mcl</sub> présentent également un module d'indentation d'environ 10 MPa légèrement plus élevé que celui du PDMS (environ 1 MPa). Ce résultat a également été rapporté dans la littérature (Sofinska *et al.*, 2019). En ce qui concerne les revêtements à base de PHBHV, des modules d'indentation entre 2 et 3 GPa ont été mesurés. Il a également été observé que l'ajout de PEG ne modifie pas le module d'indentation des revêtements étudiés (**Figure 18**).



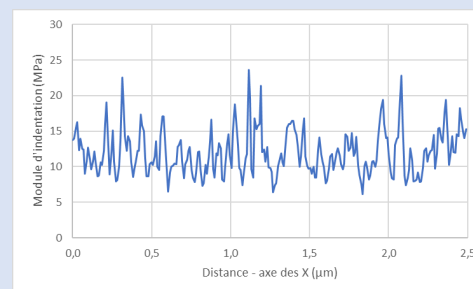
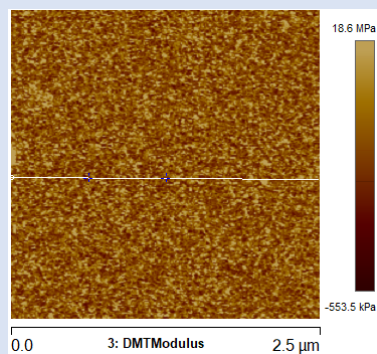
(A)



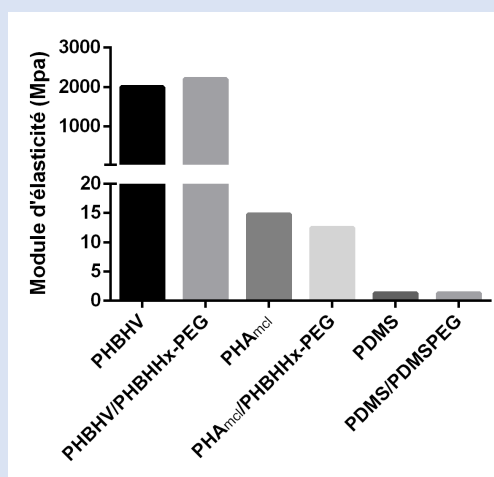
(B)



(C)



**Figure 17.** Images AFM en mode module et son profil de module correspondant pour la surface de (A) PHBHV ( $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ ), (B) PDMS ( $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ ) et (C) PHA<sub>mcl</sub> ( $2,5\mu\text{m} \times 2,5\mu\text{m}$ ). L'échelle des modules est exprimée en (A) GPa et (B) (C) MPa.



**Figure 18.** Évolution du module d'élasticité (MPa) en fonction des différents revêtements étudiés.

Les données physiques obtenues précédemment ont été comparées aux valeurs données dans la littérature (**Tableau 08**). Pour chaque revêtement étudié, les valeurs de rugosité et de module d'élasticité sont similaires à celles décrites, ce qui permet de conforter nos résultats.

**Tableau 08.** Récapitulatif des données physiques obtenues pour les systèmes étudiés dans cette étude ainsi que pour les systèmes décrits dans la littérature.

	Notre étude			Littérature			
	PHBHV	PHA <sub>mcl</sub>	PDMS	PHB	PHBHV <sup>d</sup>	PHO <sup>a</sup>	PDMS
Composition monomérique	70% HB 30% HV	48,8% HO 36% HD 13,5% HDD 1,7% HHx	-	100% HB	72,8% HB 27,2% HV	100% HO	-
Module d'élasticité (MPa)	2000	14,8	1,3	3500 <sup>b</sup>	1109	12,6	4 <sup>f</sup>
RMS (nm)	71,4 (25µm <sup>2</sup> )	4,4 (25µm <sup>2</sup> )	4,5 (25µm <sup>2</sup> )	67,4 <sup>c</sup> (25µm <sup>2</sup> )	254 (20 µm <sup>2</sup> )	30,9	4,4 <sup>e</sup> (500nm <sup>2</sup> )

<sup>a</sup> Sofinska *et al.*, 2018 ; <sup>b</sup> Wu *et al.*, 2009 ; <sup>c</sup> Chiulan *et al.*, 2016 ; <sup>d</sup> Rai *et al.*, 2011 ; <sup>e</sup> Drebezhova *et al.*, 2020 ; <sup>f</sup> Lin *et al.*, 2012.

Les objectifs fixés au début de ce chapitre ont été atteints. En effet, la synthèse du copolymère PHBHHx-PEG a été effectuée afin d'être intégré aux revêtements. Les deux PHA utilisés pour cette étude (PHBHV et PHA<sub>mcl</sub>) ont montré de très bonnes capacités filmogènes en présence ou non du copolymère PEG. La surface des revêtements a ainsi pu être caractérisée en fonction des principaux paramètres connus, à savoir, l'hydrophilie, l'énergie de surface, la rugosité et l'élasticité. Les résultats obtenus (Tableau 09) permettent de mettre en avant une différence de propriétés physiques entre les deux PHA testés. En effet, alors que le PHBHV (PHA courtes chaînes) présente, du fait de sa structure semi-cristalline, une rugosité et un module d'élasticité plus important, le PHA<sub>mcl</sub> (PHA moyennes chaînes) se rapproche du comportement d'un élastomère comme le PDMS en termes de topographie de surface et de module d'Young. Il était également important d'évaluer l'effet de l'ajout de copolymère PEG au sein des revêtements sur les propriétés physiques. Les résultats n'ont pas montré de changements significatifs de comportements des surfaces après l'ajout de copolymère PEG et ce pour les trois matrices étudiées (PHBHV, PHA<sub>mcl</sub> et PDMS) à l'état sec.

**Tableau 09.** Récapitulatif des données obtenues dans ce chapitre en fonction des différents revêtements.

	-PEG			+PEG		
	PHBHV	PHA <sub>mcl</sub>	PDMS	PHBHV	PHA <sub>mcl</sub>	PDMS
Module d'élasticité (MPa)	2000	14,8	1,3	2200	12,5	1,3
RMS (nm)	71,4	4,4	4,5	33	5,5	5,4
$\theta_{\text{eau}}$ (°)	87	85	95	75	83	93
$\gamma_{\text{eau/diiodométhane}}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	47	39	31	51	39	38

## V. Partie expérimentale

### I- Synthèse du copolymère PHBHHx-PEG

L'oligomère insaturé de PHBHHx a été obtenu selon la procédure précédemment décrite par Ramier et al. (Ramier et al. 2012). Le PHBHHx (1g) a été solubilisé dans du chloroforme anhydre (10 mL) et  $9,3 \cdot 10^{-3}$  moles d'alcool allylique et de DBTL avec un rapport molaire  $n_{OH}/n_{DBTL} = 34$  ont été ajoutées. La réaction a été réalisée dans un réacteur Anton-Paar monowave 300, MW. La source MW était un magnétron avec une fréquence de 2,5 GHz (générateur de puissance 850W). L'échantillon a été chauffé à 160°C pendant 15 minutes. Les oligomères ont finalement été précipités dans 100 mL de n-pentane et séchés sous vide à 40°C (Rendement 91%). Le PHBHHx insaturé a été solubilisé dans du DMSO (60 g.L<sup>-1</sup>). 2,5 équivalents molaire de PEGSH ont été ajoutés en présence de 2 équivalents molaires de DMPA. Le mélange a été irradié à 100% pendant 30 min sous agitation avec le Hamamatsu LC8 lightening cure (L8251), équipée d'une lampe Mercure-Xénon (200W) couplée à un guide de lumière flexible. Le processus d'addition du PEGSH et du DMPA a été répété deux fois. Le copolymère a ensuite été placé dans 50mL de DMF et purifié deux fois par dialyse contre l'eau pendant 15 jours en changeant l'eau toutes les deux heures.

### II- Caractérisation du copolymère PHBHHx-PEG

Les spectres de RMN <sup>1</sup>H dans le CDCl<sub>3</sub> ont été enregistrés à température ambiante à l'aide d'un spectromètre RMN Bruker 400MHz.

Les masses molaires moyennes ont été déterminées par des expériences de SEC en utilisant la pompe Spectra Physics P100 et deux colonnes PL-gel. Un réfractomètre interférométrique Optilab rEX de Wyatt Technology a été utilisé comme détecteur. Le chloroforme a été choisi comme éluant à un débit de 1mLmin<sup>-1</sup> et des standards de polystyrène ont été utilisés pour la calibration.

Les propriétés thermiques ont été déterminées en utilisant le calorimètre DSC-25 de TA Instruments sous atmosphère d'azote. Tous les échantillons ont été analysés entre -70°C et 200°C avec une vitesse de chauffe de 10°C.min<sup>-1</sup>. Après un refroidissement rapide de 200°C à -

70°C (à 10°C.min<sup>-1</sup>), ils ont été chauffés à nouveau à 200°C avec une vitesse de chauffage de 10°C.min<sup>-1</sup>. La température de fusion ( $T_m$ ) et l'enthalpie de fusion ( $\Delta H_m$ ) ont été déterminées lors du premier cycle tandis que la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) a été déterminée lors du second cycle.

La caractérisation structurale a été obtenue par diffraction des rayons X (XRD) à l'aide du diffractomètre D8 Advance de Bruker avec une radiation Cu K $\alpha$  opérée à 30kV et 30 mA. Les mesures de diffraction des rayons X ont été enregistrées sur une plage 2 $\theta$  de 5 à 60° par pas de 0,017° à une longueur d'onde incidente ( $\lambda$ ) de 1,542 Å.

### III- Production, extraction et purification du PHA<sub>mcl</sub>

La production de PHA est réalisée en 2 étapes, la première en milieu Zobell afin d'obtenir une densité cellulaire importante, le deuxième dans un milieu dépourvu d'azote et enrichi en source de carbone afin de limiter la division cellulaire et de favoriser la synthèse et l'accumulation intracellulaire des PHA.

Pour la phase de production de biomasse, deux erlenmeyers contenant 2L de milieu Zobell (par litre d'eau distillée : 5g de peptone, 1g d'extrait de levure, 15g de Sea Salts et pH ajusté à 7,6 sont inoculés à 10% (v/v) avec une suspension de cellules en phase exponentielle (souche *Pseudomonas ragueensis* sp. nov. (strain CNCM I-4063 in the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, Paris, France). Les erlenmeyers sont agités à la température de 30°C pendant 6h à 8 h. Après centrifugation (8000g pendant 20min, en conditions stériles) les culots bactériens sont transférés dans un fermenteur contenant 5 L de milieu 'limitant' favorisant la production des PHA. Le milieu limitant est composé d'eau de mer (par litre d'eau distillée : 15g de Sea Salt) appauvrie en tout autre élément, notamment en azote, et enrichie en huile de coprah à 10g/L, utilisée comme source de carbone. Au cours de la fermentation, le pH est maintenu automatiquement à pH 7,6 par addition d'une solution de NaOH 2N ou d'une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, la température contrôlée à 30°C, et le niveau d'oxygène est maintenu inférieur à 25%. Après 3 jours, les cellules sont récupérées par centrifugation (8000g pendant 20 min), puis le culot bactérien est lyophilisé avant analyse.

Les cellules lyophilisées sont réduites en poudre dans un mortier et extraites à l'aide de chloroforme (15 mL pour 1 g de masse de cellules sèches) pendant 4h à 50°C. Un volume d'eau (1/3) est ajouté, le mélange est agité puis centrifugé pour séparer les deux phases des débris

cellulaires. La phase organique est alors récupérée, évaporée et le solide obtenu est conservé pour les analyses. La purification du PHA est réalisée par plusieurs précipitations successives d'une solution chloroformique de PHA dans 10 volumes de méthanol froid.

#### IV- Caractérisation du PHA<sub>mcl</sub>

##### 1- Résonance magnétique nucléaire du proton (RMN <sup>1</sup>H)

Les analyses RMN <sup>1</sup>H sont réalisées à 25°C sur des échantillons de PHA dissous dans du chloroforme deutéré sur un spectromètre Bruker 400 DRX opérant à 400MHz. Les déplacements chimiques sont reportés en ppm relativement au signal du 3,3,3,4-tétraméthyl silane.

##### 2- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Pour déterminer la composition monomérique, 7mg de PHA dissous dans 1,5mL de chloroforme sont méthanolysés en présence de 1,5mL d'une solution de MeOH/HCl (17/2, v/v) à 100°C pendant 4h. La phase organique est ensuite lavée par 1mL d'eau puis séchée sur MgSO<sub>4</sub>. La silylation des esters méthyliques est réalisée en ajoutant 100 µL de BSTFA (N, O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) et 100 µL de pyridine à l'échantillon méthylé. La solution est chauffée à 70°C pendant 1h puis évaporée à sec. L'échantillon est alors dissous dans 600µL de dichlorométhane et injecté en CG-SM permettant de déterminer la longueur de la chaîne carbonée de chaque monomère.

Le système CG-SM est composé d'un chromatographe Agilent Technologies 6890N couplé à un spectromètre quadripolaire Agilent 5975 inert XL, équipé d'une colonne capillaire de silice HP5-MS (30m x 0,25mm, 0,25µm d'épaisseur de film). Un volume de 1µL est injecté (split ratio 100:1) à 250°C avec de l'hélium comme gaz vecteur et le programme de température suivant : 60°C pendant 1 min, puis rampe de 4°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 140°C, puis 15°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 280°C et 5min à 280°C. Le potentiel d'ionisation pour l'impact électronique est de 70eV.

##### 3- Chromatographie par perméation de gel (CPG)

Les poids moléculaires ont été déterminés par chromatographie par perméation de gel sur un système composé d'un module Alliance 2695 (Waters), de trois colonnes Ultrastyrigel (HR2,

HR4, HR6) placées en série, d'un réfractomètre différentiel 2414 (Waters) et d'un détecteur de diffusion de lumière laser miniDawn Treos (Wyatt Technology Corporation). Le tétrahydrofurane (THF) a été utilisé comme phase mobile à un débit de 1 mL/min. Les échantillons ont été injectés sous forme de solutions dans le THF, filtrés à travers un filtre en polytétrafluoroéthylène de 0,45  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{l}$  de solution à 5 mg/ml ont été injectés. La valeur de l'indice de réfraction spécifique  $dn/dc$  a été déterminée comme étant égale à  $0,065 \pm 0,002$  mL/g pour les PHA<sub>mcl</sub> dans le THF à température ambiante.

#### V- Préparation des revêtements

Du PHBHV (10 % en masse) a été dissous pendant 2 h sous reflux dans du dichlorométhane. Le PEG ou le PHBHHx-PEG ont été ajoutés à la solution de PHBHV, à une concentration finale de 0,1 % en poids dans la solution (1 % en masse dans le revêtement séché) et ont été laissés à agiter pendant la nuit. Du PDMS (50 % en masse) a été dissous pendant 2h dans du dichlorométhane. 0,1 % en masse de PEG ou 0,01 % en masse de CoatOsil (Momentive performance materials, France) ont été ajoutés à la solution de PDMS et laissés sous agitation pendant la nuit. Un volume de 500  $\mu\text{L}$  de chaque solution a ensuite été coulé sur un substrat en verre (lame de microscope). Pour éviter le rétrécissement du film dû à une évaporation rapide du solvant, un couvercle de boîte de Pétri en polystyrène a été placé sur chaque lame pendant le processus de séchage qui a été fixé à 2 jours pour les revêtements de PHBHV et à 7 jours pour les revêtements de PDMS à température ambiante. L'épaisseur finale du revêtement a été estimée à environ 50  $\mu\text{m}$  pour les revêtements à base de PHA et 100  $\mu\text{m}$  pour les revêtements à base de PDMS (mesurée par un Elcometer® 456).

#### VI- Mesure des angles de contact

Les angles de contact avec l'eau, le diiodométhane et le formamide ( $\theta$ ) ont été mesurés par un Digidrop (Digidrop, GBX) à température ambiante (23°C, RH 50%). Le volume de la goutte testée est de 3 $\mu\text{L}$ . Le temps d'analyse est fixé à 3 secondes. Cinq emplacements différents pour chaque revêtement (18  $\times$  18  $\times$  1 mm) ont été choisis pour obtenir une valeur moyenne.

## VII- Mesures de la rugosité et de l'élasticité des revêtements par microscopie à force atomique (MFA)

Les images AFM ont été obtenues à l'aide d'un AFM Multimode 8, équipé d'un contrôleur NanoScope V (Bruker, Santa Barbara, CA). Les images topographiques ont été enregistrées en mode ScanAsyst@ (Bruker) dans des conditions ambiantes (à 23°C et une humidité relative de 50%), en utilisant des pointes ScanAsyst-Air (fréquence de résonance de 70 KHz, constante de ressort de  $\sim 0,4$  N/m et rayon de pointe de 10 nm) à une vitesse de balayage inférieure à 2  $\mu\text{m/s}$ . Les images topographiques ont été analysées à l'aide du logiciel Nanoscope Analysis (V1.80), (Bruker, USA). Pour chaque polymère, un minimum de trois revêtements différents a été préparé et observé et sur chaque échantillon, un minimum de trois zones différentes a été analysé pour s'assurer d'une bonne reproductibilité dans la préparation du revêtement.

Le PFQNM a été utilisé pour déterminer les propriétés nanomécaniques des différents échantillons. Toutes les mesures ont été effectuées dans des conditions ambiantes. En PFQNM, le pointe de l'AFM oscille verticalement à une fréquence de 2 KHz, avec une amplitude de 150 nm. Lorsque le piézo balaie les échantillons sous la pointe (vitesse de balayage inférieure à 2  $\mu\text{m/s}$ ), une courbe force-distance est enregistrée à chaque pixel, avec une force constante qui est maintenue grâce à la boucle de rétroaction Peak-Force. La calibration de la constante de ressort des pointes a été obtenue par la méthode du bruit thermique pour la pointe ScanAsyst (constante de ressort de 0,34 N/m) ou par la méthode de Sader pour la pointe RTESP-525 (constante de ressort de 160 N/m). Leur sensibilité de déflexion a été déterminé à partir de la partie linéaire d'une moyenne de 10 courbes de « force-distance » obtenues en faisant interagir les pointes sur une surface en saphire. Le rayon de leur pointe a été calibré en utilisant des échantillons de référence (PFQNM SPM kit -12M, Bruker), un standard PDMS à 2,5 MPa pour la pointe ScanAsyst et un film polystyrène de 2,7 GPa pour la pointe RTESP-525 respectivement. À partir de ces étalons de calibration, les forces d'appuie maximales étaient fixés autour de 300 pN pour l'échantillon de PHBHV et entre 50 et 100 pN pour les surfaces de PDMS et de PHA<sub>mcl</sub>.

Les courbes de force de chaque interaction entre la pointe et l'échantillon sont analysées en temps réel pour fournir une carte nanomécanique simultanément avec l'image topographique. Le module d'indentation est calculé selon le modèle de Derjaguin-Muller-Toporov (DMT) (c'est-à-dire le modèle de Hertz incluant l'effet de l'adhésion sans changement de la surface de



contact (Derjaguin et al. 1975). Toutes les analyses de données AFM et le traitement des images ont été effectués avec le logiciel NanoScope version 1.8 (Bruker, USA).

## VI. Références bibliographiques

- Agrawal, G., Negi, Y. S., Pradhan, S., Dash, M., Samal, S. K. (2017). Wettability and contact angle of polymeric biomaterials. In *Characterization of Polymeric Biomaterials* (pp. 57-81). Woodhead Publishing.
- Arias, S. L., Devorkin, J., Civantos, A., Allain, J. P. (2020). Escherichia coli adhesion and biofilm formation on Polydimethylsiloxane are independent of substrate stiffness. *Langmuir*, 37(1), 16-25.
- Bagatella, S., Ciapponi, R., Turri, S. (2022). Nanomechanical Characterization of Bacterial Polyhydroxyalkanoates Using Atomic Force Microscopy. *Applied Sciences*, 12(10), 4994.
- Berg, J. C. (1993). The importance of acid-base interactions in wetting, coating, adhesion and related phenomena. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 8(1), 75-85.
- Bollen, C. M., Papaioanno, W., Van Eldere, J., Schepers, E., Quirynen, M., Van Steenberghe, D. (1996). The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clinical oral implants research*, 7(3), 201-211.
- Bouasse, H. (1924). *Capillarite: phenomenes superficiels*. Delagrave.
- Brady Jr, R. F., Singer, I. L. (2000). Mechanical factors favoring release from fouling release coatings. *Biofouling*, 15(1-3), 73-81.
- Chiulan, I., Mihaela Panaitescu, D., Nicoleta Frone, A., Teodorescu, M., Andi Nicolae, C., Cășărică, A., ... & Sălăgeanu, A. (2016). Biocompatible polyhydroxyalkanoates/bacterial cellulose composites: Preparation, characterization, and in vitro evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(10), 2576-2584.
- Dokukin, M. E., Sokolov, I. (2012). Quantitative mapping of the elastic modulus of soft materials with HarmoniX and PeakForce QNM AFM modes. *Langmuir*, 28(46), 16060-16071.
- Drago, R. S., Lim, Y. Y. (1971). Donor properties of a free-radical base. *Journal of the American Chemical Society*, 93(4), 891-894.
- Drebezhgova, V., Gojzewski, H., Allal, A., Hempenius, M. A., Nardin, C., Vancso, G. J. (2020). Network mesh nanostructures in cross-linked poly (dimethylsiloxane) visualized by AFM. *Macromolecular chemistry and physics*, 221(17), 2000170.
- Fields, R. J., Wiederhorn, S. M. (2006). Standard Measurement Methods for Materials Properties: Plasticity.
- Gillet, G., Azemar, F., Fay, F., Rehel, K., Linossier, I. (2018). Non-leachable hydrophilic additives for amphiphilic coatings. *Polymers*, 10(4), 445.
- Gökaltun, A., Kang, Y. B. A., Yarmush, M. L., Usta, O. B., Asatekin, A. (2019). Simple surface modification of poly (dimethylsiloxane) via surface segregating smart polymers for biomicrofluidics. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.
- Good, R. J., Oss, C. J. V. (1992). The modern theory of contact angles and the hydrogen bond components of surface energies. In *Modern approaches to wettability* (pp. 1-27). Springer, Boston, MA.
- Guegan, C., Garderes, J., Le Pennec, G., Gaillard, F., Fay, F., Linossier, I., ... & Réhel, K. V. (2014). Alteration of bacterial adhesion induced by the substrate stiffness. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 193-200.
- Guennecc, A., Brelle, L., Balnois, E., Linossier, I., Renard, E., Langlois, V., ... & Vallée-Réhel, K. (2021). Antifouling properties of amphiphilic poly (3-hydroxyalkanoate): an environmentally friendly coating. *Biofouling*, 37(8), 894-910.
- Hawkins, M. L., Faÿ, F., Réhel, K., Linossier, I., Grunlan, M. A. (2014). Bacteria and diatom resistance of silicones modified with PEO-silane amphiphiles. *Biofouling*, 30(2), 247-258.
- He, Y., Peng, W., Wang, T., Yan, S. (2014). DEM study of wet cohesive particles in the presence of liquid bridges in a gas fluidized bed. *Mathematical Problems in Engineering*, 2014.
- Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and surface forces*. Academic press.
- Jagiełło, J., Chlanda, A., Baran, M., Gwiazda, M., Lipińska, L. (2020). Synthesis and characterization of graphene oxide and reduced graphene oxide composites with inorganic nanoparticles for biomedical applications. *Nanomaterials*, 10(9), 1846.
- Ji, Y., Li, X. T., Chen, G. Q. (2008). Interactions between a poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolyester and human keratinocytes. *Biomaterials*, 29(28), 3807-3814.
- Kolewe, K. W., Peyton, S. R., Schiffman, J. D. (2015). Fewer bacteria adhere to softer hydrogels. *ACS applied materials & interfaces*, 7(35), 19562-19569.
- Lejars, M., Margailan, A., Bressy, C. (2012). Fouling release coatings: a nontoxic alternative to biocidal antifouling coatings. *Chemical reviews*, 112(8), 4347-4390.
- Lin, L. Y., Kim, D. E. (2012). Measurement of the elastic modulus of polymeric films using an AFM with a steel micro-spherical probe tip. *Polymer testing*, 31(7), 926-930.

Liu, Q., Zhu, M., Deng, B., Tung, C. H., Shyr, T. W. (2013). Evolution of concentric spherulites in crystalline-crystalline poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-b-poly (ethylene glycol) copolymers. *European polymer journal*, 49(12), 3937-3946.

Lu, J., Ngo, C. V., Singh, S. C., Yang, J., Xin, W., Yu, Z., Guo, C. (2019). Bioinspired hierarchical surfaces fabricated by femtosecond laser and hydrothermal method for water harvesting. *Langmuir*, 35(9), 3562-3567.

Majhy, B., Priyadarshini, P., Sen, A. K. (2021). Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth-facile surface modification for enhanced cell culture. *RSC advances*, 11(25), 15467-15476.

Munir, S., Iqbal, S., Jamil, N. (2015). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using paper mill wastewater as carbon source in comparison with glucose. *J Pure Appl Microbiol*, 9, 453-460.

Nguyen Tri, P., Prud'homme, R. E. (2018). Crystallization and segregation behavior at the submicrometer scale of PCL/PEG blends. *Macromolecules*, 51(18), 7266-7273.

Nguyen, H. N., Ha, P. T., Sao Nguyen, A., Nguyen, D. T., Do, H. D., Thi, Q. N., Thi, M. N. H. (2016). Curcumin as fluorescent probe for directly monitoring in vitro uptake of curcumin combined paclitaxel loaded PLA-TPGS nanoparticles. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(2), 025001.

Padermshoke, A., Katsumoto, Y., Sato, H., Ekgasit, S., Noda, I., Ozaki, Y. (2004). Surface melting and crystallization behavior of polyhydroxyalkanoates studied by attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Polymer*, 45(19), 6547-6554.

Passeri, D., Rossi, M., Tamburri, E., Terranova, M. L. (2013). Mechanical characterization of polymeric thin films by atomic force microscopy-based techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(5), 1463-1478.

Peng, S., Meng, W., Guo, J., Wang, B., Wang, Z., Xu, N., ... & Xu, J. (2019). Photocatalytically stable superhydrophobic and translucent coatings generated from PDMS-grafted-SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>@ PDMS with multiple applications. *Langmuir*, 35(7), 2760-2771.

Poincaré, H. (1895). *Capillarité : leçons professées pendant le deuxième semestre 1888-1889*. Gauthier-Villars.

Rai, R., Roy, I. (2011). Polyhydroxyalkanoates: the emerging new green polymers of choice. *A handbook of applied biopolymer technology*, 79-101.

Ramier, J., Renard, E., Grande, D. (2012). Microwave-assisted synthesis and characterization of biodegradable block copolyesters based on poly (3-hydroxyalkanoate) s and poly (d, l-lactide). *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 50(7), 1445-1455.

Rodriguez-Castellanos, W., Flores-Ruiz, F. J., Martínez-Bustos, F., Chiñas-Castillo, F., Espinoza-Beltrán, F. J. (2015). Nanomechanical properties and thermal stability of recycled cellulose reinforced starch-gelatin polymer composite. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(14).

Simon-Colin, C., Gouin, C., Lemechko, P., Schmitt, S., Senant, A., Kervarec, N., Guezennec, J. (2012). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenei* from alkanates and glucose. *International journal of biological macromolecules*, 51(5), 1063-1069.

Sofinska, K., Barbasz, J., Witko, T., Dryzek, J., Harażna, K., Witko, M., ... & Guzik, M. (2019). Structural, topographical, and mechanical characteristics of purified polyhydroxyoctanoate polymer. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(4), 47192.

Song, F., Ren, D. (2014). Stiffness of cross-linked poly (dimethylsiloxane) affects bacterial adhesion and antibiotic susceptibility of attached cells. *Langmuir*, 30(34), 10354-10362.

Song, Y., Liu, C., Liu, X., Trottier, J., Beaudoin, M., Zhang, L., ... & Wang, L. (2017). H19 promotes cholestatic liver fibrosis by preventing ZEB1-mediated inhibition of epithelial cell adhesion molecule. *Hepatology*, 66(4), 1183-1196.

Song, Y., Wang, C., Dong, X., Yin, K., Zhang, F., Xie, Z., Chu, D. (2018). Controllable superhydrophobic aluminum surfaces with tunable adhesion fabricated by femtosecond laser. *Optics & Laser Technology*, 102, 25-31.

Straub, H., Bigger, C. M., Valentin, J., Abt, D., Qin, X. H., Eberl, L., ... & Ren, Q. (2019). Bacterial adhesion on soft materials: passive physicochemical interactions or active bacterial mechanosensing? *Advanced Healthcare Materials*, 8(8), 1801323.

Suriano, R., Griffini, G., Chiari, M., Levi, M., Turri, S. (2014). Rheological and mechanical behavior of polyacrylamide hydrogels chemically crosslinked with allyl agarose for two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 30, 339-346.

Van Oss, C. J., Good, R. J., Chaudhury, M. K. (1986). Nature of the antigen-antibody interaction: Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 376, 111-119.

Wang, D., Russell, T. P. (2018). Advances in atomic force microscopy for probing polymer structure and properties. *Macromolecules*, 51(1), 3-24.

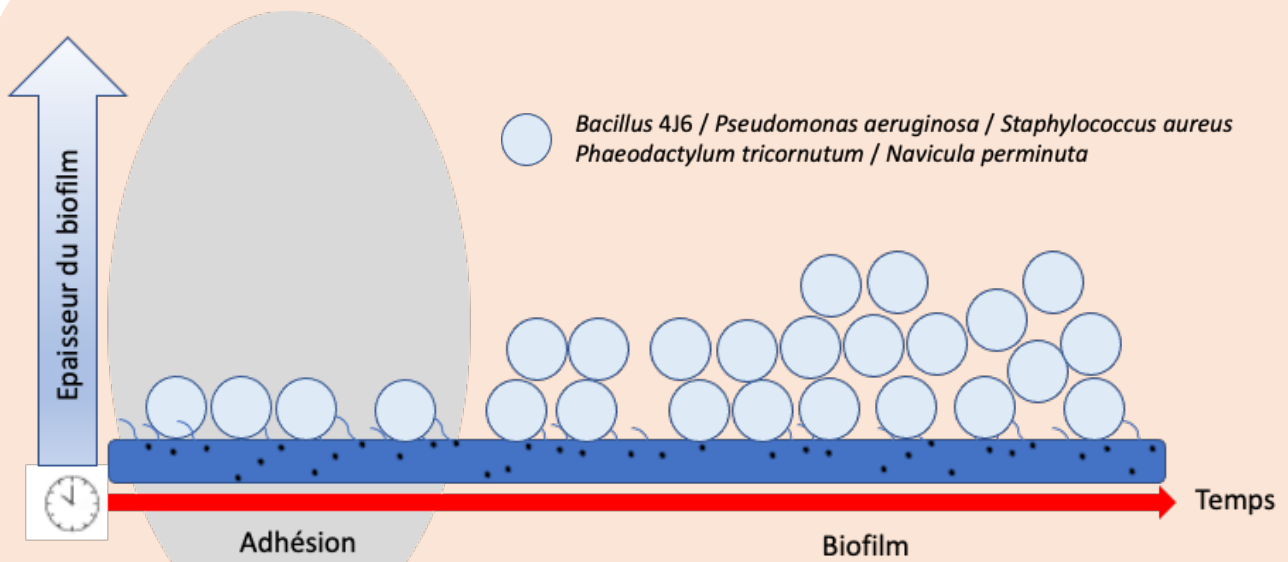
Wu, Y., Wang, J., Zhang, D., Li, L., Zhu, Y. (2019). Preparation and characterization of superhydrophobic surface based on polydimethylsiloxane (PDMS). *Journal of Adhesion Science and Technology*, 33(17), 1870-1881.

- Wu, Z., & Hjort, K. (2009). Surface modification of PDMS by gradient-induced migration of embedded Pluronic. *Lab on a Chip*, 9(11), 1500-1503.
- Xing, R., Lyngstadaas, S. P., Ellingsen, J. E., Taxt-Lamolle, S., Haugen, H. J. (2015). The influence of surface nanoroughness, texture and chemistry of TiZr implant abutment on oral biofilm accumulation. *Clinical oral implants research*, 26(6), 649-656.
- Yao, C., Ahmed, M. H., Li, X., Nedeljkovic, I., Vandooren, J., Mercelis, B., ... & Van Meerbeek, B. (2020). Zinc–Calcium–Fluoride Bioglass-Based Innovative Multifunctional Dental Adhesive with Thick Adhesive Resin Film Thickness. *ACS applied materials & interfaces*, 12(27), 30120-30135.
- Yoda, I., Koseki, H., Tomita, M., Shida, T., Horiuchi, H., Sakoda, H., Osaki, M. (2014). Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion. *BMC microbiology*, 14(1), 1-7.
- Young, T. (1805). III. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical transactions of the royal society of London*, (95), 65-87.
- Yu, Q., Li, J., Zhang, Y., Wang, Y., Liu, L., Li, M. (2016). Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells. *Scientific Reports*, 6(1), 1-14.



# Chapitre 3

## Étude de l'activité anti-bioadhésion



Microscopie confocale à balayage laser

Analyse d'image par binarisation

Obtention du pourcentage de recouvrement



## Table des matières

<b>I. Mise en place d'un protocole d'adhésion</b>	<b>130</b>
1. Microorganismes étudiés	130
a) Microorganismes marins	130
(i) Bactérie marine : <i>Bacillus</i> 4J6	130
(ii) Diatomées : <i>Phaeodactylum tricornutum</i> et <i>Navicula perminuta</i>	131
b) Microorganismes pathogènes opportunistes	133
(i) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	133
(ii) <i>Staphylococcus aureus</i>	134
2. Protocole d'adhésion	135
a) Bactéries	135
b) Diatomées	136
<b>II. Biocontamination d'origine marine</b>	<b>138</b>
1. Adhésion avec <i>Bacillus</i> 4J6	138
2. Adhésion avec <i>Navicula perminuta</i> et <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	140
a) <i>Navicula perminuta</i>	140
b) <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	142
c) Comparaison entre les deux diatomées	144
<b>III. Biocontamination d'origine médicale</b>	<b>146</b>
1. Adhésion avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	146
2. Adhésion avec <i>Staphylococcus aureus</i>	148
<b>IV. Partie expérimentale</b>	<b>153</b>
<b>V. Références bibliographiques</b>	<b>157</b>



## Table des illustrations

### Figures

- Figure 01.** Image MEB de *Bacillus* 4J6 après 3h d'adhésion sur une lame de verre. (p.130)
- Figure 02.** Image MEB des trois morphotypes de *Phaeodactylum tricornutum*. (p.132)
- Figure 03.** Image MEB de *Navicula perminuta*. (p.133)
- Figure 04.** Image MEB de *Pseudomonas aeruginosa*. (p.134)
- Figure 05.** Image MEB de *Staphylococcus aureus*. (p.134)
- Figure 06.** Protocole général de l'étude de la bioadhésion bactérienne. (p.136)
- Figure 07.** Protocole général de l'étude de la bioadhésion des diatomées. (p.137)
- Figure 08.** Recouvrement des surfaces par *Bacillus* 4J6 après 2h d'incubation. (p.139)
- Figure 09.** Recouvrement des surfaces par *Navicula perminuta* après 72h d'incubation. (p.141)
- Figure 10.** Recouvrement des surfaces par *Phaeodactylum tricornutum* après 72h d'incubation. (p.143)
- Figure 11.** Pourcentage de recouvrement obtenu sur les revêtements bruts pour les deux diatomées testées. (p.145)
- Figure 12.** Recouvrement des surfaces par *Pseudomonas aeruginosa* après 2h d'incubation. (p.147)
- Figure 13.** Recouvrement des surfaces par *Staphylococcus aureus* après 2h d'incubation. (p.149)

### Tableaux

- Tableau 01.** Les différents revêtements formulés et leurs intérêts pour l'étude. (p.129)
- Tableau 02.** Nombre moyen de diatomées ( $\text{mm}^{-2}$ ) ayant adhéré aux surfaces de verre et de PDMS après 2h. (p.131)
- Tableau 03.** Récapitulatif des pourcentages de recouvrements en fonction des revêtements pour les deux diatomées testées *N. perminuta* et *P. tricornutum*. (p.144)
- Tableau 04.** Récapitulatif des pourcentages de recouvrement en fonction des différents revêtements et pour les cinq microorganismes testés. (p.150)

Les objectifs de ce chapitre sont (i) d'étudier l'adhésion de différents microorganismes sur les revêtements formulés, (ii) d'étudier l'impact des différents paramètres déterminés précédemment sur l'adhésion et (iii) de valider la substitution possible du PDMS par du PHA. Plusieurs étapes sont nécessaires à la formation d'un biofilm. En effet, comme vu précédemment, dès les premiers instants suivant l'immersion, un film conditionnant se forme à la surface du substrat. Ce film résulte de l'adsorption spontanée de molécules organiques et d'ions et est capable d'influer favorablement ou défavorablement les interactions microorganismes-substrat. Dès lors que le microorganisme se trouve à proximité de la surface, des interactions (Lifshitz-van der Waals, électrostatiques et Acide-base de Lewis) s'établissent entre le substrat conditionné et les macromolécules présentes en surface des microorganismes. Cette seconde étape est, dans un premier temps, réversible. Le microorganisme va alors s'orienter, voire se déplacer, sur la surface à coloniser de sorte à établir un contact optimal, propice à l'établissement d'interactions fortes. Cette étape d'adhésion devient ainsi, par la suite, irréversible *via* la production de diverses molécules telles que des adhésines et des polysaccharides aboutissant, *in fine*, à la formation de micro-colonies. Ces premières étapes sont, de ce fait, cruciales dans la formation ou non du biofilm. C'est la raison pour laquelle ce chapitre est dédié à l'étude de la bioadhésion. Des bactéries et des diatomées modèles ont ainsi été sélectionnées et leurs capacités adhésives ont été testées sur les différentes surfaces formulées précédemment. Les surfaces concernées sont (i) des surfaces antiadhésives de référence, le polydiméthylsiloxane (PDMS) seul et avec ajout de polyéthylène glycol (PEG) ; (ii) une surface proadhésive de référence, le verre et (iii) des surfaces à base de poly(3-hydroxyalcanoate) (PHA) seul et avec ajout de PEG. Le **Tableau 01** récapitule les différentes surfaces et leurs intérêts pour l'étude.

**Tableau 01.** Les différents revêtements formulés et leurs intérêts pour l'étude.

Surface	Dénomination	Intérêt pour l'étude
Polydiméthylsiloxane	PDMS	Surface antiadhésive de référence
Polydiméthylsiloxane avec ajout de PEG	PDMS/PEG	Surface antiadhésive expérimentale (0,1% PEG)
Polydiméthylsiloxane avec ajout de copolymère PDMS-PEG	PDMS/PDMS-PEG	Référence bibliographique antiadhésive (0,01% PDMS-PEG)
Verre	Verre	Référence bibliographique proadhésive
Poly(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalérate)	PHBV	Référence expérimentale
Poly(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalérate) avec ajout de PEG	PHBV/PEG	Impact d'un additif hydrophile (0,1%)
Poly(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalérate) avec ajout de copolymère PHBHHx-PEG	PHBV/PHBHHx-PEG	Rétention de l'additif amphiphile au sein de la matrice
PHA <sub>mcl</sub>	PHA <sub>mcl</sub>	Impact de la longueur de la chaîne carbonée de PHA
PHA <sub>mcl</sub> avec ajout de PEG	PHA <sub>mcl</sub> /PEG	Impact d'un additif hydrophile (0,1%)
PHA <sub>mcl</sub> avec ajout de copolymère PHBHHx-PEG	PHA <sub>mcl</sub> /PHBHHx-PEG	Rétention de l'additif amphiphile au sein de la matrice

## I. Mise en place d'un protocole d'adhésion

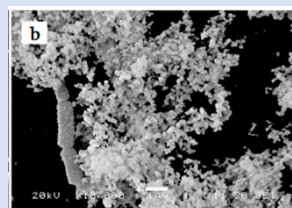
### 1. Microorganismes étudiés

L'adhésion de différents microorganismes a été étudiée de façon à obtenir des résultats tant dans le domaine marin que dans le domaine biomédical. Ainsi trois organismes marins ont été sélectionnés : une bactérie marine *Bacillus* 4J6 et deux diatomées benthiques *Phaeodactylum tricornutum* et *Navicula perminuta*. Au niveau biomédical, deux bactéries pathogènes opportunistes ont été étudiées : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Ces microorganismes sont décrits comme ayant d'importantes capacités adhésives et sont largement impliqués dans la formation de biofilm (Zea-Obando *et al.*, 2018 ; Holland *et al.*, 2004 ; Wanka *et al.*, 2021 ; Pang *et al.*, 2019 ; Barrett & Atkins, 2014). De plus, l'étude de ce panel de microorganismes permet de tester la capacité antiadhésive des surfaces formulées sur une diversité importante de mécanismes d'adhésion. En effet, d'importantes différences existent et sont décrites entre les mécanismes d'adhésion des bactéries et des diatomées mais également entre les bactéries elles-mêmes. Ces différences peuvent être liées, d'une part, à la composition de la paroi cellulaire (Gram-positif, Gram-négatif, paroi cellulaire siliceuse) mais également aux diverses molécules produites.

#### a) Microorganismes marins

##### (i) Bactérie marine : *Bacillus* 4J6

Cette bactérie marine a été isolée à la surface de lames de verre immergées dans l'Océan Atlantique (golfe du Morbihan, 47°34'37"N-2°44'54"W) pendant 6h à 1m de profondeur. Après séquençage, il a été déterminé que cette bactérie appartenait au genre *Bacillus* (Grasland *et al.*, 2003). Ce bacille à Gram-positif a une longueur de 2,05  $\mu\text{m}$  et est particulièrement adhérent grâce, notamment, à la production de nombreux exopolysaccharides (EPS) (**Figure 01**).



*Bacillus* 4J6

**Figure 01.** Image SEM de *Bacillus* 4J6 après 3h d'adhésion sur une lame de verre (milieu ASW, 20°C). D'après Zea-Obando *et al.*, 2018.

(ii) Diatomées : *Phaeodactylum tricornutum* et *Navicula perminuta*

Les diatomées sont des microalgues unicellulaires photosynthétiques vivant dans les eaux salées ou douces et possédant généralement une paroi cellulaire riche en silice. Cette paroi cellulaire, également appelée frustule, est caractérisée par un squelette siliceux (Martin-Jezequel *et al.*, 2000 ; Wetherbee, 2002) recouvert d'une enveloppe organique essentiellement composée de polysaccharides et de protéines (Hecky *et al.*, 1973). Les diatomées sont divisées en deux grandes catégories en fonction de leur frustule : les diatomées pennées et les diatomées centriques (Theriot *et al.*, 2010). Alors que les diatomées centriques présentent un frustule circulaire, triangulaire ou quadratique, les diatomées pennées possèdent un frustule elliptique ou rectangulaire. En termes de bioadhésion, les diatomées sont des organismes clés dans la colonisation des surfaces. En effet, elles sont décrites comme particulièrement adhérentes notamment sur des revêtements à base de PDMS (**Tableau 02**) (Holland *et al.*, 2004).

**Tableau 02.** Nombre moyen de diatomées ( $\text{mm}^{-2}$ ) ayant adhéré aux surfaces de verre et de PDMS après 2h d'incubation. D'après Holland *et al.*, 2004.

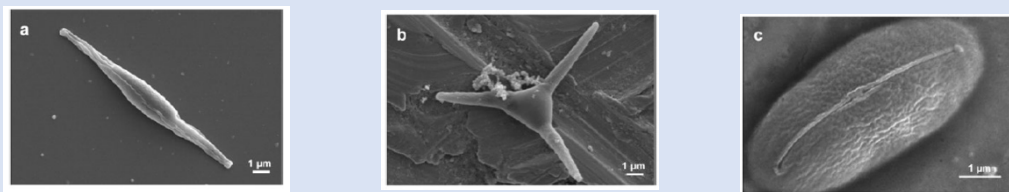
	<i>Craspedostauros</i>	<i>Amphora</i>	<i>Navicula</i>
Verre	536 $\pm$ 34	86 $\pm$ 14	1343 $\pm$ 49
PDMS	876 $\pm$ 37	504 $\pm$ 60	1598 $\pm$ 76

Cette caractéristique de forte adhésion aux silicones est problématique dans le domaine du biofouling puisque l'on retrouve très souvent un biofilm brun et gluant riche en diatomées (slime) à la surface des matériaux marins immergés (Terlizzi *et al.*, 2000).

- *Phaeodactylum tricornutum*

La cellule de *Phaeodactylum tricornutum* a une taille comprise entre 10 et 20  $\mu\text{m}$  (selon son morphotype) et une majorité du volume cellulaire est occupée par le chloroplaste. C'est une diatomée très répandue, que l'on trouve aussi bien dans les zones côtières qu'à l'intérieur des terres (Rushforth *et al.*, 1991). Trois morphotypes différents ont été décrits pour cette diatomée : les formes ovoïdes, fusiformes et triradiées (**Figure 02**). L'apparition de l'un ou l'autre de ces morphotypes n'est pas bien comprise mais semble dépendre des sous-espèces et des conditions environnementales telles que l'intensité lumineuse et la disponibilité des

nutriments (Borowitzka, 1978). Contrairement aux autres diatomées, *P. tricornutum* est très pauvre en silice, sa paroi cellulaire est essentiellement composée de molécules organiques et en particulier de glucuromannane sulfaté (Garrone *et al.*, 1981). La forme ovoïde est le seul morphotype capable de synthétiser de véritables coques de silice alors que les formes fusiformes et triradiés, très similaires, sont caractérisées par des parois cellulaires possédant presque exclusivement des composants organiques dont des polysaccharides, des protéines et une petite quantité de lipides (Tesson *et al.*, 2009). Dans le contexte de l'étude, cette diatomée est une espèce intéressante puisque la forme ovoïde a un mode de vie benthique activement mobile, connu pour sécréter des EPS (exopolysaccharides) et de ce fait adhérer aux substrats (De Martino *et al.*, 2011, Willis *et al.*, 2013). Cette diatomée est également décrite comme étant particulièrement adhérente sur les surfaces hydrophobes et notamment sur les élastomères à base de silicone (Holland *et al.*, 2004).



**Figure 02.** Image MEB (microscopie électronique à balayage) des trois morphotypes de *Phaeodactylum tricornutum* : fusiforme 20-30  $\mu\text{m}$  de longueur) (a), triradié (15-20  $\mu\text{m}$  de longueur) (b) et ovoïde (10-12  $\mu\text{m}$  de longueur) (c). D'après Francius *et al.*, 2008.

- *Navicula perminuta*

La cellule de *Navicula perminuta* a une longueur de 8 à 20  $\mu\text{m}$  et une largeur de 3 à 4  $\mu\text{m}$  (Figure 03). Peu décrite, cette diatomée fait tout de même partie des microorganismes les plus utilisés dans les travaux de recherche liés à l'adhésion et/ou la formation de biofilm (477 résultats sur Google Scholar le 11/04/2022 avec les mots clés *Navicula perminuta*, adhésion). En effet, des études ont montré que *N. perminuta* adhère plus fortement à des surfaces hydrophobes telles que des élastomères que sur des surfaces hydrophiles (Wanka *et al.*, 2021 ; Holland *et al.*, 2004).

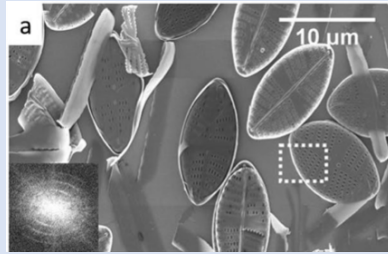


Figure 03. Image MEB de *Navicula perminuta*. D'après Aguirre et al., 2018.

b) Microorganismes pathogènes opportunistes

(i) *Pseudomonas aeruginosa*

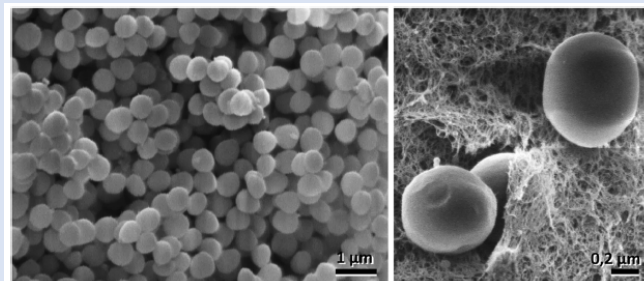
*P. aeruginosa* est un bacille à Gram-négatif monoflagellé (Figure 04). Cette bactérie environnementale ubiquitaire est à l'origine de nombreuses maladies chez les plantes, les animaux mais aussi chez l'Homme en raison de sa capacité à former des biofilms sur les surfaces humides. De ce fait, elle est à l'origine de nombreuses infections nosocomiales et/ou mortelles chez les personnes immunodéprimées (patients atteints de cancer, du VIH, de mucoviscidose, grands brûlés ou encore patients en post-chirurgie) (Gale et al., 2015 ; Wu et al., 2015 ; Gomila et al., 2018). En 2017, *P. aeruginosa* a été reconnue comme l'une des bactéries les plus dangereuses pour la santé humaine et a été listée comme pathogène prioritaire pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques par l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization, Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis, Geneva, Switzerland, 2017). Sa haute résistance aux agents microbiens est due, d'une part à son adaptabilité et à sa résistance intrinsèque, mais aussi à sa capacité à former des biofilms, protégeant ainsi les cellules bactériennes de toutes contraintes environnementales aboutissant à une colonisation et une persistance à long terme (Pang et al., 2019 ; Moradali et al., 2017). Cette capacité à former un biofilm est favorisée par des communications au sein des communautés microbiennes de *P. aeruginosa*, plus connues sous le nom de quorum sensing. Cette bactérie est donc particulièrement étudiée par la communauté scientifique que cela soit dans le domaine du développement de nouveaux antimicrobiens, de molécules anti-quorum sensing mais aussi dans la recherche de nouveaux matériaux antiadhésifs.



**Figure 04.** Image MEB de *Pseudomonas aeruginosa* (X10 000). D'après Watanabe et Senba, 2009.

(ii) *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram positif (**Figure 05**) que l'on retrouve de façon persistante (25%) ou intermittente (60%) dans les narines de la population adulte en bonne santé (Ellis et al, 2014). Des études ont établi un lien entre cette colonisation nasale et un risque accru d'infections (Dall Antonia *et al.*, 2005). Les infections concernées peuvent être des infections aiguës, telles que des bactériémies ou des abcès cutanés, causées le plus souvent par la production de toxines et d'exoenzymes sécrétées par les cellules planctoniques (Gordon & Lowy, 2008). Mais ces infections peuvent également être chroniques lorsque les cellules bactériennes s'associent sous forme de biofilm. Elles colonisent alors des surfaces inertes telles que les matériaux implantés (cathéters, prothèses articulaires, stimulateurs cardiaques) engendrant des infections de type ostéomyélite ou endocardite (Parsek & Singh, 2003 ; Kiedrowski & Horswill, 2011 ; Barrett & Atkins, 2014). Dans le cas de dispositifs médicaux infectés, le retrait est souvent nécessaire pour traiter l'infection générant ainsi des coûts matériels et humains importants (Darouiche, 2004).



**Figure 05.** Image MEB de *Staphylococcus aureus*. À gauche : vue d'ensemble des cellules en colonie ; à droite : cellules individuelles à fort grossissement. D'après Zubair *et al.*, 2015.

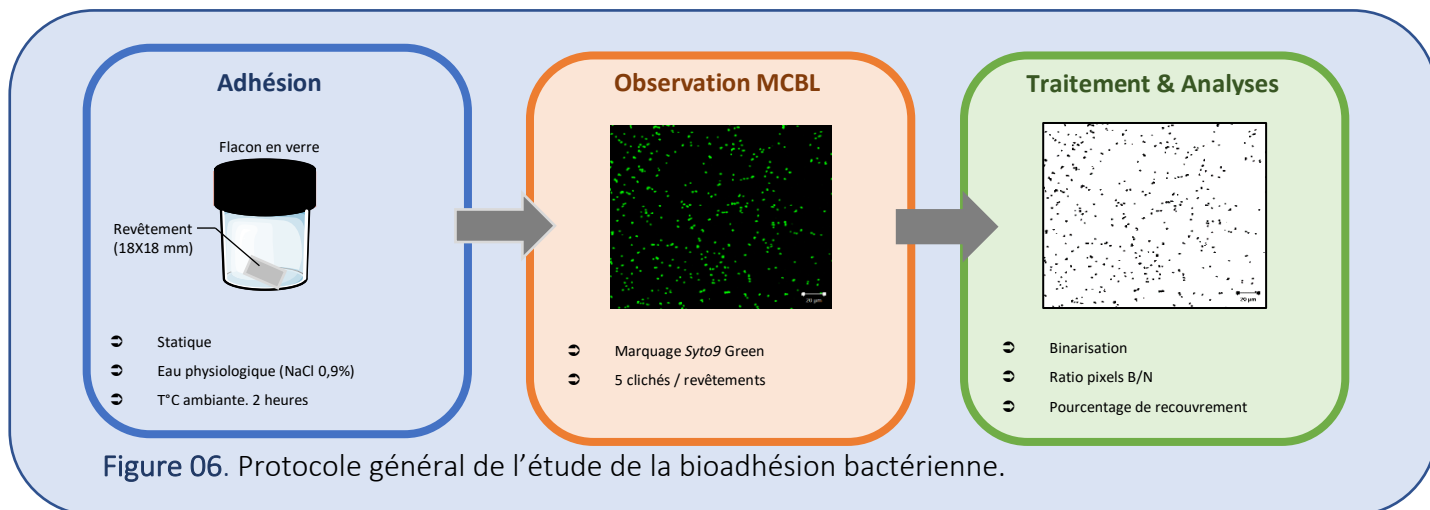
## 2. Protocole d'adhésion

Les protocoles ont été élaborés en veillant à modifier le moins possible les revêtements préparés et en limitant la perturbation des processus biologiques. L'observation au microscope confocal à balayage laser (MCBL) a permis de limiter les procédures de traitement et de préparation d'échantillons et de ce fait d'introduire un minimum de biais dans nos analyses. L'élaboration de ces protocoles a toutefois dû prendre en compte certaines contraintes notamment en termes de disponibilité des polymères et copolymères utilisés.

### a) Bactéries

L'évaluation de l'activité anti-bioadhésion des différentes surfaces a été réalisée au sein d'un flacon en verre suivant le protocole schématisé dans la **Figure 06**. L'utilisation d'un flacon de verre permet de s'affranchir des matériaux plastiques sur lesquels les bactéries auraient préférentiellement adhéré et de ce fait biaiser les résultats. Les bactéries cultivées en milieu LB ou Zobell (*P.aeruginosa*/*S.aureus* ou *Bacillus* 4J6 respectivement) sont reprises dans de l'eau physiologique (EP) à une densité optique à 590nm (DO590) égale à 0,1 ( $\cong 3.10^8$  CFU/mL). L'EP est un liquide de même osmolarité que le sérum sanguin ( $\cong 280$  à  $290$  mOsm/mL) ce qui permet d'éviter l'éclatement des cellules par choc osmotique. La similitude en termes de force ionique avec le sérum sanguin ( $\cong 154$  mmol/L) permet également de limiter l'influence du milieu sur les interactions électrostatiques. De plus, l'absence de molécules organiques permet d'éviter le conditionnement de la surface et donc sa potentielle modification en termes d'énergie de surface et/ou d'interactions. Enfin, l'absence de nutriments, défavorable à la croissance cellulaire, est un facteur clé de la formation de biofilm puisqu'elle favorise le passage de l'état planctonique à l'état sessile des cellules. Chaque flacon en verre contient un revêtement déposé sur lame de verre et reçoit un inoculum de même volume (10 mL). Les bactéries sont laissées adhérer pendant deux heures, temps suffisant pour estimer l'adhésion bactérienne sans que ces dernières ne forment de micro-colonies, qui rendraient difficile l'analyse d'image par binarisation. Cette étape a été réalisée en condition statique et à température ambiante. Chaque revêtement a été mis en contact six fois avec chaque microorganisme de façon à obtenir des réplicats biologiques permettant de réaliser des analyses statistiques.



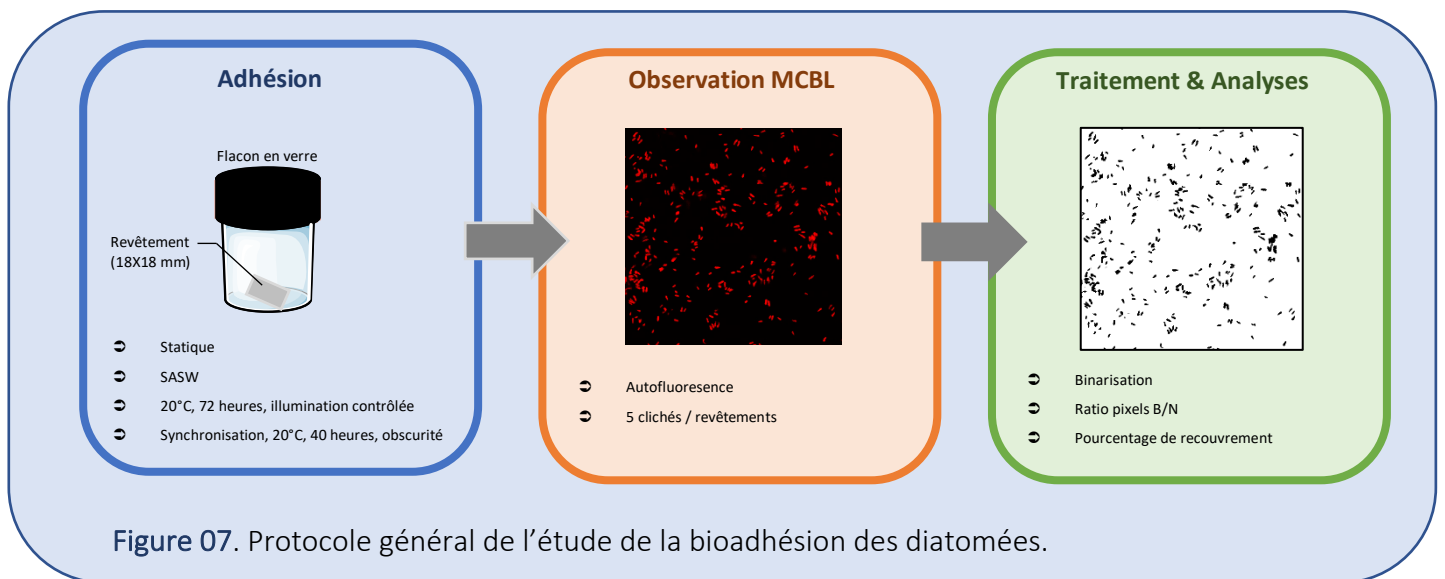


Après les deux heures d'adhésion, les revêtements sont rapidement rincés de façon à éliminer les bactéries planctoniques et les bactéries adhérentes sont marquées au Syto9 Green ( $5\mu\text{M}$ ), fluorochrome permettant de colorer les bactéries *via* la coloration de leurs acides nucléiques. Chaque revêtement est ensuite observé au microscope confocal à balayage laser (MCBL) à l'objectif X40. Cinq clichés par revêtement sont réalisés sur le logiciel Zen afin d'être analysés par la suite *via* le logiciel Image J. Cette analyse consiste à binariser en noir et blanc le cliché pris au MCBL, permettant au logiciel d'attribuer le nombre de pixels correspondant et d'établir un ratio blanc/noir. Ce ratio permet ainsi d'établir un pourcentage de recouvrement des bactéries sur la surface testée. Des analyses statistiques sont ensuite réalisées de façon (i) à comparer le potentiel antiadhésif des surfaces testées par rapport au système de référence et (ii) à évaluer l'effet de l'ajout du PEG au sein des matrices PHA.

#### b) Diatomées

L'évaluation de l'activité anti-bioadhésion a été réalisée en utilisant le même flacon en verre que précédemment et ce pour les mêmes raisons qu'évoquées pour les bactéries (**Figure 07**). Les diatomées sont cultivées en eau de mer artificielle stérile (SASW) supplémentée avec 2% de milieu Guillard F/2 et un mélange d'antibiotiques (streptomycine  $500\mu\text{g.L}^{-1}$ , pénicilline  $4\text{g.L}^{-1}$ , chloramphénicol  $100\text{mg.L}^{-1}$ ) pendant 15 jours sous illumination contrôlée ( $110\mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  avec une alternance de période lumière/obscurité de 18h/6h) afin d'atteindre la phase stationnaire. Les cultures sont ensuite synchronisées grâce à une obscurité prolongée (40 heures) de sorte que les cellules soient toutes à la même étape du cycle cellulaire (phase G1)

(Huysman *et al.*, 2010). Enfin, les cultures sont reprises dans une solution d'eau de mer artificielle à  $10^4$  cellules/mL puis incubées dans les flacons en verre contenant les revêtements, pendant 72h dans une armoire phytotronique ( $20^\circ\text{C}$ ,  $110 \mu\text{mol photons m}^2.\text{s}^{-1}$  avec une alternance de période lumière/obscurité de 18h/6h). Cette durée d'adhésion a été déterminée expérimentalement. En effet, plusieurs temps ont été testés en amont de façon à déterminer le temps d'adhésion optimal pour les diatomées. Le temps d'adhésion utilisé pour les bactéries n'a pu être utilisé ici car les mécanismes d'adhésion sont très différents entre ces deux types de microorganismes. En effet, à deux heures, très peu voire aucune diatomée n'avait adhéré à la surface des revêtements et ce même pour le PDMS, décrit comme étant une surface fortement colonisée par les diatomées. Une durée adéquate a donc été déterminée à 72 heures, temps pour lequel les diatomées adhéraient à la surface sans pour autant former des micro-colonies incompatibles avec l'analyse d'image par binarisation.

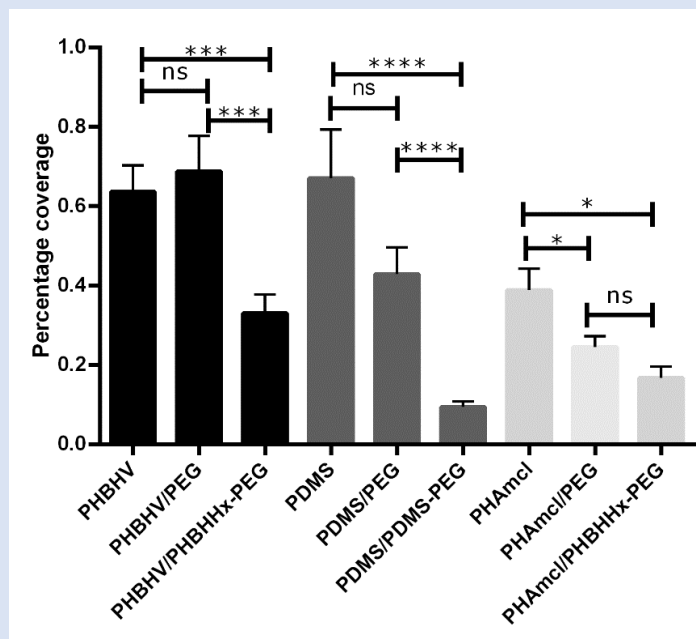
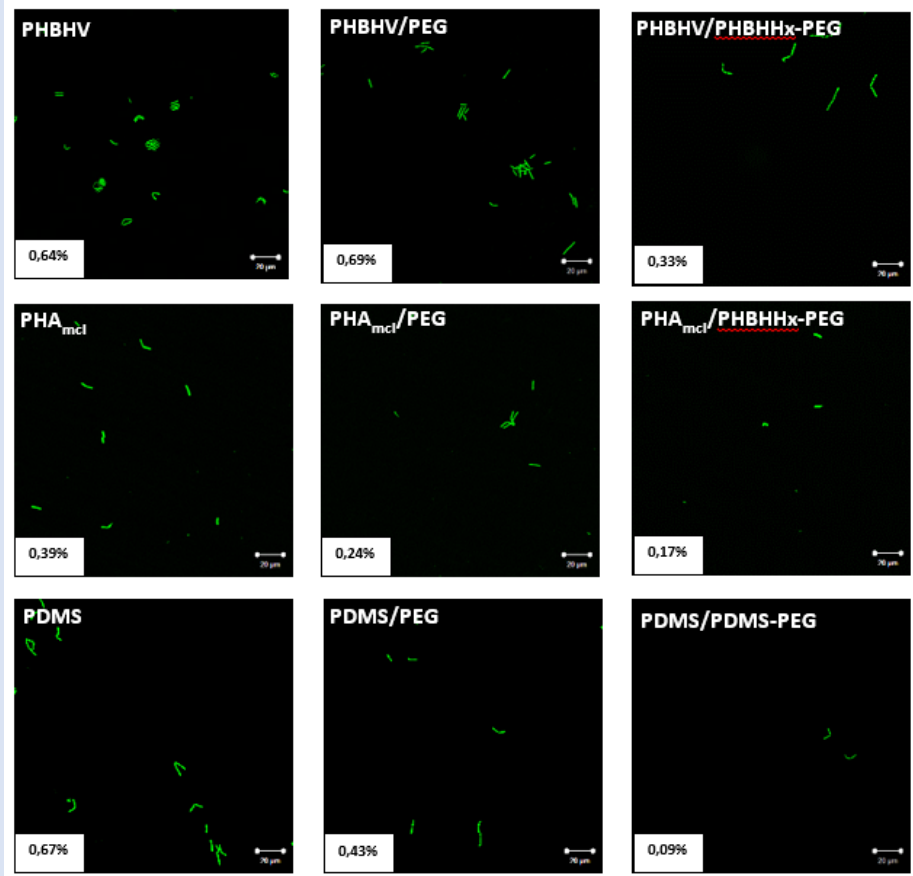
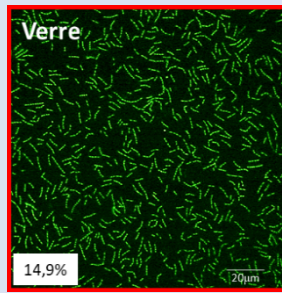


À la suite des 72 heures d'adhésion, les revêtements sont rincés rapidement de façon à éliminer les diatomées non adhérentes. L'autofluorescence générée par ces microorganismes photosynthétiques permet de s'affranchir d'une quelconque étape de marquage. De la même façon que précédemment, cinq clichés par revêtement sont réalisés par MCBL puis analysés *via* le logiciel Image J. La binarisation permet ainsi de déterminer le pourcentage de recouvrement des diatomées sur les surfaces testées.

## II. Biocontamination d'origine marine

### 1. Adhésion avec *Bacillus* 4J6

À partir des images prises par MCBL (**Figure 08**), on constate que le pourcentage d'adhésion est faible quel que soit le revêtement utilisé ( $\cong 0,6$  à  $0,1\%$ ). Afin de s'assurer du potentiel adhésif de *Bacillus* 4J6, des tests d'adhésion sur verre (surface pro-adhésive de référence) ont été réalisés et le pourcentage de recouvrement était bien plus élevé et cohérent avec les données contenues dans la littérature ( $\cong 15\%$ ) (Zea-Obando *et al.*, 2018). Le phénomène de faible adhésion observé sur nos revêtements ne peut donc pas être attribué au fait que la bactérie ne soit pas adhérente mais bien aux surfaces testées. Si l'on compare, dans un premier temps, uniquement l'adhésion de *Bacillus* 4J6 sur les polymères seuls, on constate qu'aucune différence significative n'est observée. Cette bactérie semble donc initialement adhérer de la même façon quelle que soit la surface. En revanche, en ajoutant le PEG libre dans les revêtements, on constate deux comportements différents : soit une absence d'effet significatif (PHBHV et PDMS), soit une légère diminution de l'adhésion (PHA<sub>mcl</sub>). En effet, seul, l'ajout de PEG libre dans la matrice PHA<sub>mcl</sub> semble avoir un impact sur la bioadhésion (- 50% de diminution de l'adhésion par rapport au système PHA<sub>mcl</sub> seul). Cette différence de comportement peut être attribuée à une mauvaise répartition/rétention du PEG à la surface des revêtements dûe à l'incompatibilité entre un polymère hydrophobe (PHA ou PDMS) et un polymère hydrophile (PEG). Cette hypothèse semble être confirmée lors de l'ajout de PEG sous forme de copolymère puisqu'une diminution significative de l'adhésion est observée et ce pour les trois systèmes testés (PHBHV/PHBHHx-PEG, PDMS/PDMS-PEG, PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG). La partie PDMS ou PHA contenue dans les copolymères permettrait donc de compatibiliser les deux polymères. L'efficacité des systèmes à base de copolymère varient de 48 à 87% de diminution de l'adhésion de *Bacillus* 4J6 par rapport à la matrice seule. Si l'on compare le système de référence PDMS/PDMS-PEG aux systèmes PHA formulés avec un copolymère à base de PEG, on constate que le PHBHV/PHBHHx-PEG (PHA à courtes chaînes) est peu efficace alors que le système PHA<sub>mcl</sub> /PHBHHx-PEG (PHA à moyennes chaînes) possède une efficacité similaire à celle du système PDMS/PDMS-PEG.



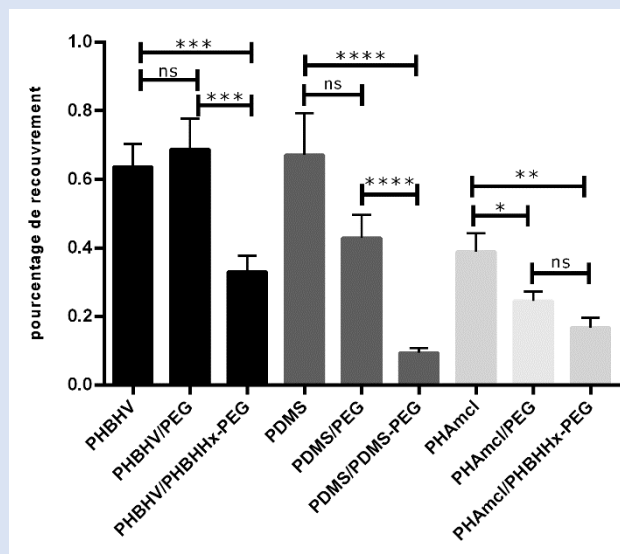
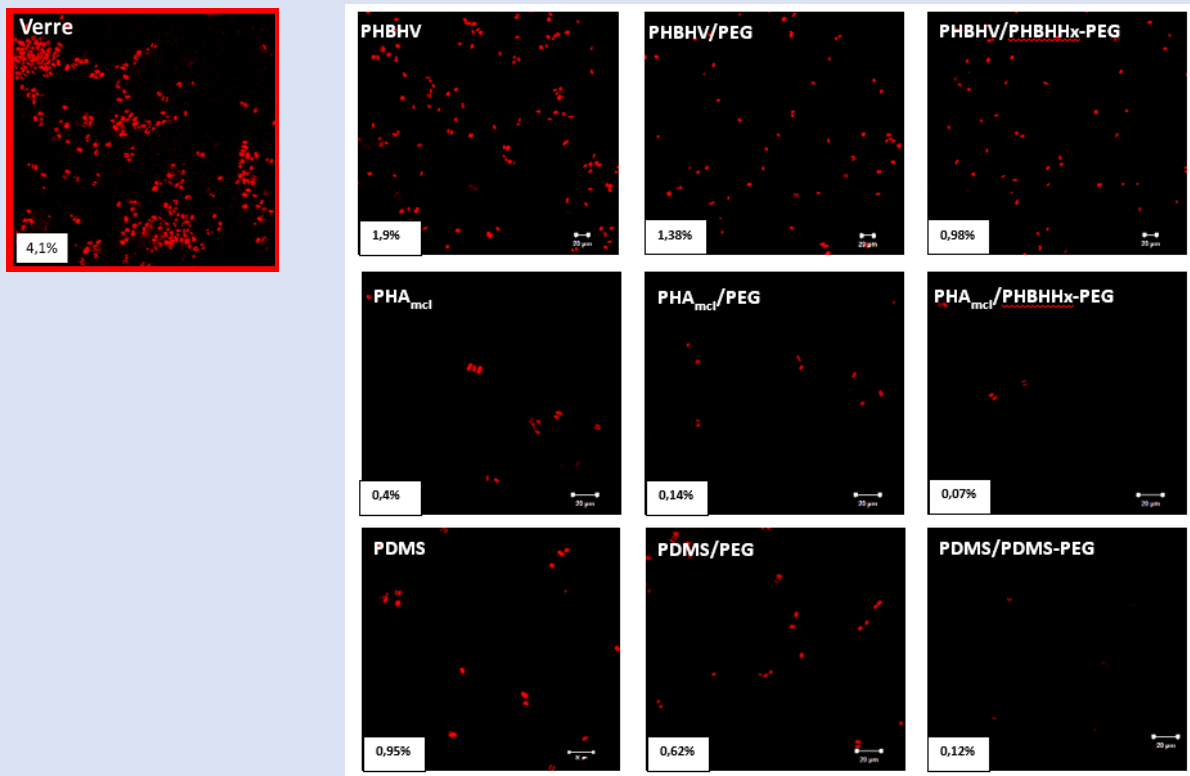
**Figure 08.** Recouvrement des surfaces par *Bacillus* 4J6 après 2h d'incubation. (a) Images obtenues par MCBL (1036x1036 px) après marquage au Syto9 Green, barre = 20 μm, surface pro-adhésive entourée en rouge et (b) Représentation graphique du pourcentage de recouvrement en fonction des revêtements testés. \*\*\*\*p < 0,0001 ; \*\*\* p < 0,001 ; \* p < 0,1 et ns = non significatif.

Une étude portant sur l'adhésion de *Bacillus* 4J6 sur différentes surfaces amphiphiles a été menée par Faÿ *et al.* (2016) et la tendance obtenue est similaire à celle montrée ici. En effet, l'étude en question a observé une relation entre la proportion d'additif amphiphile PEO-silane et l'adhésion bactérienne. Ainsi, pour une surface silane simple, le pourcentage de recouvrement après 6h d'adhésion était de 5,15% (contre à peine 1% après 2h d'adhésion pour le système PDMS testé ici). Une décroissance de l'adhésion est par la suite observée, en effet, plus le pourcentage d'additif amphiphile augmente moins la surface est colonisée par *Bacillus* 4J6 (2,52% de recouvrement bactérien après 6h pour 1% d'additif amphiphile PEO-silane). Dans notre étude, le pourcentage d'additif ajouté à la matrice seule est inférieur à 1% et le temps d'adhésion est plus court (2h) mais l'effet antiadhésif décrit par la littérature est retrouvé (0,1% de recouvrement bactérien sur le système amphiphile PDMS/PDMS-PEG). L'étude menée ici montre également qu'en plus de l'efficacité antiadhésive obtenue avec les surfaces amphiphiles à base de silicone, les surfaces amphiphiles à base de PHA ont le même comportement antiadhésif puisque l'on retrouve également une nette diminution de l'adhésion de *Bacillus* 4J6 sur les revêtements PHBHV-PHBHHx-PEG et PHA<sub>mcl</sub>-PHBHHx-PEG (-50% et -75% respectivement).

## 2. Adhésion avec *Navicula perminuta* et *Phaeodactylum tricornutum*

### a) *Navicula perminuta*

Les résultats montrent que *N.perminuta* semble adhérer préférentiellement sur des matrices hydrophobes dépourvues de PEG (PHBHV, PDMS et PHA<sub>mcl</sub>) (**Figure 09**). Ces résultats sont cohérents avec la littérature puisqu' Holland *et al.* ont montré que *N.perminuta* adhérerait préférentiellement sur des surfaces hydrophobes (Wanka *et al.*, 2021 ; Holland *et al.*, 2004). Cependant, ce critère ne semble pas être le seul pris en compte par la diatomée puisque les pourcentages de recouvrement sont deux fois plus importants entre le PHBHV et le PDMS ( $\cong$  2% et 1% respectivement) alors que le PHBHV est une surface moins hydrophobe que le PDMS (87° d'angle de contact avec l'eau contre 95° respectivement).



**Figure 09.** Recouvrement des surfaces par *Navicula perminuta* après 72h d'incubation. (a) Images obtenues par MCBL (1036x1036 px), barre = 20 µm, surface pro-adhésive entourée en rouge (b) Représentation graphique du pourcentage de recouvrement en fonction des revêtements testés. \*\*\*\*p < 0,0001 ; \*\*\* p < 0,001 ; \* p < 0,1 et ns = non significatif.

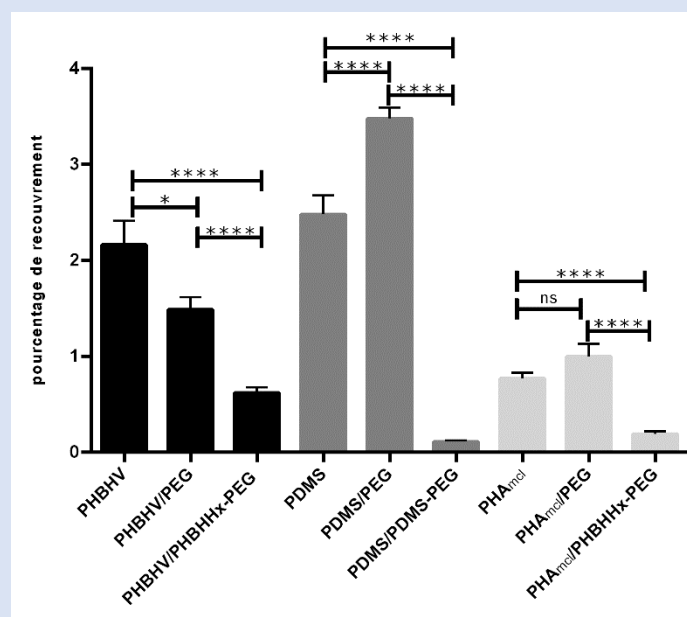
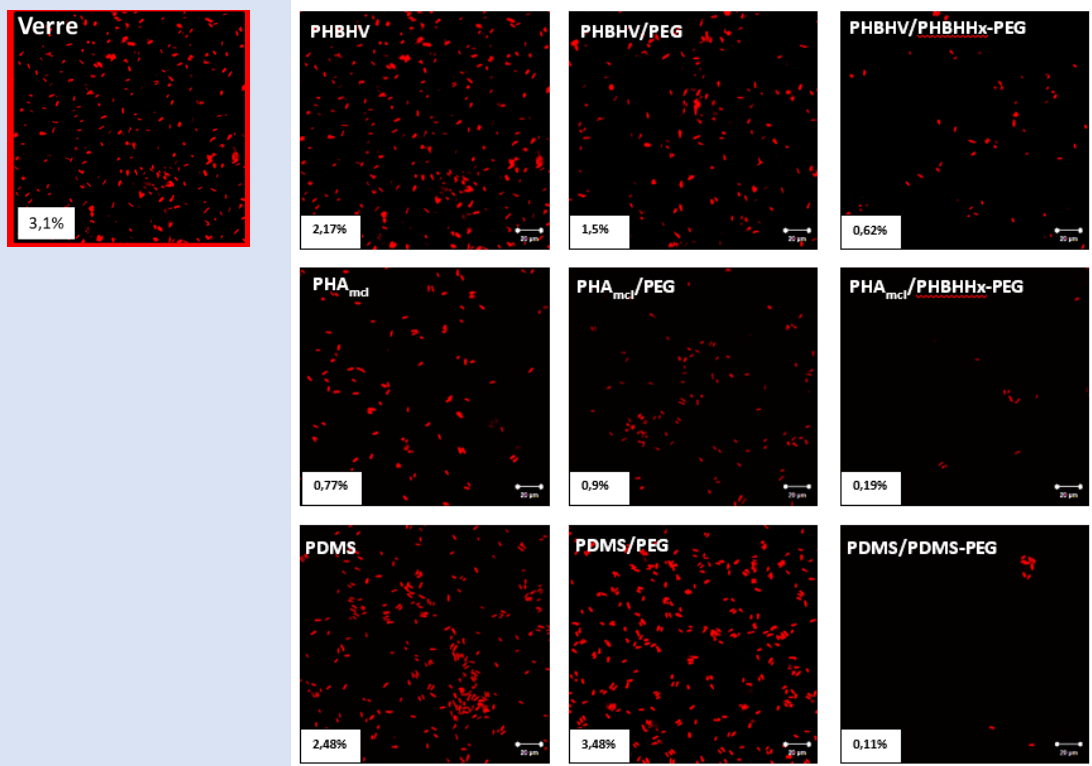
L'hydrophilie apportée par le PEG permet toutefois de limiter l'adhésion mais ce résultat n'est significatif que lorsqu'il est ajouté sous forme de copolymère. En effet, 50% de l'adhésion est

évitée lorsque le système contient un copolymère à base de PEG. Ce résultat n'est pas retrouvé lorsque le PEG est ajouté librement au système. Une nouvelle fois, la question de rétention/répartition du PEG est soulevée prouvant l'intérêt de formuler des systèmes à base de copolymère. En termes d'efficacité, le système amphiphile à base de PHA moyennes chaînes (PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG) est une alternative intéressante au système de référence (PDMS/PDMS-PEG).

Les résultats concernant le système amphiphile à base de PHA courtes chaînes (PHBHV/PHBHHx-PEG) sont cohérents puisque d'ores et déjà, la matrice seule de PHBHV était préférentiellement colonisée par la diatomée *N. perminuta*. Bien que l'hydrophilie apportée par le PEG à cette matrice ait permis de diminuer l'adhésion, ce système antiadhésif est beaucoup moins efficace que le système amphiphile de référence (PDMS/PDMS-PEG) ou le système amphiphile à base de PHA moyennes chaînes (PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG). L'explication pourrait provenir des caractéristiques de surface puisqu'il a été montré précédemment que la rugosité du système à base de PHBHV (71,4 nm) était plus importante que celle du PDMS (4,5 nm) ou encore du PHA<sub>mcl</sub> (4,4 nm). Par ailleurs, les propriétés mécaniques du PHBHV sont très différentes de celles du PDMS, avec notamment un module d'élasticité de 2000 MPa pour le PHBHV contre 1 MPa pour le PDMS, ce qui semble confirmer l'influence de l'élasticité du polymère sur l'adhésion.

#### b) *Phaeodactylum tricornutum*

Cette diatomée adhère préférentiellement au système à base de PDMS ce qui est en corrélation avec les données retrouvées dans la littérature (Holland *et al.*, 2004). En ce qui concerne les matrices de PHA seules, des résultats similaires à *N. perminuta* sont obtenus, à savoir une adhésion plus importante sur le PHBHV que sur le PHA<sub>mcl</sub> ( $\cong$  2% et 1% respectivement) (**Figure 10**). La différence de topographie et d'élasticité de surface semble là aussi jouer un rôle important puisque les deux PHA sont similaires en ce qui concerne le degré d'hydrophobie (angle de contact de  $\cong$  80°).



**Figure 10.** Recouvrement des surfaces par *Phaeodactylum tricornutum* après 72h d'incubation. (a) Images obtenues par MCBL (1036x1036 px) après marquage au Syto9 Green, barre = 20 µm, surface pro-adhésive entourée en rouge et (b) Représentation graphique du pourcentage de recouvrement en fonction des revêtements testés. \*\*\*\* $p < 0,0001$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*  $p < 0,1$  et ns = non significatif.

L'ajout de PEG libre à la matrice PDMS (PDMS/PEG) n'a aucun effet antiadhésif, il semble, au contraire, que cela ait eu l'effet inverse puisque l'adhésion a augmenté de 30% sur cette



surface. Cette augmentation n'est pas retrouvée avec les systèmes à base de PHA. Là encore, une mauvaise rétention/répartition du PEG pourrait être mise en cause. Cette possible lixiviation du PEG pourrait également être à l'origine de modification de la topographie de surface entraînant une rugosité plus importante. Cette rugosité pourrait permettre à la diatomée d'établir davantage de points d'ancrage avec la surface et donc de la coloniser plus facilement. Les résultats permettent, une nouvelle fois, de prouver l'intérêt et la nécessité de formuler des revêtements amphiphiles avec des copolymères à base de PEG puisque pour les trois matrices l'ajout de copolymère PEG diminue considérablement l'adhésion de *P. tricornutum* (jusqu'à  $\cong$  -80% d'adhésion). De la même façon que pour *N. perminuta* le système à base de PHA<sub>mcl</sub> est plus efficace que le système à base de PHBHV et se rapproche fortement des performances antiadhésives obtenues avec le PDMS/PDMS-PEG.

c) Comparaison entre les deux diatomées

Globalement les résultats montrent que *P. tricornutum* adhère davantage aux revêtements étudiés que *N. perminuta*. Cette différence peut être attribuée à leur mécanisme d'adhésion et à une sécrétion d'exopolysaccharides différents dans le temps (**Tableau 03**). En effet, le temps d'adhésion utilisée ici est de 72 heures, toutefois il est possible que la sécrétion de molécules pro-adhésives chez *N. perminuta* soit différée dans le temps, expliquant la différence de recouvrement des surfaces par rapport à *P. tricornutum*.

**Tableau 03.** Récapitulatif des pourcentages de recouvrements en fonction des revêtements pour les deux diatomées testées *N. perminuta* et *P. tricornutum*.

	Pourcentage de recouvrement	
	<i>Navicula perminuta</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
PHBHV	1,9% +/- 0,99	2,17% +/- 1,56
PHBHV/PEG	1,38% +/- 0,94	1,49% +/- 0,82
PHBHV/PHBHHx-PEG	0,98% +/- 0,29	0,62% +/- 0,37
PHA <sub>mcl</sub>	0,4% +/- 0,18	0,8% +/- 0,34
PHA <sub>mcl</sub> /PEG	0,14% +/- 0,04	1% +/- 0,73
PHA <sub>mcl</sub> /PHBHHx-PEG	0,07% +/- 0,03	0,19% +/- 0,16

PDMS	0,95% +/- 0,7	2,48% +/- 1,07
PDMS/PEG	0,62% +/- 0,27	3,48% +/- 0,62
PDMS/PDMS-PEG	0,12% +/- 0,2	0,11% +/- 0,06

En ce qui concerne *N. perminuta*, les résultats d'adhésion montrent une influence significative des propriétés physiques et mécaniques sur les revêtements bruts en particulier la rugosité à l'échelle nanométrique et le module d'élasticité (Figure 11). Toutefois, le paramètre clé responsable de la nette diminution de l'adhésion est l'ajout du PEG sous forme copolymère qui semble ainsi favoriser la formation d'une possible couche d'hydratation en surface des revêtements et limiter l'adhésion. (Figure 09 et 10).

Pour *P. tricornutum*, les résultats d'adhésion sur les revêtements bruts diffèrent de ceux obtenus pour *N. perminuta* notamment en termes d'influence des propriétés physiques et mécaniques (Figure 11). En effet, alors que *N. perminuta* semble être influée par la topographie de surface et le module élastique, *P. tricornutum* quant à elle n'y est peu voire pas sensible. En revanche, l'hydrophilie apportée en surface par le copolymère à base de PEG a un effet anti-adhésif très net sur *P. tricornutum* et ce quel que soit le revêtement (Figure 10).

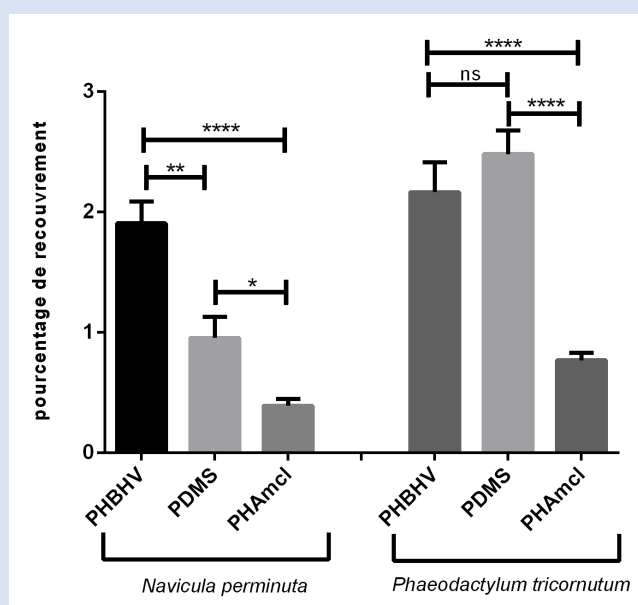


Figure 11. Pourcentage de recouvrement obtenu sur les revêtements bruts pour les deux diatomées testées. \*\*\*\* $p < 0,0001$  ; \*\*  $p < 0,01$  et ns = non significatif.

En somme, les résultats montrent que le principal paramètre permettant d'obtenir un effet antiadhésif pour les deux diatomées étudiées ici est bien l'hydrophilie apportée en surface par l'ajout du copolymère à base de PEG. Ces données sont cohérentes avec celles obtenues dans la littérature puisque récemment Wanka *et al.* ont montré l'effet antiadhésif apporté par l'hydrophilie de surface (méthacrylate de poly(éthylène)glycol) sur *Cobetia marina* (bactérie marine) et *Navicula perminuta* (Wanka *et al.*, 2021).

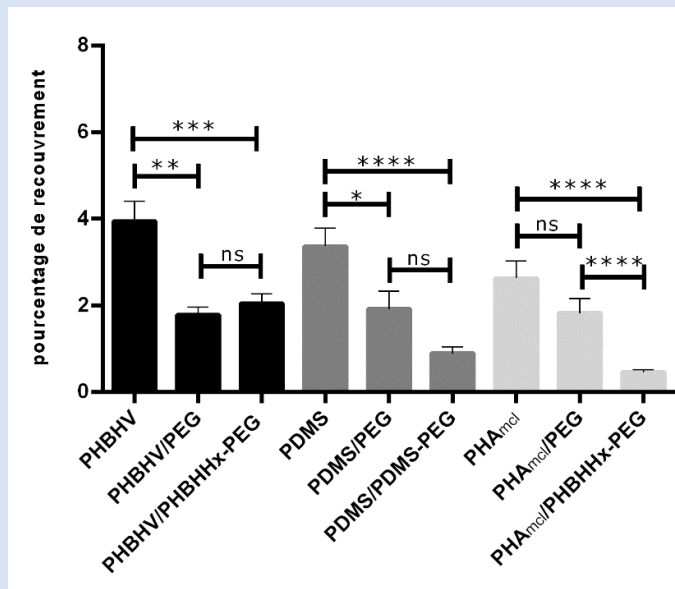
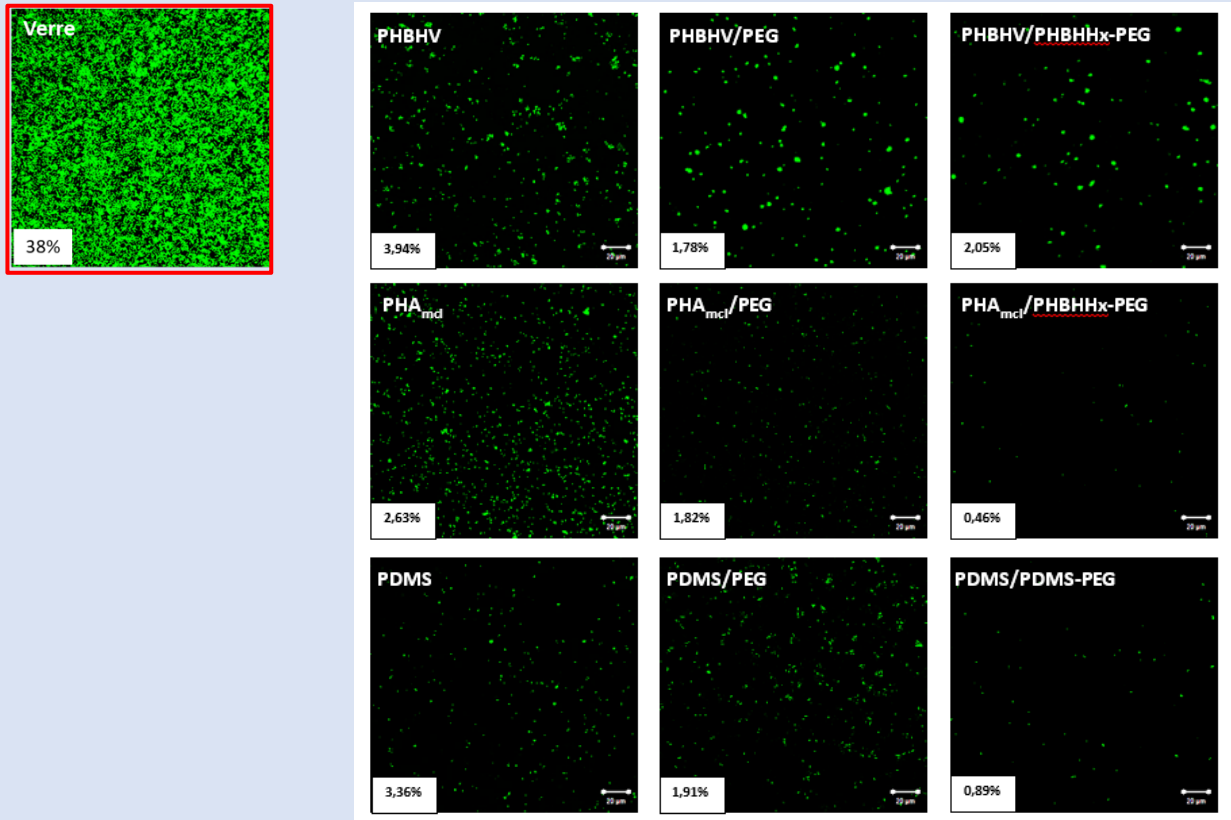
Les résultats suggèrent toutefois qu'il est possible d'optimiser les capacités antiadhésives des revêtements en utilisant des revêtements élastomères (ayant un module d'élasticité de l'ordre de 1 MPa) plutôt que semi-cristallins. De plus, bien que cela n'ait pas été testé dans ce chapitre, de nombreuses études ont montré l'intérêt d'utiliser des revêtements ayant un faible module élastique afin d'obtenir un effet fouling-release en condition dynamique (Wanka *et al.*, 2021). Cet aspect sera traité au chapitre suivant (Chapitre 4).

### III. Biocontamination d'origine biomédicale

#### 1. Adhésion avec *Pseudomonas aeruginosa*

Si l'on compare les pourcentages de recouvrement du revêtement PDMS seul aux deux revêtements PHA (PHBHV et PHA<sub>mcl</sub>) on note une différence (**Figure 12**). En effet, le PHA<sub>mcl</sub> semble avoir une capacité antiadhésive plus importante que le PDMS tandis que le PHBHV, est à l'inverse, davantage colonisé par *P.aeruginosa*. Cette tendance est confirmée lors de l'ajout de PEG libre ou de copolymère PEG. L'ajout de PEG libre au sein des systèmes PDMS et PHBHV montre une diminution significative de l'adhésion ( $\cong -2\%$ ) toutefois ce résultat n'est pas retrouvé pour le système PHA<sub>mcl</sub> puisque le pourcentage de recouvrement est quasi similaire en présence ou en absence de PEG libre ( $\cong 3\%$ ). En revanche, une efficacité antiadhésive indéniable est mise en évidence lors de l'ajout de PEG sous forme de copolymère et ceci pour les trois systèmes (PHBHV, PHA<sub>mcl</sub>, PDMS). En effet, en ce qui concerne le système à base de PDMS, l'ajout du copolymère PDMS-PEG montre une diminution significative de l'adhésion (-98% d'adhésion). Des différences sont observées entre les deux systèmes à base de PHA. Là encore le PHA<sub>mcl</sub>/PHBHVx-PEG montre des capacités antiadhésives nettement supérieures à

celles du PHBHV/PHBHHx-PEG (diminution de 80% de l'adhésion pour le PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG contre 50% pour le PHBHV/PHBHHx-PEG).

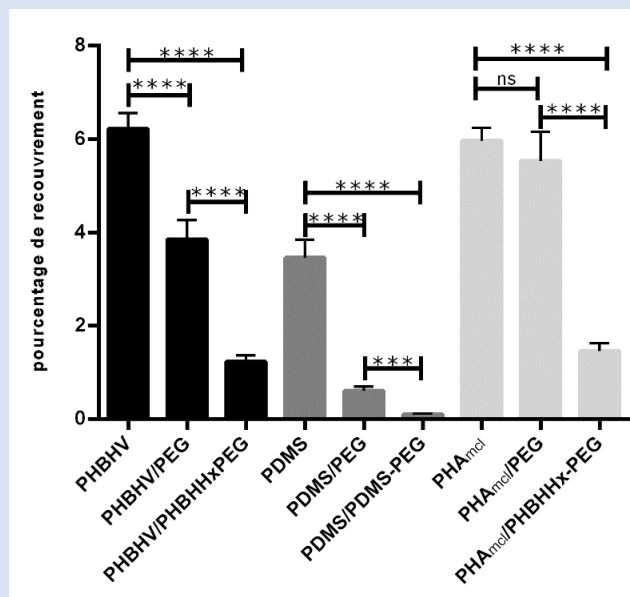
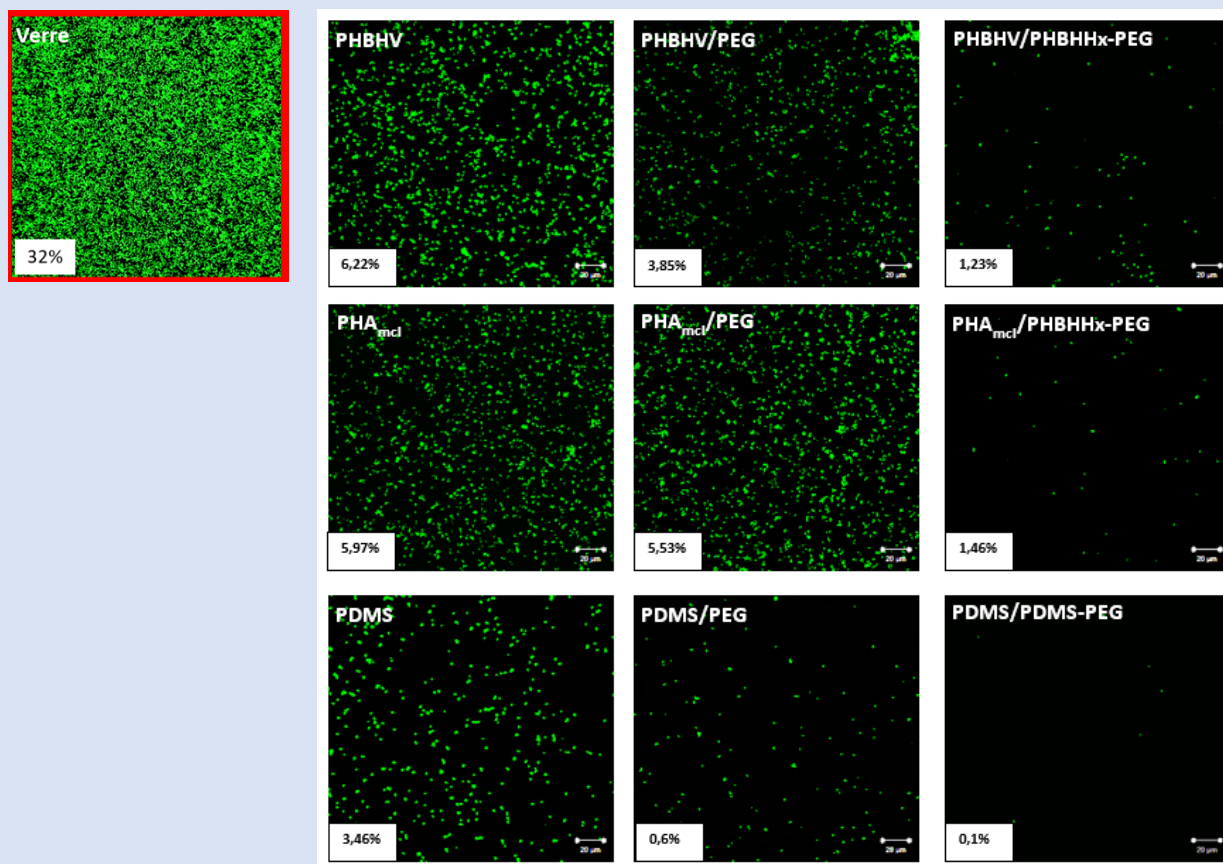


**Figure 12.** Recouvrement des surfaces par *Pseudomonas aeruginosa* après 2h d'incubation. (a) Images obtenues par MCBL (1036x1036 px) après marquage au Syto9 Green, barre = 20  $\mu\text{m}$ , surface pro-adhésive entouré en rouge et (b) Représentation graphique du pourcentage de recouvrement en fonction des revêtements testés. \*\*\*\* $p < 0,0001$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \* $p < 0,1$  et ns = non significatif.

Ces résultats suggèrent que l'hydrophilie apportée par le PEG permet de diminuer l'adhésion de *P. aeruginosa* et ce sur quasiment tous les systèmes testés. Il est également important de noter que les pourcentages de recouvrement obtenus avec les systèmes à base de PDMS sont cohérents avec ceux retrouvés dans la littérature. Par exemple, Nejadnik *et al.* ont étudié l'adhésion de *P.aeruginosa* sur des surfaces en silicone et le pourcentage de recouvrement après 2h d'adhésion était similaire à celui obtenu ici (environ 2%) (Nejadnik *et al.*, 2008).

## 2. Adhésion avec *Staphylococcus aureus*

Si l'on prend les résultats obtenus avec les matrices seules, on constate que *S. aureus* adhère préférentiellement aux deux matrices à base de PHA (PHBHV ou PHA<sub>mcl</sub>) plutôt que sur le PDMS ( $\cong$  6% de pourcentage de recouvrement pour les systèmes PHA contre  $\cong$  4 % pour le PDMS) (**Figure 13**). L'ajout de PEG libre au sein des matrices permet de diminuer significativement l'adhésion mais ce uniquement pour les systèmes PHBHV/PEG et PDMS/PEG (- 40% d'adhésion et - 80% respectivement). Pour la matrice à base de PHA<sub>mcl</sub>, l'ajout de PEG libre n'a pas d'incidence significative sur la bioadhésion ( $\cong$  6% de pourcentage de recouvrement). En revanche, de la même manière que pour l'adhésion de *P. aeruginosa*, l'ajout de PEG sous forme de copolymère a un effet notable sur la diminution de l'adhésion de *S. aureus*. En effet, une diminution de 75 à 97% de l'adhésion est observée lors de l'ajout du copolymère à base de PEG. En ce qui concerne l'adhésion de *S.aureus*, le système PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG a une efficacité comparable à celle du système PHBHV/PHBHHx-PEG. Malgré les remarquables capacités antiadhésives de ces deux systèmes PHA ( $\cong$  1 % de pourcentage de recouvrement), les résultats obtenus avec le système de référence PDMS/PDMS-PEG sont bien meilleurs puisque quasiment aucune bactérie n'adhère sur sa surface. Une fois encore, il est important de noter que les pourcentages de recouvrement observés ici sont cohérents avec ceux obtenus dans la littérature. En effet, à titre d'exemple, une étude a été menée sur les propriétés antiadhésives de revêtements à base de PMOX (poly(2-méthyl-2-oxazoline)) et les résultats ont montré une adhésion comprise entre 0,1% et 6% pour *S.aureus* en fonction du revêtement testé (He *et al.*, 2016).



**Figure 13.** Recouvrement des surfaces par *Staphylococcus aureus* après 2h d'incubation. (a) Images obtenues par MCBL (1036x1036 px) après marquage au Syto9 Green, barre = 20 μm, surface pro-adhésive entouré en rouge et (b) Représentation graphique du pourcentage de recouvrement en fonction des revêtements testés. \*\*\*\*p < 0,0001 ; \*\*\* p < 0,001 ; \* p < 0,1 et ns = non significatif.

L'intégralité des résultats obtenus a permis de mettre en avant deux choses essentielles : (i) premièrement, il est nécessaire de formuler le système en intégrant le PEG sous la forme de copolymère de façon à compatibiliser les polymères hydrophobes (PDMS ou PHA) et hydrophiles (PEG), (ii) deuxièmement, en termes d'efficacité antiadhésive, le système à base de PHA<sub>mcl</sub> semble être le meilleur candidat par rapport au PHBHV.

L'analyse des propriétés physico-chimiques et mécaniques des différents revêtements formulés permet de mieux comprendre ou du moins de corréliser ces résultats d'adhésion avec les différentes observations faites au chapitre 2 (**Tableau 04**).

**Tableau 04.** Récapitulatif des pourcentages de recouvrement en fonction des différents revêtements et pour les cinq microorganismes testés.

	Pourcentage de recouvrement					Propriétés physico-chimiques		Propriétés mécaniques
	<i>Bacillus 4J6</i>	<i>N.perminuta</i>	<i>P.tricornutum</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	Angle de contact avec l'eau (θ)	Rugosité (nm)	Module d'élasticité (Mpa)
<b>Système de référence à base de PDMS</b>								
Natif	0,67	0,95	2,48	3,36	3,46	95	4,5	1,3
+PEG	0,43	0,62	3,48	1,91	0,6	92	nd	nd
+PDMS-PEG	0,09	0,1	0,11	0,89	0,1	95	5,4	1,3
<b>Système à base de PHBHV</b>								
Natif	0,64	1,9	2,17	3,94	6,22	87	71,4	2000
+PEG	0,69	1,38	1,49	1,78	3,85	74	nd	nd
+PHBHHx-PEG	0,33	0,98	0,62	2,05	1,23	75	33	2200
<b>Système à base de PHA<sub>mcl</sub></b>								
Natif	0,38	0,39	0,77	2,63	5,96	85	4,4	14,8
+PEG	0,24	0,14	1	1,82	5,53	83	nd	nd
+PHBHHx-PEG	0,17	0,07	0,19	0,46	1,46	82	5,4	12,5



Diminution significative de l'adhésion par rapport à la matrice seule



Adhésion significativement similaire par rapport à la matrice seule



Augmentation significative de l'adhésion par rapport à la matrice seule

En effet, il a été montré, précédemment, que la topographie des revêtements formulés était différente (semi cristallin pour le PHBHV et élastomère pour le PDMS et le PHA<sub>mcl</sub>) ; ce paramètre semble donc jouer un rôle important notamment dans l'adhésion préférentielle des diatomées et des bactéries sur le système à base de PHBHV. En termes de physico-chimie de surface, la seule modification notable est l'hydrophilie apportée par l'ajout de PEG au sein de la matrice. Bien qu'aucune différence d'angle de contact n'ait été observée entre les revêtements sur des temps courts (3 secondes) et dans des conditions non immergées, on peut supposer que sur des temps plus longs et en condition d'immersion, tels qu'étudiés ici, une réorganisation des chaînes polymères s'effectue permettant au PEG d'être localisé en surface du revêtement. L'hypothèse selon laquelle cette hydrophilie de surface permettrait la formation d'une couche d'hydratation nécessaire à la capacité antiadhésive du revêtement semble être confirmée par les résultats obtenus, toutefois il est vraisemblable que ce ne soit pas le seul paramètre expliquant la différence de capacité antiadhésive.

En effet, les résultats montrent une capacité antiadhésive différente en fonction du PHA testé. Le PHA<sub>mcl</sub> associé au copolymère à base de PEG (PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG) a une capacité anti-bioadhésion nettement supérieure au système identique à base de PHBHV (PHBHV/PHBHHx-PEG). En termes de propriétés mécaniques, les résultats présentés précédemment, permettent de mettre en avant une importante différence d'élasticité entre ces deux types de PHA. D'un point de vue structure chimique, ces résultats étaient attendus puisque, le PHBHV est un PHA composé de chaînes latérales courtes ce qui lui confère une certaine rigidité tandis que le PHA<sub>mcl</sub> est composé de monomères à moyennes chaînes, responsables de son comportement élastomère. Les résultats de bioadhésion obtenus pour le système de référence PDMS/PDMS-PEG sont très proches de ceux obtenus avec le système PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG. Si l'on compare leurs propriétés mécaniques, les résultats montrent également des modules d'élasticité comparables et de l'ordre du Mpa. Cette propriété mécanique semble donc jouer un rôle central dans la capacité antiadhésive des revêtements amphiphiles.



Pour résumer, ce chapitre consacré à l'étude de l'activité anti bioadhésion des revêtements amphiphiles à base de PHA permet de mettre en avant : (i) la nécessité de formuler un revêtement amphiphile pour obtenir un effet antiadhésif (ii) une meilleure efficacité du système amphiphile à base de PHA<sub>mcl</sub> (iii) la corrélation entre les propriétés mécaniques et les propriétés antiadhésives et (iv) l'intérêt de formuler les revêtements avec le copolymère PEG plutôt qu'avec du PEG libre.

Les objectifs de ce chapitre ont été atteints, l'adhésion de cinq microorganismes a été étudiée ce qui a permis de valider la possible substitution du PDMS par des PHA et notamment les PHA<sub>mcl</sub>.

Un lien entre propriétés mécaniques et capacité fouling-release a déjà été mise en avant sur des revêtements à base de polymère de référence. De ce fait et compte tenu des résultats antiadhésifs obtenus dans ce chapitre, la suite de cette thèse a consisté à étudier la formation de biofilm puis à tester la capacité fouling-release des différents revêtements formulés.

## IV. Partie expérimentale

### I- Souches et milieux de culture

#### a. Bactéries

##### i. *Bacillus* 4J6

La souche bactérienne *Bacillus* 4J6 a été isolée sur une lame de verre immergée 1h à 6m de profondeur dans l'Océan Atlantique (Golfe du Morbihan, France, 47°34''37' N – 2°44''54' W). Elle a été cultivée dans un milieu Zobell (30g ASW, 4g bactotryptone, 1g yeast extract), 24 heures (phase exponentielle), à 20°C et sous agitation mécanique (1500 rpm). Des étalements sur gélose ont été réalisés afin d'estimer le nombre de colonies se formant par mL de milieu (UFC/mL).

##### ii. *Pseudomonas aeruginosa* & *Staphylococcus aureus*

Les souches utilisées sont : *Staphylococcus aureus* CIP 53154 et *Pseudomonas aeruginosa* MPaO1 (Manoil lab Washington). Ces souches sont cultivées en milieu LB (10 g bactotryptone, 5 g yeast extract, 10g chlorure de sodium) pendant 24 heures (phase exponentielle), à 37°C et sous agitation (150 rpm). Des étalements sur gélose ont également été réalisés afin d'estimer le nombre de colonies se formant par mL de milieu (UFC/mL).

#### b. Diatomées

Les souches de microalgues utilisées sont *Phaeodactylum tricornutum* (AC590) (AlgoBank, Université de Caen, Normandie) et *Navicula perminuta* CCAP1050/15 (Culture collection of algae & protozoa, Scottish Marine Institute). Ces microalgues sont cultivées dans un milieu composé d'eau de mer artificielle (ASW, 30 g/L) supplémentée en f/2 Guillard à 2% (Guillard & Ryther, 1962). Pour l'ensemble des milieux de culture, la stérilisation est effectuée par autoclavage à 121°C à une pression de 1 bar pendant 21 minutes.

Tout travail est effectué en conditions stériles sous hotte à flux laminaire.

## II- Condition de croissance

### a. Bactéries

Les cultures bactériennes sont réalisées dans des flacons en verre contenant 10 mL de milieu de culture. Chaque flacon reçoit un inoculum provenant du stock cryoconservé dans du glycérol à -80°C. Les cultures sont placées dans une étuve (20°C pour *Bacillus* 4J6 et 37°C pour *P. aeruginosa* et *S. aureus*) pendant 24h sous agitation (150 rpm).

### b. Diatomées

Les cultures, pour les études de croissance, sont réalisées dans des erlenmeyers contenant 200 mL de milieu de culture. Les microalgues sont inoculées à  $10^4$  cellules/mL (début de phase exponentielle) après dénombrement de la culture mère sur cellule de Malassez. Les cultures de microalgues sont axénisées avec trois antibiotiques : le chloramphénicol à 100 mg/L, la pénicilline à 1 g/L et la streptomycine à 500 µg/L (Druhel & Hsiao, 1969). Les cultures de microalgues sont placées dans une armoire phytotronique thermostatée (Hélios 600 phytotron, Cryotec, Saint-Gély-du-Fresc, France) à 20°C, et sous éclairage contrôlé ( $110 \mu\text{mol photons m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) avec une alternance lumière/obscurité de 18h/6h. Cette alternance cyclique favorise la division cellulaire (Forján *et al.*, 2015). Après avoir atteint la phase stationnaire (15 jours), les cultures sont synchronisées 40h dans l'obscurité.

## III- Protocole d'adhésion

Chaque revêtement préalablement déposé sous forme de film sur une lame de verre (18X18X1 mm) est placé dans un flacon de verre et stérilisé sous radiation UV pendant 30 minutes pour éliminer toute contamination du revêtement avant les tests d'adhésion (Portier *et al.*, 2021). Les durées d'adhésion ont été sélectionnés après plusieurs tests. En effet, il était nécessaire d'obtenir à la fois un recouvrement suffisant pour l'analyse des images par binarisation et à la fois de ne pas laisser les microorganismes former des réseaux tridimensionnels (microcolonies). Finalement, les temps d'adhésion suivants ont été retenus : 2 heures pour les bactéries et 72 heures pour les diatomées.

#### a. Bactéries

##### (i) *Bacillus* 4J6

Après 24h d'incubation, les cultures bactériennes sont reprises dans de l'eau de mer artificielle (30 g ASW) à raison de  $10^8$  cellules/mL. Chaque flacon de verre contenant un revêtement reçoit 5 mL de suspension bactérienne et est laissé en contact 2 heures à température ambiante.

##### (ii) *Pseudomonas aeruginosa* & *Staphylococcus aureus*

Après 24h d'incubation, les cultures bactériennes sont reprises dans de l'eau physiologique (NaCl 0,9%) à raison de  $10^7$  cellules/mL. Chaque flacon de verre contenant un revêtement reçoit 5 mL de suspension bactérienne et est laissé en contact 2 heures à température ambiante.

À la suite des 2 heures d'adhésion, le revêtement est sorti du flacon de verre pour être rincé brièvement afin d'éliminer les cellules planctoniques. Les bactéries adhérentes sont ensuite marquées avec du Syto9 Green (5  $\mu$ M), fluorochrome colorant les acides nucléiques en vert, pendant 20 minutes dans l'obscurité. Cette étape est indispensable afin de visualiser les bactéries au MCBL. En effet, le laser argon à 485 nm excite le fluorochrome qui émet alors une fluorescence observable entre 498 et 550 nm.

#### b. Diatomées

Après synchronisation, les diatomées sont reprises dans de l'eau de mer artificielle (30g ASW) à  $10^4$  cellules/mL. Chaque flacon de verre contenant un revêtement reçoit 5 mL de cette suspension et est laissé en contact 72 heures dans l'armoire phytotronique sous illumination contrôlée en alternant des cycles de lumière/obscurité de 18h/6h.

Après les 72 heures d'adhésion, le revêtement est sorti du flacon de verre et est rincé brièvement pour les mêmes raisons qu'évoquées précédemment. Les diatomées sont observées grâce à leur autofluorescence (Hewes *et al.*, 1998). En effet, ces microorganismes possèdent des chloroplastes contenant de la chlorophylle qui, lorsqu'elle est excitée par un laser argon à 633 nm, émet une fluorescence observable entre 638 et 720 nm. Ces longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont conservées pour l'ensemble des observations de diatomées réalisées en MCBL.

#### IV- Observation en microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

Les observations en MCBL (LSM 710, Zeiss, Germany) sont réalisées à l'aide de l'objectif X40. Huit clichés sont effectués par revêtement en quadrillant l'intégralité de la surface. Chaque type de revêtement est testé cinq fois, ce qui permet d'obtenir une moyenne de 40 clichés par revêtement. Ce nombre de clichés permet, d'une part, de s'assurer de la reproductibilité de la manipulation et d'autre part, d'effectuer des tests statistiques fiables.

#### V- Analyse d'images et statistiques

Les clichés ont été analysés à l'aide du logiciel Image J. Ce logiciel permet d'obtenir un pourcentage de recouvrement en binarisant les clichés en noir et blanc. La moyenne des pourcentages de recouvrements obtenus est ensuite réalisée et des analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.2.1. Les *p-value* ont été calculées en utilisant le test t de Student ( $p < 0,05$ ). Les barres d'erreurs représentent les déviations standards (SD) entre les pourcentages de recouvrements mesurés pour les 40 clichés effectués sur les 5 revêtements testés (8 clichés/ revêtement).

## V. Références bibliographiques

- Aguirre, L. E., Ouyang, L., Elfwing, A., Hedblom, M., Wulff, A., Inganäs, O. (2018). Diatom frustules protect DNA from ultraviolet light. *Scientific reports*, 8(1), 1-6.
- Barrett, L., Atkins, B. (2014). The clinical presentation of prosthetic joint infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 25-27.
- Borowitzka, M. A., & Volcani, B. E. (1978). The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum*: ultrastructure of ITS morphotypes 1, 2. *Journal of Phycology*, 14(1), 10-21.
- Dall Antonia, M., Coen, P. G., Wilks, M., Whiley, A., Millar, M. (2005). Competition between methicillin-sensitive and-resistant *Staphylococcus aureus* in the anterior nares. *Journal of Hospital Infection*, 61(1), 62-67.
- Darouiche, R. O. (2004). Treatment of infections associated with surgical implants. *New England Journal of Medicine*, 350(14), 1422-1429.
- De Martino, A., Bartual, A., Willis, A., Meichenin, A., Villazán, B., Maheswari, U., Bowler, C. (2011). Physiological and molecular evidence that environmental changes elicit morphological interconversion in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist*, 162(3), 462-481.
- Ellis, M. W., Schlett, C. D., Millar, E. V., Wilkins, K. J., Crawford, K. B., Morrison-Rodriguez, S. M., ... & Tribble, D. R. (2014). Hygiene strategies to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections: a cluster-randomized controlled trial among high-risk military trainees. *Clinical Infectious Diseases*, 58(11), 1540-1548.
- Faÿ, F., Hawkins, M. L., Réhel, K., Grunlan, M. A., Linossier, I. (2016). Non-toxic, anti-fouling silicones with variable PEO-silane amphiphile content. *Green Materials*, 4(2), 53-62.
- Forján, E., Navarro, F., Cuaresma, M., Vaquero, I., Ruíz-Domínguez, M. C., Gojkovic, Ž., ... & Garbayo, I. (2015). Microalgae: fast-growth sustainable green factories. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(16), 1705-1755.
- Francius, G., Tesson, B., Dague, E., Martin-Jézéquel, V., Dufrêne, Y. F. (2008). Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. *Environmental microbiology*, 10(5), 1344-1356.
- Garrone, R., Simpson, T. L., Pottu-Boumendil, J., Volcani, B. E. (1981). Silicon and siliceous structures in biological systems. *New York: Springer-Verlag*, 495-525.
- Gomila, A., Carratalà, J., Eliakim-Raz, N., Shaw, E., Wiegand, I., Vallejo-Torres, L., ... & Pujol, M. (2018). Risk factors and prognosis of complicated urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients: a retrospective multicenter cohort study. *Infection and drug resistance*, 11, 2571.
- Gordon, R. J., Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical infectious diseases*, 46(Supplement\_5), 350-359.
- Grasland, B., Mitalane, J., Briandet, R., Quemener, E., Meylheuc, T., Linossier, I., ... & Haras, D. (2003). Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. *Biofouling*, 19(5), 307-313.
- Guillard, R. R., Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*, 8(2), 229-239.
- He, T., Jańczewski, D., Jana, S., Parthiban, A., Guo, S., Zhu, X., ... & Vancso, G. J. (2016). Efficient and robust coatings using poly (2-methyl-2-oxazoline) and its copolymers for marine and bacterial fouling prevention. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 54(2), 275-283.
- Hecky, R. E., Mopper, K., Kilham, P., Degens, E. T. (1973). The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. *Marine biology*, 19(4), 323-331.
- Hewes, C. D., Mitchell, B. G., Moisan, T. A., Vernet, M., Reid, F. M. (1998). The phycobilin signatures of chloroplasts from three dinoflagellate species: a microanalytical study of *Dinophysis caudata*, *D. fortii*, and *D. acuminata* (Dinophysiales, Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 34(6), 945-951.
- Holland, R., Dugdale, T. M., Wetherbee, R., Brennan, A. B., Finlay, J. A., Callow, J. A., Callow, M. E. (2004). Adhesion and motility of fouling diatoms on a silicone elastomer. *Biofouling*, 20(6), 323-329.
- Huysman, M. J., Martens, C., Vandepoele, K., Gillard, J., Rayko, E., Heijde, M., ... & Vyverman, W. (2010). Genome-wide analysis of the diatom cell cycle unveils a novel type of cyclins involved in environmental signaling. *Genome biology*, 11(2), 1-19.
- Kiedrowski, M. R., Horswill, A. R. (2011). New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241(1), 104-121.
- Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M., Brzezinski, M. A. (2000). Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *Journal of phycology*, 36(5), 821-840.

Moradali, M. F., Ghods, S., Rehm, B. H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 39.

Nejadnik, M. R., van der Mei, H. C., Norde, W., Busscher, H. J. (2008). Bacterial adhesion and growth on a polymer brush-coating. *Biomaterials*, 29(30), 4117-4121.

Pang, X., Wong, C., Chung, H. J., Yuk, H. G. (2019). Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and its resistance to quaternary ammonium compounds in a simulated salmon processing environment. *Food Control*, 98, 200-208.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177-192.

Parsek, M. R., Singh, P. K. (2003). Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. *Annual review of microbiology*, 57, 677.

Portier, É., Azemar, F., Benkhaled, B. T., Bardeau, J. F., Faÿ, F., Réhel, K., ... & Linossier, I. (2021). Poly (oxazoline) for the design of amphiphilic silicone coatings. *Progress in Organic Coatings*, 153, 106116.

Rushforth, S. R., Brock, J. T. (1991). Attached diatom communities from the lower Truckee River, summer and fall, 1986. *Hydrobiologia*, 224(1), 49-64.

Terlizzi, A., Conte, E., Zupo, V., Mazzella, L. (2000). Biological succession on silicone fouling-release surfaces: long-term exposure tests in the harbour of ischia, Italy. *Biofouling*, 15(4), 327-342.

Tesson, B., Gaillard, C., Martin-Jézéquel, V. (2009). Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. 52 (2), 104-116.

Theriot, E. C., Ashworth, M., Ruck, E., Nakov, T., Jansen, R. K. (2010). A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecology and Evolution*, 143(3), 278-296.

Wanka, R., Koschitzki, F., Puzovic, V., Pahl, T., Manderfeld, E., Hunsucker, K. Z., ... & Rosenhahn, A. (2021). Synthesis and characterization of dendritic and linear glycol methacrylates and their performance as marine antifouling coatings. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(5), 6659-6669.

Watanabe, K., Senba, M., Ichinose, A., Yamamoto, T., Ariyoshi, K., Matsumoto, K. (2009). Bactericidal activity in filtrated supernatant of *Streptococcus sanguinis* against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 219(2), 79-84.

Wetherbee, R. (2002). The diatom glasshouse. *Science*, 298(5593), 547.

Willis, L., Cox, E. J., Duke, T. (2013). A simple probabilistic model of submicroscopic diatom morphogenesis. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(83), 20130067.

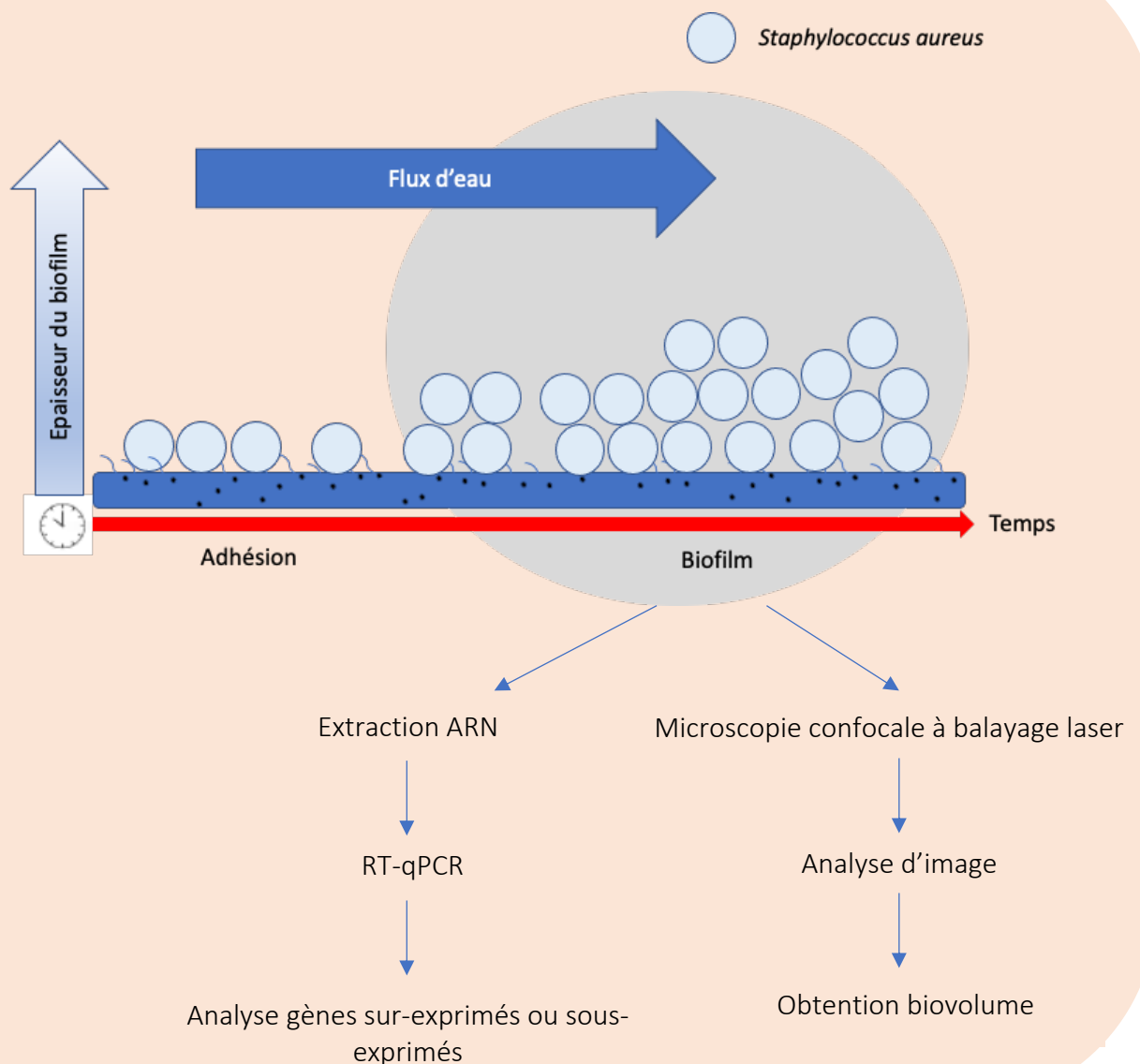
Wu, W., Jin, Y., Bai, F., Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular medical microbiology* (753-767). Academic Press.

Zea-Obando, C., Tunin-Ley, A., Turquet, J., Culioli, G., Briand, J. F., Bazire, A., ... & Linossier, I. (2018). Anti-bacterial adhesion activity of tropical microalgae extracts. *Molecules*, 23(9), 2180.

Zubair, S., Fischer, A., Liljander, A., Meens, J., Hegerman, J., Gourlé, H., ... & Jores, J. (2015). Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus*, strain ILRI\_Eymole1/1, isolated from a Kenyan dromedary camel. *Standards in genomic sciences*, 10(1), 1-12.

# Chapitre 4

## Étude de l'activité anti-biofilm, de la capacité fouling release et analyse transcriptomique





## Tables des matières

<b>I. Étude de la capacité anti-biofilm des revêtements</b>	<b>163</b>
1. La phase d'adhésion	165
2. La formation du biofilm	167
a) Les revêtements colonisés par un biofilm	168
b) Les revêtements non-colonisés par un biofilm	169
<b>II. Étude de la capacité fouling-release des revêtements</b>	<b>170</b>
1. L'effet fouling-release	170
2. Les résultats obtenus en fonction des revêtements	174
a) Les revêtements n'ayant pas ou peu de capacité FR	174
b) Les revêtements ayant une capacité FR	175
<b>III. Récapitulatif des capacités anti-biofilm et fouling-release des revêtements</b>	<b>176</b>
<b>IV. Corrélation avec les paramètres physiques, chimiques et mécaniques</b>	<b>177</b>
<b>V. Analyse transcriptomique</b>	<b>180</b>
1. Les gènes ciblés	180
a) Adhésion des cellules de <i>S. aureus</i> aux biomatériaux : les adhésines protéiques MSCRAMMs	181
b) Prolifération et production de la matrice du biofilm : l'adhésine polysaccharidique PIA	182
2. Effet du copolymère PEG sur l'expression des gènes ciblés	185
a) Les gènes impliqués dans l'adhésion et/ou la formation de biofilm	185
b) Le gène répresseur de l'opéron <i>ica</i>	190
3. Corrélation avec les capacités anti adhésives et anti-biofilm	191
<b>VI. Partie expérimentale</b>	<b>194</b>
<b>VII. Références bibliographiques</b>	<b>199</b>

## Tables des illustrations

### Figures

- Figure 01.** Plan d'expérience de l'étude de l'activité anti-biofilm avec le Drip Flow Biofilm Reactor (DFR). (p.164)
- Figure 02.** Protocole général de l'étude de l'activité anti biofilm. (p.165)
- Figure 03.** Analyse des pourcentages de recouvrement de *S. aureus* en fonction des surfaces testées après 6h d'adhésion. (p.166)
- Figure 04.** Pourcentages de recouvrement obtenus en fonction du protocole utilisé, 2h en flacons en verre ou 6h en DFR pour chaque surface testée. (p.167)
- Figure 05.** Analyse du biovolume de *S. aureus* en fonction des revêtements étudiés après 18h de culture. (p.168)
- Figure 06.** Images obtenues par MCBL (1X1 px) du biofilm de *S. aureus* sur les surfaces après marquage au Syto9 Green. (p.169)
- Figure 07.** Analyse du pourcentage de recouvrement de *S. aureus* en fonction des surfaces étudiées après 18h. (p.170)
- Figure 08.** Courbe de Baier. (p.170)
- Figure 09.** Représentation schématique des trois modes d'ouverture des fissures en mécanique de la rupture. (p.171)
- Figure 10.** Revêtement élastomère maintenu entre un substrat rigide et un disque rigide. (p.171)
- Figure 11.** Adhésion relative en fonction de la racine carrée du produit de l'énergie de surface critique ( $\gamma_c$ ) et du module d'élasticité (E). (p.173)
- Figure 12.** Analyse du biovolume de *S. aureus* sur les revêtements verre et PDMS avant et après l'application d'un flux de 20 mL.min<sup>-1</sup> pendant 30 min. (p.175)
- Figure 13.** Analyse des pourcentages de recouvrement de *S. aureus* sur les différents revêtements étudiés avant (couleur pleine) et après l'application d'un flux (couleur pointillée) de 20 mL.min<sup>-1</sup> pendant 30 min. (p.176)
- Figure 14.** Pourcentage de recouvrement en fonction de la racine carrée du produit de l'énergie de surface ( $\gamma$ ) et du module d'élasticité (E). (p.179)
- Figure 15.** Représentation schématique du cycle de vie du biofilm de *S. aureus*. (p.181)
- Figure 16.** Représentation de deux adhésines de *S. aureus*. (p.182)
- Figure 17.** Organisation de l'opéron *ica* et synthèse de l'adhésine polysaccharidique PIA. (p.184)
- Figure 18.** Expression relative des gènes impliqués dans l'adhésion et/ou la formation de biofilm en fonction des revêtements étudiés. (p.189)
- Figure 19.** Représentation schématique de l'opéron *ica*, de la synthèse de la protéine PIA et du répresseur *icaR*. (p.190)
- Figure 20.** Expression relative du gène *icaR* en fonction des revêtements testés. (p.191)
- Figure 21.** Expressions relatives des huit gènes testés en fonction des revêtements étudiés. (p.192)

**Figure 22.** Récapitulatif général de l'effet inducteur ou inhibiteur des revêtements formulés contenant un copolymère PEG sur l'expression des huit gènes testés dans cette étude : *clfA*, *clfB*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*, *ebps*, *icaA* et *icaR*. (p.193)

### Tableaux

**Tableau 01.** Propriétés physiques de plusieurs polymères. (p.172)

**Tableau 02.** Récapitulatif des énergies de surface et des modules élastiques pour chaque revêtement. (p.173)

**Tableau 03.** Récapitulatif des capacités antibiofilm et fouling-release des revêtements étudiés. (p.177)

**Tableau 04.** Récapitulatif des capacités anti-biofilm et des pourcentages d'expression des gènes pour chaque revêtement testé. (p.186)

**Tableau 05.** Récapitulatif des données obtenues après dosage de l'ARN extrait pour chaque échantillon. (p.196)

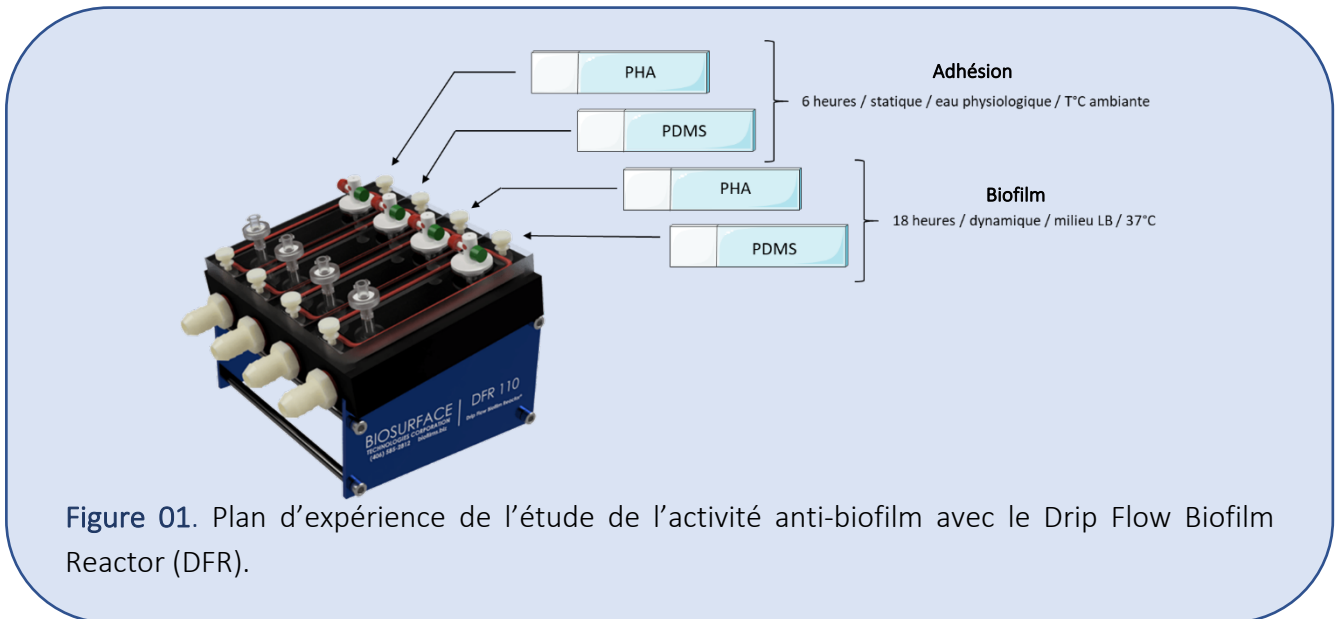
**Tableau 06.** Liste des amorces utilisées en fonction des gènes ciblés. (p.197)

Ce chapitre s'intéresse à la capacité anti-biofilm et fouling-release (FR) des revêtements formulés ainsi qu'à l'étude des gènes impliqués dans le processus d'adhésion et de formation du biofilm bactérien. Étant donné que les résultats précédents concernant les capacités antiadhésives ont montré sans ambiguïté l'intérêt de formuler les revêtements avec le PEG sous forme de copolymère, seuls ces revêtements (PHBHV/PHBHHX-PEG, PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG, PDMS/PDMS-PEG) seront utilisés en comparaison avec la matrice (PHBHV, PHA<sub>mcl</sub>, PDMS). En ce qui concerne le microorganisme, seule *Staphylococcus aureus* a été retenue pour réaliser ces tests. Plusieurs raisons sont à l'origine de ce choix : la capacité et la rapidité de cette bactérie à adhérer et former un biofilm et le fait que son génome soit séquencé et annoté.

## I. Étude de la capacité anti-biofilm des revêtements

L'évaluation de l'activité anti-biofilm des différents revêtements a été réalisée en utilisant le système « Drip Flow Biofilm Reactor » (DFR) (**Figure 01**). L'utilisation de ce système confère de nombreux avantages par rapport au système flow-cell utilisé traditionnellement. En effet, avec ce système il est possible, d'une part, d'étudier une grande surface (2 cm<sup>2</sup> pour un canal DFR vs 160 mm<sup>2</sup> pour un canal flow-cell) et d'autre part, de récupérer les revêtements après l'application du protocole. La récupération des revêtements est indispensable dans notre étude puisqu'ils ne sont pas tous parfaitement transparents. Il est donc nécessaire de les retourner afin de visualiser l'adhésion bactérienne au MCBL. Cette manipulation ne peut s'effectuer en utilisant un système flow-cell c'est pourquoi il a été nécessaire d'acquérir ce nouvel outil DFR et de mettre au point les protocoles expérimentaux. La bactérie *S. aureus* a été cultivée en milieu LB (24 h, 37°C, sous agitation à 125 rpm) puis reprise dans de l'eau physiologique (EP) afin d'atteindre une concentration de 3.10<sup>8</sup> CFU/mL (soit DO<sub>590</sub>=0,1) constituant ainsi l'inoculum. Chaque canal du système DFR contient un revêtement et reçoit 10 mL d'inoculum. Les bactéries sont laissées adhérer en condition statique pendant six heures, temps nécessaire pour l'adhésion bactérienne sans que ces dernières ne forment de micro-colonies, incompatibles avec l'analyse d'image par binarisation. Chaque revêtement a été testé indépendamment trois fois avec *S. aureus* de façon à obtenir un triplicata biologique et de pouvoir réaliser des analyses statistiques. Deux temps d'analyse ont été choisis par revêtement : le premier correspondant à l'étape d'adhésion (6 h) et permettant de corrélérer les

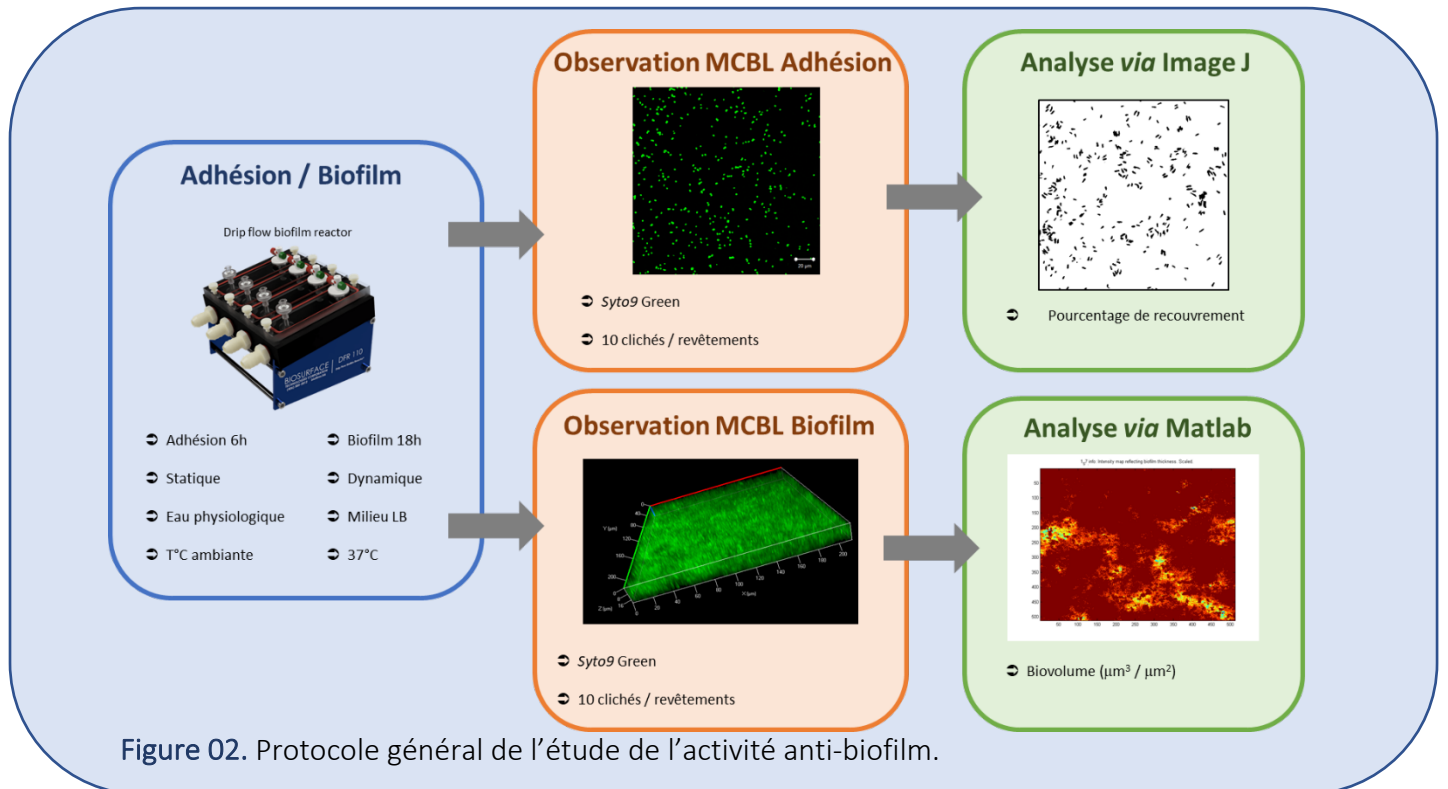
résultats obtenus avec les manipulations effectuées au chapitre précédent, et le second correspondant à la formation de biofilm (18 h) (**Figure 01**).



**Figure 01.** Plan d'expérience de l'étude de l'activité anti-biofilm avec le Drip Flow Biofilm Reactor (DFR).

Après les six heures d'adhésion, le premier revêtement a été récupéré afin d'analyser le pourcentage de recouvrement bactérien. Pour étudier la formation de biofilm un flux de milieu LB est appliqué ( $0,82 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) dans le canal contenant le second revêtement et le système est placé dans une étuve à  $37^\circ\text{C}$  pendant 18 heures. À l'issue des 18 h, le revêtement est récupéré afin d'analyser la formation de biofilm par MCBL.

Les revêtements récupérés sont rapidement rincés de façon à éliminer les bactéries planctoniques et les bactéries adhérentes sont marquées au Syto9 Green ( $5 \mu\text{M}$ ), fluorochrome permettant de colorer les bactéries *via* la coloration des acides nucléiques. Chaque revêtement est ensuite observé au microscope confocal à balayage laser (MCBL) à l'objectif X40. Cinq clichés par revêtement sont réalisés sur le logiciel Zen afin d'être analysés par la suite soit par le logiciel Image J (pourcentage de recouvrement) soit par le logiciel Matlab (biovolume) (**Figure 02**).



## 1. La phase d'adhésion

Après six heures d'incubation, l'analyse du pourcentage de recouvrement des surfaces testées permet d'observer premièrement, une adhésion similaire entre les revêtements PHBHV et le revêtement de référence pro-adhésif, le verre ( $\cong 10\%$ ) (**Figure 03**). Cependant, après l'ajout du copolymère PHBHHx-PEG au sein de la matrice PHBHV, l'adhésion bactérienne est significativement diminuée (-60%). En ce qui concerne les deux autres revêtements étudiés, le PHA<sub>mcl</sub> et le PDMS, l'analyse des pourcentages de recouvrement permet d'observer qu'ils sont initialement moins colonisés que la surface pro-adhésive (verre) ou que le PHBHV. Toutefois, un comportement similaire est observé après l'ajout de copolymère PEG à la matrice. En effet, une nette diminution est observée que cela soit pour le PHA<sub>mcl</sub> (-85%) ou pour le PDMS/PDMS-PEG (-98%) (**Figure 03**).

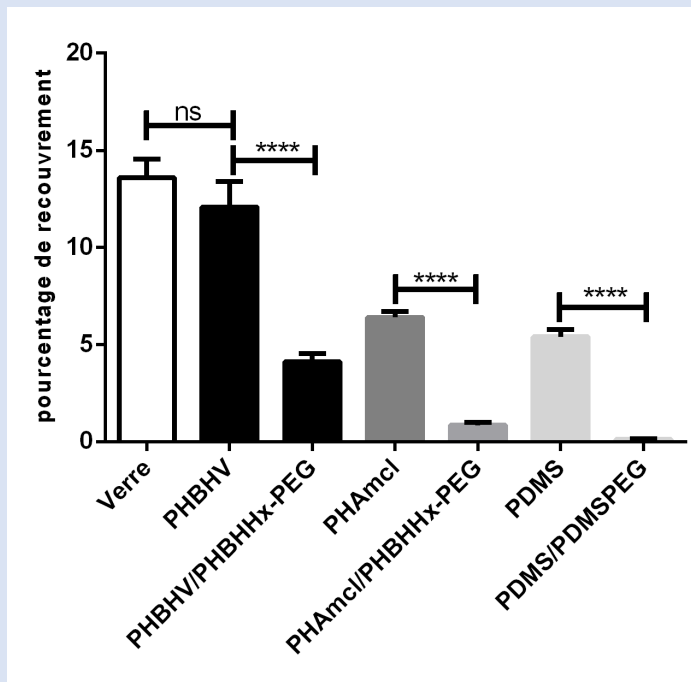
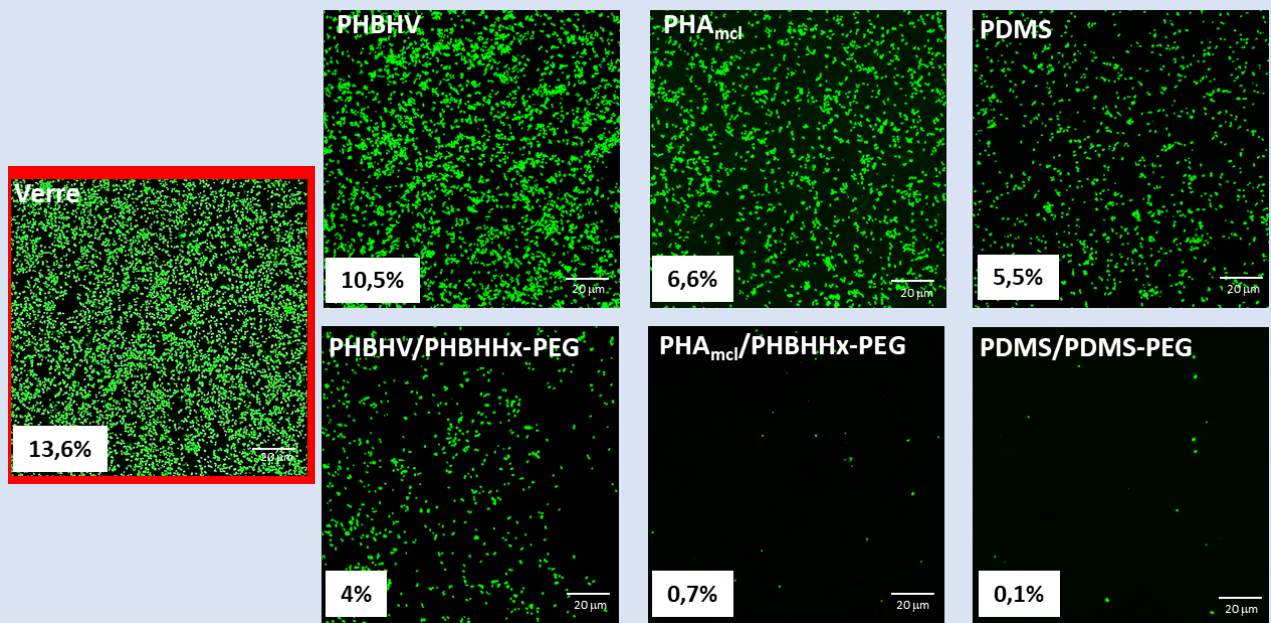
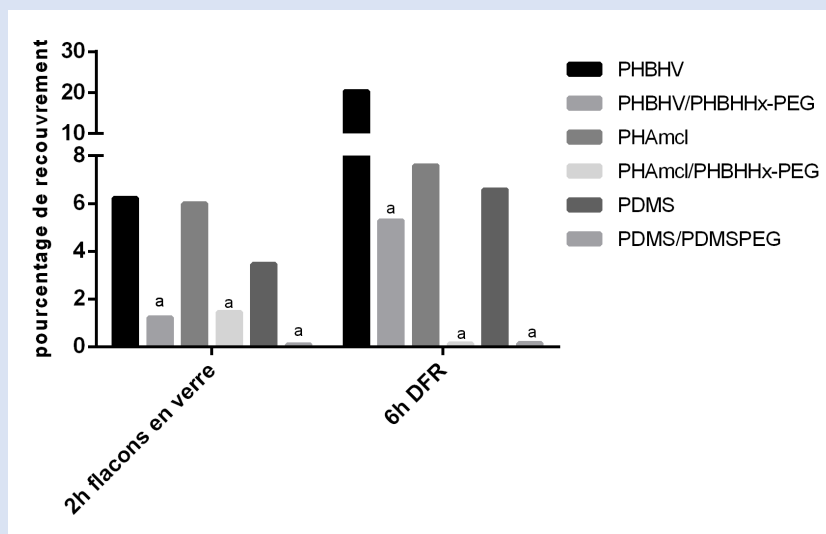


Figure 03. Analyse des pourcentages de recouvrement de *S. aureus* en fonction des surfaces testées après 6h d'adhésion. n = 30 clichés/revêtement. ns indique non significatif et \*\*\*\* indique  $p > 0.0001$ . Test *t* de Student.

Précédemment, l'étude de la capacité des revêtements à limiter l'adhésion de *S. aureus* a été évaluée selon un protocole différent. Les deux grandes différences se situaient au niveau du système utilisé et du temps d'adhésion. En effet, ici, nous utilisons le système DFR alors que précédemment nous avons utilisé des flacons en verre. De plus, les temps d'adhésion sont différents : 2 heures en flacon en verre contre 6 heures en DFR. En ce qui concerne le temps d'adhésion, plusieurs essais ont permis de valider et d'optimiser les durées d'adhésion. En termes de similitude, la même concentration bactérienne a été inoculée, l'adhésion a été réalisée en condition statique et à température ambiante.

Malgré les différences expérimentales, les résultats obtenus en DFR suivent la même tendance que ceux obtenus en flacon de verre (**Figure 04**). En effet, dans les deux expériences, le revêtement PHBHV reste le plus colonisé et un effet antiadhésif significatif du copolymère PEG est observé pour les trois revêtements. A nouveau, le revêtement PDMS/PDMS-PEG présente les meilleures capacités anti adhésives. Ces observations ont permis de valider le protocole utilisé dans ce chapitre avec le système DFR.



**Figure 04.** Pourcentages de recouvrement obtenus en fonction du protocole utilisé, 2h en flacons en verre ou 6h en DFR pour chaque surface testée. a indique  $p > 0,0001$  par rapport à la matrice seule.

## 2. La formation de biofilm

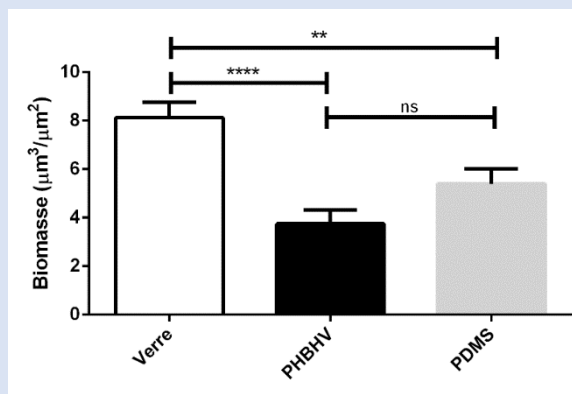
A l'issue des 18 heures d'incubation, l'analyse des images obtenues par MCBL permet de distinguer deux comportements différents. En effet, alors que sur certains revêtements les bactéries forment un biofilm, sur d'autres, seules quelques bactéries adhérentes sont observées.



La frontière entre l'adhésion et le biofilm est visualisée à l'aide du MCBL. En effet, une seule couche de cellules adhérentes est considérée comme étant de l'adhésion alors que pour le biofilm, les couches de cellules se superposent.

a) Les revêtements colonisés par un biofilm

Seuls trois revêtements sont concernés par la formation de biofilm : le verre, le PHBHV et le PDMS (**Figure 05**). En ce qui concerne le verre, ce résultat n'est pas surprenant puisque cette surface est utilisée dans le cadre de l'étude comme référence pro-adhésive. Pour le revêtement PHBHV, ce dernier était d'ores et déjà largement colonisé lors de la phase d'adhésion, il n'est donc pas étonnant que la colonisation ait continué au cours des 18 heures et qu'un biofilm se soit formé. Il faut toutefois noter que le biovolume du biofilm est deux fois moins important sur le PHBHV que sur le verre ( $3,7 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  vs  $8,1 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  respectivement). Pour le revêtement PDMS, alors qu'il n'était que peu colonisé lors de la phase d'adhésion (5% de recouvrement bactérien), il se retrouve colonisé après 18 heures d'incubation ( $\cong 5 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) (**Figure 06**). L'explication provient du fait que les systèmes à base de silicone sont connus pour être des surfaces antiadhésives efficaces uniquement en conditions dynamiques (Liu *et al.*, 2017). Il est nécessaire de rappeler qu'ici, pour la formation du biofilm, un flux très faible est appliqué ( $0,82 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Ce flux est utile pour l'apport des nutriments nécessaires aux bactéries mais il ne représente en aucun cas un stress hydrodynamique assez important pour décrocher les bactéries faiblement adhérentes au revêtement PDMS. Cette colonisation massive de *S. aureus* sur le revêtement PDMS en condition statique est donc attendue et des tests complémentaires ont été réalisés par la suite venant appuyer l'explication formulée ci-dessus.



**Figure 05.** Analyse du biovolume de *S. aureus* en fonction des revêtements étudiés après 18h de culture. n = 30 clichés/revêtement. Ns indique non significatif, \*\* indique  $p < 0.01$  et \*\*\*\* indique  $p < 0.0001$ .

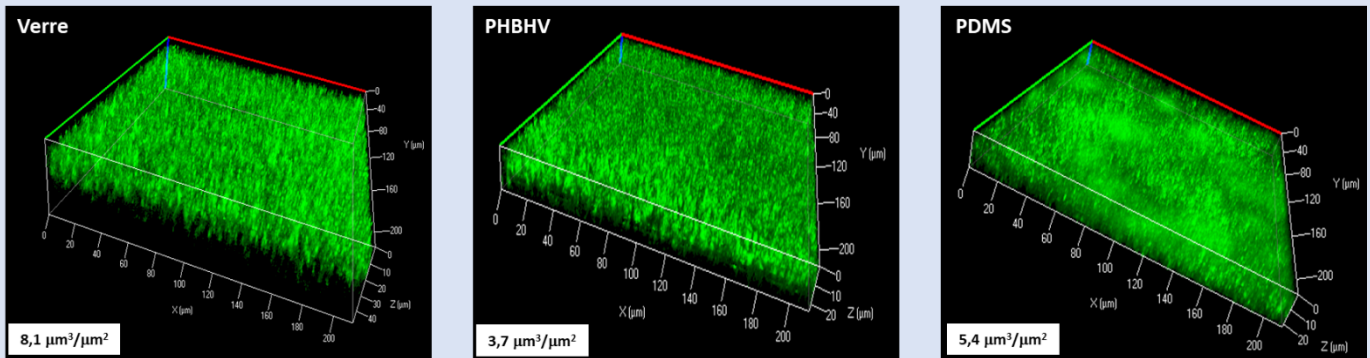
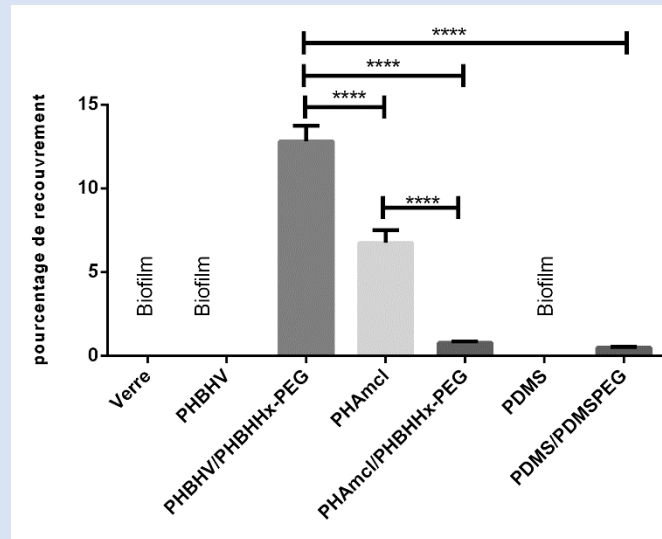


Figure 06. Images obtenues par MCBL (1X1 px) du biofilm de *S. aureus* sur les surfaces après marquage au Syto9 Green.

#### b) Les revêtements non-colonisés par un biofilm

Le PHA<sub>mcl</sub> est le seul revêtement qui malgré l'absence de PEG ne permet pas la formation de biofilm à sa surface (Figure 07). De plus, que cela soit après 6h ou après 18h d'incubation, le pourcentage de recouvrement du PHA<sub>mcl</sub> reste le même ( $\cong 6\%$ ).

Comme nous pouvions nous y attendre, aucun des revêtements contenant du PEG ne permet la formation de biofilm à sa surface. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle l'ambiguïté présente en surface, apportée par l'amphiphilie du copolymère PEG, vient perturber, d'une part l'adhésion des bactéries mais également la formation de biofilm. Le revêtement PHBHV/PHBHHx-PEG reste toutefois le plus colonisé avec un pourcentage de recouvrement passant de 4% après 6h à 12% de recouvrement après 18h (soit 3 fois plus de bactéries ayant adhéré à la surface sans pour autant former un biofilm). En ce qui concerne le PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG et le PDMS/PDMS-PEG, aucune différence n'est observée entre les deux temps d'incubation. Ces deux revêtements restent très peu colonisés et montrent une efficacité antibiofilm remarquable. Il est connu que le système amphiphile à base de PDMS et de PEG montre de très bonnes capacités antibiofilm (Guazzelli *et al.*, 2020 ; Zhang *et al.*, 2017), il constitue d'ailleurs dans cette étude la surface antibiofilm de référence. La nouveauté vient du fait que le système PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG soit un sérieux concurrent au système de référence du fait de cette impressionnante capacité antibiofilm.

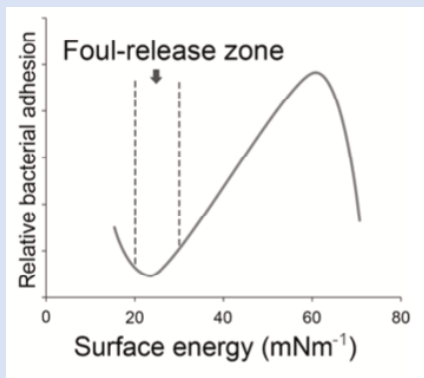


**Figure 07.** Analyse du pourcentage de recouvrement de *S. aureus* en fonction des surfaces étudiées après 18h. n= 30 clichés/revêtement. \*\* indique  $p < 0.01$  et \*\*\*\* indique  $p < 0.0001$ . Biofilm indique que le pourcentage de recouvrement n'a pas pu être évalué en raison de la présence de biofilm sur les revêtements.

## II. Étude de la capacité fouling-release des revêtements étudiés

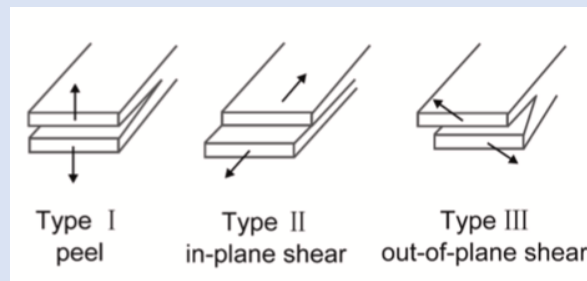
### 1. L'effet fouling-release

Les revêtements fouling-release (aussi connus sous le nom de fouling-release coating (FRC)) sont largement exploités dans le cadre d'applications commerciales pour leur capacité de libération de l'encrassement (Jin *et al.*, 2021). Baier fut le premier à étudier la relation entre l'énergie de surface et la capacité fouling-release et a proposé une courbe dite « de Baier » liant l'adhésion bactérienne relative et l'énergie de surface (Goupil *et al.*, 1973 ; Baier & De Palma, 1971) (**Figure 08**). Diverses études ont confirmé que les revêtements dont l'énergie de surface est comprise entre 22 et 25 mN/m présentent la meilleure capacité de libération de l'encrassement biologique (Salta *et al.*, 2010, Brady & Singer, 2000).



**Figure 08.** Courbe de Baier. D'après Baier, 1971.

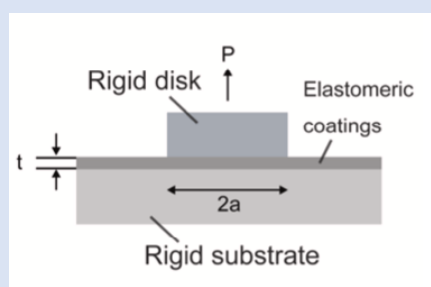
Comme la courbe de Baier reste une courbe empirique, elle ne peut pas quantifier avec précision l'effet de l'énergie de surface sur la capacité antialissure. Brady *et al.* ont alors réalisé une analogie entre adhésion de films sur un substrat et adhésion d'organismes sur une surface. Ainsi, ils ont utilisé la mécanique de la rupture de films pour décrire le processus d'élimination (Brady & Singer, 2000 ; Brady, 2001). La mécanique des fractures étudie la propagation des fissures dans les revêtements (Griffith, 1921 ; Griffith & Gilman, 1968). Les fissures à l'échelle microscopique fournissent des points de concentrations de contraintes, qui favorisent leur croissance. Il existe trois modes d'ouverture des fissures en mécanique de la rupture, à savoir le pelage de type I, le cisaillement dans le plan de type II et le cisaillement hors plan de type III (Figure 09).



**Figure 09.** Représentation schématique des trois modes d'ouverture des fissures en mécanique de la rupture.

Le raisonnement part du principe qu'aucun joint n'est entièrement exempt de défauts. Lorsque les défauts deviennent suffisamment grands, le processus d'élimination se produit (Vladkova, 2008). Par analogie, dans le cas du biofilm, il existe des défauts de cohésion entre l'organisme et la surface au moment de la bioadhésion. Les défauts vont se propager à l'interface sous l'effet d'une force externe et permettre l'effet fouling-release.

Plus précisément, Kendall s'est appuyé sur la théorie de la rupture de Griffith pour modéliser le comportement d'adhésion des élastomères à des substrats (Kendall, 1971) (Figure 10).



**Figure 10.** Revêtement élastomère maintenu entre un substrat rigide et un disque rigide ( $P$  : force d'arrachement,  $a$  : rayon de contact,  $t$  : épaisseur du revêtement).

Pour un revêtement élastomère épais, il a proposé l'équation suivante :

$$(1) \quad P_C = \sqrt{\frac{2\pi E G_C a^3}{1 - \nu^2}}$$

Où  $P_C$  est la force d'arrachement critique (critical pull-of force),  $E$  est le module élastique,  $G_C$  est l'énergie de surface critique,  $a$  est l'épaisseur et  $\nu$  est le coefficient de Poisson.

Dans cette équation (1), le module élastique  $E$  et l'énergie de surface sont des paramètres majeurs. L'équation (1) suggère que la force d'arrachement critique ( $P_C$ ) est une fonction du produit  $\sqrt{E G_C}$ . Plus précisément, la  $P_C$  peut être considérée comme la force d'adhésion critique et les matériaux ayant un module élastique ( $E$ ) et une énergie de surface ( $G_C$ ) plus faible conduisent à une  $P_C$  plus faible et présentent donc de meilleures capacités antisalissures (Brady, 2001 ; Zhang et al.,2013).

Le **Tableau 01** énumère les valeurs de la littérature pour la tension superficielle de surface (Brady, 1990) et le module d'élasticité (Brady, 1999) de certains polymères, et la valeur de la racine carrée de leur produit.

**Tableau 01.** Propriétés physiques de plusieurs polymères. *D'après Brady & Singer, 2000.*

polymer	relative adhesion	critical surface tension, $\gamma_C$ ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ )	elastic modulus, $E$ (MPa)	$(E\gamma_C)^{1/2}$
poly(hexafluoropropylene)	21	16.2	500	2.85
poly(tetrafluoroethylene)	16	18.6	500	3.05
poly(dimethylsiloxane)	6	23.0	2	0.21
poly(vinylidene fluoride)	18	25.0	1200	5.48
poly(ethylene)	30	33.7	2100	8.41
poly(styrene)	40	40.0	2900	10.77
poly(methyl methacrylate)	48	41.2	2800	10.74
Nylon 6-6	52	45.9	3100	11.93

Si une valeur d'adhésion relative de la **Figure 10** est associée à un matériau du **Tableau 01**, la valeur d'adhésion relative peut être représentée comme indiquée dans la **Figure 11**. Malgré une certaine dispersion des données, la **Figure 11** dite courbe « de Brady » montre que l'adhésion est bien mieux corrélée avec  $(E\gamma_C)^{1/2}$  ( $R^2 = 0,89$ ) qu'avec l'énergie de surface ( $R^2 = 0,75$ ) ou le module d'élasticité ( $R^2 = 0,82$ ). Le minimum d'adhésion de la **Figure 11** coïncide avec la valeur la plus faible du module élastique testé, bien que cela ne corresponde pas à la plus

faible énergie de surface testée (Tableau 01). Cette représentation souligne l'importance de prendre en compte ces deux paramètres simultanément.

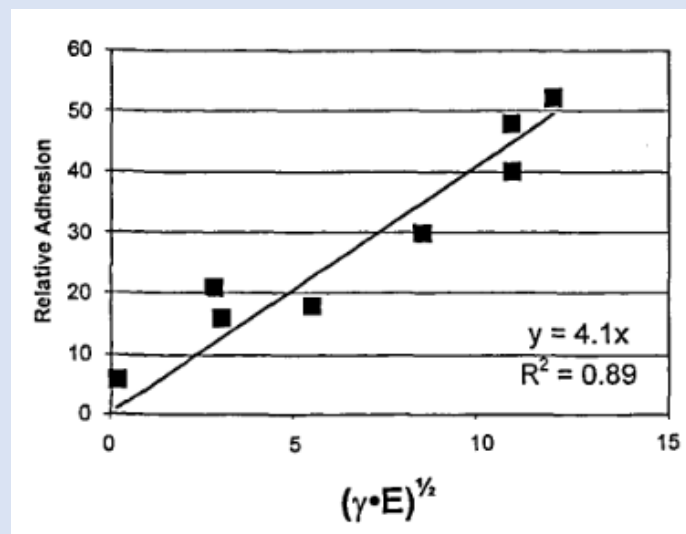


Figure 11. Adhésion relative en fonction de la racine carrée du produit de l'énergie de surface critique ( $\gamma_c$ ) et du module d'élasticité (E). D'après Brady & Singer, 2000.

Précédemment, nous avons caractérisé nos revêtements et obtenu des données en termes d'énergie de surface et de module élastique (Tableau 02).

Tableau 02. Récapitulatif des énergies de surface et des modules élastiques pour chaque revêtement.

	-PEG			+PEG		
	PHBHV	PHA <sub>mcl</sub>	PDMS	PHBHV	PHA <sub>mcl</sub>	PDMS
Module d'élasticité (MPa)	2000	14,8	1,3	2200	12,5	1,3
$\gamma_{\text{eau/diodométhane}}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	47	39	31	51	39	38

Dans la partie suivante, nous allons tester la capacité fouling-release (FR) des revêtements en évaluant la libération de l'encrassement biologique après application d'un stress hydrodynamique.

Cette étude a été réalisée dans les mêmes conditions que l'évaluation de l'activité anti-biofilm. La seule différence provient du fait qu'à l'issue des 6 heures d'adhésion puis des 18 heures de formation de biofilm, un flux a été pulsé de façon à générer un stress hydrodynamique en surface des revêtements. Le débit du flux était de 20 mL.min<sup>-1</sup> et ce dernier a été appliqué durant 30 mn. Pour rappel, une surface dite « fouling-release » ne permet pas l'établissement d'interactions fortes entre les microorganismes et la surface, de ce fait un simple stress

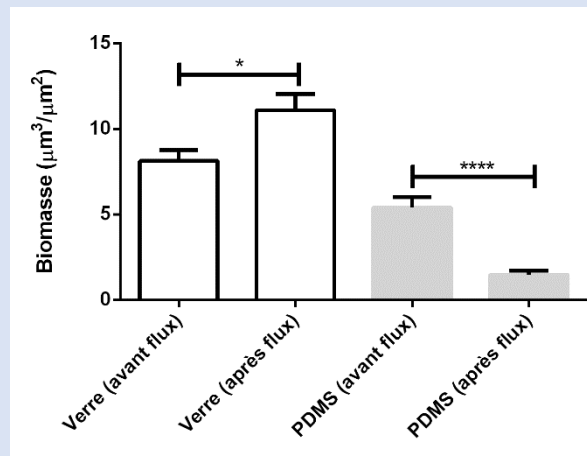
hydrodynamique permettra le décrochage des microorganismes faiblement adhérents. Typiquement, le revêtement PDMS/PDMS-PEG est connu pour être un revêtement FR, son efficacité est soumise à la présence d'un flux (Sundaram et al., 2011 ; Galhenage et al., 2017 ; Noguer et al., 2017).

## 2. Les résultats obtenus en fonction des revêtements

### a) Les revêtements n'ayant pas ou peu de capacité FR

Le verre, surface pro-adhésive de référence, établit des interactions fortes avec les microorganismes. Cette surface ne répond donc théoriquement pas à la définition d'une surface FR. En pratique cela se confirme puisqu'aucun effet du flux n'est observé (**Figure 12**). Au contraire, une augmentation du biovolume est mesurée (+ 37%). L'explication pourrait provenir du fait qu'en dépit du flux appliqué, les microorganismes fortement adhérents et bien à l'abri des contraintes de cisaillement sous la forme d'un biofilm, continuent à proliférer en profitant de l'apport continu de nutriments *via* le flux appliqué. En ce qui concerne le PDMS, les résultats sont différents. L'effet du flux est visible puisqu'une importante partie du biofilm est décrochée (-70% de biomasse). Malgré le flux, une partie du biofilm subsiste en surface du revêtement PDMS ( $1,5 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  en termes de biovolume bactérien). D'après la littérature, le PDMS est considéré comme une surface FR du fait des interactions faibles entre les microorganismes et sa surface. Il est, de ce fait, largement utilisé notamment dans des environnements dynamiques tels que le domaine naval. La persistance du biofilm dans notre étude peut toutefois s'expliquer par la contrainte de cisaillement appliquée. En effet, comme précisé précédemment, un flux de  $20\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (soit  $0,18 \text{ mbar}/\text{min}$ ) est appliqué dans le système « Drip Flow Biofilm Reactor ». Cette contrainte est largement en dessous des contraintes nécessaires afin d'obtenir l'effet FR des systèmes PDMS. En effet, la majorité des études décrivant un effet FR utilisent une pression d'environ 100 Pa (Fabbri *et al.*, 2018). Dans notre cas, la pression appliquée au sein de notre système DFR est de 18 Pa, soit 5 fois moins que la contrainte appliquée dans la littérature. Rappelons que sous la forme d'un biofilm, les bactéries sont protégées des contraintes environnementales grâce à la production d'une matrice d'exopolysaccharides (EPS). L'application d'une faible contrainte pourrait donc permettre d'éliminer une partie du biofilm mais pas sa totalité. Pour des raisons de contrainte technique cette manipulation n'a pas été effectuée, toutefois il est supposé que l'intégralité du

biofilm présent sur le système PDMS aurait pu être décrochée avec l'application d'un flux plus important.



**Figure 12.** Analyse du biofilm de *S. aureus* sur les revêtements verre et PDMS avant et après l'application d'un flux de  $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 30 min.  $n = 30$ . \* indique  $p < 0.1$  et \*\*\*\* indique  $p < 0.0001$ .

#### b) Les revêtements ayant une capacité FR

Les systèmes à base de PHBHV avec ou sans copolymère PEG montrent une capacité FR (**Figure 13**). En effet, l'application d'un flux permet d'une part, le décrochage du biofilm formé sur le PHBHV pour obtenir un recouvrement d'à peine 4% mais aussi le décrochage des cellules certainement faiblement adhérentes sur le système PHBHV/PHBHHx-PEG (- 80%).

En ce qui concerne le système à base de  $\text{PHA}_{\text{mcl}}$  initialement peu colonisé, le flux permet un décrochage de 75% des bactéries dans les deux cas ( $\text{PHA}_{\text{mcl}}$  et  $\text{PHA}_{\text{mcl}}/\text{PHBHHx-PEG}$ ), ces revêtements peuvent donc être considérés comme FR. Enfin, le revêtement PDMS/PDMS-PEG également peu colonisé après 18h présente le plus faible pourcentage de recouvrement après l'application du flux (0,2% de recouvrement de surface). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans la littérature et confirment une nouvelle fois l'efficacité FR des systèmes amphiphiles à base de silicone (Hu *et al.*, 2020 ; Noguer *et al.*, 2017 ; Olsen *et al.*, 2014 ; Martinelli *et al.*, 2011)). Cette étude permet également de montrer qu'en plus des performances antiadhésives, les systèmes à base de PHA, et notamment le système



PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG, sont des candidats très intéressants en termes d'une part, de capacité antibiofilm et d'autre part, de capacité fouling-release.

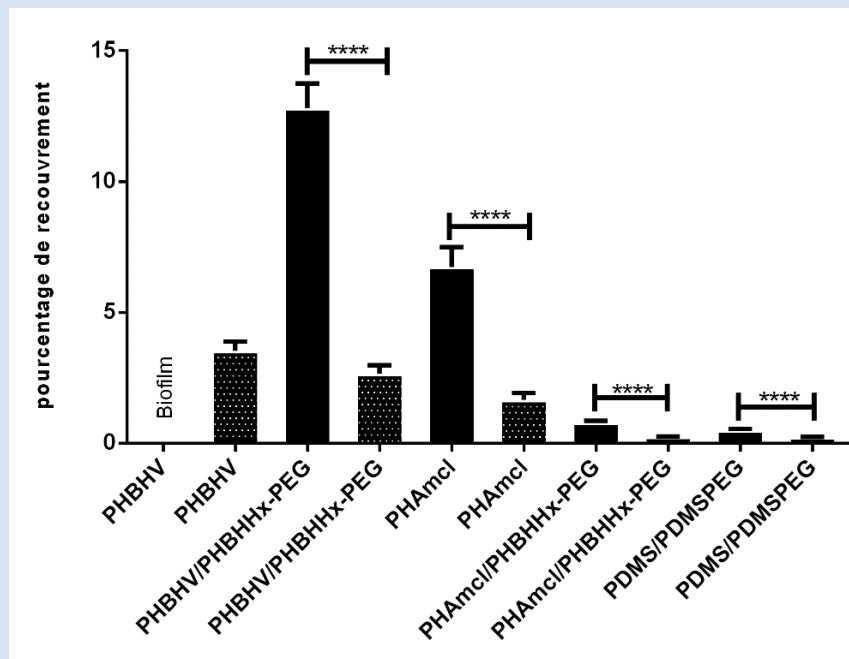


Figure 13. Analyse des pourcentages de recouvrement de *S. aureus* sur les différents revêtements étudiés avant (couleur pleine) et après l'application d'un flux (couleur pointillée) de 20 mL.min<sup>-1</sup> pendant 30 min. n = 30 clichés/revêtement. \*\*\*\* indique p < 0.0001.

### III. Récapitulatif des capacités anti-biofilm et fouling-release des revêtements

Si l'on résume les résultats obtenus en termes de capacité anti-biofilm et fouling-release (Tableau 03), on observe trois grandes catégories. La première est constituée du verre. En effet cette surface ne possède ni capacité antibiofilm, ni capacité FR. La seconde catégorie regroupe les surfaces intermédiaires pour lesquelles un léger effet antiadhésion et/ou FR a été observé, il s'agit des revêtements PHBV et du PDMS. La dernière catégorie rassemble les revêtements les plus performants que cela soit en termes de capacités antibiofilm mais également FR : PHBV/PHBHHx-PEG, PHA<sub>mcl</sub>, PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG et PDMS/PDMS-PEG. Ces résultats permettent de montrer, une nouvelle fois, l'intérêt d'incorporer un copolymère PEG au sein du revêtement puisque pour les trois matrices, cet ajout a permis d'obtenir des capacités antibiofilm et fouling-release.

**Tableau 03.** Récapitulatif des capacités antibiofilm et fouling-release des revêtements étudiés.

	Verre	PHBHV	PHBHV PHBHHx-PEG	PHAmcl	PHAmcl PHBHHx-PEG	PDMS	PDMS PDMS-PEG
Biofilm ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) <i>Avant flux</i>	8,1	3,7	-	-	-	5,4	-
Biofilm ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) <i>Après flux</i>	11,09	-	-	-	-	1,47	-
Capacité anti-biofilm	-	-	+	++	+++	-	+++
Pourcentage de recouvrement (%) <i>Avant flux</i>	-	-	12,8	6,7	0,8	-	0,5
Pourcentage de recouvrement (%) <i>Après flux</i>	-	3,5	2,7	1,6	0,2	-	0,2
Capacité fouling-release	-	+/-	+	+	+++	+/-	+++

- 1<sup>ère</sup> catégorie : Ø capacité antibiofilm et FR
- 2<sup>ème</sup> catégorie : revêtements intermédiaires
- 3<sup>ème</sup> catégorie : revêtements les plus performants

#### IV. Corrélation entre capacité FR et propriétés physiques, chimiques et mécaniques.

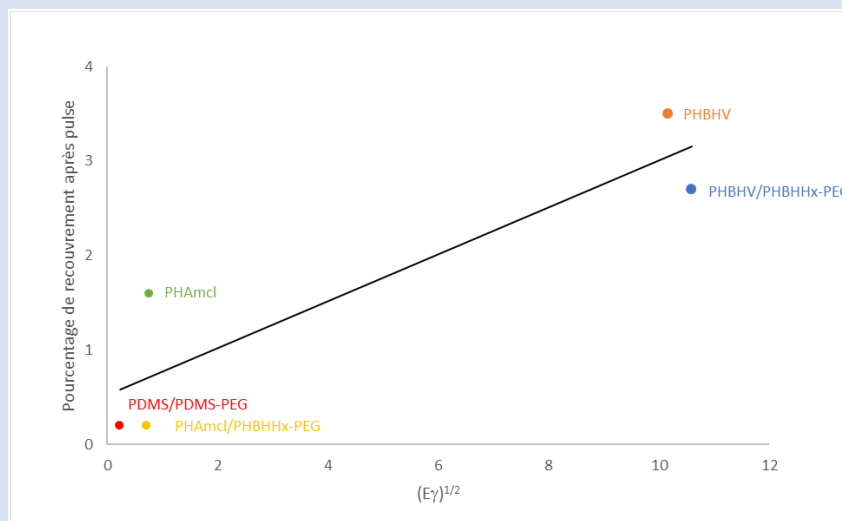
Comme vu précédemment, les propriétés physico-chimiques et mécaniques sont très souvent corrélées à la capacité fouling-release des revêtements. Ainsi les énergies de surface  $\gamma$  et les modules d'élasticité  $E$  doivent être optimisés afin d'obtenir un revêtement ayant, d'une part, une faible énergie de surface et d'autre part, un faible module d'élasticité. Rappelons que d'après Baier, l'adhésion relative est la plus faible lorsque l'énergie de surface du revêtement est comprise dans une zone entre 22 et 25 mN/m. Au-delà de cette zone, la surface pourrait être propice à l'adhésion (Baier, 1971). Toutefois, un joint entre un revêtement et une surface n'étant pas exempt de défaut, Brady et Singer ont proposé d'intégrer des concepts de mécanique de rupture et de prendre en compte le module d'élasticité  $E$  dans cette « prévision » d'adhésion relative (Brady & Singer, 2000). Dans cette étude, les énergies de

surface  $\gamma$  et les modules d'élasticité  $E$  de chaque revêtement ont été déterminés afin d'établir ou non un lien avec la capacité antiadhésive, antibiofilm et fouling-release.

Comme vu précédemment (**Tableau 02**), les énergies de surfaces peuvent être déterminées selon plusieurs méthodes avec des incertitudes liées à leurs utilisations. Dans cette étude, nous avons choisi d'appliquer la méthode d'Owens-Wendt avec une combinaison de deux solvants : l'eau et le diiodométhane. Cette méthode nous semble être la plus appropriée aux propriétés des surfaces étudiées ici.

Si l'on tient uniquement compte des paramètres cités précédemment, à savoir l'énergie de surface  $\gamma$  et le module d'élasticité  $E$ , on peut très rapidement s'apercevoir que la capacité antiadhésive et/ou antibiofilm ne repose pas uniquement sur ces critères. En effet, si l'on analyse dans un premier temps les énergies de surface et les capacités fouling release telles que l'a suggéré Baier, on observe que le PHA<sub>mcl</sub> avec ou sans copolymère PEG, bien qu'ayant une énergie de surface au-delà de la « fouling-release zone », présente des capacités FR tout à fait remarquables. De plus, si l'on prend le PHBHV, on peut observer une nette différence de comportement FR entre la matrice seule et la matrice avec le copolymère PEG, alors que leur énergie de surface ne sont pas significativement différentes à sec. Il semble alors évident que d'autres paramètres entrent en jeu et que l'énergie de surface à elle seule ne permet pas d'expliquer le comportement FR. En intégrant le module d'élasticité tel que l'ont fait Brady et Singer (**Figure 14**), on s'aperçoit qu'effectivement un faible module d'élasticité semble être requis pour améliorer les capacités FR. En effet, d'après nos résultats on observe que le système ayant les meilleures capacités FR est le PDMS/PDMS-PEG, avec un module d'élasticité de 1 MPa. De plus, l'analyse des modules des deux systèmes à base de PHA présente une importante différence. Alors que les systèmes à base de PHA<sub>mcl</sub> se rapprochent du module d'élasticité des systèmes à base de PDMS (14,8 MPa), les systèmes à base de PHBHV, quant à eux, ont un module 200 fois supérieur (2000 MPa). Si l'on corrèle ces résultats aux capacités FR, on observe que les systèmes à base de PHA<sub>mcl</sub> sont bien les plus performants en termes de capacité FR. Un faible module d'élasticité semble donc être un paramètre important dans la capacité FR des revêtements. Toutefois, en ce qui concerne les systèmes à base de PHBHV, la représentation dite « de Brady » ne permet pas de comprendre l'activité de ces revêtements puisque malgré leur module d'élasticité et leur énergie de surface élevés, les système PHBHV/PHBHHx-PEG ont montré des capacités antibiofilm et FR non négligeables. D'autres paramètres entrent donc en jeu dans l'efficacité de nos revêtements qui semble être

notamment dû au caractère amphiphile de leur surface apportée par le copolymère PEG (caractère mal évalué par les méthodes de caractérisation mises en œuvre sur les films secs).



**Figure 14.** Pourcentage de recouvrement en fonction de la racine carrée du produit de l'énergie de surface ( $\gamma$ ) et du module d'élasticité ( $E$ ). Adapté de Brady & Singer, 2000.

En termes de perspectives, il serait intéressant d'évaluer les paramètres physico-chimiques de nos revêtements après hydratation puisque, rappelons-le, ces paramètres ont été déterminés sur des revêtements secs. La technique de la bulle captive (mesure d'angle de contact d'une bulle d'air avec la surface immergée d'un revêtement) pourrait ainsi nous permettre de mettre en évidence la réorganisation des chaînes de PEG au sein de nos revêtements lorsque ces derniers sont immergés et ainsi confirmer notre hypothèse selon laquelle l'ajout d'un copolymère PEG au sein des revêtements entraîne une ambiguïté en surface responsable de l'efficacité antiadhésive et antibiofilm des systèmes formulés.

Pour la suite de cette étude, nous avons souhaité comprendre les mécanismes génomiques mis en jeu dans le phénomène d'adhésion des organismes et/ou de formation de biofilm en fonction des revêtements. Pour cela, nous avons réalisé une analyse transcriptomique de huit gènes cibles décrits comme étant impliqués dans le processus d'adhésion et de formation de biofilm. Comme pour l'étude de l'activité antibiofilm et de la capacité FR, cette analyse a été menée sur la bactérie *S. aureus* dont le génome complet est d'ores et déjà séquencé.

## V. Analyse transcriptomique

### 1. Les gènes ciblés

Comme décrit précédemment, *S. aureus* est à la fois une bactérie commensale et un pathogène opportuniste de l'Homme. Le terme commensal désigne les organismes qui vivent aux dépens des autres sans leur causer de dommage. *Staphylococcus aureus* se trouve principalement au niveau des fosses nasales (Williams, 1963) mais d'autres réservoirs existent comme le pharynx, les surfaces humides de la peau et occasionnellement, chez certains individus, au niveau du tube digestif. *S. aureus* a développé de nombreux mécanismes de virulence et de stratégies d'échappement au système immunitaire de l'hôte, incluant les protéines de surface, la sécrétion d'enzymes et de toxines. L'adhésion sur milieu biotique (tissu humain) et abiotique (cathéter, prothèse, etc.) est une étape critique pour la colonisation de la bactérie durant les étapes précoces de l'invasion (Pavithra & Doble, 2008). *S. aureus* exprime un éventail d'adhésines et de protéines polysaccharidiques, qui permettent l'adhésion à de multiples facteurs de l'hôte (comme la matrice extra-cellulaire, les protéines plasmatiques et les protéines de surfaces cellulaires) et l'adhésion des bactéries entre elles, étape essentielle à la formation d'un biofilm.

Dans cette étude, nous avons choisi de nous intéresser à l'étape d'adhésion *via* l'étude des adhésines protéiques MSCRAMMs et à l'étape de maturation du biofilm *via* une adhésine polysaccharidique PIA (Figure 15).

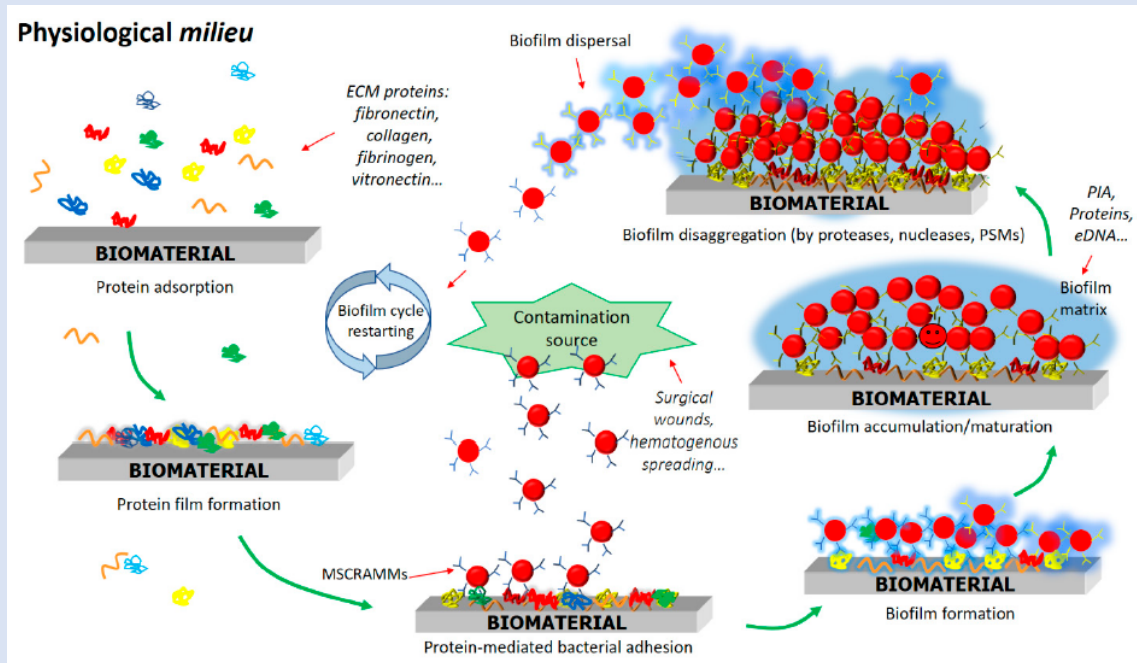


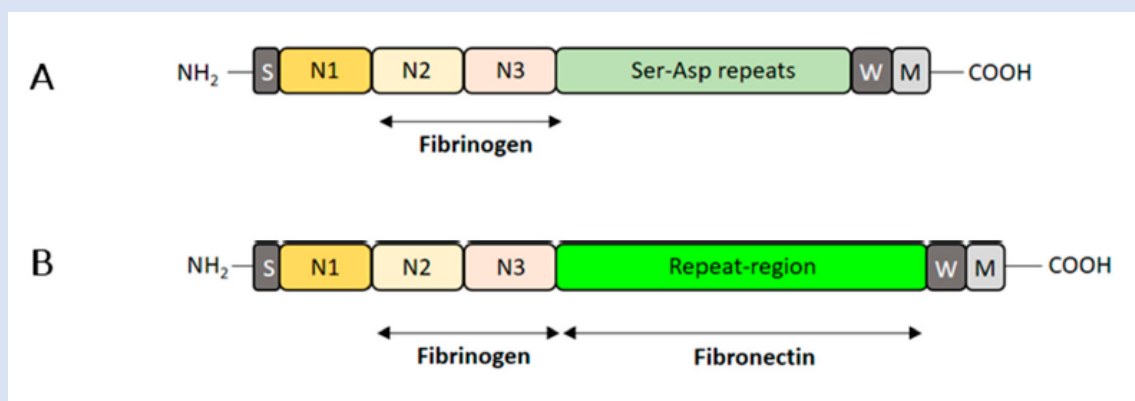
Figure 15. Représentation schématique du cycle de vie du biofilm de *S. aureus*. Dans la première étape, les cellules de *S. aureus* adhèrent à la surface abiotique des biomatériaux *via* des adhésines (MSCRAMMs) qui reconnaissent spécifiquement les protéines plasmatiques recouvrant le dispositif. Dans un deuxième temps, les bactéries prolifèrent, s'accumulent et produisent une matrice composée de polysaccharides (PIA), d'ADN extracellulaire et de protéines. La troisième étape consiste à disperser les bactéries et disséminer l'infection. D'après Pietrocola *et al.*, 2022.

a) Adhésion des cellules de *S. aureus* aux biomatériaux : les adhésines protéiques MSCRAMMs

L'interaction entre la bactérie et la surface à coloniser passe tout d'abord par la capacité de la bactérie à adhérer aux biomatériaux. Pour cela, les protéines de surface jouent un rôle primordial dans l'adhésion et initient ainsi la colonisation. Ces protéines de surface ancrées à la paroi bactérienne sont appelées MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Les MSCRAMMs sont des protéines associées au peptidoglycane (PDG) de la bactérie par des liaisons covalentes. Ces adhésines sont responsables de l'attachement de la bactérie à différents composés physiologiques matrices comme le collagène, le fibrinogène ou la fibronectine et initient la colonisation (Patti *et al.*, 1994 ; Foster & Hook, 1998). Il existe une vingtaine de MSCRAMMs chez *S. aureus* (Patti *et al.*, 1994 ; Clarke & Foster, 2006) dont les principales sont : les protéines de liaison à la fibronectine, FnbpA et FnbpB (Fibronectin binding protein A et B) (Jonsson *et al.*, 1991), la protéine de liaison au

collagène, Cna (collagen binding protein) (Switalski *et al.*, 1989), la protéine de liaison à l'élastine (Ebbs) (Seo *et al.*, 2008 ; Campoccia *et al.*, 2009) ainsi que les protéines de liaison au fibrinogène ClfA, ClfB (clumping factor A et B) et Fib (fibrinogen binding protein) (Shannon & Flock, 2004 ; McDevitt *et al.*, 1994 ; Ni Eidhin *et al.*, 1998).

Toutes les adhésines ont des caractéristiques structurales communes (**Figure 16**) (Pietrocola *et al.*, 2022). À l'extrémité N-terminale se trouve la séquence S ou peptide signal dont le rôle est d'adresser la protéine nouvellement synthétisée vers la membrane. En position C-terminale, les régions M et W correspondent respectivement à la région d'ancrage à la membrane cytoplasmique et à la région d'ancrage à la paroi. Ces deux régions sont séparées par une séquence consensus LPXTG. Le clivage de la séquence LPXTG entre la thréonine (T) et la glycine (G) par une enzyme, la sortase A permet la formation d'une liaison amide entre le groupe carboxyl de la thréonine et le groupe aminé des molécules du peptidoglycane (Mazmanian *et al.*, 1999). Cette liaison permet alors d'ancrer la protéine à la paroi.



**Figure 16.** Représentation de deux adhésines de *S. aureus*. (A) ClfA (ou ClfB) ; (B) FnBPA (ou FnBPB). S : peptide signal ; M et W : domaines d'ancrage respectivement à la membrane cytoplasmique et à la paroi. La région N-terminale A contient trois sous-domaines distincts nommés N1, N2 et N3. La région sérine-aspartate de ClfA et ClfB est composée d'un nombre variable de répétitions dipeptidiques sérine-aspartate. La région répétée de FnBPA et FnBPB comprend 10 unités de 39 résidus de liaisons à la fibronectine. Pour chaque adhésine, les sites de liaison aux protéines spécifiques sont indiqués. D'après Pietrocola *et al.*, 2022.

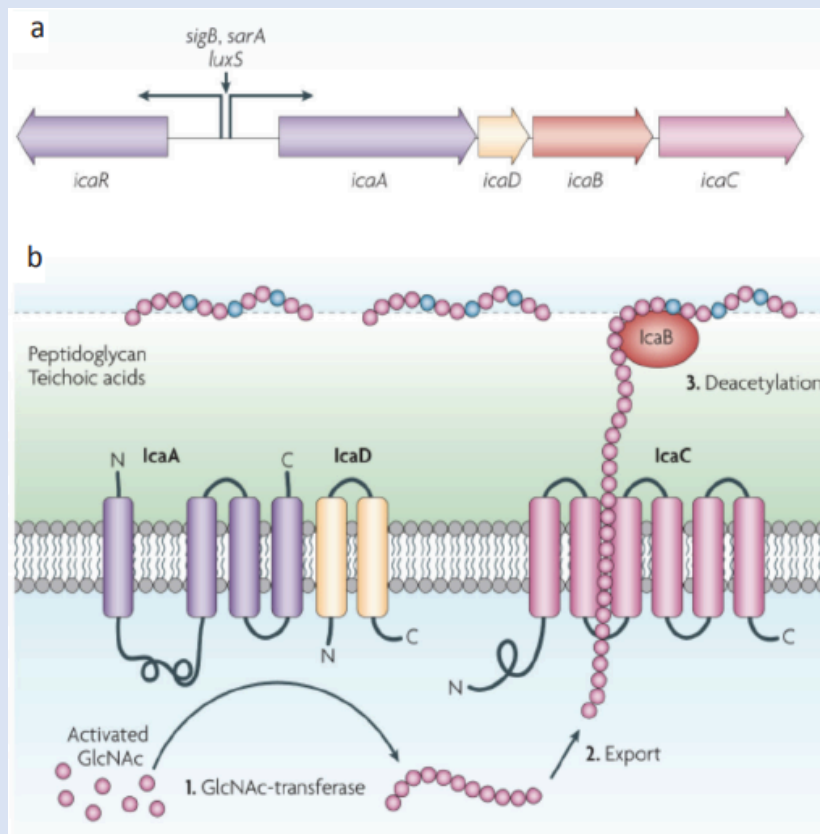
b) Prolifération et production de la matrice du biofilm : l'adhésine polysaccharidique PIA

Bien que de nombreux facteurs internes et externes influencent l'attachement et la maturation du biofilm, la production de la protéine PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin) connue également sous le nom de PNAG (Polymeric N-Acetyl-Glucosamine) est le facteur le mieux caractérisé. Cette adhésine polysaccharidique est le composant majeur de la matrice

extracellulaire du biofilm permettant l'adhésion intercellulaire. PIA (28 kDa) est composée de deux fractions polysaccharidiques (Mack *et al.*, 1996). La fraction 1 est un polymère de N-acétyl-glucosamine linéaire et représente 80% du PIA. Chaque chaîne est constituée en moyenne de 130 résidus et possède 15 à 20% de résidus déacétylés distribués au hasard, conférant à la fraction 1 sa charge positive. La fraction 2 est structurellement proche du polysaccharide 1 mais moins riche en résidus D-glucosaminyl non acétylés. Le PIA est donc à la fois chargé positivement et négativement ce qui lui permet de se lier au peptidoglycane, aux acides teichoïques et aux supports abiotiques.

La protéine PIA est codée par l'opéron *ica* (intercellular adhesion) (Maira-Litran *et al.*, 2002). Cet opéron a initialement été identifié chez *S. epidermis* par mutagenèse aléatoire permettant d'isoler des mutants ne produisant plus de biofilm (Mack *et al.*, 1996). L'opéron a ensuite été identifié chez *S. aureus* (Cramton *et al.*, 1999) mais également chez d'autres espèces comme *S. caprae* (Allignet *et al.*, 2001). La plupart des isolats cliniques de *S. aureus* portent l'opéron *ica* (Cramton *et al.*, 1999 ; Arciola *et al.*, 2001 ; Fowler *et al.*, 2001). Le locus *ica* comprend 5 gènes : les gènes *icaA*, *icaD*, *icaB* et *icaC*, co-transcrits à partir d'un unique promoteur en amont d'*icaA* et un gène régulateur négatif, *icaR* situé en amont de *icaA* et transcrit en sens opposé aux autres (**Figure 17**) (Cramton *et al.*, 1999). La protéine IcaA est une N-acétyl glucosamine transférase qui synthétise un homopolymère de N-acétyl glucosamine. Pour assurer cette fonction, IcaA a besoin de la protéine transmembranaire accessoire IcaD. La chaîne croissante de PIA est alors exportée par la protéine transmembranaire IcaC. Après exportation, le polymère est pris en charge par la protéine de surface IcaB dont le rôle est de déacétyler certains résidus N-acétyl glucosamine. Cette réaction va donner au polymère son caractère cationique, essentiel à l'attachement aux surfaces biotiques et abiotiques (Gerke *et al.*, 1998 ; Vuong *et al.*, 2004 ; Otto, 2012) (**Figure 17**).





**Figure 17.** Organisation de l'opéron *ica* et synthèse de l'adhésine polysaccharidique PIA. (a) Organisation du locus *ica*. Le locus *ica* est composé de 5 gènes. Les 4 gènes successifs, *icaA*, *D*, *B* et *C*, co-transcrits à partir d'un promoteur unique en amont de *icaA*, permettent la synthèse du polysaccharide. Le gène *icaR* code le régulateur du locus *ica*. *IcaR* est transcrit en sens inverse des autres. Ces gènes sont régulés par plusieurs protéines dont  $\sigma^B$  et SarA. (b) Synthèse de PIA. IcaA associée à IcaD permet l'activation du N-acetyl glucosamine pour l'associer à une chaîne de N-acetyl glucosamine. IcaC est une protéine transmembranaire assurant le transport de PIA nouvellement synthétisé hors de la cellule et l'association de la nouvelle molécule au PIA déjà en place. IcaB permet la déacétylation de certains résidus pour permettre une modification de la charge négative en charge positive qui facilite l'interaction avec les supports. D'après Otto, 2009.

Le mécanisme de formation du biofilm chez *S. aureus* n'est pas encore bien compris et seul un nombre limité d'études sur les profils d'expression des gènes impliqués dans la production de biofilms a été réalisé.

Pour comprendre le comportement de *S. aureus* face à nos revêtements, nous avons cherché à détecter l'expression de 8 gènes impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilm. Ainsi 6 gènes codant des adhésines protéiques MSCRAMMs ont été étudiés : *fib*, *clfA*, *clfB*, *ebps*, *fnbA* et *fnbB* et 2 gènes impliqués dans la synthèse de l'adhésine polysaccharidique PIA : *icaA* et *icaR*.

Cette étude a été réalisée après 18h d'incubation de *S. aureus* en système « Drip Flow Biofilm Reactor ». Les cellules bactériennes adhérentes ont ensuite été récupérées et les ARNs extraits. Après une étape de transcription inverse, une PCR quantitative a été réalisée avec les amorces dessinées spécifiquement pour l'analyse des gènes cibles de la souche *S. aureus* CIP 53154 étudiée ici.

## 2. Effet du copolymère PEG sur l'expression des gènes ciblés

Afin d'avoir une idée précise de l'effet du copolymère PEG au sein des revêtements formulés sur l'expression des gènes ciblés, les calculs d'expression relative ont été effectués en prenant comme référence le revêtement dépourvu de PEG. Ainsi, il est possible d'observer précisément l'effet de l'incorporation du copolymère PEG sur l'expression des gènes par rapport au revêtement seul (expression relative de la matrice seule = 1).

- a) Les gènes impliqués dans l'adhésion et/ou la formation de biofilm : *clfA*, *clfB*, *ebps*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*, *icaA*

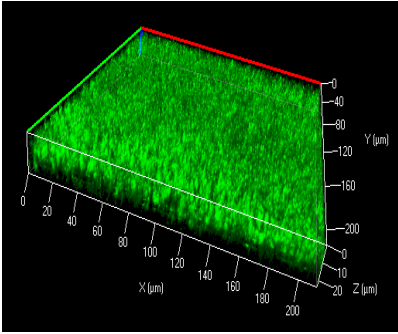
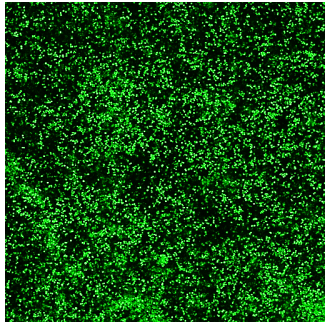
Les résultats permettent d'observer globalement une baisse significative de l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion et/ou la formation de biofilm lorsque les revêtements contiennent du PEG (de -50% à -99%) (**Tableau 04**). Le plus fort pourcentage d'inhibition est retrouvé pour le revêtement PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG, avec, pour chaque gène impliqué, une diminution de 99% de l'expression par rapport au revêtement PHA<sub>mcl</sub>. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que, même dépourvu de PEG, le revêtement PHA<sub>mcl</sub> ne permet pas l'établissement d'un biofilm. En effet, après 18 heures d'incubation il reste très peu colonisé (6,7% de recouvrement bactérien). Puisqu'elles ne forment pas de biofilm, les bactéries n'ont en aucun cas la nécessité d'exprimer les gènes impliqués dans la formation de ce biofilm. Cette hypothèse semble confirmée avec les résultats obtenus puisque très peu d'expression est obtenue en présence du revêtement PHA<sub>mcl</sub> et par conséquent la présence de PEG au sein du revêtement diminue voire inhibe la quasi-totalité de l'expression des gènes impliqués dans la formation de biofilm.

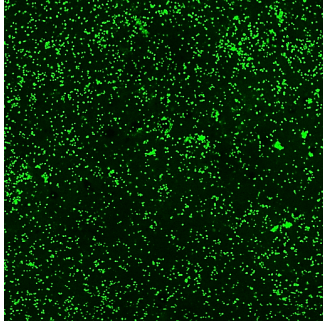
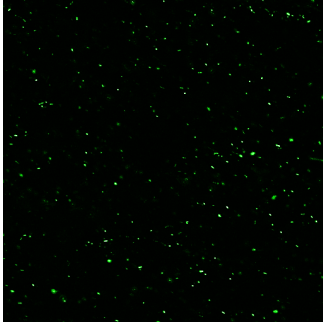
En ce qui concerne, les revêtements à base de PHBHV et de PDMS, les pourcentages d'inhibition de l'expression sont moins importants que précédemment mais restent significatifs. Cette différence pourrait provenir du fait qu'à l'inverse du PHA<sub>mcl</sub>, les revêtements PHBHV et PDMS sont colonisés par un biofilm après 18 heures. Les gènes impliqués dans la

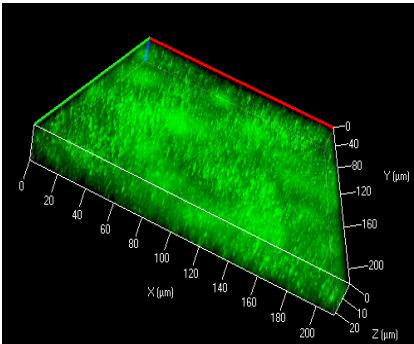
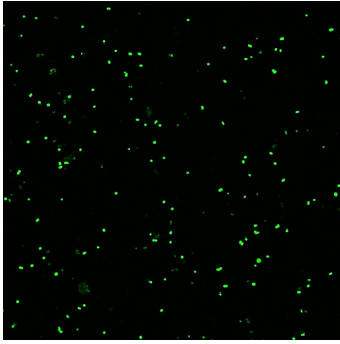
formation de biofilm sont par conséquent exprimés face à ces revêtements. Toutefois, l'ajout de PEG au sein de ces deux revêtements ne permettait pas l'établissement d'un biofilm et ce résultat est cohérent avec les pourcentages d'inhibition d'expression des gènes impliqués dans la formation de biofilm. Ces observations sont cohérentes avec d'autres études qui ont montré que le niveau d'expression de *fnbpA* et *clfA* dans les souches productrices de biofilm était significativement plus élevé que celui des souches ne produisant pas de biofilm (Rahimi *et al.*, 2016).

En comparant l'expression relative en fonction de chaque gène testé, on observe des différences entre les revêtements (**Figure 18**).

**Tableau 04.** Récapitulatif des capacités anti biofilm et des pourcentages d'expression des gènes pour chaque revêtement testé. Les pourcentages d'expression sont calculés pour chaque revêtement contenant du PEG par rapport au revêtement sans PEG. Biofilm + regroupe les gènes impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilm et Biofilm - indique le gène impliqué dans la répression de l'opéron *ica*.

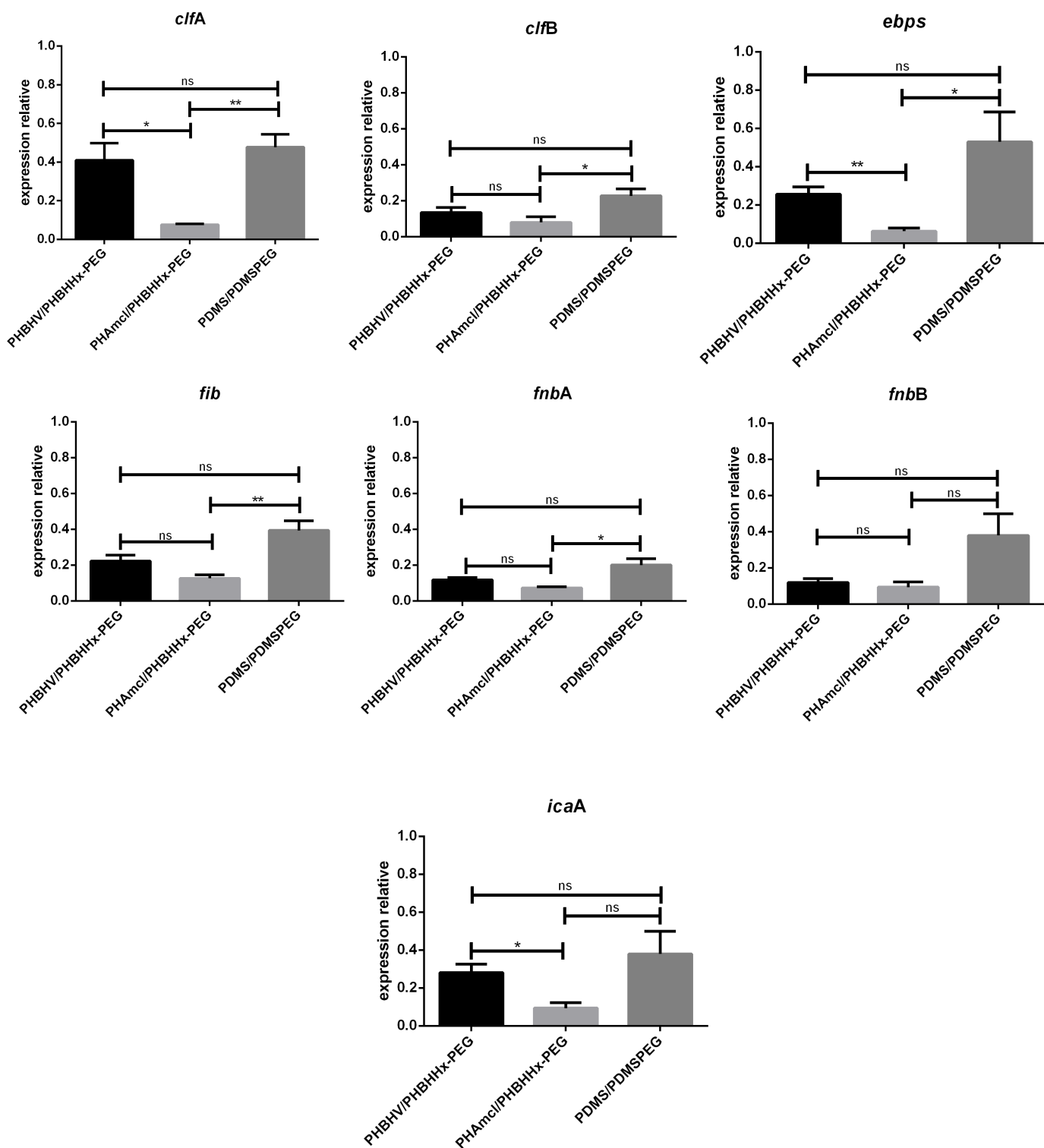
			PHBHV	PHBHV/PHBHHx-PEG
Après 18 h d'incubation				
Pourcentage d'expression des gènes par rapport au revêtement sans PEG	Biofilm +	<i>clfA</i>	-59%	
		<i>clfB</i>	-87%	
		<i>ebps</i>	-75%	
		<i>fib</i>	-78%	
		<i>fnbA</i>	-89%	
		<i>fnbB</i>	-88%	
		<i>icaA</i>	-72%	
	Biofilm -	<i>icaR</i>	+ 433%	

			PHA <sub>mcl</sub>	PHA <sub>mcl</sub> /PHBHHx-PEG
Après 18 h d'incubation				
Pourcentage d'expression des gènes par rapport au revêtement sans PEG	Biofilm +	<i>clfA</i>	-99%	
		<i>clfB</i>	-99%	
		<i>ebps</i>	-99%	
		<i>fib</i>	-99%	
		<i>fnbA</i>	-99%	
		<i>fnbB</i>	-99%	
		<i>icaA</i>	-99%	
	Biofilm -	<i>icaR</i>	+1500%	

			PDMS	PDMS/PDMS-PEG
Après 18 h d'incubation				
Pourcentage d'expression des gènes par rapport au revêtement sans PEG	Biofilm +	<i>clfA</i>	-53%	
		<i>clfB</i>	-78%	
		<i>ebps</i>	-47%	
		<i>fib</i>	-61%	
		<i>fnbA</i>	-80%	
		<i>fnbB</i>	-62%	
		<i>icaA</i>	-62%	
	Biofilm -	<i>icaR</i>	+1320%	

De façon systématique, l'expression des gènes semble plus importante face au revêtement PDMS/PDMS-PEG. On observe même une augmentation souvent significative de l'expression des gènes face au PDMS/PDMS-PEG par rapport au PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG (*clfA*, *clfB*, *ebps*, *fib*, *fnbA*). Aucune différence significative n'est obtenue entre les revêtements PDMS/PDMS-PEG et PHBHV/PHBHHx-PEG, toutefois, là encore, une tendance se profile et on observe une expression plus importante des gènes face au PDMS/PDMS-PEG. Si l'on corrèle ces résultats d'expression avec les pourcentages de recouvrement obtenu précédemment, on peut noter que malgré une expression plus importante des gènes face au revêtement PDMS/PDMS-PEG, ce dernier est le moins colonisé (0,5 % de recouvrement bactérien). A l'inverse, le revêtement PHBHV/PHBHHx-PEG est le plus colonisé (12,8% de recouvrement bactérien) et pourtant les niveaux d'expressions des gènes ne sont pas les plus élevés. A l'inverse, le revêtement PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG est celui induisant le moins les gènes impliqués dans la formation de biofilm et ce de manière significative dans le cas de deux gènes : *clfA* et *ebps*. Seuls les niveaux d'expression du PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG sont en adéquation avec le pourcentage de recouvrement bactérien obtenu (0,8%).

Ces résultats révèlent toute la complexité des mécanismes génétiques impliqués dans la formation de biofilm. En effet, dans cette étude, seuls 8 gènes impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilm ont été étudiés. En réalité, de nombreux autres gènes sont mis en jeu, certains déjà connus, tels que *bap* (biofilm-associated protein) (Cucarella et al., 2001), *sdr* (serine-aspartate repeat family proteins) (Barbu et al., 2014), *cna* (collagen-binding protein) et *eno* (laminin-binding protein) (Azara et al., 2017). De façon à n'omettre aucune information pouvant se révéler importante, il serait intéressant de réaliser un séquençage de l'ARN dans le but de quantifier l'ARN total issu de la transcription et mettre en évidence d'autres gènes non connus pour être impliqués dans l'adhésion et/ou la formation de biofilm.



**Figure 18.** Expression relative des gènes impliqués dans l'adhésion et/ou la formation de biofilm en fonction des revêtements étudiés. Référence = 1. ns indique non-significatif, \* indique  $p > 0.1$  ; \*\* indique  $p > 0.01$ .

b) Le gène répresseur de l'opéron *ica* : *icaR*

La formation de biofilm *via* par la protéine PIA est strictement contrôlée par des circuits de régulation complexes qui répondent à des stimuli externes (environnementaux) et internes (métaboliques) (Sadykov *et al.*, 2008 ; Cue *et al.*, 2012). Les principaux acteurs du contrôle de l'opéron *icaADBC* sont des protéines régulatrices telles que le facteur sigma alternatif  $\sigma^B$  et un certain nombre de facteurs de transcriptions classiques dont *icaR* est le plus important (Cue *et al.*, 2012). Le gène *icaR* est codé immédiatement en amont de l'opéron *icaADBC* et transcrit de manière opposée. *IcaR* est un membre de la famille TetR des régulateurs de transcription qui répriment la transcription de l'opéron *icaADBC* en se liant à l'opérateur *icaADBC* (Conlon *et al.*, 2002 ; Jefferson *et al.*, 2003 ; Jeng *et al.*, 2008) (Figure 19). En raison de sa localisation génétique conservée dans les staphylocoques *ica*-positifs, *icaR* est considéré comme faisant partie du locus *ica*. La répression de la transcription de l'opéron *icaADBC* par *icaR* est le mécanisme le plus immédiat pour contrôler la formation du biofilm médiée par PIA. Cependant, d'autres facteurs influencent également l'expression de *icaADBC*, directement ou indirectement, ce qui donne lieu à un réseau de régulation complexe qui est loin d'être complètement compris (Cue *et al.*, 2012).

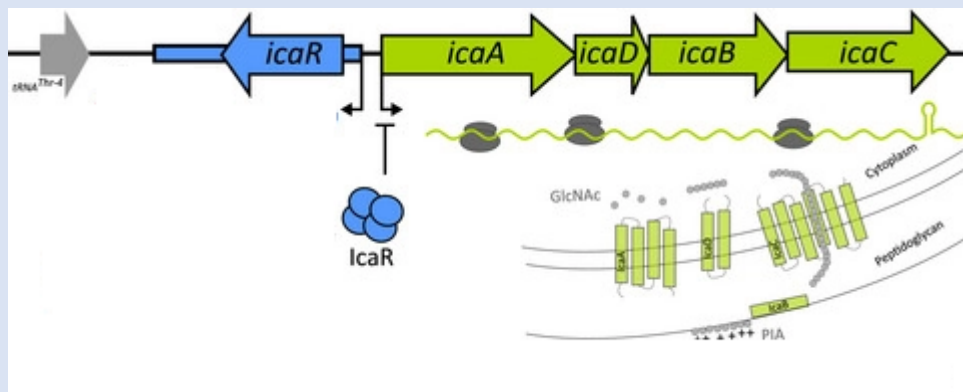
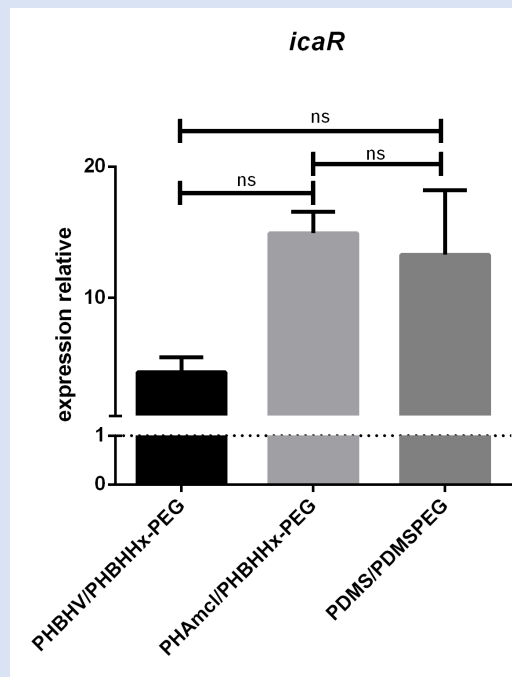


Figure 19. Représentation schématique de l'opéron *ica*, de la synthèse de la protéine PIA et du répresseur *icaR*. Adaptée de Lerch *et al.*, 2019.

Dans le cadre de cette étude, on s'attend donc à ce que le gène *icaR* soit exprimé lorsque les bactéries ne produisent pas de biofilm.

Les résultats obtenus en termes d'expression relative du gène *icaR* sont cohérents avec l'hypothèse formulée (Figure 20). En effet, nous avons montré précédemment que l'ajout de copolymère PEG au sein des revêtements empêchait l'établissement du biofilm et une

induction très importante du gène *icaR* est observée en présence de ces revêtements (jusqu'à 15 fois plus d'expression pour le revêtement PHA<sub>mcl</sub>/PHBHHx-PEG). La production de la protéine PIA semble donc importante dans l'établissement de biofilm sur nos revêtements. Ces résultats sont en accord avec la littérature puisqu'une étude a montré qu'une mutation dans le locus *ica* entraîne l'incapacité à produire PIA et donc inhibe la formation de biofilm (Cramton *et al.*, 1999).



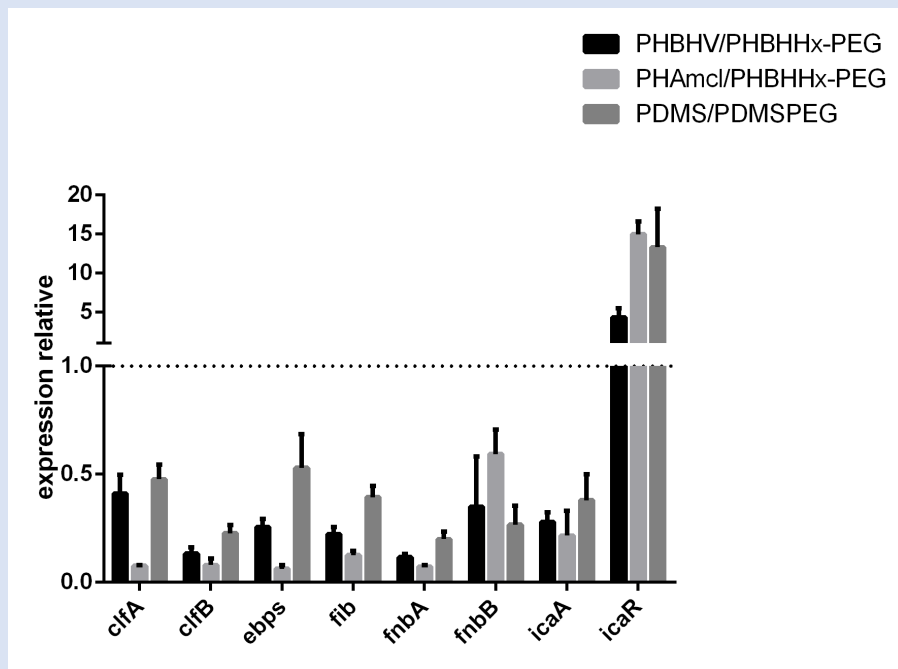
**Figure 20.** Expression relative du gène *icaR* en fonction des revêtements testés. Référence= 1. ns indique non significatif.

### 3. Corrélation avec les capacités anti-adhésives et anti-biofilm

L'intégralité des résultats est représentée dans la **Figure 21**. Cette représentation permet d'observer que tous les gènes impliqués dans l'adhésion et/ou la formation de biofilm sont fortement réprimés lorsque le copolymère PEG est ajouté aux revêtements (expression relative < 1). Comme décrit précédemment, seul le gène *icaR* est induit de 5 à 15 fois.

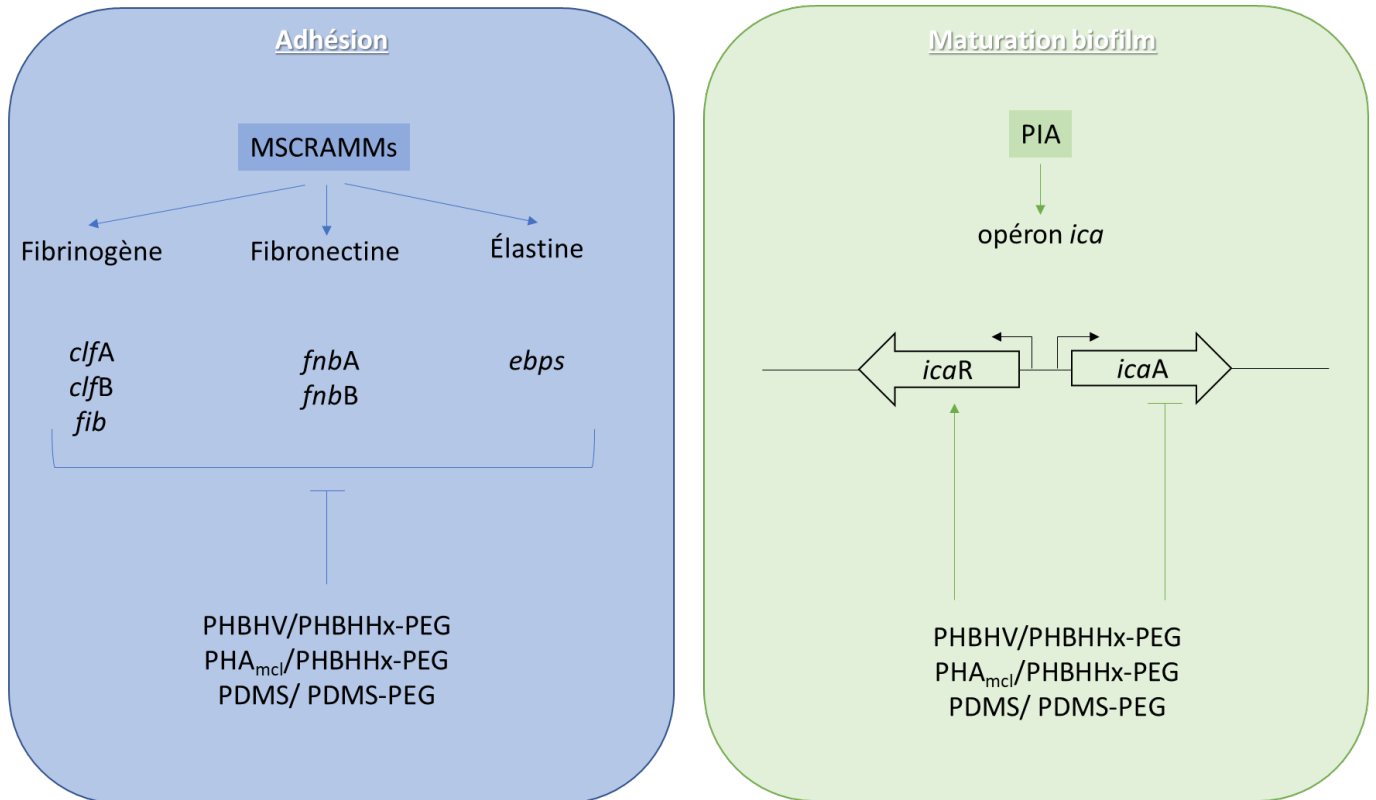
Ces résultats permettent de conforter l'hypothèse selon laquelle l'ajout de copolymère PEG au sein de la matrice perturbe l'établissement de biofilm en agissant sur la production de polysaccharide et sur la capacité d'adhésion *via* l'ambiguïté apportée en surface.





**Figure 21.** Expressions relatives des huit gènes testés en fonction des revêtements étudiés. Référence : revêtement seul.

Ces analyses transcriptomiques permettent non seulement d'établir un lien entre les résultats obtenus en expression relative et ceux obtenus pour l'analyse de la capacité anti biofilm mais également de les corrélérer. Ainsi, la capacité anti biofilm des revêtements contenant un copolymère PEG peut en partie s'expliquer par les différences d'expression de gènes impliqués dans la formation du biofilm. Même si tous les comportements observés n'ont pas été expliqués par l'analyse de ces 8 gènes, d'autres études pourront être menées afin de parfaire la compréhension moléculaire du phénomène d'adhésion et de formation de biofilm.



- Induction du gène
- | Répression du gène

**Figure 22.** Récapitulatif général de l'effet inducteur ou inhibiteur des revêtements formulés contenant un copolymère PEG sur l'expression des huit gènes testés dans cette étude : *clfA*, *clfB*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*, *ebps*, *icaA* et *icaR*.

## VI. Partie expérimentale

### I- Souche bactérienne et milieu de culture

La souche *Staphylococcus aureus* CIP 53154 a été cultivée en milieu LB (10 g.L<sup>-1</sup> bactotryptone, 5 g.L<sup>-1</sup> yeast extract, 10g.L<sup>-1</sup> chlorure de sodium) pendant 24 heures (phase stationnaire), à 37°C et sous agitation (125 rpm). Des étalements sur gélose ont également été réalisés afin d'estimer le nombre de colonies se formant par mL de culture (UFC/mL).

### II- Conditions de croissance

Les cultures bactériennes ont été réalisées dans des flacons en verre contenant 10 mL de milieu de culture. Chaque flacon a été inoculé avec le stock cryoconservé dans du glycérol (25% final) à -80°C. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 24h.

### III- Protocole d'adhésion et de formation de biofilm pour l'analyse de la capacité anti-biofilm

Chaque revêtement est placé dans un canal du système « Drip Flow Biofilm Reactor » et est stérilisé sous radiation UV pendant 30 minutes pour éliminer toute contamination avant l'inoculation. Après 24h d'incubation, la culture de *S. aureus* est reprise dans de l'eau physiologique (NaCl 0,9%) à 10<sup>7</sup> cellules/mL. Chaque canal du système DFR contenant un revêtement reçoit 10 mL de suspension bactérienne. Après 6h d'adhésion en condition statique et à T°C ambiante, le système est placé dans une étuve à 37°C et un flux continu est appliqué (0,82 mL.min<sup>-1</sup>) pendant 18 heures.

Deux temps ont été choisis pour analyser les revêtements au microscope confocal à balayage laser (MCBL) : 6h et 18h. À chacune de ces étapes, les revêtements sont récupérés, rincés brièvement pour éliminer les cellules bactériennes non adhérentes et les bactéries adhérentes sont marquées au Syto9 green (5µM) (Invitrogen). Les observations au MCBL (LSM 710, Zeiss, Germany) sont réalisées à l'aide de l'objectif X40. Dix clichés sont réalisés en quadrillant le revêtement. Chaque type de revêtement est testé trois fois, ce qui permet d'obtenir 30 clichés par revêtement et par temps d'étude.

Les clichés sont réalisés avec le logiciel Zen puis analysés *via* le logiciel Image J. Ces analyses d'images permettent d'obtenir un pourcentage de recouvrement. Enfin, des tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.2.1.

#### IV- Protocole d'adhésion et de formation de biofilm pour l'analyse de la capacité fouling-release

Après 6 heures d'incubation à température ambiante, le système est branché afin d'appliquer un flux continu de milieu LB dans chaque canal ( $0.82\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Le système est placé dans une étuve à  $37^\circ\text{C}$  pendant 18 heures.

A l'issue des 18 heures d'incubation, un flux plus important est appliqué pendant 30 mn ( $20\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) de façon à évaluer l'effet d'un stress hydrodynamique à la surface des revêtements testés.

Plusieurs temps ont été choisis pour analyser les revêtements au MCBL : 6h, 18h et 18h+30mn de flux. A chacune de ces étapes, les revêtements sont récupérés, rincés brièvement pour éliminer les cellules bactériennes planctoniques et les bactéries adhérentes sont marquées au Syto9 green ( $5\mu\text{M}$ ). Les observations en MCBL (LSM 710, Zeiss, Germany) sont réalisées à l'aide de l'objectif X40. Dix clichés sont réalisés en quadrillant le revêtement. Chaque type de revêtement est testé trois fois, ce qui permet d'obtenir 30 clichés par revêtement et par temps d'étude (6h, 18h ou 18h+30mn de flux).

Les clichés sont analysés *via* le logiciel Image J pour les revêtements non colonisés par un biofilm ou *via* le logiciel COMSTAT (Heydorn *et al.*, 2000) pour les revêtements colonisés par un biofilm. Ces analyses d'images permettent d'obtenir soit un pourcentage de recouvrement dans le cas de bactéries adhérentes soit une valeur de biovolume dans le cas de bactéries ayant formé un biofilm. Enfin, des tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.2.1.

#### V- Protocole de récupération des cellules

A l'issue des 18 heures, les cellules bactériennes adhérentes sont récupérées à l'aide d'un grattoir de cellules (stérile et RNase free) et remises en suspension dans de l'eau ultrapure DNase/RNase free. Deux volumes de RNA protect reagent (Qiagen) sont ajoutés à la suspension

bactérienne. Les suspensions sont mélangées pendant 5 secondes puis centrifugées à 1000g pendant 10 mn à 4°C. Les culots cellulaires sont stockés à – 80°C en attendant l'extraction ARN.

#### VI- Protocole d'extraction d'ARN

L'extraction est réalisée à l'aide du kit Master Pure™ Complete DNA & RNA Purification (Lucigen) et selon les instructions fournies.

#### VII- Électrophorèse sur gel d'agarose

Cette étape est nécessaire afin de vérifier l'absence d'ADN dans les échantillons d'ARN. Si l'électrophorèse révèle la présence d'ADN dans un ou plusieurs échantillons, l'extraction est reprise à partir de l'étape « élimination de l'ADN génomique ». De plus, cette étape permet de vérifier l'état de l'ARN extraits et de s'assurer qu'il n'est pas dégradé. L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose 2% (30-40 mn à 80 volts) puis révélée sous rayonnement UV grâce à l'ajout de Midori green au sein du gel avant sa polymérisation.

#### VIII- Dosage de l'extrait d'ARN

La quantité et la qualité des ARN extraits ont été déterminées par mesure de l'absorbance à 260, 280 et 230 nm en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop (Implen). Un ratio supérieur à 2 doit être obtenu pour  $A_{260}/A_{280}$  et  $A_{260}/A_{230}$  afin de s'assurer de l'absence de pollution par des protéines et/ou des composés phénoliques.

**Tableau 05.** Récapitulatif des données obtenues après dosage de l'ARN extrait pour chaque échantillon.

	Quantité ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
Verre	3,29	2,17	2,28
PHBHV	1,01	2,16	2,22
PHBHV/PHBHHx-PEG	1,24	2,16	2,20
PHA <sub>mcl</sub>	0,77	2,22	2,17
PHA <sub>mcl</sub> /PHBHHx-PEG	0,83	2,22	2,13
PDMS	1,98	2,10	2,10
PDMS/PDMS-PEG	0,50	2,14	2,19

## IX- Transcription inverse

Chaque échantillon contenant de l'ARN a été dilué de façon à obtenir 50 µL de solution à 50ng/µL. La transcription inverse a été réalisée à l'aide du kit high-capacity cDNA (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) et selon les instructions fournies. Chaque tube PCR a ensuite été placé dans un thermocycleur (Bio-Rad T 100 thermal cycler), 25°C pendant 10 mn puis 37°C pendant 120 minutes. Une solution d'ADNc de 25ng/µL est obtenue en fin de réaction.

## X- PCR quantitative

Huit gènes ont été ciblés pour cette étude : *clfA*, *clfB*, *ebps*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*, *icaA* et *icaR*. Les amorces ont été dessinées par rapport au génome séquencé de *S. aureus* NCTC 6571.

**Tableau 06.** Liste des amorces utilisées en fonction des gènes ciblés.

Gène	Nom complet	Amorce FW	Amorce Rev
<i>clfA</i>	Clumping factor A	5'-GCGTGGCTTCAGTGCTTGTGA <sub>3'</sub>	5'-TGCTGAGTAGTCCAAAACCGATT <sub>3'</sub>
<i>clfB</i>	Clumping factor B	5'-GATTTCCAATGCGCAAGGAA <sub>3'</sub>	5'-ACAGCTCTCGTTCTAACACTTGGTT <sub>3'</sub>
<i>icaA</i>	Intercellular adhesion	5'-GCCATGTGTTGGATGTTGGTT <sub>3'</sub>	5'-TTGCTTCCAAAGACCTCCCA <sub>3'</sub>
<i>icaR</i>	Intercellular adhesion repressor	5'-AAGACTTTCAGAATTTAATATTGCTGTTTC <sub>3'</sub>	5'-AAGGATGCTTTCAAATACCAACTTTC <sub>3'</sub>
<i>ebps</i>	Elastin binding protein	5'-CAGGTTACCGGAAAATGTT <sub>3'</sub>	5'-ACTTAAACCATTGGCAGCTCTAATT <sub>3'</sub>
<i>fib</i>	Fibrinogen binding protein	5'-TCGAATATGGTGACGTCCA <sub>3'</sub>	5'-CCTCAGTTTTCGCTGCTGGT <sub>3'</sub>
<i>fnbA</i>	Fibronectin binding protein A	5'-GAAAACATAAATTGGGAGCAGCA <sub>3'</sub>	5'-CAACGATCATTGTTCTAAGAATACTG <sub>3'</sub>
<i>fnbB</i>	Fibronectin binding protein B	5'-GGTTACGAAGGTGGCCAAA <sub>3'</sub>	5'-TGTGTCTTCTCGAATGACTGATT <sub>3'</sub>

### - Réalisation d'une gamme de dilution de l'ADNc

Une dilution au 200<sup>ème</sup> de la solution d'ADNc a été réalisée de façon à obtenir une concentration de 0,125ng/µL. Ainsi, 8µL de cette solution dans un puit permettront d'avoir une quantité d'ADNc de 1 ng.

Cette solution sera diluée de 10 en 10 de façon à obtenir 4 tubes avec une concentration de 0,125 ; 0,0125 ; 0,00125 et 0,000125 ng/µL.

- Réalisation de la plaque

Les réactions sont effectuées en trois exemplaires sur des plaques à 96 puits et le volume de réaction a été fixé à 20  $\mu\text{L}$  par puit. Chaque puits est complété avec 8  $\mu\text{L}$  d'ADNc, 2  $\mu\text{L}$  de mix d'amorces (100  $\mu\text{M}$ ) et 10  $\mu\text{L}$  de Power SYBR green. Trois puits sont réalisés par dilution d'ADNc soit 12 puits par condition. Des contrôles endogènes en triplicat ont également été intégrés *via* l'utilisation du mix d'amorces 16S (le contrôle endogène est le gène dont la transcription ne varie pas entre les conditions testées). Une condition contrôle a également été choisie : le verre. La réaction débute par une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 mn puis 40 cycles d'amplification à 95°C pendant 20 sec, 60°C pendant 20 sec et 72°C pendant 20 sec (7300 Real-Time PCR system, Applied Biosystems).

- Analyse des données

L'expression de 8 gènes a été calculée par rapport à une référence et à un contrôle endogène (16S). Les valeurs de Ct (cycle threshold) sont obtenues pour chaque échantillon à l'issue de la réaction. Ces Ct sont des valeurs auxquelles la courbe PCR croise le seuil fixé (0,3). Plus la valeur de Ct est élevée (30-35), moins l'ARNm détecté est présent, car il faut plus de cycles PCR pour pouvoir détecter l'amplification fluorescente. En revanche, si le Ct a une petite valeur (10-15), le gène est fortement exprimé. Le niveau d'expression du gène a été quantifié de manière relative entre deux conditions par la formule  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

## VII. Références bibliographiques

- Allignet, J., Aubert, S., Dyke, K. G., & El Solh, N. (2001). Staphylococcus caprae strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the ica operon involved in biofilm formation. *Infection and immunity*, 69(2), 712-718.
- Arciola, C. R., Baldassarri, L., & Montanaro, L. (2001). Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of clinical microbiology*, 39(6), 2151-2156.
- Azara, E., Longheu, C., Sanna, G., & Tola, S. (2017). Biofilm formation and virulence factor analysis of Staphylococcus aureus isolates collected from ovine mastitis. *Journal of applied microbiology*, 123(2), 372-379.
- Baier, R. E., & DePalma, V. A. (1971). The relation of the internal surface of grafts to thrombosis. *Management of Arterial Occlusive Disease*, 18, 1-47.
- Barbu, E. M., Mackenzie, C., Foster, T. J., & Höök, M. (2014). SdrC induces staphylococcal biofilm formation through a homophilic interaction. *Molecular microbiology*, 94(1), 172-185.
- Brady Jr, R. F., & Singer, I. L. (2000). Mechanical factors favoring release from fouling release coatings. *Biofouling*, 15(1-3), 73-81.
- Campoccia, D., Montanaro, L., Ravaioli, S., Cangini, I., Speziale, P., & Arciola, C. R. (2009). Description of a new group of variants of the Staphylococcus aureus elastin-binding protein that lacks an entire DNA segment of 180 bp. *The International Journal of Artificial Organs*, 32(9), 621-629.
- Clarke, S. R., & Foster, S. J. (2006). Surface adhesins of Staphylococcus aureus. *Advances in microbial physiology*, 51, 187-224.
- Conlon, K. M., Humphreys, H., & O'Gara, J. P. (2002). icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in Staphylococcus epidermidis. *Journal of bacteriology*, 184(16), 4400-4408.
- Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., & Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation. *Infection and immunity*, 67(10), 5427-5433.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., & Penadés, J. R. (2001). Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 183(9), 2888-2896.
- Cue, D., Lei, M. G., & Lee, C. Y. (2012). Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 38.
- Fabbri, S., Dennington, S. P., Price, C., Stoodley, P., & Longyear, J. (2018). A marine biofilm flow cell for in situ screening marine fouling control coatings using optical coherence tomography. *Ocean Engineering*, 170, 321-328.
- Foster, T. J., & Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. *Trends in microbiology*, 6(12), 484-488.
- Fowler Jr, V. G., Fey, P. D., Reller, L. B., Chamis, A. L., Corey, G. R., & Rupp, M. E. (2001). The intercellular adhesion locus ica is present in clinical isolates of Staphylococcus aureus from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Medical microbiology and immunology*, 189(3), 127-131.
- Galhenage, T. P., Webster, D. C., Moreira, A., Burgett, R. J., Stafslin, S. J., Vanderwal, L., ... & Clare, A. S. (2017). Poly (ethylene) glycol-modified, amphiphilic, siloxane-polyurethane coatings and their performance as fouling-release surfaces. *Journal of Coatings Technology and Research*, 14(2), 307-322.
- Gerke, C., Kraft, A., Süßmuth, R., Schweitzer, O., & Götz, F. (1998). Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis Polysaccharide Intercellular Adhesin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18586-18593.
- Goupil, D. W., DePalma, V. A., & Baier, R. E. (1973). Prospects for nontoxic fouling-resistant paints. In *Proc 9th Ann Conf Marine Technol Soc* (pp. 445-458).
- Griffith, A. A. (1921). The phenomena of rupture and flow in solids. *Philosophical transactions of the royal society of London. Series A*, 221(582-593), 163-198.
- Griffith, A. A., & Gilman, J. J. (1968). The phenomena of rupture and flow in solids. *Transactions of the ASM*, 61, 855-906.
- Guazzelli, E., Perondi, F., Criscitiello, F., Pretti, C., Oliva, M., Casu, V., ... & Martinelli, E. (2020). New amphiphilic copolymers for PDMS-based nanocomposite films with long-term marine antifouling performance. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(42), 9764-9776.
- Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B. K., & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 146(10), 2395-2407.



- Hu, W., He, X., Bai, Y., Zheng, L., Hu, Y., Wang, P., ... & Jia, K. (2020). Synthesis and self-assembly of polyethersulfone-based amphiphilic block copolymers as microparticles for suspension immunosensors. *Polymer Chemistry*, 11(8), 1496-1503.
- Jefferson, K. K., Cramton, S. E., Götz, F., & Pier, G. B. (2003). Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Molecular microbiology*, 48(4), 889-899.
- Jeng, W. Y., Ko, T. P., Liu, C. I., Guo, R. T., Liu, C. L., Shr, H. L., & Wang, A. H. J. (2008). Crystal structure of IcaR, a repressor of the TetR family implicated in biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Nucleic acids research*, 36(5), 1567-1577.
- Jin, Z., Mei, H., Pan, L., Liu, H., & Cheng, L. (2021). Superhydrophobic self-cleaning hierarchical micro-/nanocomposite coating with high corrosion resistance and durability. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(11), 4111-4121.
- Jonsson, K., Signäs, C., Müller, H. P., & Lindberg, M. (1991). Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*: the complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *European Journal of Biochemistry*, 202(3), 1041-1048.
- Kendall, K. (1971). The adhesion and surface energy of elastic solids. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 4(8), 1186.
- Lerch, M. F., Schoenfelder, S. M., Marincola, G., Wencker, F. D., Eckart, M., Förstner, K. U., ... & Ziebuhr, W. (2019). A non-coding RNA from the intercellular adhesion (*ica*) locus of *Staphylococcus epidermidis* controls polysaccharide intercellular adhesion (PIA)-mediated biofilm formation. *Molecular microbiology*, 111(6), 1571-1591.
- Liu, C., Ma, C., Xie, Q., & Zhang, G. (2017). Self-repairing silicone coatings for marine anti-biofouling. *Journal of Materials Chemistry A*, 5(30), 15855-15861.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., & Laufs, R. (1996). The intercellular adhesion in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1, 6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *Journal of bacteriology*, 178(1), 175-183.
- Maira-Litrán, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark III, G., Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (2002). Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infection and immunity*, 70(8), 4433-4440.
- Martinelli, E., Suffredini, M., Galli, G., Glisenti, A., Pettitt, M. E., Callow, M. E., ... & Lyall, G. (2011). Amphiphilic block copolymer/poly (dimethylsiloxane)(PDMS) blends and nanocomposites for improved fouling-release. *Biofouling*, 27(5), 529-541.
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H., & Schneewind, O. (1999). *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 285(5428), 760-763.
- McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P., & Foster, T. J. (1994). Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 11(2), 237-248.
- Ni Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Höök, M., & Foster, T. J. (1998). Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 30(2), 245-257.
- Noguer, A. C., Olsen, S. M., Hvilsted, S., & Kiil, S. (2017). Diffusion of surface-active amphiphiles in silicone-based fouling-release coatings. *Progress in Organic Coatings*, 106, 77-86.
- Olsen, S. M., Blom, A., Thorlaksen, P., Hillerup, D., & Sørensen, K. F. (2014). Advances in coating technology. In *The 17th international Congress on Marine Corrosion and Fouling Stephen Riady Centre, National University of Singapore* (p. 56).
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*—the accidental pathogen. *Nature reviews microbiology*, 7(8), 555-567.
- Otto, M. (2012). Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 34, No. 2, pp. 201-214). Springer-Verlag.
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J., & Höök, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Reviews in Microbiology*, 48(1), 585-617.
- Pavithra, D., & Doble, M. (2008). Biofilm formation, bacterial adhesion, and host response on polymeric implants—issues and prevention. *Biomedical Materials*, 3(3), 034003.
- Pietrocola, G., Campoccia, D., Motta, C., Montanaro, L., Arciola, C. R., & Speziale, P. (2022). Colonization and Infection of Indwelling Medical Devices by *Staphylococcus aureus* with an Emphasis on Orthopedic Implants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5958.

Rahimi, F., Katouli, M., & Karimi, S. (2016). Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. *Microbial pathogenesis*, 98, 69-76.

Sadykov, M. R., Olson, M. E., Halouska, S., Zhu, Y., Fey, P. D., Powers, R., & Somerville, G. A. (2008). Tricarboxylic acid cycle-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *Journal of bacteriology*, 190(23), 7621-7632.

Salta, M., Wharton, J. A., Stoodley, P., Dennington, S. P., Goodes, L. R., Werwinski, S., ... & Stokes, K. R. (2010). Designing biomimetic antifouling surfaces. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1929), 4729-4754.

Seo, Y. S., Lee, D. Y., Rayamahji, N., Kang, M. L., & Yoo, H. S. (2008). Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. *Research in veterinary science*, 85(3), 433-438.

Shannon, O., & Flock, J. I. (2004). Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* binds to platelets and inhibits platelet aggregation. *Thrombosis and haemostasis*, 91(04), 779-789.

Sundaram, H. S., Cho, Y., Dimitriou, M. D., Weinman, C. J., Finlay, J. A., Cone, G., ... & Ober, C. K. (2011). Fluorine-free mixed amphiphilic polymers based on PDMS and PEG side chains for fouling release applications. *Biofouling*, 27(6), 589-602.

Switalski, L. M., Speziale, P., & Höök, M. (1989). Isolation and characterization of a putative collagen receptor from *Staphylococcus aureus* strain Cowan 1. *Journal of Biological Chemistry*, 264(35), 21080-21086.

Vladkova, T. (2008). Surface modification approach to control biofouling. Springer Series on Biofilms. Springer, Berlin, Heidelberg.

Vuong, C., Voyich, J. M., Fischer, E. R., Braughton, K. R., Whitney, A. R., DeLeo, F. R., & Otto, M. (2004). Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cellular microbiology*, 6(3), 269-275.

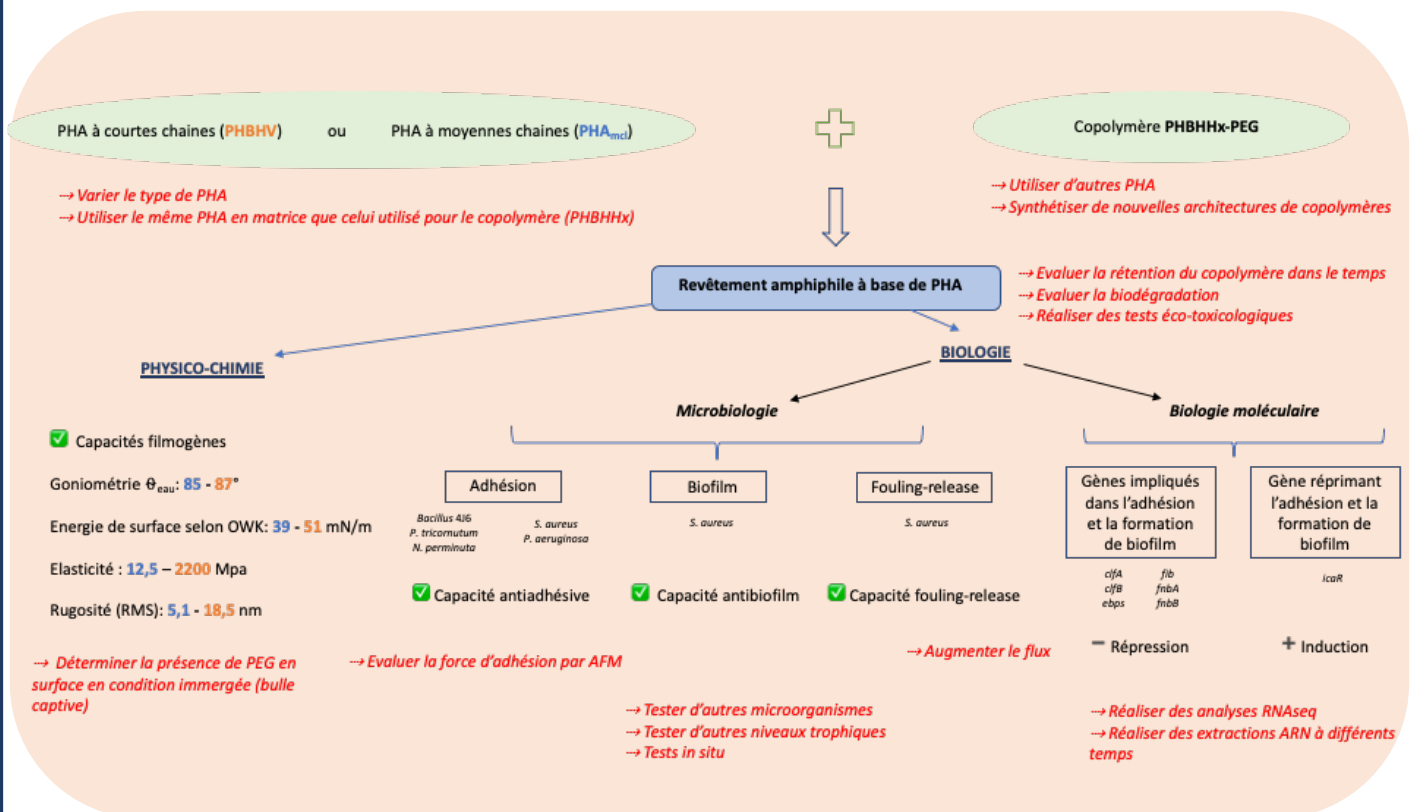
Williams, R. E. O. (1963). Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriological reviews*, 27(1), 56-71.

Zhang, Q., Jiang, J., Gao, F., Zhang, G., Zhan, X., & Chen, F. (2017). Engineering high-effective antifouling polyether sulfone membrane with P (PEG-PDMS-KH570) SiO<sub>2</sub> nanocomposite via in-situ sol-gel process. *Chemical Engineering Journal*, 321, 412-423.

Zhang, X., Wang, L., & Levänen, E. (2013). Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion. *Rsc Advances*, 3(30), 12003-12020.



# Conclusion générale & Perspectives



L'apparition de biofilm pose de sérieux problèmes dans de nombreux domaines. L'un des premiers secteurs touchés est le milieu marin. En effet, pour les navires, infrastructures et matériels aquacoles semi-immergés, l'encrassement biologique est un fléau qui, d'une part, a un réel coût économique et d'autre part, a un fort impact environnemental. Loin d'être le seul secteur touché, on retrouve également le domaine médical avec notamment la colonisation de dispositifs médicaux tels que les cathéters, les stents ou encore les implants. De lourdes conséquences peuvent alors en découler allant du retrait du dispositif infecté jusqu'au décès du patient.

Des solutions limitant cet encrassement biologique ont été développées au cours de ces dernières années, toutefois l'apparition de nouvelles contraintes liées à la préservation de l'environnement ont orienté les dernières recherches vers de nouvelles alternatives écoresponsables. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce projet de thèse qui vise à substituer un composé d'origine pétrochimique, le polydiméthylsiloxane (PDMS), par un biopolymère, le poly(hydroxyalcanoate) (PHA) (**Figure 01**). Afin d'obtenir l'effet antiadhésif recherché, un système a été formulé sur la base d'un système amphiphile existant et efficace constitué de PDMS et de polyéthylène glycol (PEG). Ce système consiste à intégrer au sein d'une matrice hydrophobe (PDMS ou PHA) un copolymère amphiphile (PDMS-PEG ou PHA-PEG) composé d'une partie hydrophobe (PDMS ou PHA) à laquelle est greffé un polymère hydrophile (PEG). L'objectif de ce copolymère amphiphile est double. Il permet, d'une part, d'obtenir l'effet antiadhésif en venant perturber les interactions physico-chimiques nécessaires à l'établissement des organismes à la surface et il permet, d'autre part, la rétention du polymère hydrophile au sein du système grâce à sa partie hydrophobe. Cette stratégie permet donc au système d'être efficace mais également durable dans le temps. Sur la base de ces connaissances, des systèmes amphiphiles à base de PHA et de PEG ont été formulés.

Deux types de PHA ont été sélectionnés pour ce projet de thèse, l'un faisant partie des PHA à courtes chaînes : le PHBHV et l'autre faisant partie des PHA à moyennes chaînes : le PHA<sub>mcl</sub>. Leurs différences en termes de longueur de chaîne carbonée leur confèrent des propriétés physico-chimiques et mécaniques très différentes. En effet, le PHBHV présente un taux de cristallinité nettement supérieur au PHA<sub>mcl</sub> ce qui a un impact sur la rugosité et l'élasticité du revêtement formulé. De précédentes études ont montré une relation entre ces paramètres et la capacité d'une surface à limiter l'encrassement. De ce fait, au-delà de substituer un composé

pétrochimique par un biopolymère, cette étude s'est également intéressée à l'optimisation du système en testant deux types de PHA différents.

Les paramètres physico-chimiques et mécaniques de chaque système formulé ont été déterminés ce qui a permis de mettre en évidence des différences entre le PHBHV et le PHA<sub>mcl</sub> en termes d'élasticité notamment. L'hydrophilie apportée par le PEG en surface a également été évaluée. Les résultats ont montré une légère diminution d'hydrophobie en présence du copolymère amphiphile dans les systèmes à base de PHA. Ces mesures ayant été réalisées sans immersion, il serait intéressant de les réaliser en immersion de façon à se placer dans les mêmes conditions que les tests biologiques réalisés par la suite.

Plusieurs étapes sont nécessaires à l'établissement d'un biofilm, la première consiste en la formation d'interactions physico-chimiques entre le microorganisme et le substrat à coloniser, c'est ce que l'on appelle l'étape d'adhésion. La première partie des tests biologiques réalisés dans cette étude a consisté à évaluer la capacité antiadhésive des systèmes formulés. Pour cela, différents microorganismes ont été mis en contact avec les revêtements et les pourcentages de recouvrement de la surface ont été déterminés. Les microorganismes sélectionnés pour cette étude sont : une bactérie marine, *Bacillus* 4J6 ; deux diatomées, *Phaeodactylum tricornutum* et *Navicula perminuta* et deux bactéries pathogènes opportunistes : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Les résultats montrent une importante capacité antiadhésive des systèmes amphiphiles par rapport à leurs homologues dépourvus de copolymère amphiphile et ce pour tous les microorganismes étudiés. Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse de départ selon laquelle l'ajout d'un copolymère amphiphile perturbe l'adhésion des microorganismes à la surface des revêtements formulés. De légères différences d'efficacité ont été remarquées entre les systèmes amphiphiles à base de PHBHV et de PHA<sub>mcl</sub>. En effet, le système amphiphile à base de PHA<sub>mcl</sub> limite davantage l'adhésion par rapport au système amphiphile à base de PHBHV.

Afin d'approfondir ces résultats, des tests biologiques ont été réalisés sur l'étape suivant l'adhésion, à savoir la formation du biofilm. Pour cela, la bactérie pathogène *S. aureus* a été mise en contact avec les systèmes amphiphiles formulés et le biovolume bactérien formé à la surface a été évalué. Les résultats obtenus ont permis de montrer, l'efficacité anti-biofilm des systèmes amphiphiles formulés, avec, à nouveau, une meilleure capacité anti-biofilm des systèmes à base de PHA<sub>mcl</sub> par rapport aux systèmes amphiphiles à base de PHBHV.

Le système amphiphile à base de PDMS et de copolymère PDMS-PEG a montré d'impressionnantes capacités de libération de l'encrassement biologique (aussi appelé fouling-release). Des études ont montré que cette capacité était liée aux propriétés physico-chimiques et mécaniques du PDMS. En effet, ces dernières ne permettent pas l'établissement d'interactions fortes entre le microorganisme et la surface, de ce fait, l'application d'un simple flux permet son décrochage. Cette capacité est fortement recherchée notamment dans des applications pour l'industrie maritime ou encore dans le domaine biomédical. En effet, que cela soit pour l'un ou l'autre des secteurs mentionnés ci-dessus, tous les deux utilisent les revêtements en condition dynamique. Étant donné que les systèmes amphiphiles formulés dans cette étude ont montré de très bonnes capacités antiadhésives et anti-biofilm, la suite du projet a consisté à évaluer leur capacité fouling-release. Pour cela, la bactérie *S. aureus* a été incubée dans un système « Drip Flow Biofilm Reactor » de façon à générer un biofilm sur les systèmes formulés puis à appliquer un flux. Les résultats obtenus ont permis d'attribuer une capacité fouling-release aux revêtements amphiphiles à base de PHA. A nouveau, le système à base de PHA<sub>mcl</sub> est plus performant que celui à base de PHBHV.

L'intégralité des tests biologiques ont donc permis de montrer les capacités antiadhésives, anti-biofilm et fouling-release des revêtements amphiphiles formulés à base de PHA et de copolymère PHA-PEG. Le système est davantage efficace lorsqu'il est formulé avec le PHA<sub>mcl</sub> et se rapproche fortement des capacités du système amphiphile de référence formulé avec le PDMS. Les propriétés physico-chimiques et mécaniques semblent donc jouer un rôle important dans la capacité fouling-release d'un revêtement tel que décrit dans la littérature, toutefois, les résultats obtenus avec le système amphiphile à base de PHBHV montre que ce ne sont pas les seuls paramètres à prendre en considération. En effet, malgré des propriétés mécaniques très éloignées de celles du PDMS et du PHA<sub>mcl</sub>, le système amphiphile à base de PHBHV montre de bonnes capacités antiadhésives, anti-biofilm et fouling-release par rapport à son homologue dépourvu de copolymère amphiphile. L'ambiguïté de surface apportée par le copolymère amphiphile à base de PEG semble donc jouer un rôle primordial dans les résultats obtenus.

Enfin, dans l'idée de comprendre les différents mécanismes génétiques mis en jeu lors de l'adhésion de *S. aureus* sur les systèmes formulés dans cette étude, des analyses transcriptomiques ont été réalisées. Ces dernières ont permis de corréler les résultats observés en amont avec ceux obtenus après analyse transcriptomique puisque les résultats montrent

clairement une sous-expression des gènes impliqués dans la formation de biofilm lorsque la bactérie est au contact des systèmes amphiphiles.

Ces résultats viennent soutenir l'hypothèse selon laquelle l'ambiguïté apportée en surface par le copolymère amphiphile rend la surface inhospitalière à l'adhésion du micro-organisme. De plus, les résultats précédents montrent que les « quelques » micro-organismes parvenant malgré tout à adhérer à la surface sont éliminés facilement à l'aide d'un flux.

Les systèmes formulés dans cette étude permettent donc premièrement de limiter l'adhésion et la formation de biofilm et deuxièmement de libérer l'encrassement après l'application d'un flux.

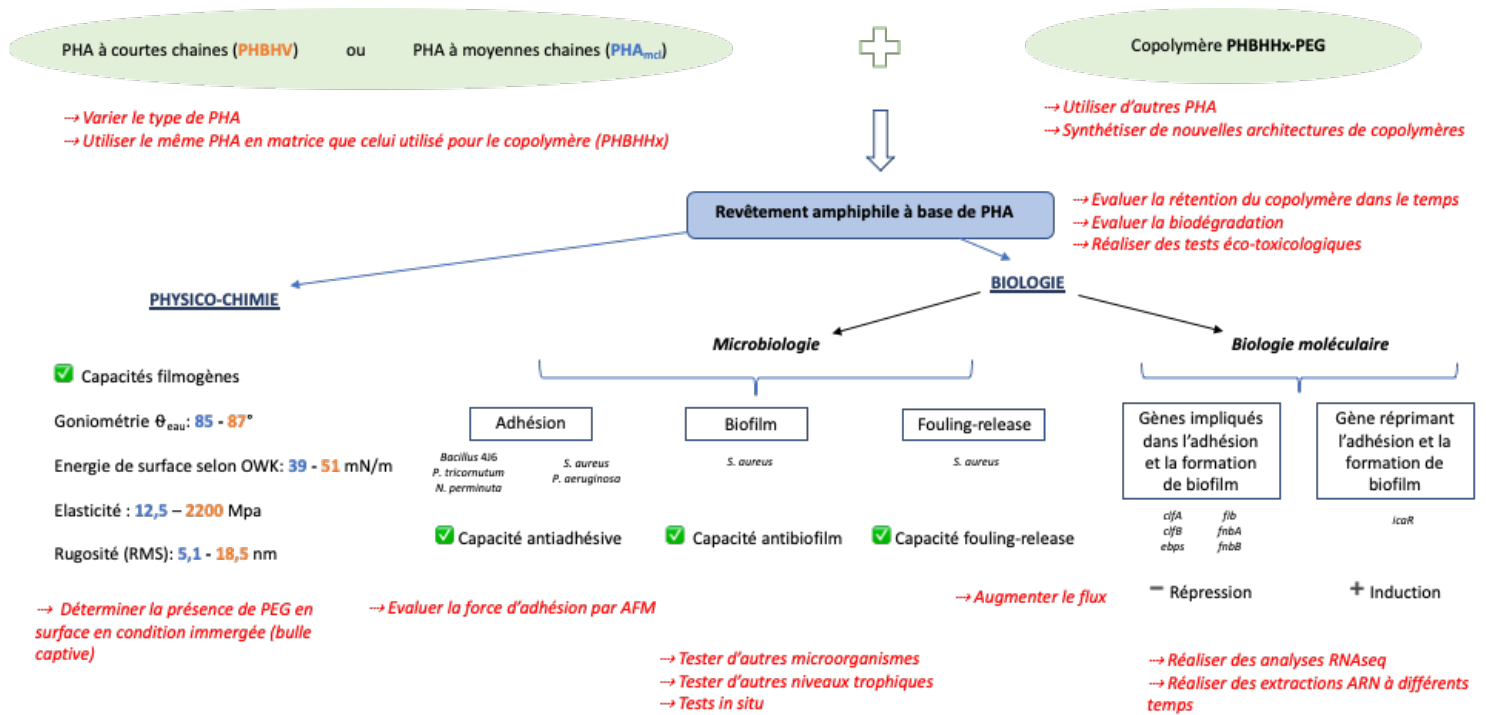


Figure 01. Bilan des résultats et perspectives (en rouge)



## ANNEXES

### Communication orale :

**Biopolymère amphiphile pour surface anti-biofilm** - 41<sup>èmes</sup> journées de la section GFP Grand Ouest – 1<sup>er</sup> prix de la meilleure conférence orale

**Amphiphilic biopolymers for antifouling surfaces** - 3<sup>rd</sup> Flower conference - Lorient

**Antifouling properties of amphiphilic poly(3-hydroxyalkanoate):an environmentally-friendly coating** - 48<sup>èmes</sup> journées d'études des polymères – Ile de Porquerolles

**Propriétés antiadhésives d'un revêtement amphiphile à base de poly(3-hydroxyalkanoate): vers des matériaux plus respectueux de l'environnement** - COPAMPHI 4<sup>ème</sup> colloque national sur les copolymères amphiphiles

**Antifouling properties of amphiphilic poly(3-hydroxyalkanoate): a need to go for environmentally friendly coatings** - 6<sup>th</sup> Workshop on Biofouling & Antifouling - Toulon

### Poster :

**Antifouling properties of amphiphilic poly(3-hydroxyalkanoate) :an environmentally-friendly coating** – Journées de l'École doctorale des sciences de la mer – Brest - 1<sup>er</sup> prix du meilleur poster

**Antibiofilm capacity of amphiphilic poly(3-hydroxyalkanoate)** – EUROBIOFILM 2022 - Mallorca

### Publications scientifiques:

**Antifouling properties of amphiphilic poly(3-hydroxyalkanoate): an environmentally-friendly coating** – Guennec *et al.*, 2021. Biofouling.

**Titre :** Biopolymère amphiphile pour surface anti-biofilm

**Mots clés :** Antifouling, diatomées, bactéries, PHA, copolymère amphiphile, analyse transcriptomique

**Résumé :** Le développement de biofilms pose de sérieux problèmes dans le domaine marin et médical. Leur grande tolérance vis-à-vis d'agents chimiques utilisés habituellement (désinfectants, antibiotiques, biocides) rend leur éradication difficile. De plus, l'utilisation de molécules biocides est largement controversée, considérant leur impact environnemental catastrophique. Les recherches se sont concentrées sur des systèmes qui, par leur composition, limitent la biocontamination. Parmi eux, on trouve des systèmes amphiphiles pouvant être composés d'une matrice hydrophobe de polydiméthylsiloxane (PDMS) et d'un copolymère amphiphile PDMS-PEG. Malgré leur efficacité, ces systèmes sont remis en cause du fait de l'origine pétrochimique du PDMS. L'objectif de ce projet de thèse est de substituer le PDMS par un biopolymère, le poly(hydroxyalcanoate) (PHA).

Un système a été formulé avec du PHA en tant que matrice hydrophobe et un copolymère PHA-PEG en tant qu'additif amphiphile. Deux types de PHA ont été utilisés dans cette étude, le PHBHV (PHA à courtes chaînes) et le PHA<sub>mcl</sub> (PHA à moyennes chaînes). Les revêtements formulés ont été caractérisés physiquement, chimiquement et mécaniquement. Puis leur capacité anti-adhésive, anti-biofilm et fouling-release ont été évaluées sur différents microorganismes. Deux bactéries pathogènes opportunistes, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie marine, *Bacillus* 4J6 et deux diatomées benthiques, *Phaeodactylum tricorutum* et *Navicula perminuta*. Enfin, afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire impliqué dans l'adhésion de *S. aureus*, des analyses transcriptomiques ont été réalisées.

**Title:** Amphiphilic biopolymer for antibiofilm surface

**Keywords:** Antifouling; diatoms; bacteria; PHA; amphiphilic copolymer; transcriptomic analysis

**Abstract:** The development of biofilms causes serious problems in the marine and medical fields. Their high tolerance to commonly used chemical agents (disinfectants, antibiotics, biocides) makes their eradication difficult. Moreover, the use of biocide molecules is widely controversial, considering their catastrophic environmental impact. Research has therefore focused on systems that, by their composition, limit biocontamination. Among them are amphiphilic systems that can be composed of a hydrophobic polydimethylsiloxane (PDMS) matrix and an amphiphilic PDMS-PEG copolymer. Despite their efficiency, these systems are questioned because of the petrochemical origin of PDMS. The objective of this thesis project is to substitute PDMS with a biopolymer, poly(hydroxyalkanoate) (PHA).

A system was formulated with PHA as a hydrophobic matrix and a PHA-PEG copolymer as an amphiphilic additive. Two types of PHA were used in this study, PHBHV (short chain length) and PHA<sub>mcl</sub> (medium chain length). The formulated coatings were characterized physically, chemically and mechanically. Then their anti-adhesive, anti-biofilm and fouling-release capacities were evaluated on different microorganisms. Two opportunistic pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, a marine bacterium, *Bacillus* 4J6 and two benthic diatoms, *Phaeodactylum tricorutum* and *Navicula perminuta*. Finally, in order to better understand the molecular mechanisms involved in the adhesion of *S. aureus*, transcriptomic analyses were performed.