



HAL
open science

Protections antimicrobiennes : combinaison de la fonctionnalisation et de la nano-structuration pour explorer les interactions cellule/surface

Marion Stalet

► To cite this version:

Marion Stalet. Protections antimicrobiennes : combinaison de la fonctionnalisation et de la nano-structuration pour explorer les interactions cellule/surface. Autre. Université Grenoble Alpes [2020-..]; Université de Sherbrooke. Département de biologie, 2024. Français. NNT : 2024GRALV006 . tel-04651199

HAL Id: tel-04651199

<https://theses.hal.science/tel-04651199v1>

Submitted on 17 Jul 2024

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES ET DE L'UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie Biologie

Unité de recherche : Systèmes Moléculaires et Nano Matériaux pour l'Énergie et la Santé
(UMR 5819) et Laboratoire Nanotechnologies et Nanosystèmes (IRL 3463)

Protections anti-microbiennes : combinaison de la fonctionnalisation et de la nano-structuration pour explorer les interactions cellule/surface

Antimicrobial protection: combining functionalization and
nano-structuring to explore cell-surface interactions

Présentée par :

Stalet, Marion

Direction de thèse :

Michael CANVA et Yoann ROUPIOZ Directeurs de Recherche, CNRS	Directeurs de thèse
Paul CHARETTE Professeur, Université de Sherbrooke	Co-Directeur de thèse
Loïc LEROY Maitre de conférences, UGA	Co-Encadrant
Laurence CONVERT Chargée de Recherche, Université de Sherbrooke	Co-Encadrante

Rapporteurs :

Lydie PLOUX Directrice de Recherche, CNRS	Nathalie FAUCHEUX Professeure, Université de Sherbrooke
Vincent HUMBLOT Directeur de Recherche, CNRS	

Thèse soutenue publiquement le **26/03/2024** devant le jury composé de :

Yoann ROUPIOZ Directeur de Recherche, CNRS	Directeur
Michael CANVA Directeur de Recherche, CNRS	Co-Directeur
Lydie PLOUX Directrice de Recherche, CNRS	Présidente
Vincent HUMBLOT Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
Nathalie FAUCHEUX Professeure, Université de Sherbrooke	Rapporteuse
Marianne WEIDENHAUPT Maitresse de conférences, UGA-INP	Examinatrice

Titre : Protections antimicrobiennes : combinaison de la fonctionnalisation et de la nano-structuration pour explorer les interactions cellule/surface

Mots clés : Fonctionnalisation chimique, Peptides Antimicrobiens, Nanostructuration, Protection bactéricide, Électrodépôt, Interactions cellules/surfaces

Résumé : Les micro-organismes, omniprésents et résilients, détiennent le titre incontestable d'organismes vivants les plus tenaces de notre planète. Présents sur Terre depuis environ 4 milliards d'années, leurs remarquables mécanismes d'adaptation leur ont permis de coloniser tous les environnements, même les plus extrêmes, et d'y jouer un rôle essentiel. Bien que leur prolifération rapide et leur capacité de résistance aux antibiotiques soient établies depuis au moins un siècle, la fin de l'ère dorée des antibiotiques dans les années 1960 a ravivé les préoccupations en matière de santé publique. Afin de faire face à la recrudescence de cette résistance, de nouvelles solutions technologiques ont été explorées pour limiter la contamination d'environnements et de surfaces sensibles, notamment dans le domaine médical. Parmi elles, la fabrication de surfaces activement antimicrobiennes est particulièrement pertinente. Les approches de fonctionnalisation chimique de surface et de relargage d'agents antimicrobiens ont été explorées intensivement ces dernières années mais souffrent encore de limites liées à la durabilité de leur activité. Des approches plus récentes dans le développement de matériaux dits « fonctionnels », comme la nano-fabrication de surfaces bio-inspirées, se révèlent également prometteuses et pourraient compléter les approches existantes. Cependant, les mécanismes d'interaction entre les micro-organismes et les surfaces sont complexes et, pour chaque approche, de nombreux paramètres comme les conditions d'étude ou les caractéristiques physico-chimiques des matériaux employés peuvent influencer l'efficacité des surfaces. En outre, le manque de protocoles standards pour caractériser l'ensemble des propriétés antimicrobiennes des surfaces fonctionnelles complique la mise en commun des connaissances et la compréhension des mécanismes. En utilisant la fonctionnalisation chimique avec des peptides antimicrobiens et la nano-structuration par électro-dépôt, cette thèse vise à mettre en évidence l'impact de certains paramètres de conception des surfaces et l'importance de les prendre en compte pour concevoir des solutions efficaces. En se basant sur l'étude d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis*, deux souches bactériennes pertinentes pour leur rôle sur la santé humaine et leurs différences morphologiques, un protocole exhaustif de caractérisation microbiologique des propriétés antimicrobiennes de matériaux fonctionnels, accompagné d'algorithmes semi-automatiques accélérant le traitement des données ainsi produites, a été développé. Ce protocole a été appliqué pour évaluer l'efficacité des approches, que ce soit individuellement ou en combinaison. Les résultats obtenus permettent de mieux comprendre l'impact des différents paramètres étudiés et mettent en avant les étapes clés dans la compréhension et l'évaluation des propriétés antimicrobiennes.

Title: Antimicrobial protection: combining functionalization and nano-structuring to explore cell-surface interactions

Keywords: Chemical functionalization, Antimicrobial peptides, Nanostructuring, Antibacterial protection, Electrodeposition, Cell/surface interactions

Abstract: Microorganisms, ubiquitous and resilient, hold the undisputed title of the most persistent inhabitants of our planet. Present on Earth for approximately 4 billion years, their remarkable adaptive mechanisms have enabled them to colonize all environments, even the most extreme, and to play an essential role in them. Although their virulent proliferation and antibiotic resistance capabilities have been established for at least a century, the end of the golden age of antibiotics in the 1960s has revived concerns. To address the resurgence of this resistance, new technological solutions have been explored to limit contamination in sensitive environments and surfaces, particularly in the medical field. Among these, the fabrication of actively antimicrobial surfaces is particularly relevant. Approaches involving chemical surface functionalization and the release of antimicrobial agents have been extensively explored in recent years but still suffer from disadvantages related to the sustainability of their activity. Newer approaches, such as the nanofabrication of bioinspired surfaces, also show promise and could complement existing methods. However, the interaction mechanisms between microorganisms and surfaces are complex, and for each approach, numerous parameters can influence surface effectiveness. Additionally, the lack of standardized protocols to characterize the full antimicrobial properties of surfaces complicates the sharing of knowledge and understanding of mechanisms. This thesis aims to highlight the impact of specific surface design parameters and the importance of taking them into account to design effective solutions, utilizing chemical functionalization with antimicrobial peptides and nanostructuring through electrodeposition. Drawing on the study of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*, two bacterial strains relevant for their impact on human health and their morphological differences, a comprehensive protocol for microbiological characterization of antimicrobial properties, accompanied by semi-automatic algorithms expediting data processing, has been developed. This protocol has been applied to assess the effectiveness of the approaches, whether individually or in combination. The obtained results contribute to a better understanding of the impact of the various studied parameters and emphasize key steps in comprehending and evaluating antimicrobial properties.

À mon grand-père.

Remerciements

Au terme de cette aventure scientifique et humaine, je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes exceptionnelles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse. Ce projet a été rendu possible grâce à une collaboration internationale entre le laboratoire SyMMES de Grenoble et l'IRL-LN2 de Sherbrooke, impliquant ainsi de nombreux acteurs, à qui je tiens à adresser mes sincères remerciements.

Tout d'abord, je souhaite remercier chaleureusement la présidente du jury, Dr. Lydie Ploux, ainsi que la Pr. Nathalie Faucheux et le Dr. Vincent Humblot, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Vos relectures ainsi que les échanges ayant eu lieu lors de la soutenance ont été des plus enrichissants. Mes remerciements s'étendent à Marianne Weidenhaupt en sa qualité d'examinatrice mais aussi de référente tout au long de ces années, depuis les bancs de Phelma jusqu'à aujourd'hui.

Je souhaite ensuite exprimer ma reconnaissance envers mes deux co-directeurs de thèse, Yoann Roupioz et Michael Canva, pour m'avoir permis de participer à ce projet fascinant et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche des deux côtés de l'Atlantique! Votre expertise et nos échanges ont été essentiels pour mener à bien mes recherches, et votre soutien constant a été une source de motivation face aux défis rencontrés.

Je tiens également à remercier sincèrement tous mes co-superviseurs pour leur aide précieuse pendant ces trois années. Je souhaite remercier chaleureusement Loïc Leroy pour ses conseils toujours avisés et constructifs, ainsi que pour avoir partagé son expertise sur tous les aspects physico-chimiques de ce projet. Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude envers Laurence Convert pour son soutien inestimable tout au long de ce projet. Sa contribution s'étend du soutien administratif à la rédaction, en passant par l'expérimentation, et ses paroles rassurantes ainsi que ses conseils ont toujours été d'une grande aide.

Un grand merci également aux autres membres du CREAB et du groupe Biophotonique qui m'ont accompagné durant ce projet. En particulier, j'aimerais remercier Paul Charette pour son accueil chaleureux à Sherbrooke et ses sujets de discussion toujours passionnants, qu'ils soient scientifiques ou non; Rémi Dreyfus, pour sa curiosité et ses questions perspicaces qui m'ont souvent permis de prendre du recul sur mes recherches; Jean-François Bryche pour ses encouragements et son expertise dans les processus de fabrication, l'électrochimie et l'imagerie électronique; Guillaume Beaudin pour sa grande pédagogie et son aide à mieux comprendre le monde fabuleux de la programmation orientée objet; et Michel Grandbois et Raphaël Mathey pour m'avoir gentiment aidé à étendre ma compréhension et mes connaissances en microbiologie.

Mes remerciements s'étendent également aux personnels des laboratoires pour leur assistance technique et logistique, ainsi qu'à tous les collaborateurs du CEA et de l'Université de Sherbrooke.

La cotutelle m'a offert la chance de partager cette aventure avec une multitude de camarades, rendant difficile la tâche de les nommer tous. Je me permets donc d'allonger encore un peu ces remerciements pour mettre en lumière les membres des incroyables équipes que j'ai eu le privilège de côtoyer quotidiennement : merci aux CREABien.ne.s et aux Sherbrookoise.s, qu'ils soient permanents, non-permanents, co-bureaux, stagiaires, anciens, nouveaux, de passage... Je vous suis reconnaissante pour votre gentillesse, votre sensibilité, votre humour, et pour les discussions passionnantes, les fous rires et les pauses café toujours gourmandes! Merci à mes collègues devenus amis avec qui j'ai pu partager les voyages, le roller, le squash, les parties de spike-ball, les karaokés, le hockey, les randonnées, le padel, les bars, les barbecues et bien plus encore! Vous avez grandement contribué à faire de ces années de doctorats une expérience extraordinaire et riche en beaux souvenirs.

Enfin, je suis infiniment reconnaissante envers ma famille, mes amis et mon chéri pour leur amour et leur soutien durant ces années pour le moins mouvementées, et pour avoir été une source constante d'inspiration et de motivation. Quelques mots ne suffiraient pas à exprimer la gratitude que je ressens, vous êtes mon monde, merci.

Table des abréviations

- AA** : acides aminés
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AFM** : Microscopie à Force Atomique
- AMP** : peptide anti-microbien ou *AntiMicrobial Peptide* en anglais
- APD3** : *Antimicrobial Peptide Database* en anglais
- APTES** : (3-Aminopropyl)triéthoxysilane
- ATRP** : polymérisation radicalaire par transfert d'atome ou *Atom Transfer Radical Polymerization* en anglais
- CE** : contre-électrode ou *Counter-Electrode* en anglais
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- DBAASP** : *Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides* en anglais
- DMF** : N-diméthylformamide
- DMSO** : diméthylsulfoxyde
- EDX** : spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie ou *Energy-Dispersive X-ray spectroscopy* en anglais
- EPS** : substance polymérique extracellulaire ou *Extracellular Polymeric Substance* en anglais
- HDP** : peptide de défense de l'hôte ou *Host-Defense Peptide* en anglais
- IPA** : Alcool isopropylique ou 2-propanol
- ISO** : Organisation internationale de normalisation ou *International Organization for Standardization* en anglais
- LPS** : Lipopolysaccharides
- MATISS** : *Microbial Aerosol Tethering on innovative surfaces in the International Space Station*
- McF** : McFarland
- MEB** : Microscopie Électronique à Balayage
- MET** : Microscopie Électronique en Transmission
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- PBS** : tampon phosphate salin ou *Phosphate-Buffered Saline* en anglais
- PEG** : Polyéthylène glycol
- PI** : iodure de propidium ou *Propidium Iodide* en anglais
- PMMA** : polyméthacrylate de méthyle
- QCM** : micro-balances à quartz ou *Quartz Crystal Microbalance* en anglais
- RAFT** : Transfert de chaîne avec fragmentation par addition réversible ou *Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer* en anglais
- RE** : électrode de référence ou *Reference Electrode* en anglais
- RIE** : Gravure ionique réactive ou *Reactive Ion Etching* en anglais

Table des abréviations •

ROS : espèces oxygénées réactives ou *Reactive Oxygen Species* en anglais

rpm : rotations par minute

SAM : monocouche auto-assemblée ou *Self-Assembled Monolayer* en anglais

SMP : N-succinimidyl-3-maléimidopropionate

SPA : dénombrement par goutte ou *Spot Plating Assay* en anglais

SPC : dénombrement sur gélose ou *Standard Plate Count method* en anglais

SPPS : Synthèse Peptidique en Phase Solide

SPRi : imagerie par résonance des plasmons de surface ou *Surface Plasmon Resonance imaging* en anglais

TS : bouillon de sel de tryptone ou *Tryptone Salt broth* en anglais

TSB : bouillon tryptique de soja ou *Tryptic Soy Broth* en anglais

WE : électrode de travail ou *Working Electrode* en anglais

XPS : spectrométrie photo-électronique X ou *X-ray Photoelectron Spectroscopy* en anglais

Table des matières

INTRODUCTION ET ÉTAT DE L'ART

1.1.	Les micro-organismes : contexte général	17
1.2.	Les mécanismes de la prolifération microbienne sur les surfaces	19
1.2.1.	Variabilité génétique et morphologique	19
1.2.2.	Le biofilm : prolifération et protection	22
1.3.	Les surfaces anti-bactériennes bio-inspirées et synthétiques	24
1.3.1.	Définition et propriétés d'une surface anti-microbienne	25
1.3.2.	Applications et défis	26
1.3.3.	Approches existantes conférant des propriétés anti-microbiennes aux surfaces	27
1.4.	Difficulté de la caractérisation des propriétés anti-microbiennes	34
1.5.	Objectifs du projet de thèse	35

FONCTIONNALISATION AVEC DES PEPTIDES ANTI-MICROBIENS

2.1.	Les AMPs : de leur découverte aux applications actuelles	41
2.1.1.	Origines et caractéristiques des AMP	41
2.1.2.	Mécanismes d'interaction des AMPs avec les micro-organismes	44
2.1.3.	Synthèse des AMPs	50
2.1.4.	Applications des AMPs	51
2.1.5.	Avantages et défis de l'utilisation des AMPs comme revêtement	52
2.2.	Sélection des AMPs étudiés	54
2.2.1.	Critères de sélection des peptides d'intérêt	54
2.2.2.	Cathélicidine humaine ou LL-37	55
2.2.3.	Magainine I	56
2.3.	Fonctionnalisation de la surface par des AMPs	58
2.3.1.	Choix du substrat et de la méthode d'immobilisation	58
2.3.2.	Synthèse des peptides	60
2.3.3.	Sélection des séquences contrôles	60

Table des matières •

2.3.4.	Paramètres d'immobilisation	62
2.4.	Caractérisation des propriétés physico-chimiques des surfaces fonctionnalisées avec des AMPs	69
2.4.1.	Difficultés d'obtenir des données quantitatives et qualitatives	69
2.4.2.	Mesure de l'énergie de surface	70
2.5.	Conclusion du chapitre	72
LES SURFACES NANO-STRUCTURÉES BIO-INSPIRÉES		
3.1.	Surfaces nano-structurées : morphologies, propriétés, fabrication et enjeux	75
3.1.1.	Surfaces naturelles	75
3.1.2.	Surfaces synthétiques et méthode de fabrication	76
3.1.3.	Propriétés et mécanismes des surfaces nano-structurées anti-microbiennes	79
3.1.4.	Défis et perspectives des mécanismes d'actions de la nano-structuration	86
3.2.	Sélection de la méthode de fabrication des échantillons nano-structurés	86
3.2.1.	Contraintes imposées par le substrat	86
3.2.2.	Procédés de fabrication des nano-structures d'or dans la littérature	87
3.2.3.	Fabrication des surfaces par électrodépôt	88
3.3.	Résultats de l'évaluation de l'influence des paramètres de dépôt	94
3.3.1.	Paramètres expérimentaux testés	94
3.3.2.	Effet de l'agitation	95
3.3.3.	Effet de la concentration en HAuCl_4	97
3.3.4.	Impact de la durée de dépôt	104
3.3.5.	Impact de la concentration en $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	104
3.3.6.	Synthèse des conditions expérimentales optimales	105
3.4.	Échantillons sélectionnés pour la caractérisation de l'activité anti-bactérienne	105
3.5.	Conclusion du chapitre	107
PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES		
4.1.	Introduction aux méthodes de caractérisations des surfaces anti-microbiennes	111
4.1.1.	Approches quantitatives	111
4.1.2.	Approches d'imagerie non quantitatives	118

Table des matières •

4.1.3. Enjeux du développement d'un protocole complet par caractériser les matériaux anti-microbiens	118
4.2. Influences des paramètres environnementaux et cellulaires sur la caractérisation des matériaux	120
4.2.1. Impact des paramètres bactériens	120
4.2.2. Impact des paramètres environnementaux	126
4.3. Optimisation des étapes du protocole	132
4.3.1. Énumération sur gélose	132
4.3.2. Microscopie de fluorescence et marqueurs de viabilité	134
4.3.3. Récupération des bactéries adhérees aux surfaces	135
4.4. Traitement des données de microscopie de fluorescence	141
4.4.1. Principe de fonctionnement du programme d'analyse des images avec Python	142
4.4.2. Étapes clefs du programme Python	144
4.4.3. Représentation des données	148
4.5. Résultats de la caractérisation micro-biologique des échantillons	149
4.5.1. Étude des surfaces nano-structurées	149
4.5.2. Propriétés anti-microbiennes des surfaces planes fonctionnalisées avec des AMPs	161
4.5.3. Combinaison de la fonctionnalition peptidique avec les nano-structures	163
4.6. Conclusion du chapitre	164
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	
5.1. Caractérisation complémentaire des SAMs et élargissement de la fonctionnalisation à d'autres AMPs	171
5.2. Exploration d'autres micro- et nano-structures dorées	171
5.3. Optimisation de la caractérisation microbiologique	173
5.4. Autres améliorations ou pistes à explorer	174
5.5. Conclusion générale et perspectives long-terme	175

CHAPITRE 1

INTRODUCTION ET ÉTAT DE L'ART

1.1.	Les micro-organismes : contexte général	17
1.2.	Les mécanismes de la prolifération microbienne sur les surfaces	19
1.3.	Les surfaces anti-bactériennes bio-inspirées et synthétiques	24
1.4.	Difficulté de la caractérisation des propriétés anti-microbiennes	34
1.5.	Objectifs du projet de thèse	35

CHAPITRE 1

INTRODUCTION ET ÉTAT DE L'ART

1.1. Les micro-organismes : contexte général

Les micro-organismes sont considérés comme les premières formes de vie apparues sur Terre, il y a entre 3,8 et 4,4 milliards d'années.^{1,2} Ce terme englobe une grande diversité d'êtres vivants, et bien que la classification des micro-organismes soit sujette à évolution, sont généralement regroupés sous cette dénomination des organismes unicellulaires, notamment les procaryotes tels que les bactéries et les archées, ainsi que les eucaryotes comme les levures, les algues et les protozoaires.³ Les virus, bien qu'ils ne soient pas considérés comme des êtres vivants et ne forment pas un règne distinct, sont également souvent inclus dans cette catégorie. Au sein de cette diversité microbienne, les bactéries se distinguent par leur omniprésence dans l'environnement et leur impact significatif sur la santé humaine et animale, l'agriculture et l'environnement. Elles sont donc au cœur des discussions de santé publique et à l'origine d'une grande partie des défis liés à la prolifération microbienne.

Les micro-organismes, en particulier les bactéries, jouent un rôle à travers différentes relations de mutualisme (bénéfices réciproques), commensalisme (bénéfices sans perturbation de l'hôte) ou parasitisme (bénéfices pathogènes pour l'hôte). Certaines bactéries, lorsqu'elles pénètrent dans des environnements critiques pour les humains, évoluent rapidement de simples résidents à menaces concrètes, posant ainsi un risque significatif sur la santé. C'est le cas de *Staphylococcus aureus*, impliqué dans diverses infections cutanées et respiratoires et de *Staphylococcus epidermidis*, connu pour sa formation de biofilms sur les dispositifs médicaux.⁴ Dans l'industrie agro-alimentaire, *Escherichia coli*, *Salmonella Campylobacter* et *Listeria monocytogenes* sont des causes fréquentes parmi d'autres d'intoxications alimentaires. Dans l'agriculture, les *Xanthomonas* sont un groupe de bactéries responsables de maladies chez les plantes, entraînant des pertes de récoltes. Dans les secteurs de l'acheminement et du traitement de l'eau, *Pseudomonas aeruginosa* peut contaminer les milieux aquatiques et causer des infections chez certains individus.^{4,5}

Outre les implications économiques majeures résultant de la prolifération des micro-organismes, avec un impact économique estimé à près de 4 000 milliards de dollars en 2019 juste pour les biofilms, les conséquences sur la santé humaine associées aux infections suscitent une inquiétude particulière.⁶ Bien que la découverte et l'utilisation des antibiotiques depuis 1929 aient considérablement atténué les conséquences dévastatrices des infections bactériennes, l'usage excessif et systématique de ces médicaments a conduit à une résistance bactérienne croissante. Alors que des infections

autrefois mortelles sont aujourd'hui considérées comme moins menaçantes, des rapports récents signalent l'émergence de nouvelles infections dangereuses, largement en raison de leur résistance accrue aux antibiotiques.⁷ Selon les données recensées par de nombreux organismes, la prévalence des infections résistantes aux antibiotiques est en constante augmentation dans le monde entier. Selon le Ministère de la Santé et de la Prévention, en France chaque année, plus de 150 000 patients développent une infection liée à une bactérie multirésistante.^{8,9} En 2018 au Canada, il a été établi que près de 26% des infections sont résistantes et que d'ici 2050, cette proportion pourrait être susceptible de passer à 40%.¹⁰ Si ce cas se présentait, le cumul des décès dans le pays pourrait atteindre 396 000 et entraîner une baisse du PIB de l'ordre de 21 milliards de dollars.¹⁰ En février 2017, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) sonne l'alarme concernant les micro-organismes résistants aux antibiotiques et a publié une liste de 12 bactéries pathogènes nécessitant un traitement urgent.^{11,12} Parmi ces pathogènes figurent les agents ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et les espèces *Enterobacter*), caractérisés par une résistance accrue aux médicaments et une virulence élevée.^{13,14} L'augmentation et le vieillissement de la population humaine, accompagnées de la destruction des habitats naturels sont aussi des facteurs aggravants en ce qui concerne la prévalence de la prolifération des micro-organismes.¹⁵

Les voies de contamination par des bactéries, comme celles des champignons et des virus, dépendent de l'espèce étudiée, illustrant la complexité du problème. La transmission des pathogènes est souvent définie comme le passage de bactéries d'un réservoir vers un hôte. Les réservoirs, qui peuvent être vivants (humains, animaux) ou environnementaux (nourriture, sol, eau, air), servent de milieu de survie et de développement pour les bactéries jusqu'à ce qu'elles contaminent un hôte. Les voies de transmission courantes comprennent la contamination par contact, les gouttelettes, la voie aéroportée et l'ingestion.¹⁶ Parmi ces modes de transmission, la contamination par contact, englobant le contact direct de peau à peau ou de muqueuse à muqueuse, la transmission fécale-orale des bactéries intestinales et la transfusion de produits sanguins contaminés, présente des défis significatifs. Des études approfondies ont démontré que les bactéries déposées sur une surface peuvent survivre plusieurs heures à plusieurs mois, favorisant ainsi leur multiplication et le risque de contamination d'autres êtres vivants pouvant être en contact avec la surface.¹⁷ Dans les établissements de soins, où les surfaces sont à proximité des patients et peuvent être fréquemment touchées, le risque de contamination est considérablement accru. Ces infections peuvent se propager non seulement aux patients, mais également au personnel médical et aux instruments, contribuant ainsi à la propagation continue des agents pathogènes. De surcroît, la généralisation de l'utilisation d'implants orthopédiques, dentaires, respirateurs, lentilles et cathéters intensifie la susceptibilité d'infection et l'importance des conséquences liées à la contamination par contact.⁴ Ces dispositifs sont partiellement ou entièrement intégrés dans l'organisme,

amplifiant ainsi les risques associés à toute présence de micro-organismes.¹⁸ Les infections associées aux implants représentent approximativement 50% de toutes les infections nosocomiales. Celles-ci sont particulièrement difficiles à traiter, la pose d'implants augmentant la probabilité d'infections persistantes et résistantes aux traitements à cause des bactéries pouvant y adhérer.¹⁹

Malgré les recommandations de l'OMS, comme la désinfection régulière des surfaces et des mains, le port des masques et la vaccination, la prévalence des infections contractées dans l'environnement hospitalier ne semble pas diminuer, avec plusieurs centaines de millions de personnes affectées chaque année.^{20,21} Cette prévalence, combinée aux limitations des méthodes de traitement des infections selon les régions du monde, illustre bien que la lutte contre la contamination microbienne reste un défi contemporain majeur, avec le potentiel de devenir encore plus préoccupant dans les années à venir en raison de l'antibio-résistance. Il est donc impératif de mettre au point de nouvelles stratégies pour contrer leur prolifération. En ce sens, la création ou la modification de surfaces permettant de limiter leur contamination et la prolifération des micro-organismes à leur contact est une solution prometteuse. Cependant, la diversité morphologique et métabolique des pathogènes complexifie le développement de solutions efficaces, durables et large spectre.

1.2. Les mécanismes de la prolifération microbienne sur les surfaces

1.2.1. Variabilité génétique et morphologique

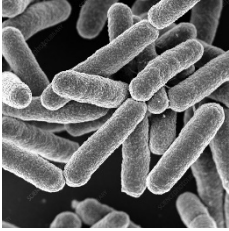
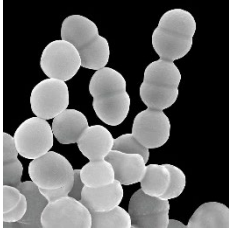
En phylogénétique, les bactéries sont classées parmi un même règne, au même rang que le règne des animaux. Deux espèces telles qu'*Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis* sont donc aussi éloignées au niveau degré de parenté que l'*Homo Sapiens* et la coccinelle à sept points (*Coccinella septempunctata*). Ces différences s'expriment au travers de formes, tailles, membrane, métabolismes, organes extérieurs et organisations variés. Le Tableau 1 illustre les principales différences de caractéristiques entre les deux espèces bactériennes citées plus tôt.

Les bactéries sont généralement classifiées en fonction de leur morphologie. En ce qui concerne la taille, elles peuvent mesurer entre 0,3 et 5 μm . Les bactéries individuelles adoptent principalement des formes sphériques (coccus), en bâtonnet (bacille) ou incurvées (vibrio, spirillum ou spirochète).²² Bien que certaines bactéries préfèrent évoluer individuellement, d'autres peuvent former des duos, des chaînettes ou des grappes. Une manière plus spécifique pour classer les bactéries est basée sur la coloration de Gram, qui permet d'identifier le type de membrane de la bactérie. Les bactéries à Gram positif possèdent une membrane relativement épaisse comparée à celle des bactéries à Gram négatif. Les éléments structurels de chaque type sont illustrés en Figure 1. Une membrane cytoplasmique interne est commune aux deux types de bactéries, mais les Gram positifs sont composés en plus d'une épaisse paroi de

CHAPITRE 1 • INTRODUCTION ET ÉTAT DE L'ART

peptidoglycanes, tandis que les Gram négatifs eux possèdent une paroi de peptidoglycanes beaucoup plus fine et une membrane externe.

Tableau 1 – Propriétés morphologiques et physiologiques des deux espèces bactériennes. Micrographies MEB tirés de Science Photo Library.

Propriétés	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Morphologie		
Taille moyenne	2 x 0,8 µm	1 µm
Forme	Bâtonnet	Sphérique
Membrane	Gram négatif	Gram positif
Motilité	Active (flagelles) ²³	Passive (éjection) ²⁴
Temps de génération à 37°C en milieu riche	20 minutes ²⁵	17 - 38 minutes ²⁶
Respiration aérobie et anaérobie	Anaérobie facultative	Anaérobie facultative

Généralement, les bactéries possèdent une charge nette négative à la surface de leur paroi cellulaire en raison de la présence d'acides téichoïques, lipotéichoïques et de phospholipides. D'autres éléments sont présents ou absents en fonction du type de membrane, tels que les lipopolysaccharides, les porines et certaines protéines. Les enveloppes bactériennes sont donc des structures complexes qui jouent un rôle majeur dans leur protection et leur adaptabilité.

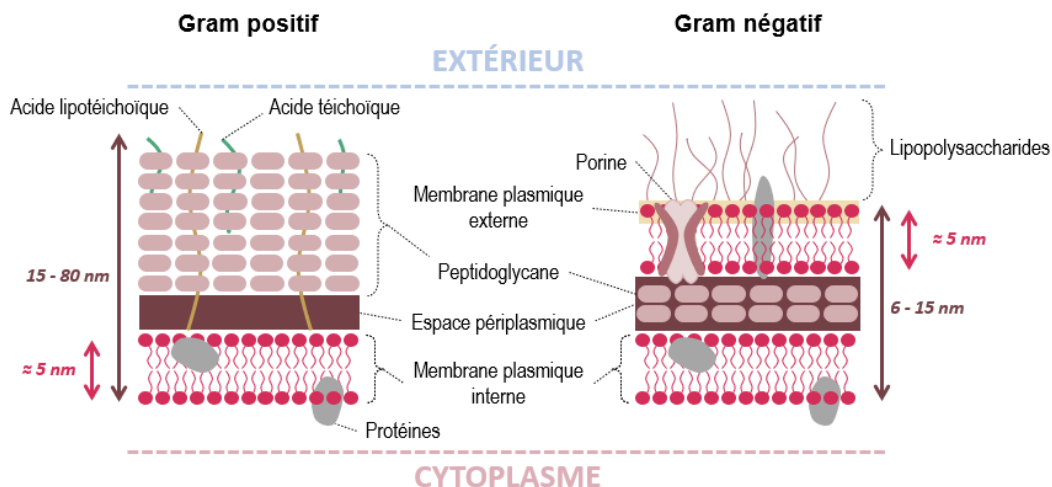


Figure 1 – Différences et éléments communs entre les parois externes des bactéries Gram positives et négatives. Inspiré de Technology Networks.²⁷

Malgré la diversité morphologique des bactéries, il est tout de même possible de trouver des éléments communs à la majorité des espèces. Ces éléments structurels communs, ainsi que certains facultatifs, sont illustrés dans la Figure 2. Les bactéries sont généralement composées d'un cytoplasme, d'une paroi et d'une membrane cellulaire et leur information génétique est majoritairement contenue dans une unique molécule circulaire d'acide désoxyribonucléique (ADN) nommé nucléoïde.¹⁶

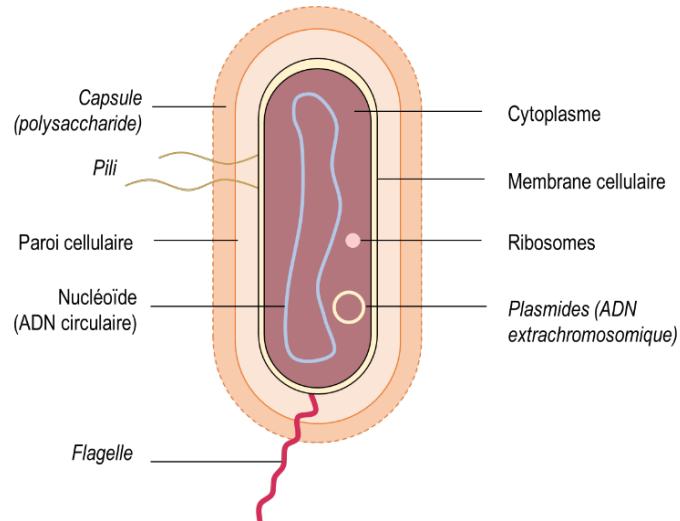


Figure 2 – Structure d'une cellule bactérienne. Les éléments en italiques sont facultatifs et ne sont pas présents chez toutes les bactéries. Inspiré de Doron et al.¹⁶

Cependant, une partie de l'ADN peut être retrouvée dans les plasmides, des ADN extrachromosomiques circulaires capables de se répliquer indépendamment et étant responsables de certaines fonctions de la bactérie, en particulier la production de toxines et la résistance aux antibiotiques. Les plasmides sont des vecteurs de transfert horizontal des gènes, ils peuvent se transmettre d'une bactérie à l'autre par différents moyens comme la conjugaison cellule-cellule à l'aide de pili, la transduction par des phages, la transmission à l'aide de vésicules ou par mobilisation conjugative.²⁸ Cette particularité, qui contribue à l'adaptabilité des bactéries, joue un rôle majeur dans la propagation rapide de gènes responsables de la résistance aux antibiotiques.

Les pili et le flagelle sont également des éléments essentiels, permettant respectivement aux bactéries d'adhérer aux surfaces et d'être motiles. La motilité, décrivant la capacité d'une bactérie à se déplacer, peut être active quand le mouvement est dirigé et nécessite une dépense énergétique, ou passive quand elle dépend plutôt d'une action environnementale. Six types de motilité ont été identifiés, quatre actives comme la nage (*swimming*), l'essaimage (*swarming*), le planement (*gliding*) et la contraction (*twitching*) et deux passives comme le glissement (*sliding*) et l'éjection (*darting*).²⁴ Certains de ces modes de déplacements, illustrés en Figure 3, ne sont que partiellement élucidés et peuvent varier entre les espèces bactériennes.

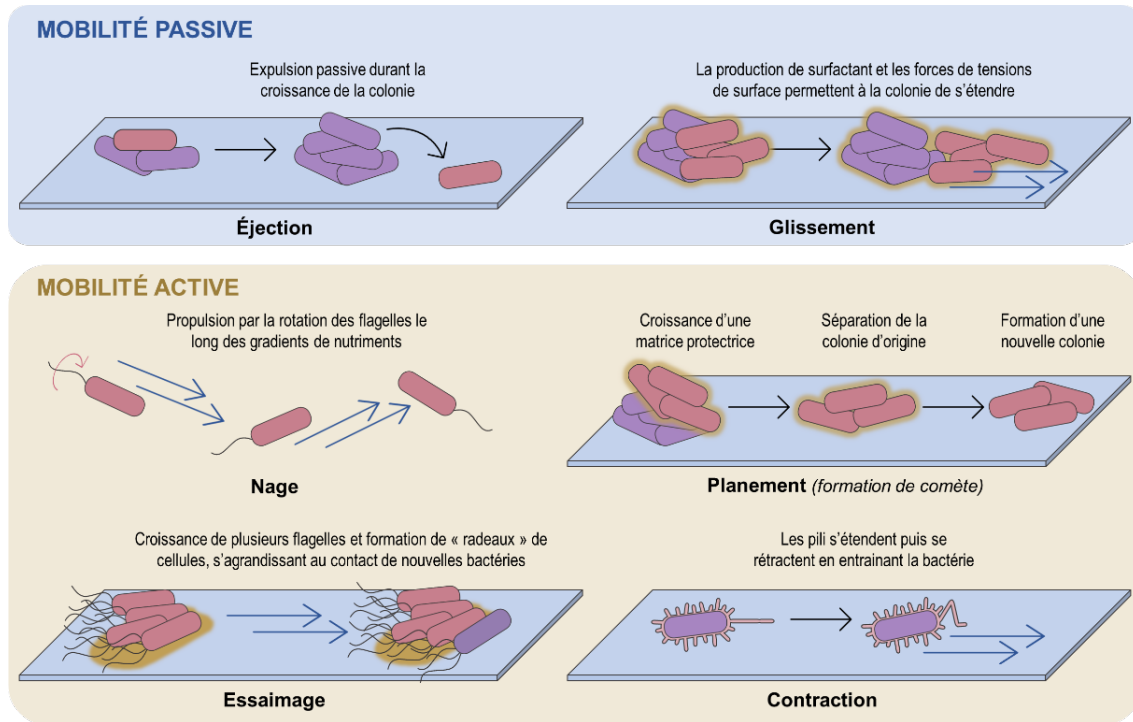


Figure 3 – Modes de mobilité actif et passif des bactéries.

Les structures bactériennes sont dynamiques et évoluent entre les espèces, mais aussi entre les générations d'une même espèce pour s'adapter à leur environnement. Les variations de taille, forme, composition de la membrane et motilité vont grandement influencer l'adhésion des bactéries sur les surfaces et une bonne compréhension de ces caractéristiques constitue un fondement essentiel pour la conception de surfaces antimicrobiennes.

1.2.2. Le biofilm : prolifération et protection

L'interaction des micro-organismes avec les surfaces est gouvernée par divers paramètres, qu'ils soient environnementaux ou intrinsèques aux bactéries étudiées et aux matériaux constituant la surface. L'adhésion aux surfaces peut même participer au développement des colonies microbiennes. Chez certaines bactéries, un mécanisme supplémentaire aggrave et complique la lutte contre leur prolifération, le biofilm. Malgré le manque de consensus sur la définition, un biofilm est généralement décrit comme une communauté microbienne attachée à un substrat et entourée d'une matrice de substance polymérique extracellulaire (EPS). Cette matrice est majoritairement composée d'eau (95%), mais contient aussi des polysaccharides, des protéines, de l'ADN extracellulaire, des glycoprotéines et d'autres polymères naturels.²⁹ La structure du biofilm offre de nombreux avantages, comme une protection efficace contre les agressions extérieures. Elle permet de limiter l'impact d'anti-bactériens comme les anti-septiques et les antibiotiques en limitant la quantité pouvant pénétrer dans le biofilm et atteindre les bactéries. Cette chute de concentration de molécules biocides est problématique, car

l'exposition répétée des bactéries à des quantités d'anti-bactériens en dessous de leur concentration minimale inhibitrice (CMI) favorise le développement de résistances.³⁰ Outre la protection des bactéries, le biofilm favorise la mise en place d'une communication interne entre les bactéries, nommé *quorum sensing*. Celui-ci permet aux bactéries de réguler l'expression génique et de s'organiser de manière optimale. Le processus de formation d'un biofilm se divise généralement en trois étapes principales : l'adhésion initiale des bactéries, la maturation du biofilm, et enfin, sa dispersion, comme illustrées dans la Figure 4.

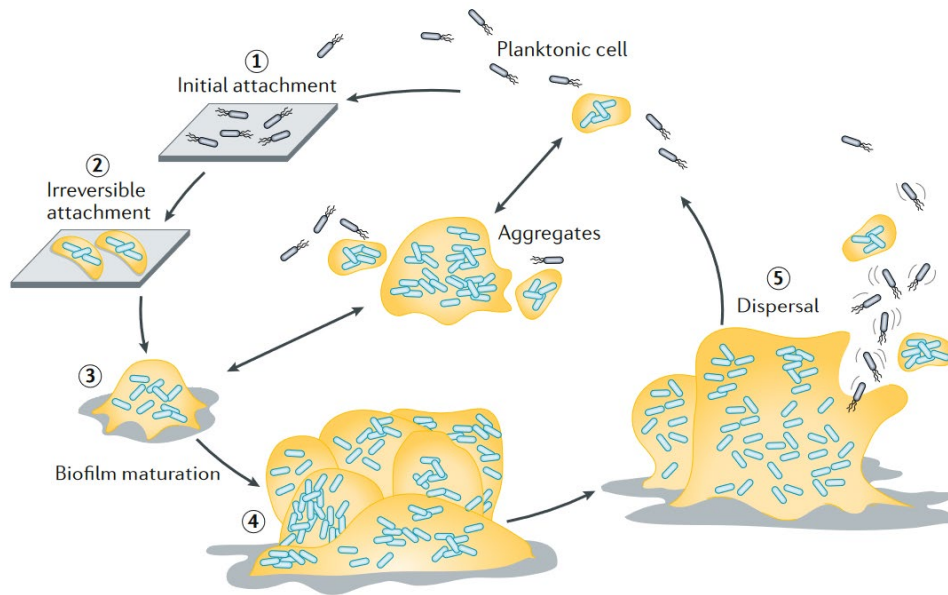


Figure 4 - Formation et dispersion des biofilms. Traduit depuis Rumbaugh et al.³¹

L'adhésion et la prolifération bactériennes sont largement régies par les propriétés physico-chimiques de la surface. Initialement, le rapprochement et l'attachement des bactéries sur un substrat sont facilités par l'adsorption de molécules présentes dans le fluide en contact sur la surface et la formation d'une couche de conditionnement. Leur adhésion provoque une altération légère des propriétés physiques de la surface, facilitant l'accès des bactéries à celle-ci.³² Dans les environnements peu riches, les nutriments s'accumulent aussi majoritairement sur les surfaces grâce à la sédimentation, ce qui en fait des zones propices à la croissance bactérienne.³³ L'adhésion est dans un premier temps orchestrée par des interactions électrostatiques et hydrodynamique, une étape généralement réversible qui dure moins d'une minute à 37°C pour *Staphylococcus epidermidis*.³⁴ Par la suite, les forces de Van der Waals entre la membrane externe de la bactérie et la surface, combinées à l'action des appendices externes comme les pili et les flagelles, ainsi qu'à la production d'une matrice EPS protectrice, stabilisent la bactérie sur la surface. Cette étape, qui peut s'étendre sur plusieurs heures, est irréversible. La charge de la surface, son hydrophobicité et la topographie du matériau jouent des rôles cruciaux dans ce processus d'adhésion des micro-organismes.³⁵

Lors de la formation d'un biofilm, un changement phénotypique de la population bactérienne est observable durant l'étape d'adhésion: les bactéries présentes en suspension dans le liquide (forme planctonique) font place à des micro-colonies en surface (forme sessile).³⁶ L'expression de nouveaux gènes chez les bactéries sessiles entraîne le début de la sécrétion de la matrice EPS et la fixation irréversible de la colonie sur un matériau. À la suite de cette étape, les cellules se multiplient et colonisent la surface, s'organisant en colonnes séparées par des interstices ou sous la forme d'autres structures (voir Figure 4). Ces structures permettent de créer des canaux afin d'approvisionner les bactéries en nutriments et en oxygène. Après cette phase de croissance et de stabilisation, le biofilm atteint une phase stationnaire, où la multiplication des cellules et leur mort se compensent. Durant cette phase de maturité, le *quorum sensing* se met en place. Cela repose sur l'expression de gènes codant pour la sécrétion de protéines de la matrice EPS pour stabiliser la structure, entraînant une croissance en épaisseur (jusqu'à atteindre environ 100 micromètres), le biofilm devenant alors multi-couche.³⁷ Après la maturation, la dernière étape du cycle est celle du détachement et de la dissolution, souvent partielle, du biofilm. Par la sécrétion d'enzymes, les polysaccharides responsables de l'intégrité du biofilm se décomposent et libèrent des bactéries qui pourront coloniser de nouvelles surfaces.³²

En résumé, la prolifération des bactéries repose sur leur adaptabilité et leur résistance aux agressions externes comme les antibiotiques ou les autres organismes, attribuées à des caractéristiques morphologiques distinctes. Les membranes complexes et la formation de biofilms offrent une protection robuste contre les agressions extérieures, tandis que les pili et les flagelles facilitent la colonisation des surfaces. Les plasmides permettent une rapide acquisition de gènes, et le transfert génétique de génération en génération favorise la dissémination rapide des résistances acquises. L'ensemble de ces caractéristiques rend donc la lutte contre la prolifération des bactéries pathogènes particulièrement complexe et de nombreux défis ont émergé récemment, exigeant de nouvelles solutions technologiques. La plupart des stratégies actuelles contre les micro-organismes se concentrent sur le traitement et la prévention des infections, mais la formation de biofilm et l'apparition de résistances démontre les limites actuelles de ces approches. Il est donc impératif de trouver des alternatives et notamment de se concentrer sur des moyens de prévention de l'adhésion et de la prolifération des bactéries. De nombreux défis subsistent pour concevoir des systèmes anti-bactériens efficaces, impliquant une approche préventive, spécifique aux micro-organismes, large spectre et donc actif contre des espèces aux caractéristiques diverses, tout en minimisant le risque de résistance.

1.3. Les surfaces anti-bactériennes bio-inspirées et synthétiques

Une alternative prometteuse pour contrer la prolifération bactérienne consiste à recourir à des surfaces anti-bactériennes. Cette approche cible les étapes initiales

d'adhésion et la réduction de la multiplication des micro-organismes dans divers environnements critiques.

1.3.1. Définition et propriétés d'une surface anti-microbienne

Par définition, une surface anti-microbienne est une surface permettant de réduire la prolifération et la survie de micro-organismes, mais ce terme regroupe différentes propriétés, illustrées sur la Figure 5 pour le cas des bactéries. Dans la littérature, les surfaces anti-microbiennes sont souvent séparées en deux ou trois catégories en fonction de leurs effets.

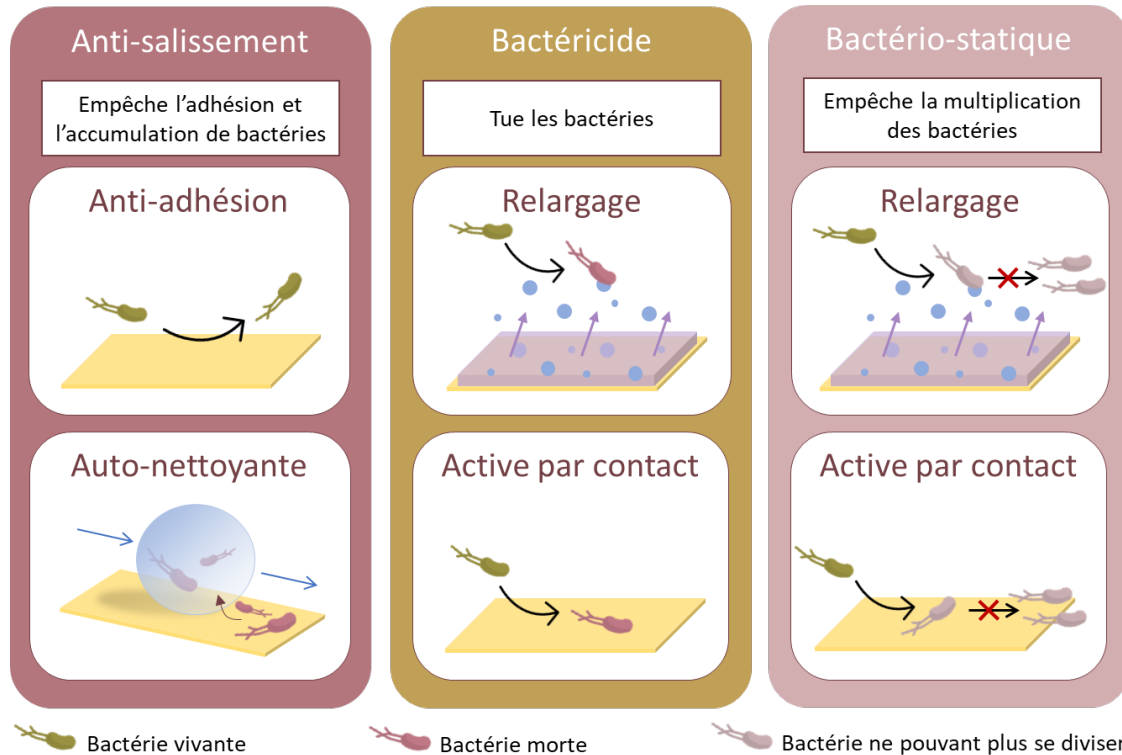


Figure 5 – Représentation des trois principales propriétés associées aux surfaces anti-microbiennes, et leur sous-catégorisation en fonction de leur mode d'action.

Le terme anti-salissure (*antibiofouling/antifouling* en anglais) désigne les surfaces qui peuvent empêcher l'adhésion des micro-organismes sur la surface grâce à des conditions défavorables. Cette catégorie comprend donc les surfaces anti-adhésives, mais aussi les surfaces auto-nettoyantes. Ces dernières décrivent les substrats qui peuvent être nettoyés de leur contamination microbienne par passage de gouttelettes d'eau ou de surfactant sur la surface.

Les surfaces désignées comme biocides incluent les surfaces bactéricides, mais aussi les surfaces virucides et fongicides. Dans le cas des bactéries, ces surfaces déclenchent la lyse des cellules. Cette action peut être effectuée par contact avec la surface (« *contact-killing* » en anglais) ou par relargage d'agents biocides dans le milieu contenant des bactéries.

Enfin, le terme bactériostatique définit les surfaces qui inhibent la multiplication des cellules en contact. Les cellules récupèrent normalement leur capacité à proliférer une fois qu'elles sont libérées de la surface. Cette action peut aussi être effectuée par relargage d'agents bactériostatiques, comme certains antibiotiques.³⁸

1.3.2. Applications et défis

La mise en place de surfaces anti-microbiennes nécessite la prise en compte de divers aspects cruciaux pour assurer leur efficacité et leur utilisation sécurisée dans différentes situations et pour diverses applications. Outre l'efficacité intrinsèque de la surface, qui demeure un critère incontournable dans la conception de surfaces anti-microbiennes, plusieurs propriétés clés doivent être attentivement considérées.

Dans les domaines d'application liés à la santé, comme les instruments médicaux et les implants, la bio-compatibilité et la non-toxicité des surfaces sont des critères plus que nécessaires. Les surfaces anti-microbiennes doivent être compatibles avec les environnements biologiques dans lesquels elles seront utilisées et la bio-compatibilité est donc essentielle pour éviter tout effet nocif sur les cellules et les tissus environnants, garantissant ainsi une utilisation sûre et sans danger, notamment dans des applications médicales telles que les implants ou les dispositifs médicaux.

La durabilité et la résistance mécanique de la surface sont aussi nécessaires, en particulier dans des environnements difficiles d'accès ou pour des surfaces dont le remplacement est limité, comme les prothèses. Les surfaces anti-microbiennes doivent présenter une durabilité adéquate pour maintenir leurs propriétés anti-microbiennes tout au long de leur cycle de vie. La résistance à l'usure, aux conditions environnementales et aux cycles de nettoyage est essentielle pour assurer une protection anti-microbienne à long terme (sur plusieurs mois), en particulier dans des applications telles que les revêtements de surfaces dans les environnements hospitaliers. Un des défis majeurs concernant la durabilité des surfaces est la gestion du relargage d'agents anti-microbiens à partir de la surface ou de la destruction du revêtement. Il est crucial de minimiser tout relargage excessif, car cela peut entraîner une réduction prématurée de l'efficacité anti-microbienne. Un équilibre délicat doit être atteint pour assurer une libération contrôlée des agents anti-microbiens, suffisante pour maintenir leur efficacité, mais évitant une diffusion excessive dans l'environnement. De plus, pour des surfaces difficilement accessibles, la régénération des agents actifs de la surface n'est pas possible. Si un relargage trop rapide par rapport à sa durée de vie à lieu, celle-ci peut perdre en efficacité. De plus, le relargage d'agent potentiellement cytotoxiques peut poser un problème pour certaines applications et doit donc être contrôlé.^{39,40}

Afin d'être polyvalentes et efficaces, les surfaces anti-microbiennes doivent cibler un large éventail de micro-organismes, couvrant aussi bien les bactéries Gram-positives que Gram-négatives, les champignons et éventuellement les virus. Cette capacité large-spectre est cruciale pour maximiser l'efficacité dans des environnements où divers

pathogènes peuvent être présents, comme les hôpitaux. Bien que des approches spécifiques à une espèce de micro-organismes soient utiles pour certaines applications, notamment la détection et l'identification de pathogène, leur spécificité peut engendrer un manque d'adaptabilité face à la contamination de la surface par de nouveaux micro-organismes.

En conclusion, la sélection et l'adaptation des méthodes et agents actifs de surfaces anti-microbiennes en fonction des applications spécifiques et de leurs contextes d'utilisation apparaissent comme une nécessité. Comprendre les exigences particulières de chaque domaine d'application permet non seulement de maximiser l'efficacité anti-microbienne, mais également d'assurer une mise en œuvre optimale et sécuritaire de ces surfaces dans des environnements variés. Cela souligne l'importance de la personnalisation des approches pour répondre aux besoins spécifiques tout en garantissant des performances durables, une bio-compatibilité adéquate, et une minimisation des risques liés au relargage ou à la réduction d'efficacité au fil du temps. En somme, l'adaptabilité des stratégies de conception aux applications individuelles représente un pilier fondamental pour le développement réussi de surfaces anti-microbiennes fonctionnelles.

1.3.3. Approches existantes conférant des propriétés anti-microbiennes aux surfaces

Il est possible pour une surface de posséder plusieurs des propriétés décrites précédemment. Ces caractéristiques peuvent être intrinsèques aux matériaux utilisés ou être conférées par modification de la surface. En terme général, il existe trois stratégies afin de conférer des propriétés anti-microbiennes aux surfaces : la fonctionnalisation chimique de la surface avec des groupes répulsifs ou biocides ; le stockage et relargage d'agents biocides et finalement la modification de la topologie de la surface. Le mécanisme d'action de ces approches peut être passif (anti-salissure, structuration de surface) ou actif (ciblage de la bactérie). Ces stratégies, ainsi que leurs fonctionnements et quelques matériaux pouvant classiquement être utilisés pour conférer différentes propriétés sont recensés dans la Figure 6. Une autre manière de catégoriser les surfaces anti-microbiennes est de les séparer en fonction de l'origine de leur activité, artificielle ou naturelle.

1.3.3.1. Les approches synthétiques

Un grand nombre de techniques historiques de modification des surfaces sont artificielles. Cette approche a été largement utilisée pour la construction de surfaces anti-bactériennes ces dernières années.⁴⁰ Dans cette catégorie se trouvent des surfaces à base de polymères et de nano-particules, exhibant des effets bactéricides ou anti-salissures. Un exemple historique notoire de ce type de recouvrement est l'utilisation d'espèces telles que le cuivre ou le tributylétain afin de réduire l'attachement et la croissance d'organismes marins sur les coques de bateaux.⁴¹

a. Polymères

Pour la création de surface anti-salissures, les polymères anti-adhésifs sont des matériaux de choix. Ils peuvent agir sur l'adhésion des micro-organismes en venant générer de l'encombrement stérique avec leurs chaînes, induire une répulsion électrostatique entre la surface et les micro-organismes ou rendre difficile leur adhésion non-réversible en diminuant l'énergie de surface.⁴² Concernant les polymères utilisés dans cette approche, les polymères synthétiques hautement hydrophiles et hydrophobes, ainsi que les polymères zwitterioniques (possédant un nombre équivalent de groupes anioniques et cationiques répartis de manière homogène sur leurs chaînes polymères) et leurs dérivés sont des matériaux de choix.⁴³

Les polymères utilisés afin de conférer des propriétés biocides sont le plus souvent les polymères cationiques (charges interagissent avec la membrane des bactéries, chargée négativement) et les polymères composés de N-halamine cycliques (groupement halogène interagissent avec des récepteurs bactériens).⁴⁰

Les polymères peuvent être accrochés à une surface en utilisant différentes méthodes décrites dans le Tableau 2 ci-dessous. Ces méthodes de modification de la surface possèdent chacune des avantages et des inconvénients pouvant impacter leur application, notamment en fonction de leur durabilité et du contrôle du dépôt.

Tableau 2 – Les techniques de modification de surfaces.

Méthode	Description	Exemples	Avantages	Limitations
Recouvrement	Adsorption physique par interactions non covalentes	Couche-par-couche, revêtement par immersion	Très simple	Souvent non-uniforme, mécaniquement faible, peu stable à long terme, difficilement industrialisable
Grafting-to	Liaisons covalentes avec des groupes complémentaires de la surface	Monocouches auto-assemblées (SAMs)	Stable à long terme, couches homogènes et composition contrôlée	Difficilement industrialisable
Grafting-from	Initiateur présent à la surface utilisé pour polymériser	Transfert de chaîne avec fragmentation par addition réversible (RAFT), polymérisation radicale par transfert d'atome (ATRP)	Même avantages que « Grafting-to », mais avec une densité de chaînes plus importante	Difficilement industrialisable

b. Métaux

Parmi les autres matériaux anti-microbiens, certains métaux et leurs dérivés présentent une très bonne activité anti-bactérienne, grâce à leurs interactions électrostatiques avec les bactéries et la création d'espèces oxygénées réactives (ROS).⁴⁴ Quelques-unes des espèces métalliques notables possédant des propriétés anti-bactériennes sont les suivantes :

- Argent et oxyde d'argent (le plus fréquent, large spectre)
- Titane et oxyde de titane (anti-bactérien, anti-fongique)
- Oxyde de zinc (large spectre)
- Autres : nickel, or, cuivre, fer, palladium, aluminium, magnésium

L'utilisation de ces matériaux sous forme de nano-particules s'est particulièrement développée ces dernières années. Un des avantages de cette approche est la taille des nano-matériaux, qui leur permet notamment d'intégrer facilement les biofilms en profondeur, de pénétrer dans les bactéries ou d'être injecté ou incorporé avec d'autres matériaux.⁴⁴ Certains nano-matériaux peuvent directement interagir avec les membranes microbiennes chargées négativement, comme les nano-particules cationiques d'Ag ou d'Al₂O₃.⁴⁴ D'autres matériaux, peuvent venir perturber la cellule en interagissant avec des éléments intracellulaires ou membranaires.⁴⁴

Ces nano-matériaux peuvent être immobilisés sur la surface ou incorporés dans un revêtement avec les mêmes méthodes utilisées pour accrocher les polymères. Bien que les anti-microbiens à base de métaux soient très prometteurs, leur potentiel de toxicité pour l'Homme quand ceux-ci sont sous forme de nano-particules limite grandement leur utilisation actuelle et leur entrée sur le marché.⁴⁵

c. Autres matériaux

D'autres matériaux tels que le graphite et certaines molécules comme les composés d'ammonium quaternaire ou de N-halamine peuvent aussi être utilisés comme matériaux anti-microbiens.

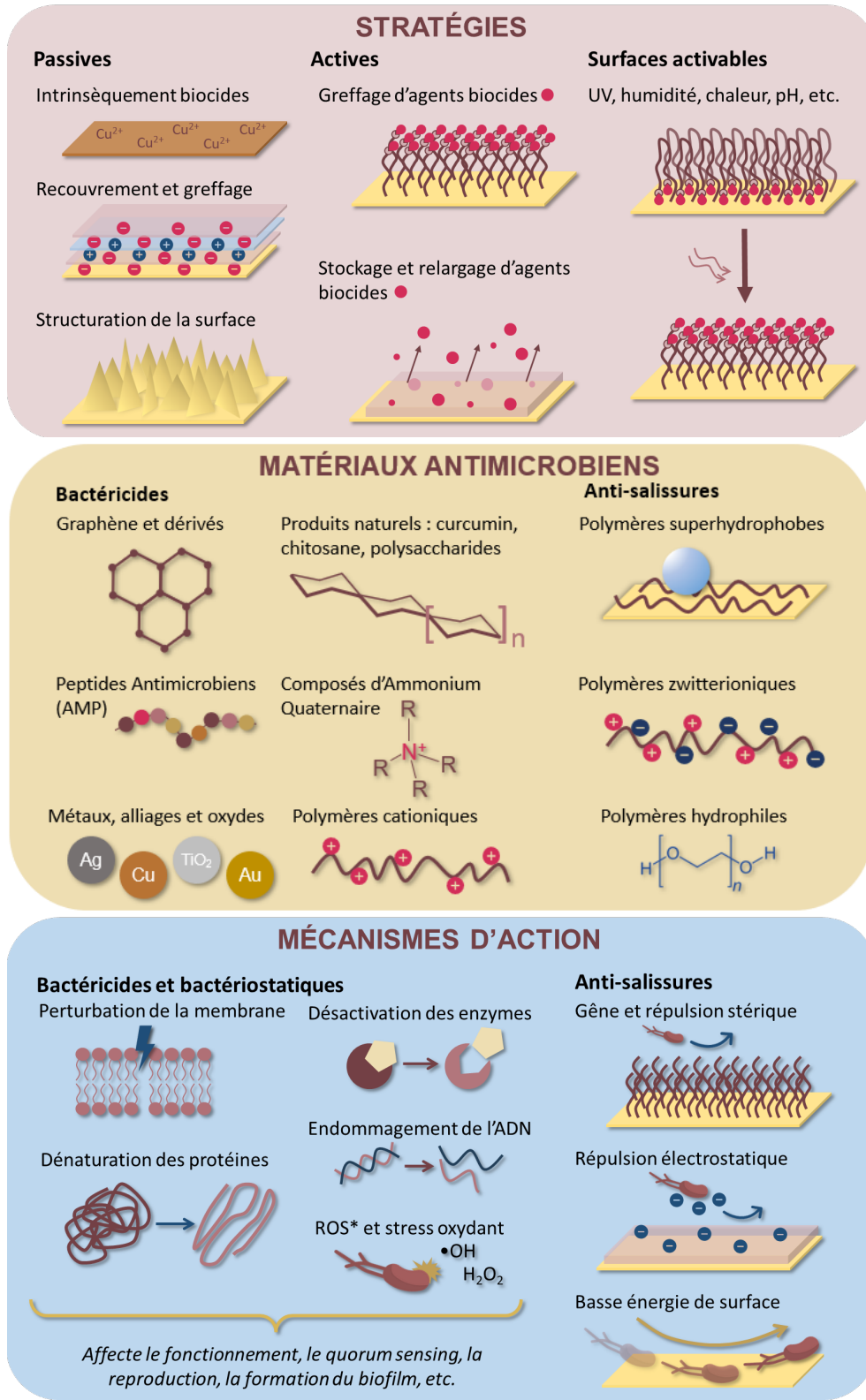


Figure 6 – Représentation des stratégies utilisées pour la fabrication de surfaces anti-microbienne, de différents matériaux classiquement utilisés et des mécanismes d'actions des surfaces et des agents anti-microbiens.

1.3.3.2. Les surfaces anti-bactériennes naturelles et bio-inspirées

Parmi la multitude d'approches et de matériaux utilisés pour créer des surfaces antimicrobiennes, les approches naturelles et bio-inspirées sont des alternatives particulièrement intéressantes. En effet, de nombreux organismes vivants ont dû s'adapter pour lutter contre les infections liées aux micro-organismes et ont donc développé diverses protections et mécanismes de défense, parfois au cours de millions d'années d'évolution. Ces approches sont donc de plus en plus explorées au cours des dernières années afin de contourner les limites des approches synthétiques.

a. Fonctionnalisation avec des agents naturels

Les organismes vivants ont développé divers moyens de défense contre la colonisation par des micro-organismes pathogènes, parmi lesquels la production d'agents antimicrobiens naturels joue un rôle crucial. Ces agents bio-actifs comprennent des molécules comme des enzymes, des peptides, des polymères naturels, etc.⁴⁶

Agents anti-adhésifs. Certaines enzymes comme les protéases et les glycosidases peuvent avoir un effet anti-salissure, en empêchant l'adhésion des micro-organismes par hydrolyse des liaisons peptidiques ou par rupture des liaisons ester des polysaccharides nécessaires à l'adhésion des micro-organismes.⁴³

Agents anti-biofilms. Les molécules impactant le biofilm peuvent agir selon différents modes d'action : déstabilisation de la matrice EPS, limitation du *quorum sensing*, diffusion et action biocide au sein des cellules, etc. Concernant les molécules pouvant impacter la matrice EPS, il existe des enzymes comme la Dispersine B (produite par *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) et la rhDNase, sécrétées par le pancréas et les glandes parotides et également présentes dans le sang, l'urine et d'autres tissus, ou la protéinase K.⁴³ Si les bactéries ont déjà adhéré à la surface et que le biofilm est dans ses premières étapes de formation, des enzymes lyasiques peuvent dégrader les substances produites par le biofilm en formation.⁴³ D'autres molécules, comme l'acétylcystéine et l'hamamélitannine (produite par *Staphylococcus aureus*) peuvent réguler la matrice EPS en diminuant la production des substances polymères extracellulaires du biofilm. La production d'acides aminés D par les bactéries pourrait notamment être un signal déclencheur de la dissolution du biofilm.⁴³ Certaines molécules sont aussi capables d'impacter le *quorum sensing* et de provoquer la dissolution du biofilm. Les plus notables sont les furanones halogénés, appelés fimbrolides, qui sont produits par certaines algues.⁴³

Agents bactéricides/bactériostatiques. Parmi les agents ayant un effet bactéricide, le chitosane tient un rôle particulier. Ce biopolymère polycationique naturel présent dans les exosquelettes des crustacés est particulièrement pertinent pour les applications commerciales. En effet, le chitosane peut être utilisé comme préservateur et a de potentielles applications pour la bio-impression 3D, l'emballage alimentaire et le traitement des plaies.⁴⁷ Son mécanisme d'action est basé sur la déstabilisation de la paroi cellulaire, pouvant mener à sa perméabilisation totale.⁴⁷ Les huiles essentielles sont des

substances aromatiques naturelles produites par diverses plantes comme le romarin et le thym. Grâce à leur composés phénoliques et hydrophobes, elles peuvent avoir une activité large-spectre et être efficaces contre des bactéries Gram-positives et Gram-négatives, mais aussi certains champignons.⁴⁷⁻⁴⁹ Cependant, leur mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé du fait de leur composition complexe. Certaines enzymes, comme le glucose oxydase, peuvent aussi être responsables de la production de produits anti-microbiens comme le peroxyde d'hydrogène, responsable de la production de ROS.⁵⁰ Les peptides anti-microbiens (AMP) sont de même des agents prometteurs. Ils sont sécrétés par un grand nombre d'organismes que cela soit les bactéries, les animaux, les insectes ou les plantes. Leur activité anti-bactérienne en solution a démontré une efficacité large spectre sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, sur des champignons et même sur des virus et des cellules cancéreuses.⁵¹ La diversité de leurs séquences, propriétés physico-chimiques et mécanismes d'action en font là aussi des agents anti-microbiens de choix.

En conclusion, les agents anti-microbiens naturels présentent un grand potentiel pour la fabrication de surfaces. Certaines des molécules discutées sont déjà utilisées comme recouvrement anti-microbien en surfaces de leur hôte. Il est donc très intéressant de s'inspirer de ces approches pour fonctionnaliser différentes surfaces à l'aide de ces agents anti-microbiens.

b. Surfaces micro et nano-structurées bio-inspirées

Il était déjà reconnu depuis plusieurs années que certains animaux et plantes possédaient des topologies de surface leur conférant des propriétés anti-adhésives et auto-nettoyantes, comme la feuille de lotus et la peau de requin.⁵² Cependant, l'aspect bactéricide de la structuration de surface n'avait pas été démontré précisément avant les années 2010. Certaines surfaces nano-structurées, comme celles des ailes de cigales mises en lumière par Ivanova *et al*, présentent un mécanisme mécano-bactéricide dont la première découverte remonte à 2012.⁵³ Entre 2015 et 2019, beaucoup de nouvelles études essayant d'élucider les mécanismes d'actions des structures et essayant de les reproduire synthétiquement ont vu le jour.⁵² Cela a notamment permis de mettre en avant les propriétés anti-microbiennes diverses de nombreuses surfaces naturelles, certaines illustrées en Figure 7.

Récemment, une meilleure compréhension de ces mécanismes a été établie, mais beaucoup d'études ont surtout mis en lumière les perspectives très intéressantes de leur application comme surface anti-microbiennes et la nécessité d'approfondir et de généraliser les connaissances dans le domaine.⁵⁴ Cependant, cette approche est limitée actuellement par les méthodes de fabrication pointues nécessaires pour structurer les surfaces et difficilement adaptables à de larges matériaux.

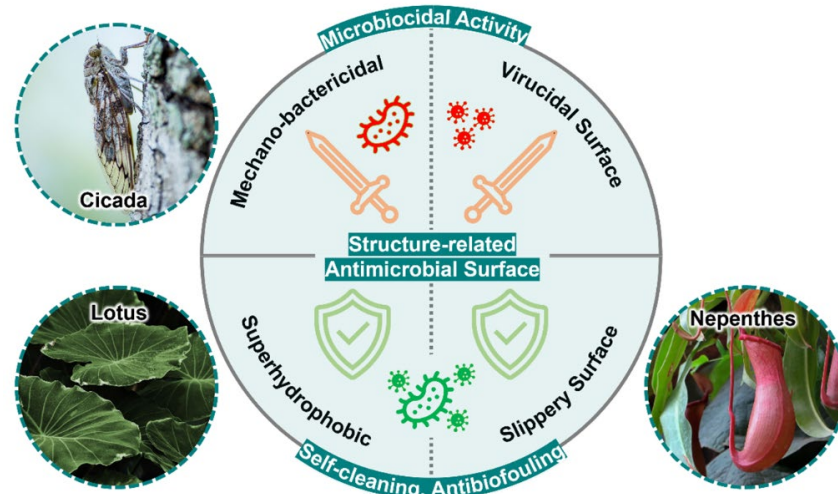


Figure 7 - Classification des surfaces anti-microbiennes micro- et nano-structurées et leurs inspirations naturelles. Tirée de Lee et al, sous licence [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).³⁴

1.3.3.3. Approches combinées existantes

Afin de réduire les limitations des surfaces anti-microbiennes actuelles, la combinaison de différentes fonctionnalités est une approche intéressante permettant de cumuler les effets des différents matériaux utilisés. De nombreuses surfaces ont été développées de cette manière, comme des surfaces répulsives et libératrices, des repoussant et tuant par contact, des relâchement et destruction par contact ainsi que des surfaces sensibles au pH, thermo-sensibles et bio-réactives.⁴⁶ La majorité de ces approches sont basées sur la combinaison de polymères anti-adhésifs, comme du polyéthylène glycol (PEG), avec des agents biocides, comme des nano-particules, des bioréacteurs, des peptides anti-microbiens, etc. Un exemple de surface anti-adhésives/biocides est l'utilisation de nano-rods d'or modifiés avec des PEG peuvent d'un côté éliminer des bactéries grâce à un effet photothermique sous irradiation proche infrarouge, et de l'autre empêcher l'accumulation de débris de bactéries sur la surface grâce à la couche d'hydratation formée par les PEG.⁵⁵ Une autre catégorie d'approches, qui fait l'objet d'études intensives, est celle des stratégies auto-adaptatives, réagissant uniquement en présence d'une infection microbienne. La modification de certaines propriétés de la surface et du milieu en contact avec celle-ci, comme le pH ou la présence de certaines enzymes, peut permettre de déclencher les mécanismes anti-microbiens uniquement au moment opportun, ce qui prolonge la durée de vie de ces revêtements.⁵⁵ Ces méthodes sont intéressantes, car elles permettent d'améliorer les caractéristiques des surfaces développées, comme leur durabilité, et de réduire certains désavantages comme la cytotoxicité de certains agents ou leur dégradation. L'exploration de nouvelle combinaison d'approches, reposant sur la synergie de différents mécanismes d'action, ouvre la voie à la création de surfaces spécifiques et efficaces. Cette démarche nécessite

une poursuite des investigations pour perfectionner les solutions existantes et en développer de nouvelles.

1.3.3.4. Les limites des surfaces anti-microbiennes développées à ce jour

Les fonctionnalisations actuelles des surfaces anti-microbiennes présentent certaines limites qu'il est important de prendre en considération. Les fonctionnalisations utilisant des brosses polymères ou des gels sont très répandues grâce à leur facilité de synthèses, leur faible coût et la simplicité de la mise en place de protocole de fonctionnalisation. De plus, les effets anti-microbiens des polymères reposent souvent sur des paramètres physico-chimiques (hydrophobie, charge cationique, etc.) plutôt que sur des interactions avec des récepteurs microbiens, ce qui permet de moduler l'action des polymères en ajustant leurs paramètres structurels. Leur utilisation est cependant limitée par leur durabilité dans le temps ou le besoin de les régénérer. La stabilité mécanique des polymères attachés de manière non-covalente est fragile et peut être modifiée par les conditions environnementales de la surface comme la température et le pH. De plus, le relargage des polymères dans le milieu peut réduire l'efficacité de la surface sur le long terme et poser des problèmes de toxicité. Concernant les agents anti-microbiens bio-inspirés, certains inconvénients limitent leur emploi. L'utilisation d'enzymes est très prometteuse et est déjà répandue pour certains recouvrements aquatiques, cependant leur application dans le domaine du médical reste encore limitée. En effet, leur non-sélectivité entraîne le risque de dégrader involontairement certaines molécules et induit des risques de cytotoxicité, leur activité doit donc être entièrement contrôlée.⁵⁶ Les méthodes basées sur la libération des nano-particules ou d'ammonium quaternaires posent des problèmes de résistance microbienne, de durabilité, de cytotoxicité pour les cellules de mammifères et d'hypersensibilité chez l'Homme.^{50,57,58} Concernant les AMP, leur importante diversité est un avantage indéniable, cependant certains peuvent exprimer de la toxicité ou engendrer des résistances. La compréhension de leur mécanisme d'action doit donc être approfondie, et leur choix en fonction des applications doit être réalisé avec une sélection méticuleuse.

1.4. Difficulté de la caractérisation des propriétés anti-microbiennes

À cause de la complexité des interactions entre les surfaces et les micro-organismes et la diversité de leur mode de transmission, de prolifération et d'adaptabilité, la fabrication de surfaces anti-microbiennes est complexe. Leur caractérisation l'est d'autant plus, car il est nécessaire de prendre en compte et de quantifier les différentes propriétés pour une surface anti-microbienne : anti-salissures, bactéricide, bactériostatique. Parmi les méthodes de caractérisation on retrouve de manière répandue l'utilisation de systèmes d'imagerie électronique (MEB/MET), de microscopes à force atomique (AFM), de fluorescence et de méthodes de culture solide ou liquide diverses.^{58,59} Ces méthodes sont très variées et permettent d'étudier différentes propriétés des surfaces anti-microbienne. Comme il a clairement été démontré par Michalska *et al* en 2021,

l'exploration croissante de nouvelles surfaces anti-microbiennes nano-structurées bio-inspirées nécessite une standardisation des méthodes. Ce manque de coordination concernant la caractérisation des surfaces rend difficile la comparaison entre études des efficacités et la compréhension générale des paramètres influençant les mécanismes d'actions des structures. De plus, cette standardisation nécessite d'être étendue aux études se concentrant sur la fonctionnalisation chimique avec des agents biocides et des polymères, car les méthodes se développant sont de plus en plus multi-approches et une compréhension étendue est nécessaire. La plupart des caractérisations employées sont la fluorescence par marquage live/dead et l'énumération de colonies sur géloses, mais les interprétations des résultats de ces approches généralistes manquent souvent de recul sur la complexité de la caractérisation, ce qui peut les rendre trompeuses.⁵⁴ Afin de continuer à approfondir les connaissances concernant les surfaces anti-microbiennes et leur mécanisme d'action, il est donc nécessaire en ce qui concerne la caractérisation d'avoir une approche globale, standard et complète.

1.5. Objectifs du projet de thèse

La prolifération microbienne est un problème majeur de santé publique qui entraîne des coûts économiques et sociaux importants dans presque tous les secteurs d'activité humaine, notamment les soins de santé, l'industrie alimentaire, les transports publics et même l'aérospatiale. Les inquiétudes sont renforcées par la prévalence croissante de la résistance aux traitements et le manque de nouveaux antibiotiques. Il est donc crucial de développer des surfaces capables de limiter l'adhésion et la prolifération des micro-organismes à leurs stades précoces. Il existe déjà de nombreuses méthodes permettant de conférer des propriétés anti-microbiennes aux matériaux, mais elles présentent souvent des inconvénients. Parmi les différentes approches synthétiques et naturelles envisagées, celles bio-inspirées semblent prometteuses, car posant moins de problème de toxicité et de durabilité. En particulier, la fonctionnalisation de surface avec des AMPs et les surfaces micro- et nano-structurées pour créer des surfaces anti-microbiennes sont toutes deux des approches intéressantes avec des avantages indéniables. La grande variété des AMPs, leurs différents mécanismes d'action, leur action large-spectre et leur structure synthétisable et modulable en font des candidats de choix pour la lutte contre les micro-organismes. La structuration de surface quant à elle est une approche relativement nouvelle. Ses mécanismes d'actions, comme ceux des peptides anti-microbiens, ne sont pas encore bien élucidés et beaucoup de travail reste à faire afin de comprendre leurs modes d'action.

Relativement peu d'études se sont penchées sur la combinaison de surfaces nano-structurées physiquement et de fonctionnalisation peptidique, malgré son potentiel.⁶⁰⁻⁶² Cette approche a plutôt été utilisée en combinant plusieurs fonctionnalisations chimiques, en accrochant les peptides sur des surfaces à l'aide de polymères par exemple ou en fonctionnalisant des nano-particules avec des peptides. Parmi les études existantes,

il est possible de tirer plusieurs avantages certains à la combinaison de ces approches. Premièrement, un renforcement des propriétés anti-bactériennes grâce à la combinaison des activités des approches est possible. L'équipe de *Rigo et al.* en 2020 a étudié la possible synergie d'une nano-structuration avec des micelles polymériques et d'une fonctionnalisation avec des peptides immobilisés sur celles-ci. Les résultats démontrent une activité bactéricide accrue significative des nano-structures par rapport à la surface nue, ainsi qu'un renforcement du pouvoir bactéricide de la surface avec l'ajout de la fonctionnalisation peptidique aux nano-structures³⁹. *Zhu et al.* ont fonctionnalisé du titane, nano-structuré par traitement hydrothermique, recouvert avec des AMP par extraction sous vide et lyophilisation et ont démontré une augmentation du pouvoir anti-bactérien du titane nano-structuré.⁶³ Deuxièmement, il est possible de minimiser certains inconvénients des surfaces par combinaison de plusieurs approches. Comme expliqué précédemment, l'utilisation d'AMP afin de créer des surfaces anti-microbiennes est très prometteuse, mais est ralentie par la cytotoxicité potentielle de certains d'entre eux. Dans une étude réalisée en 2019 par *Chen et al.* il a été démontré que la cytotoxicité du peptide Méliittine peut être grandement réduite quand celui-ci est immobilisé à la surface d'une nano-fibre, mais qu'il conserve son pouvoir anti-bactérien⁶⁴. La combinaison de nano-structures avec des peptides pourrait donc améliorer la sélectivité de ces derniers. Finalement, la combinaison des approches permet de cumuler plusieurs propriétés et donc de créer des surfaces particulièrement propices à certaines applications. Dans une étude par *Li et al.*, des nano-tubes de dioxyde de titane chargés avec des peptides anti-microbiens ont démontré une grande activité bactéricide ainsi qu'un pouvoir ostéoconducteur. Ces deux propriétés peuvent donc être conférées à la surface par combinaison des approches⁶¹.

Une étude plus approfondie des différents aspects de cette combinaison est nécessaire, car seuls quelques systèmes spécifiques ont été étudiés. De plus, ces études se concentrent souvent sur une seule espèce bactérienne ou l'utilisation d'un seul peptide et n'évaluent pas leur potentielle action large spectre.

Les objectifs de cette thèse sont multiples. Dans un premier temps, la réalisation de surfaces fonctionnalisées avec une variété de peptides d'un côté, et de surfaces nano-structurées avec différentes morphologies de l'autre, suivies par la caractérisation de leurs propriétés anti-microbiennes respectives devrait permettre d'investiguer plus en profondeur les différents paramètres pouvant impacter l'efficacité des surfaces créées. Dans un second temps, il est nécessaire d'établir un protocole de caractérisation permettant de quantifier précisément les propriétés anti-adhésives, bactéricide et bactério-statiques des surfaces afin d'acquérir une compréhension étendue de l'impact de la modification de la surface sur son caractère anti-microbien. Finalement, l'étude de la combinaison de la fonctionnalisation peptidique avec les nano-structures espère pouvoir mettre en lumière des synergies et permettre de limiter les inconvénients des approches

seules. Une analyse détaillée des enjeux liés aux sujets de la caractérisation microbiologique des surfaces anti-bactériennes, de la fonctionnalisation peptidique et de la nano-structuration sera développée et discutée de manière à pouvoir mettre en perspectives les expériences réalisées. Dans chaque partie, de nombreux paramètres nécessitent d'être considérés et étudiés. Ces derniers sont illustrés dans la Figure 8 qui synthétise les sujets abordés durant les différents chapitres de cette thèse.

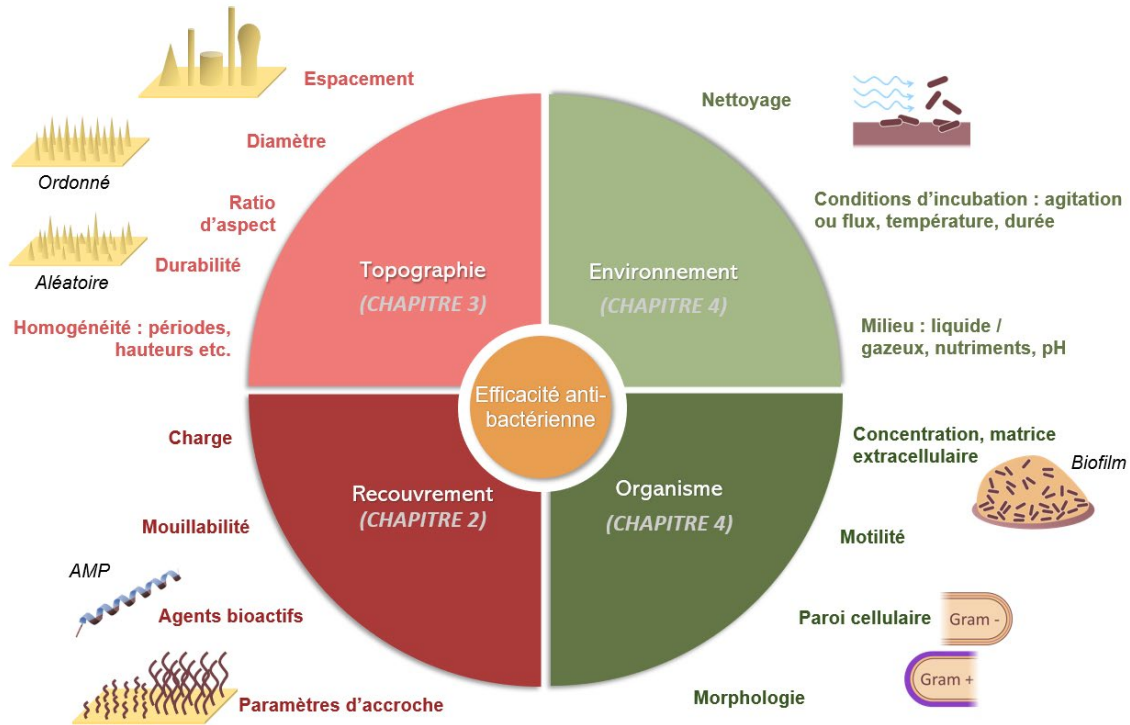


Figure 8 - Les différents facteurs pouvant influencer les propriétés anti-bactériennes d'une surface.

CHAPITRE 2

FONCTIONNALISATION AVEC DES PEPTIDES ANTI-MICROBIENS

2.1.	Les AMPs : de leur découverte aux applications actuelles	41
2.2.	Sélection des AMPs étudiés	54
2.3.	Fonctionnalisation de la surface par des AMPs	58
2.4.	Caractérisation des propriétés physico-chimiques des surfaces fonctionnalisées avec des AMPs	69
2.5.	Conclusion du chapitre	72

CHAPITRE 2

FONCTIONNALISATION AVEC DES PEPTIDES ANTI-MICROBIENS

2.1. Les AMPs : de leur découverte aux applications actuelles

2.1.1. Origines et caractéristiques des AMP

2.1.1.1. Définitions et origines des AMPs naturels

Les peptides anti-microbiens (*Antimicrobial Peptides*, en anglais ou AMPs) jouent un rôle crucial dans le système immunitaire de nombreux êtres vivants et possèdent une activité contre une gamme variée de micro-organismes (action large-spectre). Les AMPs font partie de la famille des peptides de défense de l'hôte (*Host defense peptides*, HDP en anglais) et peuvent être eux-mêmes classifiés selon leur action : anti-bactériens, anti-viraux, anti-fongiques, anti-biofilms, anti-parasitaires, etc.⁶⁵ La découverte du premier peptide anti-microbien, le lysozyme (enzyme lysant les bactéries présent dans le blanc de l'œuf), remonte aux années 1920 et à Alexander Fleming, avant même la découverte de la pénicilline.⁶⁶ Les prémices des recherches concernant les AMPs ont fortement coïncidé avec l'âge d'or des antibiotiques, mais il a fallu attendre les années 1980 pour que le domaine prenne vraiment de l'essor et pour voir apparaître les premières grandes familles de peptides et une classification. La découverte d'AMPs notables tels que les cécropines, les défensines et les magainines a ouvert la voie à une exploration approfondie de leurs effets anti-microbiens⁶⁷ Les avancées technologiques, avec notamment l'invention de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle (RMN 2D), ont permis de déterminer les structures 3D des peptides anti-microbiens et de favoriser l'exploration de leurs mécanismes d'action. Ces vingt dernières années, la découverte de nouveaux peptides anti-microbiens a connu un essor croissant et ce qui était un ensemble de 1000 peptides comptabilisés en 2008 s'est élevé à 2000 AMPs en 2012 et à 3569 en juillet 2023.^{67,68}

2.1.1.2. L'importance des bases de données

Par nature, les peptides anti-microbiens sont d'origines diverses, et possèdent une grande variété de propriétés et de structures, détaillés dans la sous-partie suivante. L'hétérogénéité du groupe formé par les AMPs rend leur recensement difficile et dès le début des années 2000 les premières bases de données apparaissent afin de faciliter ce processus fastidieux. Actuellement, il n'existe toujours pas de base de données exhaustive et les informations sur les AMPs sont réparties au travers de plusieurs dizaines de banques d'informations. Celles-ci peuvent être générales ou spécifiques à certaines classes de peptide, recenser les AMPs naturels et/ou synthétiques et chacune peut contenir certaines

séquences exclusives.⁶⁹ Les données quantitatives et les caractéristiques relatives aux AMPs examinés dans cette revue bibliographique sont issues de différentes bases de données sources, mais l'*Antimicrobial Peptide Database* (APD <https://dbaasp.org/home>, 2003-2023) créée en 2003 et la *Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides* (DBAASP <https://aps.unmc.edu/>, 2014-2023) ont été les plus fréquemment consultées.^{70,71}

Les bases de données offrent, entre autres, des informations sur la composition en acides aminés des AMP, leurs propriétés structurales et chimiques, leurs sources, ainsi que leur efficacité contre différentes espèces. Certaines bases incluent même des outils de prédiction des propriétés des AMPs synthétiques. Les récentes avancées en matière d'apprentissage automatique et d'intelligence artificielle laissent entrevoir la possibilité de prédire les propriétés de nouveaux AMPs de manière plus efficace. Cependant, ce domaine est encore en phase d'exploration et de nombreux défis subsistent, notamment à cause de la non-uniformisation des bases de données, des ensembles étudiés, des modèles de prédiction utilisés et de la faible précision des méthodes employées.^{72,73} Mais le potentiel d'utilisation de ces approches souligne l'importance de maintenir les bases de données aussi complètes et à jour que possible.

2.1.1.3. Propriétés, structures et classification des AMPs

De nos jours, il est établi que les AMPs sont produits par tous les organismes, des procaryotes aux êtres humains. Cependant, la majeure partie des AMPs mis au jour l'ont été chez les animaux, les bactéries et les plantes, comme il est illustré dans la Figure 9A.

Par définition, les AMPs sont des séquences d'acides aminés (ou AA), différenciables des protéines par leurs chaînes plus courtes. En terme général, on parle de peptide en dessous de 10 AA, de polypeptide entre 10 et 100 AA et de protéines au-dessus de 100 AA. La plupart des AMPs comptent moins de 50 AA, bien que certains soient plus longs et puissent atteindre jusqu'à 100 acides aminés (Figure 9B). Une liste des 21 acides aminés et de leurs propriétés est disponible en [Annexe A](#).

La plupart des AMPs ont une charge cationique nette allant de +1 à +10, cependant il est possible de trouver des peptides avec une charge nette négative (Figure 9C). La majorité des peptides sont amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils sont composés de segments distincts hydrophiles et lipophiles ou hydrophobes, et possèdent un poids moléculaire souvent largement inférieur à 10 kDa (soit environ 90 acides aminés).

Les AMPs sont souvent classifiés en fonction de leur structure secondaire et se répartissent en cinq grandes classes : les peptides α -hélicoïdaux, les peptides β -feuilletés, les peptides étendus, les peptides avec une structure mixte et finalement les peptides « inhabituels ». Les AMPs α -hélicoïdaux sont les peptides les plus abondants dans la nature et il a été démontré que la conformation en α -hélice de ces AMPs résulte de leur interaction avec les membranes microbiennes. Dans cette conformation, les segments

hydrophiles et hydrophobes répartis le long de la chaîne sont regroupés en deux groupes de part et d'autre de l'hélice, ce qui confère aux AMPs leur caractère amphiphile et intervient directement dans leur mécanisme d'action.⁷⁴ Ce changement de conformation est illustré en Figure 11.

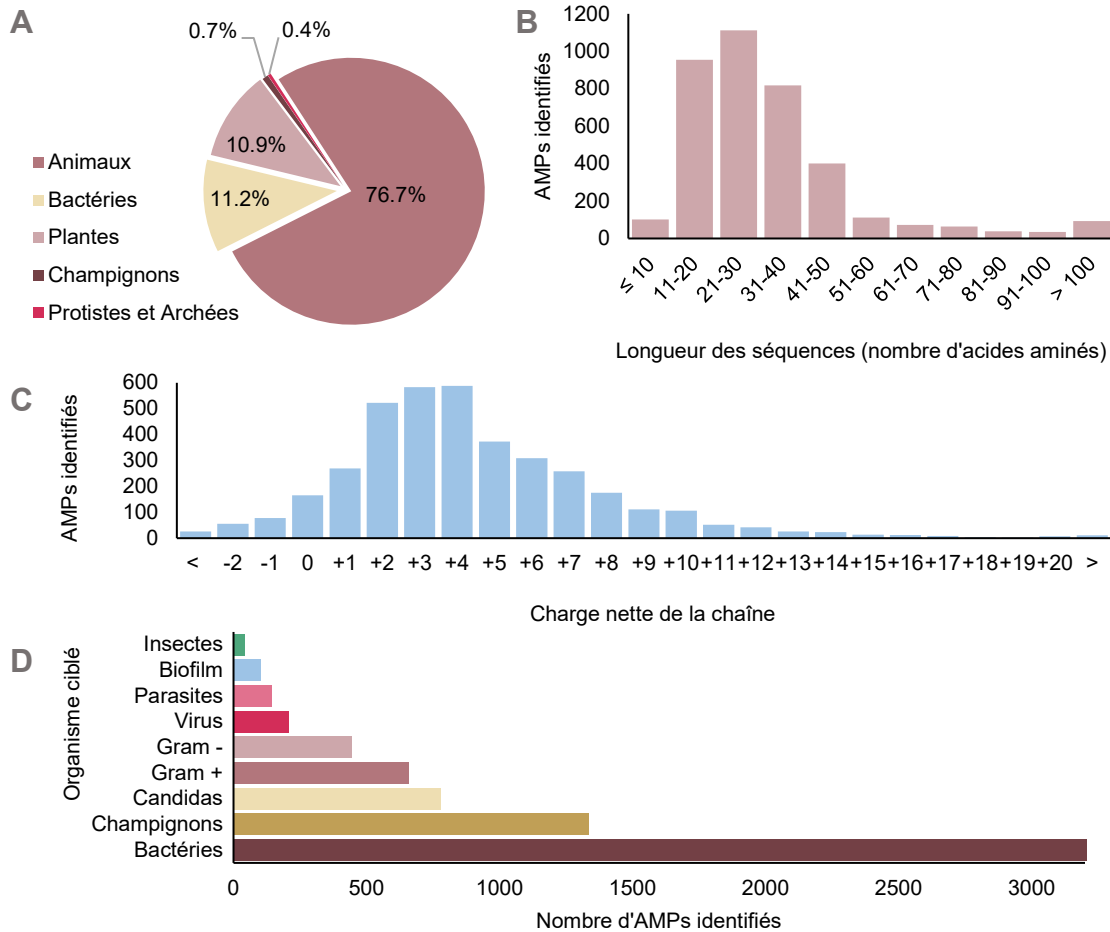


Figure 9 – Données statistiques liées aux AMPs tirées de la base de données APD3 en novembre 2023.⁷⁰

Les AMPs β -feuilletés sont constitués d'au moins deux brins (illustrés par les flèches dans la Figure 10) composés de nombreuses structures linéaires et adoptants une conformation en « épingle à cheveux ». Les interactions chimiques permettant de stabiliser les deux brins sont souvent des ponts disulfures (souvent 2 à 4) provenant du pontage de cystéines dans la séquence, ce qui permet aux AMPs- β de conserver leur conformation, même au contact de membranes microbiennes. Les peptides mixtes ont des séquences pouvant former des domaines avec différentes structures. Par exemple, la Termicine possède une structure α -hélicoïdale et des β -feuilletés ; la Lactoferricine porcine est α -hélicoïdale et étendue; la Thanatine possède des β -feuilletés mais aussi une structure étendue, etc.⁷⁵ Il arrive que certains peptides présentent une structure cyclique ou en boucle, à cause d'une séquence fermée ou de différentes interactions entre les acides aminés de la chaîne. Finalement, les peptides n'ayant pas de structure 3D spécifique comme les α -hélices et β -

feuillet, mais une structure linéaire sont souvent désignés comme « étendus ». Les structures 3D des AMPs sont souvent associées à une chaîne peptidique plus riche en certains acides aminés, comme la lysine, l’alanine, la leucine et la glycine pour les α -hélices et les β -feuillet. ⁷⁴


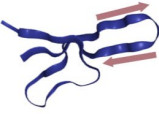

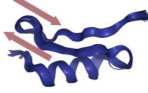
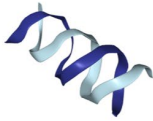
Structure 3D	α -hélice	β -feuillet	Étendue	Mixte	Inhabituelle
Illustration					
Exemple d'AMP	LL-37	Defensin-6	Indolicidine	Termicine	Gramicidine
Riche en acides aminés	A L K G	C A L K G	W P G	C A L K G	C

Figure 10- Catégories et propriétés des différentes structures 3D chez les AMP.

En raison de leurs caractéristiques physico-chimiques uniques et de leurs structures 3D, les peptides anti-microbiens cationiques présentent de fortes interactions avec les surfaces chargées négativement, telles que les membranes cellulaires. Cela leur confère des propriétés anti-microbiennes particulièrement intéressantes. Bien que les mécanismes d'action sur les membranes fassent encore l'objet d'études, et ne soient pas entièrement élucidés à ce jour, certaines caractéristiques générales de leur action sont déjà néanmoins bien connues.

2.1.2. Mécanismes d'interaction des AMPs avec les micro-organismes

2.1.2.1. Cibles cellulaires

Les AMPs faisant partie des HDP chez une grande variété d'espèces, leur utilisation en tant que molécule de défense contre les infections leur permet d'avoir une action large-spectre contre de nombreux micro-organismes comme les bactéries (et notamment les biofilms), les champignons et les parasites (voir Figure 9D). Chez les bactéries, les AMPs produits leur permettent de rivaliser pour les nutriments dans l'environnement et sont donc efficaces contre de nombreuses espèces bactériennes. Il a aussi été démontré que les AMPs sont efficaces contre certains virus comme le HIV et le virus de la grippe A. Finalement, de plus en plus d'éléments plaident en faveur d'une activité anti-cancéreuse de certains AMPs. La multiplicité des cibles des AMPs peut être en grande partie expliquée par leurs modes d'action variés. ⁷⁶ Leur activité anti-microbienne peut être subdivisée en deux mécanismes d'action généraux : la modulation de l'immunité de l'hôte ou une activité anti-microbienne directe. L'activité anti-microbienne directe peut elle-même découler de différents modes d'actions, comme l'interaction avec les membranes microbiennes ou la liaison avec des récepteurs spécifiques externes ou des cibles internes.

2.1.2.2. Perméabilisation des membranes bactériennes

La majorité des AMPs ont une action basée sur leur interaction avec des éléments de la membrane microbienne, sans récepteurs spécifiques. Ces interactions sont majoritairement dépendantes de la charge des AMPs et de leur hydrophobicité. Actuellement, plus de 85% des AMPs étudiés possèdent une activité anti-bactérienne, leurs mécanismes d'interactions sont donc parmi les mieux décrits dans la littérature.⁷⁰

Selon l'APD3, il est recensé que 92% des AMPs sont des peptides cationiques.⁷⁰ Étant donné que la surface des membranes bactériennes est souvent chargée négativement à cause des molécules la composant, il a été démontré que les AMPs se lient initialement à la surface de la membrane par le biais d'interactions électrostatiques. La structure caractéristique des AMPs contenant des résidus hydrophiles et hydrophobes leur permet ensuite d'interagir et de pénétrer dans la bicouche lipidique de la membrane bactérienne, ce qui entraîne une désorganisation de celle-ci. Certains peptides anioniques possèdent également une activité anti-bactérienne, comme le maximin-H5 de grenouille et la dermcidine humaine. Cependant, ces peptides sont minoritaires et leurs mécanismes restent très largement incompris, bien qu'il ait été reconnu que certains agissent en participant à la réponse immunitaire ou en présence de co-facteurs, comme les ions Zn^{2+} et Ca^{2+} qui leur permettraient de prendre des configurations oligomériques et donc de s'insérer dans la membrane bactérienne.^{66,74} Ces peptides ne seront donc pas abordés dans ce projet.

Les mécanismes d'action des AMPs cationiques sont connus pour créer des disruptions dans les membranes bactériennes, induisant ainsi la lyse cellulaire. Les principaux modèles sont représentés en Figure 11. Dans un premier temps, certains AMPs comme les α -hélices sont connus pour subir un changement de conformation induisant le regroupement des résidus hydrophobes et hydrophiles de part et d'autre du peptide, puis de s'accrocher parallèlement à la surface, avec leurs résidus hydrophobes orientés vers la bicouche lipidique.⁷⁴

Dans certains cas, les AMPs peuvent adopter un mécanisme d'action transmembranaire. C'est le cas du modèle « *Barrel-stave* », où au-delà d'une certaine concentration, les AMPs vont former des oligomères et s'insérer verticalement au sein de la couche lipidique de la membrane. Ils vont ainsi former une structure en « tonneau » avec leurs résidus hydrophiles composant la paroi interne de celui-ci. Au fur et à mesure, les pores s'agrandissent grâce au recrutement progressif d'AMPs au niveau de la membrane, ce qui finit par entraîner leur transport au travers de celle-ci, puis la fuite du contenu cytoplasmique et finalement la mort de la bactérie. Le modèle du pore toroïdal comme son nom l'indique crée lui aussi des structures responsables de la lyse osmotique de la bactérie. Cependant, à la différence de « *Barrel-stave* », ici la bicouche se déforme et ce sont uniquement les têtes polaires des lipides qui sont en interaction avec les peptides.

D'autres modèles ont été décrits et ne nécessitent pas forcément une conformation en hélice. Les peptides dont le mécanisme d'action suit le modèle en tapis recouvrent dans un premier temps la membrane de la bactérie grâce aux interactions électrostatiques, puis à partir d'une certaine concentration peptidique de surface un point de saturation est atteint. Comme sous l'action d'un détergent, la couche lipidique se replie alors sur elle-même, la membrane s'effondre et le cytoplasme s'échappe à l'extérieur de la cellule. Des agrégats peuvent aussi être formés quand les AMPs interagissent avec la membrane cytoplasmique. Ils peuvent alors pénétrer dans la membrane et former des micelles peptides-lipides.

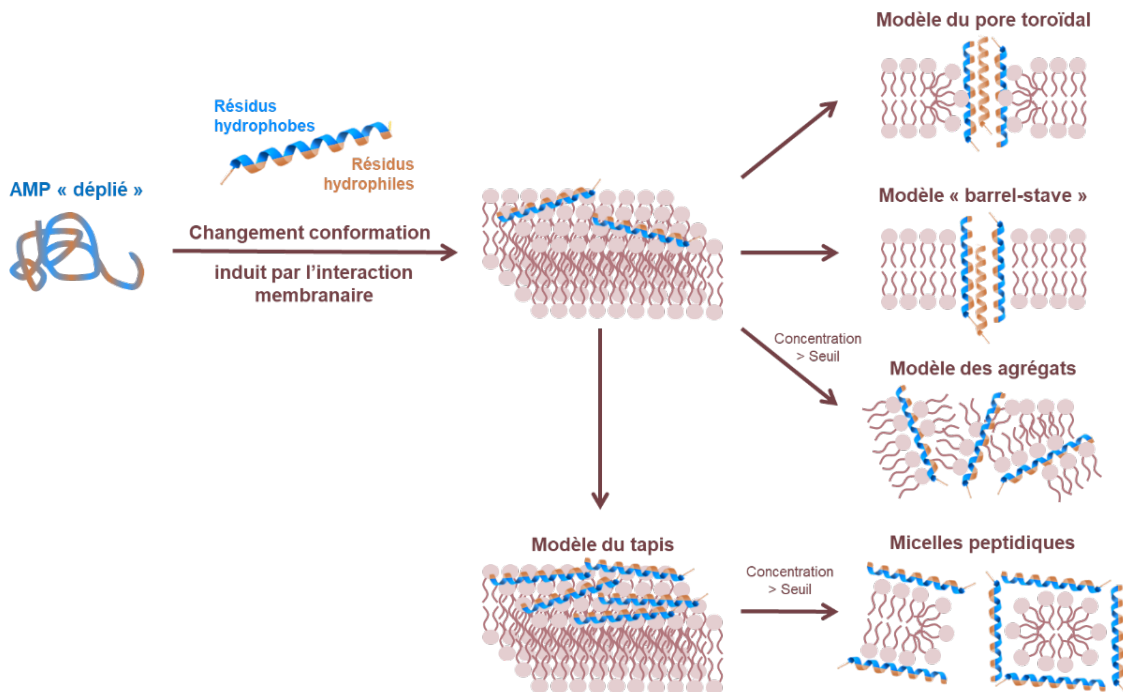


Figure 11 – Mécanismes d'action des AMPs lors de leur interaction avec une membrane microbienne. Dans le modèle du tapis, les AMPs sont illustrés sous forme d'hélices par souci de lisibilité. Inspiré de Huan et al.⁷⁷

2.1.2.3. Mécanismes d'action ciblant des récepteurs cellulaires

Depuis plusieurs années, il a été mis en évidence qu'un certain nombre d'AMPs cationiques agissent selon d'autres mécanismes d'action et sont capables d'agir sur des cibles spécifiques.

Certains peptides sont capables de pénétrer les cellules sans déstabiliser la membrane et d'agir sur la paroi cellulaire ou sur les éléments présents dans le cytoplasme. Ce mode d'action peut être leur mécanisme principal ou être complémentaire à la disruption de la membrane par un des mécanismes présentés dans la section précédente. Le fonctionnement connu anti-microbien général intra et extracellulaire des AMPs est résumé en Figure 12.

CHAPITRE 2 • FONCTIONNALISATION AVEC DES PEPTIDES ANTI-MICROBIENS

Concernant les cibles extra-cellulaires, certains peptides comme la Nisine ou la Mésentéricine se lient aux lipides II, des constituants essentiels du peptidoglycane qui sont ancrés dans la membrane bactérienne. Ces lipides jouent un rôle crucial dans la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries, et l'interaction avec ces AMPs entrave leur fonction habituelle.

Mécanisme	Cible	Récepteur	Activité	AMPs
Récepteurs spécifiques	Paroi cellulaire	Lipides II	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Vancomycine
			Formation de pores	Nisine
	Intracellulaire	Acides nucléiques	Inhibe les métabolismes de l'ADN et de l'ARN	Buforine II, Indolicidine
			Inhibe la production de protéines	Pleurocidine, CP10A, magainine 1
		Protéines chaperonnes	Entrave le repliement des protéines nouvellement synthétisées	Riches en proline: pyrrolicine, apidécine et drosocine,
		Protéases	Entrave le métabolisme cellulaire	Histatine-5, ixodidine
		Récepteurs multiples	Entrave la division cellulaire	Indolicidine, diptericine, microcine J25
Ribosome	Bloque la translation et la synthèse de protéine	Api137, bacténécine 7, Tur1A		
Sans récepteurs spécifiques	Membrane	∅	Formation de pores	Méllittine, magainine 2, lacticine Q et alaméthicine
			Pas de formation de pore	Cecropine P1

Figure 12- Les différents modes d'action des AMPs.

Pour les cibles intra-cellulaires, certains AMPs peuvent interagir avec la membrane cytoplasmique, puis s'accumuler à l'intérieur des cellules. Une fois à l'intérieur, les AMPs peuvent interagir avec une variété de cibles cellulaires et entraver de nombreux mécanismes : synthèse de protéines et d'acides nucléiques, division cellulaire, repliement des protéines, action des protéases, etc. C'est le cas de la buforine II, par exemple, qui peut traverser la membrane bactérienne d'*E. coli* sans la détruire et se lier à l'ADN et à l'ARN.⁷⁸ L'inhibition de l'activité enzymatique par les AMPs est aussi possible, mais ce dernier mode d'action est souvent minoritaire.⁷⁹

Contrairement à la destruction de la membrane bactérienne, les mécanismes d'action extra- et intra-cellulaires nécessitent des cibles spécifiques, à l'instar des antibiotiques, ce qui peut engendrer des résistances. Ils ne seront donc pas explorés durant ce projet, mais il est important de garder à l'esprit le potentiel effet conjoint des mécanismes d'action des AMP.

2.1.2.4. Modulation de l'immunité

Comme expliqué en introduction, les AMPs naturels font partie des peptides de défense de l'hôte, ils participent donc à la modulation de l'immunité. En plus de leur

activité anti-microbienne directe, les AMPs sont produits par de nombreuses cellules comme les neutrophiles et les macrophages et peuvent être responsables du recrutement et de l'activation de cellules de l'immunité innée, comme les mastocytes, les leucocytes et les cellules dendritiques. Il a aussi été démontré que les AMPs peuvent jouer un rôle dans le système immunitaire adaptatif, avec le recrutement de lymphocytes T et B.⁷⁸ Cependant, les mécanismes exacts de leur fonction dans l'immunité ne sont pas encore clairement élucidés et cette propriété ne sera pas étudiée durant cette thèse.

2.1.2.5. Spectre d'activité des AMPs

La remarquable diversité des mécanismes d'actions des AMP, parfois mono- ou multi-activités, en font des candidats idéaux pour des solutions anti-microbiennes large-spectre. Une des interrogations actuelles à propos des AMPs concerne leur capacité à cibler spécifiquement de multiples pathogènes tout en ayant peu de toxicité envers les cellules mammifères. Une partie des cibles microbiennes, en dehors des bactéries, et leurs mécanismes d'interaction avec les AMPs sont recensés dans le Tableau 3.

Tableau 3 – Mécanismes et peptides possédant une activité anti-viral, anti-fongique, anti-cancer et anti-biofilm.

Organisme cible	Mécanismes de ciblage	Actions	Exemple d'AMP
Cellules cancéreuses	Large superficie et présence d'un grand nombre d'éléments chargés négativement à leur surface favorisant leur ciblage	Apoptose ou nécrose, inhibition de l'angiogenèse, interférence avec la synthèse interne de protéines	Poca A, Poca B et CyO4, bmattacine2, latérosporuline10
Virus	Interaction avec des protéines membranaires (Gp41), inhibition de l'enzyme protéolytique NS3/4A	Prévient le changement de conformation du virus, nécessaire à son intégration, inhibe certains mécanismes cellulaires	Enfuvirtide (T-20), télaprévir et bocéprévir, LL-37
Biofilm	Prévention de la formation par effets bactéricides sur les bactéries planctoniques, vise les éléments essentiels au maintien du biofilm	Inhibe les interactions cellule-cellule, empêche l'adhésion, interfère avec le <i>quorum sensing</i> , diminue l'expression de gènes essentiels à la formation du biofilm.	Pleurocidin, Nisin A, Gramicidin S
Champignons	Formation de pore, interactions avec la membrane et la paroi cellulaire, inhibition d'acides nucléique, etc.	Similaire aux actions anti-bactériennes.	Défensines végétales, thionines, cécropines, mélittine

Il est postulé depuis des années que cette spécificité est notamment due aux différences de composition des membranes cellulaires entre pathogènes et hôtes. En effet, la structure de base des membranes cellulaires est composée de protéines et des lipides. La membrane des cellules bactériennes est composée d'un grand nombre des phospholipides hydroxylés chargés négativement, là où ce sont majoritairement des phospholipides non chargés dans les membranes des cellules de mammifères.⁷⁶ Cette différence peut en partie expliquer l'activité préférentielle des AMPs cationiques envers les bactéries. Bien qu'il existe chez les bactéries des différences morphologiques importantes au niveau de leur structure externe, des éléments chargés négativement et spécifiques à chaque type de membranes sont présents et favorisent l'interaction avec les AMPs : chez les bactéries à Gram négatif, ce sont les lipopolysaccharides (LPS) et chez les bactéries à Gram positif, ce sont les acides lipotéichoïques. De la même manière, bien que la membrane des champignons soit différente et majoritairement composée de chitine, elle contient aussi des éléments de charges négatives, comme le phosphomannane, le phosphatidylinositol et le diphosphatidylglycérol.⁷⁶ Comme pour les bactéries, les modes d'action des AMPs anti-fongiques sont basés sur des cibles intra et extra-cellulaire et sur l'interaction des peptides avec la membrane selon les mêmes modèles précédemment décrits.⁸⁰

Les cellules cancéreuses, à la différence des cellules saines, possèdent également plus de phospholipides et de glycoprotéines chargés négativement sur leur membrane. En outre, la présence d'un grand nombre de microvillosités augmente leur superficie disponible, ce qui augmente le nombre d'interactions possibles avec les AMPs en surface.⁸¹

En résumé, les AMPs utilisent principalement leur caractère cationique afin d'interagir spécifiquement avec les pathogènes et initier leur adhésion, ce qui leur confère cette propriété large-spectre. Cependant, certaines interactions faibles avec les membranes des cellules de mammifères ont été observées, pouvant entraîner une toxicité pour la cellule. Ces interactions électrostatiques ne sont donc pas seules responsables de l'activité des AMPs et leurs modes d'action dépendent aussi de nombreux autres paramètres.

2.1.2.6. Paramètres influençant le caractère anti-microbien des AMPs

L'activité des AMPs est influencée par de nombreux facteurs, tous intrinsèquement liés à la composition et à la longueur de la chaîne d'acides aminés.⁷⁶ Cette dernière est évidemment un paramètre majeur de leur efficacité, car elle influence la charge nette, l'hydrophobicité et la structure secondaire des AMPs et ainsi leurs mécanismes d'action sur la membrane bactérienne.

Bien qu'une séquence standard d'AMP soit généralement courte (entre 20 et 50 acides aminés), sa longueur a une grande importance et peut moduler l'activité anti-microbienne. En effet, selon le mode d'action du peptide, une certaine taille de séquence est nécessaire afin d'interagir avec la bicouche lipidique, s'y insérer et y former des pores stables pour certains mécanismes. En général, il faut au moins 7 à 8 acides aminés pour

former une structure amphiphile. La longueur affecte également la structure secondaire et le mode d'action du peptide. Il a été estimé qu'au minimum 22 acides aminés sont nécessaires pour traverser la bicouche lipidique bactérienne pour les AMPs ayant une structure secondaire en hélice- α . Ce minimum s'élèverait à seulement 8 acides aminés pour les AMPs avec une structure de β -feuillet.⁷⁵

La charge nette des AMPs influençant leur capacité à se lier aux membranes cellulaires, il a été démontré dans la littérature qu'une corrélation directe entre la charge des AMPs et leurs activités anti-microbiennes était observable et qu'une augmentation de la charge nette des peptides conduit souvent à l'amélioration de l'activité des peptides.⁶⁹ Toutefois, d'autres études ont démontré que la position des acides aminés cationiques dans la chaîne peptidique impacterait plus l'activité des AMPs que l'augmentation de leur charge nette.⁸² De plus, pour des peptides dont la charge a été fortement augmentée positivement, une réduction de leur effet anti-microbien peut aussi être observée.⁷⁶

L'hydrophobicité des chaînes latérales des acides aminés joue aussi un rôle majeur dans l'efficacité des peptides. Les peptides dépourvus de résidus hydrophobes se fixent généralement faiblement à la membrane, tandis que les peptides à forte hydrophobie restent souvent plus longtemps sur la membrane. En d'autres termes, l'hydrophobicité est un critère majeur de l'action des AMPs car elle permet aux peptides solubles dans l'eau de se répartir et de s'insérer dans la bicouche lipidique. Cependant, une hydrophobicité excessive peut également réduire l'efficacité des peptides et entraîner une toxicité pour les cellules de mammifères.⁷⁵

Tous les paramètres précédemment cités sont interdépendants, il n'existe donc pas de solution standard pour optimiser l'efficacité des AMPs synthétiques ou dérivés d'AMPs naturels. Cependant, certaines approches peuvent être employées dans ce but. L'isomérisation L-à-D des acides aminés par exemple permet d'améliorer la stabilité et la longévité des peptides en insérant des acides aminés plus difficilement dégradables par les enzymes. La cyclisation des peptides, l'utilisation d'acides aminés non-naturels et l'«agrafage» des chaînes latérales pour forcer certaines conformations sont aussi des solutions employées.⁷⁶ Afin de concevoir des AMPs synthétiques et d'explorer l'optimisation de leur efficacité, différentes synthèses ont été mises au point. De plus, il est important de noter que les AMPs peuvent avoir une multi-activité, il est donc difficile d'établir des relations directes et générales entre structures, séquences et mécanismes d'action. Un nombre croissant de groupes de recherche explorent l'utilisation de modèles d'apprentissage automatique pour prédire l'activité des AMPs en se fondant sur leur séquence ou leurs propriétés physico-chimiques. Cependant, ce domaine de recherche en est encore à ses débuts.⁷³

2.1.3. Synthèse des AMPs

Généralement, les AMPs peuvent être produits par ribosome, sans ribosome ou synthétisés chimiquement. Dans la nature, les peptides sont générés par transcription

ribosomale par les animaux, les plantes et les insectes, ou de manière non ribosomale à l'aide d'enzymes par les bactéries et les champignons. Les AMPs peuvent ainsi être obtenus à partir d'organismes vivants, en appliquant des processus d'extraction et de purification plus ou moins complexes. Cependant, ces méthodes de production nécessitent une adaptation à chaque organisme d'origine pour garantir une bonne pureté et un bon rendement et ces procédés sont souvent coûteux en temps et en argent.

La modification génétique de certains organismes permet de contourner ces limitations en permettant la production d'AMPs spécifiques en grande quantité par l'expression et la modification des gènes d'une espèce hôte. Ces espèces hôtes sont principalement des bactéries ou des plantes, caractérisées par leur vitesse de croissance rapide et des propriétés génétiques, physiologiques et bio-chimiques bien connues. Cependant, cette méthode demeure elle aussi onéreuse.⁵¹

La synthèse chimique des AMPs, telle que la synthèse peptidique en phase solide (SPPS) et la synthèse assistée par micro-ondes, constitue une approche avantageuse pour la recherche. Elle est souvent moins coûteuse et permet un contrôle total de la synthèse de la chaîne peptidique, autorisant la production d'AMPs non naturels, comme les peptides contenant des isomères D. Cette méthode offre également la possibilité d'incorporer d'autres éléments dans la chaîne que les acides aminés, voire de créer de nouvelles séquences totalement artificielles. En outre, elle permet une production en quantité et en qualité intéressante.⁶⁹ Cependant la synthèse peptidique souffre encore d'inconvénients, comme la difficulté à produire des peptides complexes, comme les peptides circulaires.

L'utilisation de ces méthodes de synthèse a facilité la production à grande échelle de certains AMPs et a permis d'explorer l'impact de certaines altérations de la chaîne peptidique sur leur efficacité anti-microbienne. Ainsi, l'utilisation des AMPs pour lutter contre les micro-organismes est confirmée comme prometteuse, et leur exploration se poursuit.

2.1.4. Applications des AMPs

2.1.4.1. Comme nouvelle classe d'antibiotiques

Face à la menace croissante des infections bactériennes résistantes aux antibiotiques utilisés cliniquement, les AMPs se positionnent comme une solution prometteuse. Leur action rapide, leur large spectre d'activité et leur faible propension au développement de résistance en font des candidats attractifs. Le marché mondial global des AMPs connaît une croissance notable, estimé à 5 millions de dollars en 2020 et prévoit d'atteindre 6 millions de dollars d'ici la fin de 2027.⁵¹

Les AMPs peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec des antibiotiques conventionnels, des anti-viraux ou d'autres composants anti-microbiens pour obtenir un effet synergique.⁵¹ Bien que plusieurs centaines d'AMPs soient en cours d'essais cliniques, il n'existe que quelques AMPs actuellement approuvés par la FDA. La polymyxine B par

exemple, est efficace contre les bactéries Gram positives et négatives et est commercialisée pour traiter les infections des voies urinaires, la méningite, les septicémies et les infections oculaires. La vancomycine est quant à elle utilisée pour traiter les infections liées à des bactéries à Gram positif uniquement. Le nombre réduit d'AMPs commercialisés est principalement dû à certains défis concernant l'utilisation des peptides comme leur biodisponibilité et leur potentielle toxicité envers les cellules de mammifères, ce qui limite leur utilisation à une application cutanée pour le moment.

Cependant, certaines modifications et voies d'administration ont démontré que les AMPs peuvent conserver leur activité et avoir une toxicité réduite en les combinant avec d'autres molécules ou en les immobilisant sur d'autres matériaux. Leur immobilisation sur des molécules de PEG a notamment démontré une absorption tissulaire non spécifique et une toxicité cellulaire et une dégradation réduites et une augmentation de leur demi-vie sanguine.⁸¹

2.1.4.2. Comme revêtement pour les dispositifs médicaux et les surfaces à contact fréquent

La toxicité associée aux AMPs est souvent liée aux fortes concentrations utilisées pour compenser leur demi-vie relativement courte dans notre système. Cependant, dans la nature, il peut être observé que les AMPs sont conçus pour agir localement, notamment sur des surfaces. Le mucus épidermique de la peau de requin par exemple, contient des AMPs permettant d'y empêcher la croissance de micro-organismes.⁸³ Ainsi, il est donc encore une fois bon de s'inspirer de la nature pour développer de nouvelles solutions aux limitations actuelles concernant les AMPs. L'immobilisation stable des AMPs sur un biomatériau pourrait être la voie pour surmonter ces difficultés. L'immobilisation covalente des AMPs peut augmenter leur stabilité à long terme tout en diminuant leur toxicité, par rapport aux approches basées sur leur relargage. En outre, l'orientation correcte du peptide sur un matériau peut entraîner une activité accrue.⁸⁴ L'immobilisation des AMPs sur des surfaces afin de conserver leur efficacité anti-microbienne tout en limitant leur désavantage représente donc une piste prometteuse à explorer.

2.1.5. Avantages et défis de l'utilisation des AMPs comme revêtement

Contrairement aux antibiotiques classiques qui nécessitent des cibles cellulaires spécifiques, chaque AMP peut exercer des activités anti-microbiennes multiples, ce qui entraîne un faible potentiel de développer des résistances chez les bactéries.⁷⁹ En plus de ces avantages, leur utilisation est efficace sur les biofilms résistants aux antibiotiques et présente des effets positifs facilitant la reconstruction des plaies et le contrôle de l'inflammation.⁸² Finalement, les mécanismes d'action des peptides polycationiques sont souvent ciblés vers les membranes microbiennes chargées négativement, ce qui n'est pas le cas des membranes des cellules de mammifères et réduit donc leur potentiel de toxicité pour certaines concentrations inhibitrices pour les bactéries.⁸⁵ De plus, les méthodes de synthèses actuelles permettent d'explorer différentes modifications permettant

d'optimiser la sélectivité des AMP aux pathogènes, et de réduire leur activité envers les cellules de mammifères, comme avec l'utilisation d'isomères D et de lysine.⁵¹

Cependant, bien que les mécanismes d'action des peptides soient connus dans les grandes lignes, un grand nombre de mécanismes ne sont pas encore entièrement élucidés, leur efficacité contre les micro-organismes dépend d'un grand nombre de facteurs et celle-ci est majoritairement établie quand les peptides sont en solution. Bien que l'immobilisation de peptides à la surface soit un moyen de limiter leurs désavantages, il est important d'avoir conscience de l'impact des méthodes d'immobilisation sur l'efficacité des AMP. En particulier, les mécanismes d'action des AMPs nécessitent leur insertion dans les membranes microbiennes et parfois leur migration au sein de celle-ci. Le greffage des peptides sur une surface peut donc empêcher ces mécanismes et le choix de la méthode d'accroche a un impact majeur sur la conservation de leur efficacité. De plus, il a été démontré que dans certains cas, la densité surfacique de peptides en contact avec la paroi bactérienne doit atteindre un seuil pour avoir une efficacité suffisante.⁸⁶ Les conditions de greffages sur surfaces influençant la densité possible des AMPs, cet aspect doit donc être pris en considération.

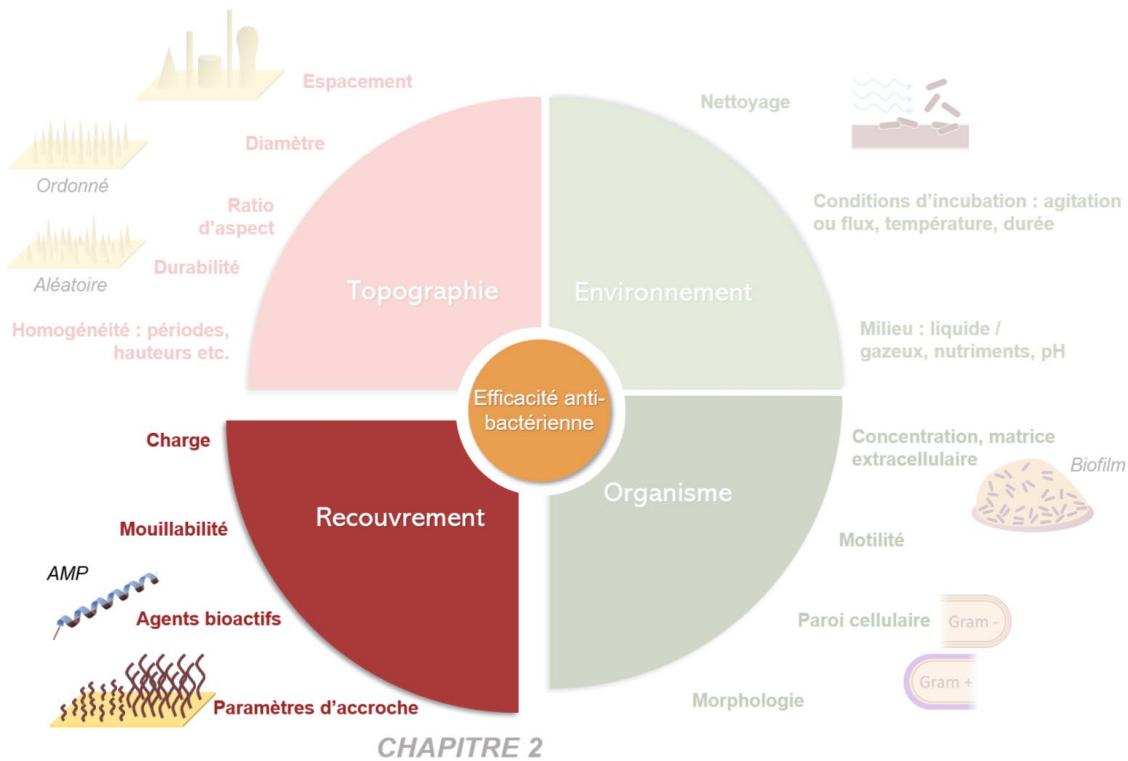


Figure 13 – Les différents facteurs pouvant influencer les propriétés anti-bactériennes d'une surface : focus sur les paramètres relatifs à la fonctionnalisation de surface.

2.2. Sélection des AMPs étudiés

2.2.1. Critères de sélection des peptides d'intérêt

Dans le contexte du développement de surfaces anti-microbiennes fonctionnalisées, la sélection de peptides doit être guidée par différents critères.

Premièrement, dans notre cas, l'étude fondamentale des paramètres d'immobilisation des AMPs nécessite une connaissance des mécanismes d'action du peptide étudié. Comme il a été établi dans la première partie de ce chapitre, les mécanismes d'action des AMPs sont nombreux et encore très peu élucidés. Afin de mieux comprendre et mettre en perspective les résultats de l'efficacité anti-microbienne des AMPs greffés aux surfaces, il était important de choisir des AMPs dont le mécanisme est connu. Concernant les autres critères, les bases de données mentionnées précédemment ont permis de rechercher et d'identifier des peptides pertinents pour notre étude.

Un deuxième critère déterminant pour la sélection des AMPs est leur efficacité à large spectre. Bien que les AMPs soient généralement efficaces contre différents micro-organismes, cela ne s'applique pas à tous les AMPs. Il est donc intéressant de pouvoir sélectionner des peptides efficaces contre de nombreuses espèces de bactéries, mais aussi contre différents organismes comme les champignons ou les virus.

De plus, les études évaluant l'efficacité des AMPs sont souvent menées en solution plutôt que lorsqu'ils sont immobilisés sur une surface. Bien qu'il soit envisageable d'effectuer une recherche d'activité anti-bactériennes pour de nombreux AMPs, l'étude d'AMPs ayant déjà démontré une efficacité après immobilisation a été privilégiée par souci de simplification de cette partie du projet.

Afin de faciliter la synthèse des peptides, un autre critère de sélection est la longueur de la séquence des AMP. Des peptides relativement courts (<50 acides aminés) et linéaires sont privilégiés par souci de simplicité pour la synthèse chimique. En effet, certaines séquences trop complexes sont difficilement synthétisables par SPPS et certaines séquences d'intérêt considérées pour ce projet ont été impossible à produire ou à purifier. C'est le cas notamment de la Gramicidine, qui est trop hydrophobe. Le choix des séquences étudiées a donc été aussi conditionné par la faisabilité et l'accessibilité de la synthèse.

De plus, l'absence de cystéine dans la chaîne principale est nécessaire afin de ne pas induire de greffage aléatoire (le choix de ce critère est justifié en partie 1.3.1.).

Concernant la bio-compatibilité des AMPs, choisir des peptides uniquement naturels dans un premier temps a semblé plus pertinent, car ils induisent souvent moins de risques de cytotoxicité. Cependant, sélectionner des AMPs dont l'absence totale de cytotoxicité a été prouvée réduit drastiquement la liste de candidats, ce critère est donc considéré comme moins important. De plus, comme pour l'efficacité, la toxicité des AMPs est la plupart du temps établi en solution et pour de très fortes concentrations. Permettre de

potentiellement observer des différences de toxicité quand les AMPs sont immobilisés peut donc être un sous-objectif du projet. De la même manière, l'absence totale de résistance n'est pas un critère majeur pour cette étude.

Après une veille bibliographique des AMPs pertinents et respectant les critères de sélections, une liste réduite des peptides d'intérêt a été établie (voir [Annexe B](#)). Parmi les candidats, un premier ensemble de deux peptides ainsi qu'un contrôle ont été sélectionnés et sont présentés dans les sections suivantes.

2.2.2. Cathélicidine humaine ou LL-37

Les cathélicidines sont une des deux sous-familles d'AMPs présents chez les mammifères, la deuxième étant les défensines. Une seule classe a été identifiée chez l'Homme dans cette sous-famille, nommée LL-37, dont les principales caractéristiques sont illustrées en Figure 14. Ce peptide est produit par les cellules telles que les neutrophiles et les cellules épithéliales. Il peut moduler la réponse immunitaire en recrutant les cellules compétentes sur les sites d'infection et favoriser la libération de cytokines inflammatoires.⁸¹

La cathélicidine humaine LL-37 est un des peptides anti-biofilm les plus étudiés; plus de 2 400 publications scientifiques lui ont été dédiées depuis 1996 selon PubMed. En plus de son action directe sur les membranes microbiennes, il a été démontré que cet AMP est aussi capable d'affecter le système de signalisation des cellules bactériennes. Ce peptide peut notamment inhiber la formation du biofilm, tel que celui de *P. aeruginosa*, à une concentration aussi faible que 0,5 µg/mL.⁸⁷⁻⁸⁹

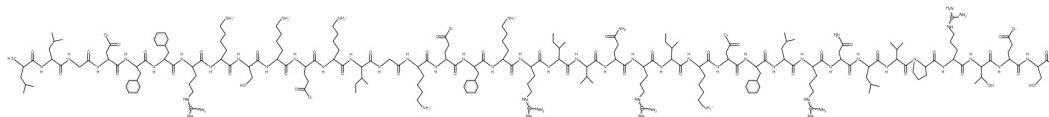
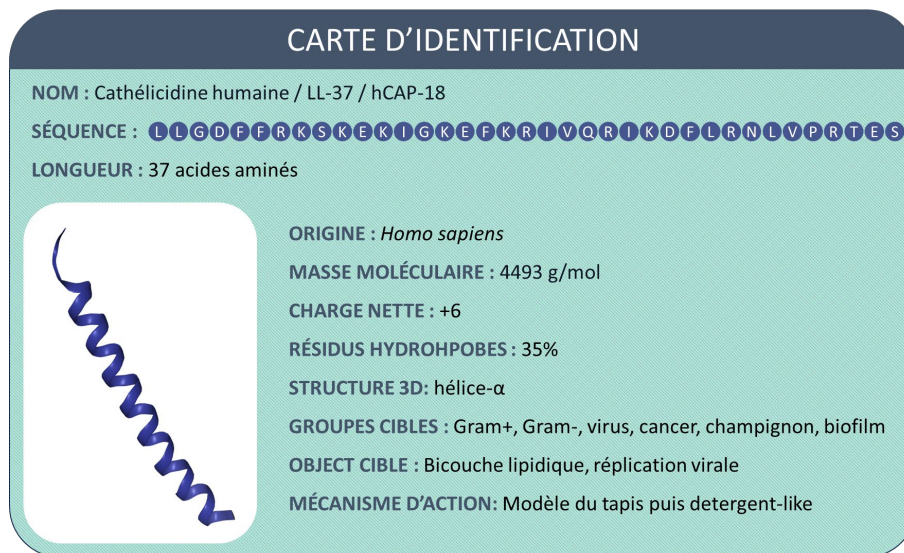


Figure 14 - Caractéristiques et propriétés physico-chimiques de la cathélicidine humaine LL-37. Données tirées de APD3, DBAASP et PubChem.^{70,71,90}

Son mécanisme d'action a été longuement étudié et il est maintenant établi que cet AMP suit un modèle de tapis à basse densité en surface de la cellule, puis une action de disruption de la membrane similaire à celle d'un détergent à plus haute densité.⁹¹ Une fois la membrane déstabilisée, le peptide LL-37 peut se transloquer dans la bactérie, où il interfère avec des cibles internes telles que l'ADN et nuit à des processus tels que la transcription. Les peptides recouvrent dans un premier temps la surface et s'associe 2 par 2 de manière anti-parallèle puis finissent par former des tétramères. Ce peptide nécessite une association d'au moins 4 peptides afin d'être fonctionnel.⁹²

Le peptide LL-37 possède de nombreuses autres propriétés intracellulaires. Il est par exemple connu pour stimuler la différenciation des cellules dendritiques et des cellules osseuses.⁹³ Malgré son potentiel évident, cet AMP n'est toujours pas approuvé comme agent thérapeutique. En cause, des effets cytotoxiques ont été démontrés en solution, ainsi que la possible apparition de résistances chez certaines bactéries.⁹⁴ Ce peptide faisant partie de notre système de défense naturel, une mauvaise utilisation risquerait de compromettre les barrières et mécanismes de protection de corps humain, et il est donc nécessaire de pousser son étude et la compréhension de son fonctionnement.

Concernant l'effet anti-bactérien de LL-37 greffé sur une surface, un certain nombre d'études ont démontré une activité anti-bactérienne sur différentes espèces au travers de différentes méthodes d'immobilisation. L'immobilisation du peptide KR-12, dérivé du LL-37, sur des surfaces en titane avec un espaceur PEG a démontré une augmentation de l'efficacité anti-bactérienne de la surface et une réduction de l'adhésion et de la formation de biofilms après 6 heures d'incubation avec *Staphylococcus epidermidis*.⁹⁵ De même, son immobilisation sur du polyétheréthercétone (PEEK) a démontré une bonne efficacité anti-bactérienne contre la même espèce tout en améliorant l'adhésion, la prolifération et la différenciation ostéogénique des cellules de mammifères et en promouvant l'ostéointégration de la surface.⁹⁶ L'immobilisation du peptide complet sur du titane a aussi démontré une augmentation importante du nombre de cellules lysées contre *Escherichia coli* lorsque celui-ci est immobilisé à l'aide d'un espaceur PEG et n'a en revanche démontré aucune activité lorsque le peptide est greffé sans espaceur ou de manière aléatoire et avec une orientation non-contrôlée.⁸⁸

2.2.3. Magainine I

La magainine-1, ainsi que son homologue à deux substitutions, la magainine-2, ont été découvertes en 1987 par Zasloff.⁶⁶ Cette découverte a eu lieu lors d'expériences sur des grenouilles africaines *Xenopus laevis*, où il a été observé que celles-ci présentaient des capacités de cicatrisation exceptionnelles et étaient rarement sujettes à des infections. Ces peptides, constitués de 23 acides aminés, dont le nom dérive du mot hébreu "bouclier", démontrent une activité contre un large éventail de micro-organismes, en particulier les bactéries à Gram positif.

CHAPITRE 2 • FONCTIONNALISATION AVEC DES PEPTIDES ANTI-MICROBIENS

Les magainines présentent une structure 3D étendue dans certaines conditions, mais forment une hélice- α au contact des membranes microbiennes. Leur mécanisme d'action anti-microbien est basé sur leur interaction avec les lipides des membranes cellulaires et elles sont capables de perforer les cellules par formation de pores toroïdaux, stables grâce à des oligomères composés de quatre à sept peptides auto-assemblés parallèlement et insérés perpendiculairement dans la bicouche de la membrane.⁹⁷ Un effet anti-adhésif sur les bactéries a de plus été observé, dû à la présence d'un groupe amine protoné à l'extrémité du peptide, les fonctions cationiques étant connues pour avoir des propriétés répulsives contre les bactéries.⁹⁸ Concernant la cytotoxicité de la Magainine-1, aucun effet négatif contre les cellules de mammifères n'a été clairement établi, au moins à faible concentration.⁹⁹

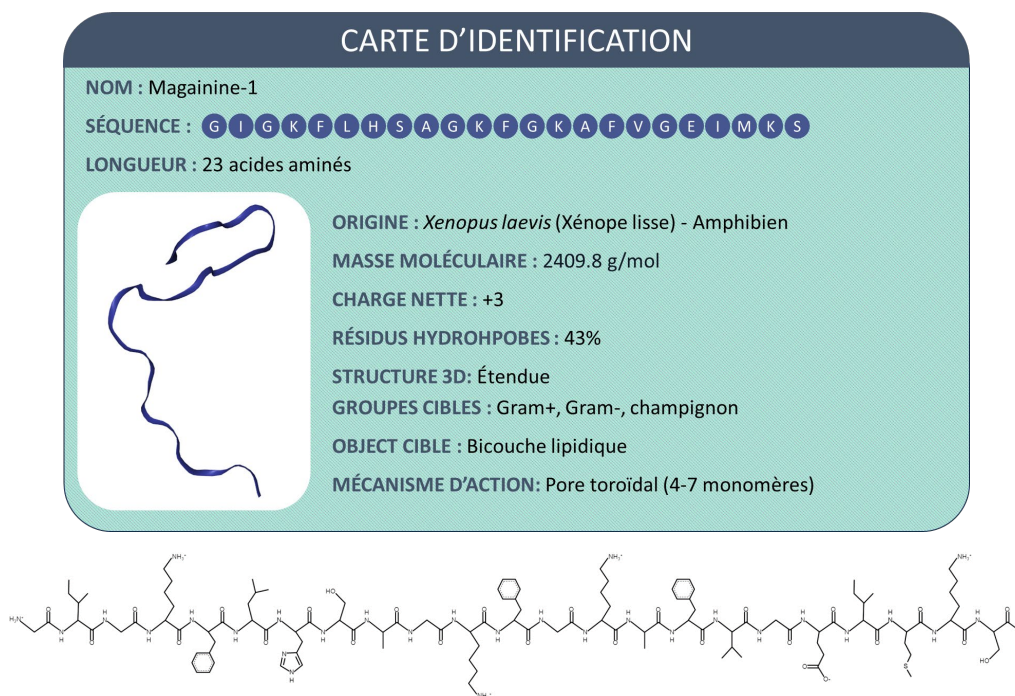


Figure 15 – Caractéristiques et propriétés physico-chimiques de la Magainine-1. Données tirées de APD3, DBAASP et PubChem.^{70,71,90}

La magainine-1 a démontré une efficacité anti-bactérienne, même une fois greffée chimiquement sur des broches en polymère contre différentes espèces Gram-positives (*Listeria ivanovii*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*). De plus, la Magainine-1 a démontré un pouvoir bactériostatique, même en étant immobilisée grâce à un espaceur court de 2 à 6 atomes de carbone.⁹⁸⁻¹⁰⁰

2.3. Fonctionnalisation de la surface par des AMPs

2.3.1. Choix du substrat et de la méthode d'immobilisation

Dans ce projet, le choix du substrat n'a pas été imposé par une application précise, cette étude se voulant plus fondamentale qu'applicative. Une large gamme de matériaux pouvait donc être considérée, les plus communs dans la création de surfaces anti-microbienne étant le silicium ou le dioxyde de silicium, le titane ou le dioxyde de titane, le fer, l'argent, l'or ou certains polymères. Le choix de la méthode de fonctionnalisation de surface par des AMPs est étroitement lié au substrat considéré. Parmi les objectifs de cette thèse, la parallélisation des expériences de caractérisation pour différents peptides est cruciale, une surface de plusieurs cm² accessible en grande quantité était donc nécessaire. De plus, afin de ne pas occulter l'effet de la fonctionnalisation, il est important de considérer des matériaux n'ayant pas de propriétés anti-microbiennes intrinsèques, comme l'argent par exemple. L'utilisation de matériaux bio-compatibles permet finalement de garder en considération les potentielles applications des surfaces développées.

L'immobilisation des AMPs peut être effectuée selon différentes approches. Parmi celles-ci les plus fréquentes sont les méthodes physiques d'adsorption, telles que le recouvrement couche par couche, et les fonctionnalisations chimiques par liaisons covalentes ou quasi covalentes, comme la chimie CLICK et l'utilisation de monocouches auto-assemblées (*Self-Assembled Monolayer* en anglais, ou SAM).^{86,93} Les méthodes d'adsorption physiques sont basées sur des liaisons faibles (non covalentes) qui ne permettent pas d'assurer la stabilité de la fonctionnalisation, ce qui peut entraîner un relargage des AMPs et une dégradation de la fonctionnalisation sur le long terme. Les approches d'immobilisation chimiques en revanche sont particulièrement intéressantes pour le revêtement des surfaces, car elles confèrent une grande stabilité aux liaisons surface/AMPs, limitent leur relargage et permettent même d'accroître leur activité anti-microbienne.⁹³

En prenant en considération les différents critères de durabilité, accessibilité et compatibilité avec les expériences, un substrat en verre recouvert d'une couche d'accroche en titane de quelques nanomètres puis d'une couche d'or de 30 nm, couplé à une fonctionnalisation par auto-assemblage sur thiols s'est imposé comme étant une solution pour ce projet. Cette combinaison substrat/fonctionnalisation présente de nombreux avantages. Premièrement, l'affinité très forte de l'atome de soufre pour les métaux nobles permet aux espèces thiolées de se lier très fortement (50 – 100 kJ/mol) avec l'or, permettant l'auto-assemblage des peptides sur la surface.^{101,102} Grâce aux méthodes de synthèse des AMPs telle que la SPPS (décrite en section 1.3.1.), l'insertion contrôlée d'un acide aminé contenant un atome de soufre au bout d'une chaîne latérale, permet de pouvoir ajouter facilement un ancrage aux peptides. De plus, il est par exemple possible de choisir l'orientation d'accroche des peptides par leur extrémité C-ter ou N-ter en

fonction de la position d'incorporation de l'élément dans la chaîne. Le protocole d'accroche est aussi largement simplifié, l'auto-assemblage en SAM des peptides thiolés étant réalisable en une unique étape : les séquences peptidiques en solution dans un tampon sont déposées directement sur le substrat puis incubées plusieurs heures durant lesquelles l'immobilisation et l'auto-organisation des AMPs a lieu. Cette approche permet aussi une flexibilité de la fonctionnalisation, car elle permet d'effectuer des co-dépositions simplement en réalisant des co-mélanges avec d'autres espèces thiolées, comme d'autres peptides ou des PEG par exemple. Finalement, cette approche est largement employée par de nombreuses équipes de recherche depuis plusieurs années, notamment au sein du laboratoire SyMMES.^{103,104} Les caractéristiques de cette méthode sont donc bien connues et caractérisées, et il a notamment été démontré que l'activité de certains peptides greffés à l'aide de thiols pouvaient durablement conserver leur efficacité jusqu'à six mois après leur première utilisation.¹⁰⁵

Au travers d'une participation au projet « MATISS » (Microbial Aerosol Tethering on innovative surfaces in the International Space Station) et à la fabrication d'échantillons pour le projet, d'autres types de fonctionnalisations ont été envisagées durant la thèse. Ce projet étudie les propriétés anti-bactériennes de matériaux dans l'espace et a pour objectif de permettre de mieux comprendre les mécanismes d'adhésion des biofilms dans l'ISS. Ce projet est issu d'une coopération entre l'agence spatiale française CNES, l'ENS de Lyon, le CEA Tech - LETI et l'entreprise de construction Saint-Gobain. Au travers d'une collaboration avec le CEA-LETI, des surfaces en quartz ont été fonctionnalisées avec le peptide LL-37. Un protocole de fonctionnalisation adapté à ce type de substrat et aux séquences peptidiques thiolés a donc été développé, utilisant une silanisation avec le (3-Aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) ainsi qu'une réticulation par N,N-diméthylformamide (DMF) et N-succinimidyl-3-maléimidopropionate (SMP).

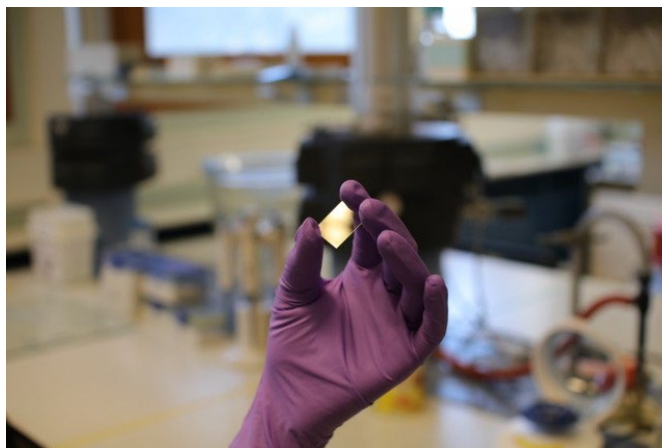


Figure 16 – Photographie d'une lamelle de quartz fonctionnalisée avec l'AMP LL-37 dans le cadre du projet MATISS.

Ce protocole a finalement été mis en place afin de produire des échantillons, en partant de solutions peptidiques de fonctionnalisation de concentrations 10, 50 et 100 μM . Deux

séries d'expériences sont menées en parallèle, avec des tests de contamination sur 8 et 16 mois à bord de l'ISS. Les échantillons réalisés sont partis rejoindre l'ISS le 5 juin 2023 à bord d'une fusée Falcon 9 de SpaceX et les résultats de ces expériences devraient pouvoir être disponibles en 2025.

2.3.2. Synthèse des peptides

Les AMPs synthétisés ont été fabriqués à façon par différentes sociétés ou laboratoires spécialisés dans la synthèse et l'analyse des peptides. Ceux-ci utilisent la synthèse peptidique en phase solide (SPPS) pour la production de séquences peptidiques. La SPPS est une méthode de synthèse séquentielle, permettant la création de peptides sur un support fixe, souvent un polymère insoluble.

Son principe réactionnel est illustré en Figure 17 : la SPPS met en œuvre des acides aminés protégés ajoutés successivement à la chaîne, du C-terminal au N-terminal, via un cycle comprenant des étapes de dé-protection, de lavage et de couplage. Initialement, le premier acide aminé est attaché à un support via une liaison covalente. Le groupe aminé du résidu fixé est ensuite déprotégé afin de le rendre réactif pour l'étape de couplage suivante. Un nouvel acide aminé protégé est couplé au groupe aminé déprotégé, prolongeant ainsi la chaîne peptidique et finalement, les réactifs et sous-produits n'ayant pas réagi sont éliminés par lavage.

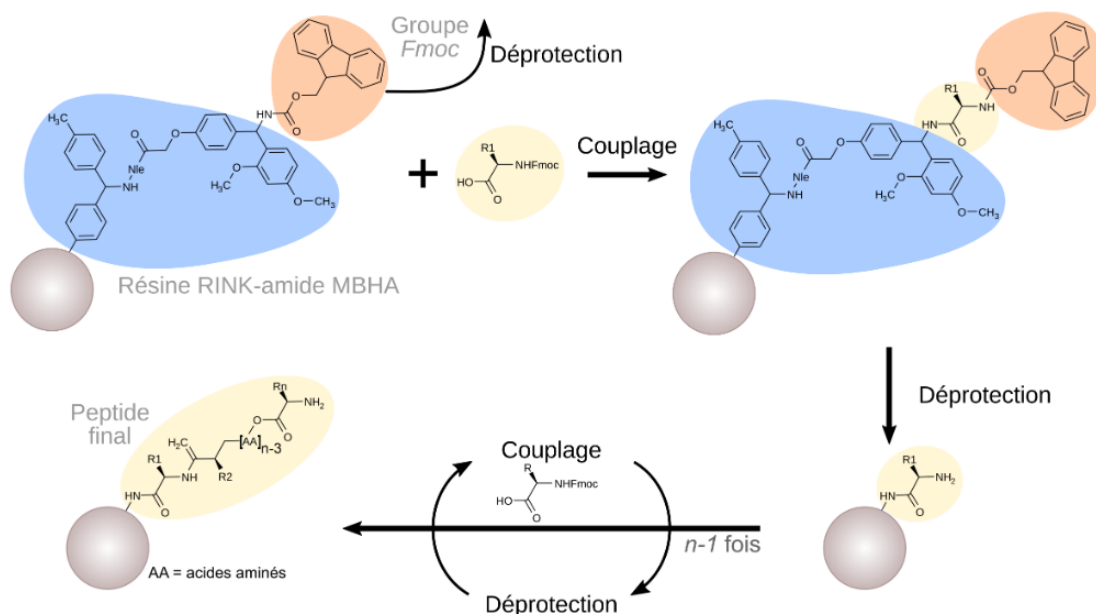


Figure 17 - Synthèse peptidique sur support solide (SPPS). Fmoc : fluorénylméthoxycarbonyle. Reproduit depuis la thèse de Pardoux, E.¹⁰³

L'automatisation et les améliorations de la SPPS ces dernières années ont rendu les peptides synthétiques plus accessibles pour diverses applications scientifiques et industrielles, notamment grâce à l'ajout d'espaces ou d'autres acides aminés au sein de

la chaîne. Cette approche possède un bon rendement grâce à l'élimination des espèces n'ayant pas réagi à chaque étape, avec peu de perte de produit final. Cependant, son utilisation pour certaines séquences particulières est parfois laborieuse.¹⁰⁶ Les séquences trop longues ou trop hydrophobes, par exemple, sont difficiles à synthétiser et à purifier.

2.3.3. Sélection des séquences contrôles

Afin de tester l'activité anti-microbienne des AMPs, des séquences peptidiques servant de contrôle négatif sont nécessaires afin de déterminer si les propriétés observées sont spécifiques aux AMPs utilisés, ou sont juste issues de la fonctionnalisation de la surface. Pour cela, il peut être intéressant de comparer leur activité à celle de peptide possédant des caractéristiques peut avantageuse pour l'interaction avec les bactéries, telles qu'une charge nette neutre ou anionique, une séquence très courte ou composée d'acides aminés ne présentant pas d'activité significative.

Dans de précédents projets, la leucocine A24, un segment de la bactériocine leucocine A possédant un caractère bactéricide réduit, a été utilisé pour immobiliser des bactéries. En plus d'avoir une faible activité anti-bactérienne et une séquence de longueur similaire à la magainine, ce peptide présente une charge nette neutre, ce qui en fait un bon candidat en tant que contrôle. La version randomisée de ce peptide a donc été utilisée comme contrôle pour des sondes à AMPs afin de conserver la même charge nette tout en défavorisant sa structure secondaire.¹⁰³ Cette séquence peptidique a donc été utilisée dans ce projet comme contrôle négatif de l'activité anti-bactérienne et une partie des expériences a été réalisée avec elle. Cependant, les résultats ont montré une activité anti-bactérienne non nulle et la validité du peptide contrôle a été remis en question et a mené à le supprimer des expériences. Les liens entre mécanismes d'action et séquence peptidique sont très complexes et la redistribution randomisée des mêmes acides aminés peut ne pas suffire à supprimer l'activité anti-bactérienne d'un peptide. Finalement, une charge nette neutre n'implique pas l'absence d'acides aminés chargés cationiquement dans la séquence et pouvant interagir avec les bactéries.

En revanche, il a été clairement établi dans la littérature que les charges cationiques des chaînes latérales des peptides ont un impact déterminant sur leur activité anti-bactérienne, car elles permettent leur interaction avec les membranes.¹⁰⁷ Il a donc été choisi comme nouveaux contrôles de partir de la séquence de la Magainine I et de substituer les acides aminés positifs tels que la lysine par des acides aminés négatifs comme l'acide glutamique afin d'annuler son activité. De nouveaux peptides contrôles négatifs ont donc été synthétisés par l'équipe de Didier Boturyn au Département de Chimie moléculaire de l'UGA et sont résumés dans le Tableau 4. Un contrôle de la propriété anti-adhésive a aussi été ajouté avec une fonctionnalisation d'une zone avec des PEG de 800 Da thiolés, connus pour être hydrophiles et anti-adhésifs.

2.3.4. Paramètres d'immobilisation

Le choix des paramètres d'immobilisation des séquences sélectionnées a un impact crucial sur l'efficacité des AMPs greffés.¹⁰⁸ Afin d'essayer d'optimiser les conditions d'immobilisation des peptides pour leur permettre de conserver leur activité anti-microbienne, une série de paramètres expérimentaux ont été explorés.

2.3.4.1. Espaceurs

L'ajout d'un espaceur à la fin de la chaîne peptidique permet de conditionner l'action des AMPs en surface. Dans la littérature, un certain nombre d'études a démontré que l'activité bactéricide de peptides comme le LL-37 et la Nisine pouvait entièrement disparaître si aucun espaceur n'était utilisé entre le peptide et la surface.^{86,88} Des espaceurs courts et peu flexibles permettent d'immobiliser les AMPs en limitant leur action anti-microbienne, ce qui peut être avantageux pour certaines applications comme l'utilisation d'AMPs comme sondes dans la détection de bactéries.¹⁰⁹ Dans notre cas, l'espaceur ne doit pas limiter l'activité des peptides. Il doit donc être suffisamment flexible pour permettre aux peptides d'interagir les uns avec les autres et suffisamment long pour permettre aux peptides de s'insérer dans les membranes microbiennes. Il a été démontré que ce paramètre est parfois plus déterminant encore pour l'activité des AMPs que la concentration en surface.¹⁰⁸

L'utilisation de PEG comme espaceur est une pratique courante, car ce polymère correspond aux exigences de longueur, de flexibilité et de biocompatibilité. De surcroît, celui-ci est connu pour avoir un effet anti-adhésif quand utilisé seul sur des surfaces. Afin de ne pas affecter l'activité des peptides, un espaceur n'ayant pas d'activité connue est préférable. Parmi le catalogue d'espaceurs proposé par les entreprises de synthèse peptidique, comme SB-PEPTIDE ou Proteomic Solutions, l'utilisation de β -alanine (voir Figure 18) a semblé pertinente par sa simplicité d'insertion dans la synthèse, sa versatilité, sa biocompatibilité et son absence d'activité.

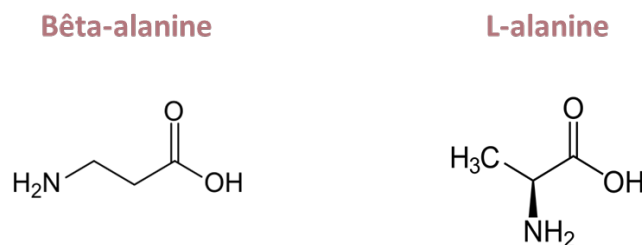


Figure 18 – Structure de la chaîne des deux isomères de l'acide aminé alanine.

La β -alanine est un isomère de l'acide aminé naturel de la L-alanine (ou simplement alanine) avec son groupement amine en position β par rapport au groupe carboxyle. L'ajout de cet acide aminé à une chaîne peptidique permet de rallonger celle-ci de 4 liaisons atomiques (contre 3 pour la L-alanine). L'utilisation d'une série plus ou moins longue de β -alanine permet de moduler la longueur de l'espaceur et est très facilement

mise en place durant la SPPS. Bien qu'il ait été démontré qu'une chaîne longue soit plus flexible et permette au peptide de mieux interagir avec les membranes, un lien trop grand peut amener à une réduction de la densité de surface des peptides.¹¹⁰ Afin de conférer aux AMPs différents degrés de liberté, deux espaceurs plus ou moins longs constitués d'une série de β -alanines ont été utilisés. Bien que l'espaceur le plus court soit formé d'une séquence de seulement trois β -alanines, la longueur de cet espaceur est de 12 liaisons atomiques, là où un effet anti-bactérien a pu être observé chez les magainines pour des espaceurs inférieurs à 10 liaisons atomiques.⁸⁶ L'espaceur le plus long est quant à lui composé d'une séquence de 10 β -alanines, soit une longueur de 40 liaisons atomiques. Pour chaque séquence, l'espaceur est indiqué dans le Tableau 4.

2.3.4.2. Orientation du peptide immobilisé

Le sens d'immobilisation des peptides sur une surface (par leur C-ter ou leur N-ter) a aussi été démontré comme ayant un impact capital sur leur activité. Les AMPs sont souvent constitués de différents segments actifs d'acides aminés. La lactoferrine humaine (hLF), par exemple, contient un domaine cationique N-terminal essentiel à l'activité anti-bactérienne.⁷⁵ Certains sens d'immobilisation peuvent donc complètement annuler l'activité des AMPs en rendant leurs sites d'interaction inaccessibles ou induisant des changements de conformation.¹¹⁰ Dans une étude par Gabriel *et al*, l'immobilisation aléatoire de LL-37 en surface s'est conclue en une baisse de l'activité là où l'immobilisation de peptide à partir de son N-ter a permis de restaurer ses propriétés anti-microbiennes.⁸⁸

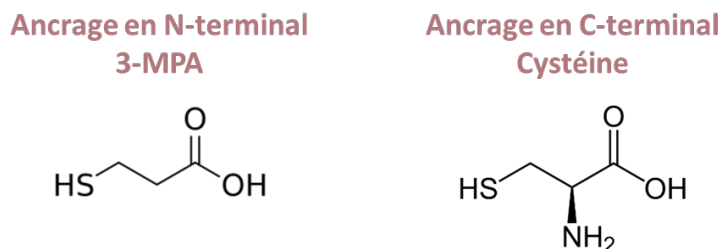


Figure 19 – Molécules utilisées pour immobiliser les AMPs selon une orientation préférentielle. 3-MPA : acide 3-mercaptopropionique.

Afin de caractériser l'activité anti-bactérienne des AMPs en fonction des deux orientations d'immobilisation sur la surface dorée, les séquences peptidiques ont été synthétisées en insérant une cystéine en début de chaîne ou un acide 3-mercaptopropionique (3-MPA) en fin de chaîne (voir Figure 19). Ces éléments sont ajoutés durant la SPPS après avoir rallongé le peptide avec la séquence de l'espaceur. Pour chaque séquence, l'ancrage utilisé et l'orientation du peptide sont résumés dans le Tableau 4.

2.3.4.3. Solubilisation des peptides

Afin de procéder à la fonctionnalisation des surfaces, les AMPs synthétisés doivent être solubilisés. La solubilité des AMPs dans différents solvants dépend directement de la

composition en acide aminés de la chaîne peptidique et de l'espaceur. Il est notamment possible de prédire la solubilité d'un peptide en se basant sur sa séquence.

Les peptides très courts (moins de cinq résidus), sont généralement très solubles dans l'eau ou dans un tampon aqueux. Il faut cependant vérifier l'absence d'acides aminés hydrophobes (comme W, L, I, F, M, V, Y) dans la chaîne. Si un trop grand nombre de résidus hydrophobes sont présents (> 50%) alors l'utilisation de solvants organiques comme le diméthylsulfoxyde (DMSO), le DMF ou l'acétonitrile est préconisée. Le DMSO est souvent le plus utilisé, étant un solvant organique idéal pour les applications biologiques en raison de sa faible toxicité. Par conséquent, avant de choisir un solvant et de dissoudre le peptide il est important de connaître le contenu en résidus hydrophobes des séquences à solubiliser et de calculer la charge nette du peptide pour déterminer le caractère acide, basique ou neutre du peptide en utilisant les règles suivantes :

- Attribuer une valeur de -1 à chaque résidu acide : D, E, et COOH C-terminal.
- Attribuer une valeur de +1 à chaque résidu basique : K, R et le NH₂ N-terminal.
- Attribuer une valeur de +1 à chaque résidu H à pH < 6 et zéro à pH > 6.
- Compter le nombre total de charges du peptide à pH 7 (D, E, K, R, COOH C-terminal et NH₂ C-terminal).

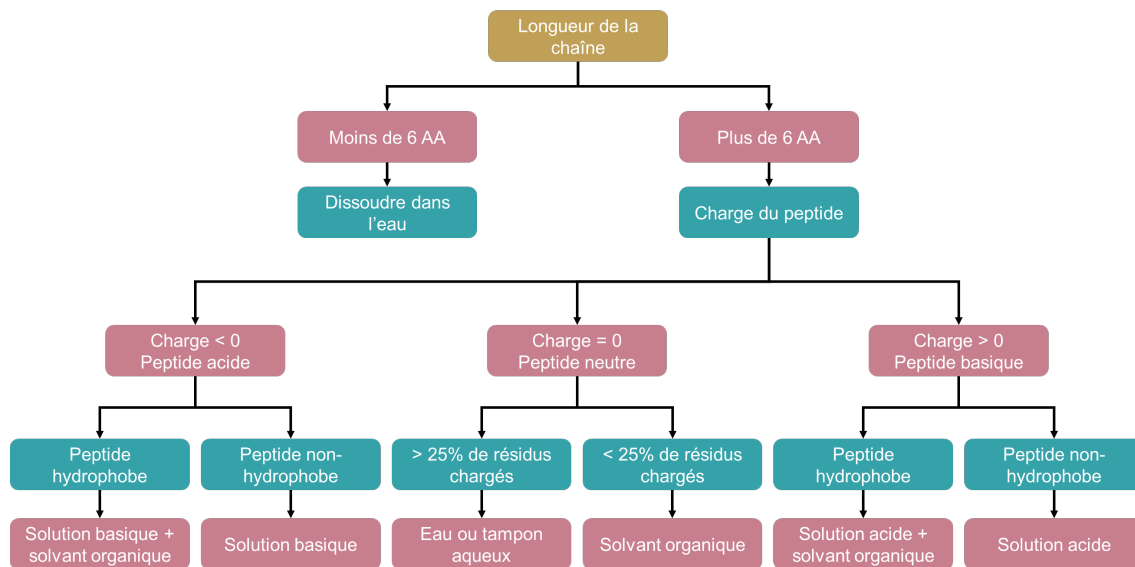


Figure 20 – Recommandations pour la sélection des solvants pour la solubilisation des peptides. Traduit depuis la page web « Peptide solubility guidelines » de Sb Peptide.

Pour chaque séquence, le solvant approprié est déterminé à l'aide du raisonnement illustré en Figure 20. L'utilisation d'ultrasons pendant quelques secondes peut aider à la dissolution des peptides. Des AMPs correctement solubilisés doivent donner une solution transparente et sans particule. Les solvants finalement utilisés pour chaque peptide sont résumés dans la dernière colonne du Tableau 4.

2.3.4.4. Concentrations des solutions peptidiques

Afin de permettre l'auto-assemblage des peptides sur l'or, le choix de la concentration des solutions peptidiques est capital. En effet, il a été démontré que la densité d'AMP greffés est directement corrélée aux concentrations utilisées durant les SAMs.¹¹¹ Comme discuté précédemment, optimiser la quantité de peptides immobilisés permet de ne pas entraver leurs mécanismes d'actions et donc de conserver leur efficacité anti-bactérienne au maximum. Dans une étude de 2018, une corrélation positive a été démontrée entre des concentrations de PEG thiolés de 0.05 à 1 mM et la densité de greffage des SAMs. Selon les concentrations, les densités obtenues s'étendent de 0,6 à 1,5 chaîne/nm². Dans la littérature, les concentrations de peptides utilisées varient de quelques μM à plusieurs mM selon les applications et les densités de greffage de 0.01 à 5 chaînes/nm².¹¹²⁻¹¹⁴

Dans des projets précédents, comme durant la thèse d'Éric Pardoux au sein de l'équipe CREAB du SyMMES et le post-doctorat d'Agnès Roux, l'impact de la concentration peptidique pour l'auto-assemblage de sondes sur or a été exploré. Une concentration optimale de 100 μM, a notamment été établie et utilisée efficacement pour fonctionnaliser les surfaces.¹⁰⁹ La densité des peptides greffés associée à cette concentration a aussi été déterminée par spectrométrie photoélectronique X (XPS). Parmi les peptides immobilisés étudiés, la densité de la magainine-1 avec un espaceur de 3 β-alanines a été quantifiée. Les résultats ont permis de mettre en lumière une densité de greffage des peptides entre 1,5 et 2 molécules/nm², ainsi que des distances inter-peptides inférieures à 9 Å, ce qui illustre la capacité des peptides greffés par SAMs de thiols à tapisser de manière très dense la surface fonctionnalisée.¹⁰³

En utilisant une densité de greffage théorique de 1,5 peptide/nm² et la concentration standard de 100 μM, il est possible de calculer le pourcentage de peptides présents dans la solution nécessaires pour fonctionnaliser uniformément un échantillon :

$$\%_{\text{greffé}} = \frac{N_{\text{AMP greffés}}}{N_{\text{AMP en solution}}} \times 100 \text{ et } \begin{cases} N_{\text{AMP greffés}} = \rho_{\text{greffage}} \times S_{\text{échantillon}} \\ N_{\text{AMP en solution}} = N_a \times V_{\text{solution}} \times C_{\text{solution}} \end{cases}$$

Avec N la quantité de peptides greffés ou en solution, la superficie de l'échantillon $S_{\text{échantillon}}$, le nombre d'Avogadro $N_a = 6,022\ 140\ 857 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, la densité de greffage ρ_{greffage} , le volume de solution peptidique V_{solution} et sa concentration C_{solution} .

Pour un échantillon de 0.56 cm² à fonctionnaliser avec 30 μL de solution peptidique, on obtient donc un total d'immobilisation de 4.7% de peptides présents dans la solution. L'utilisation d'une concentration de 100 μM est donc amplement suffisante pour permettre aux SAMs de se former correctement pour notre étude. La formation de SAMs avec d'autres concentrations a été utilisée pour le projet MATISS, cependant l'étude des paramètres de fonctionnalisation s'est principalement concentrée sur l'impact de l'orientation des peptides et de la longueur de l'espaceur.

2.3.4.5. Conditions d'auto-assemblage

Avant de procéder à l'auto-assemblage des peptides sur or, une étape clef du protocole de fonctionnalisation est le nettoyage de la surface par plasma. L'utilisation d'un plasma oxygène/argon permet entre autres d'éliminer les résidus de contamination organique qui pourrait nuire à la formation uniforme des SAMs. Cette étape permet aussi d'augmenter l'adhésion des thiols, car les forces nécessaires à la rupture des liaisons entre le sulfure et l'or sont plus importantes quand l'or est oxydé.¹⁰¹ Ce nettoyage s'accompagne de l'augmentation de la réactivité de la surface, de sa mouillabilité mais aussi de sa rugosité. Un protocole de nettoyage optimisé pour la fonctionnalisation de SAMs peptidiques peut être trouvé en [Annexe H2](#), basé sur celui développé par Éric Pardoux pendant sa thèse.

En ce qui concerne l'étape d'auto-assemblage en elle-même, l'utilisation de surface de plusieurs dizaines de mm² a mené à l'exploration de diverses méthodes pour fonctionnaliser uniformément les échantillons. Initialement, des essais ont été réalisés avec deux méthodes de fonctionnalisation. La première consiste en un dépôt d'une goutte de solution peptidique suffisamment grande pour recouvrir toute la surface de l'échantillon, soit 10 µL pour une surface de 0.25 mm² (voir Figure 21B). Pour la seconde méthode, une goutte de plus faible volume (soit 5 µL pour une surface de 0.25 mm²) est déposée et son étalement sur la surface est uniformisé en la recouvrant d'une lamelle de verre (voir Figure 21A). Néanmoins, ces méthodes se sont avérées non optimales. Le dépôt par goutte a abouti à une fonctionnalisation non-uniforme, la goutte ne s'étalant pas sur l'intégralité de la surface, et cela malgré l'augmentation de la mouillabilité de la surface grâce au plasma, diminuant son angle de contact de 70° à environ 30°. D'autre part, bien que le dépôt mettant en œuvre les lamelles présente les avantages d'utiliser une moins grande quantité de peptides et d'uniformiser le dépôt, sa fragilité a été un obstacle.

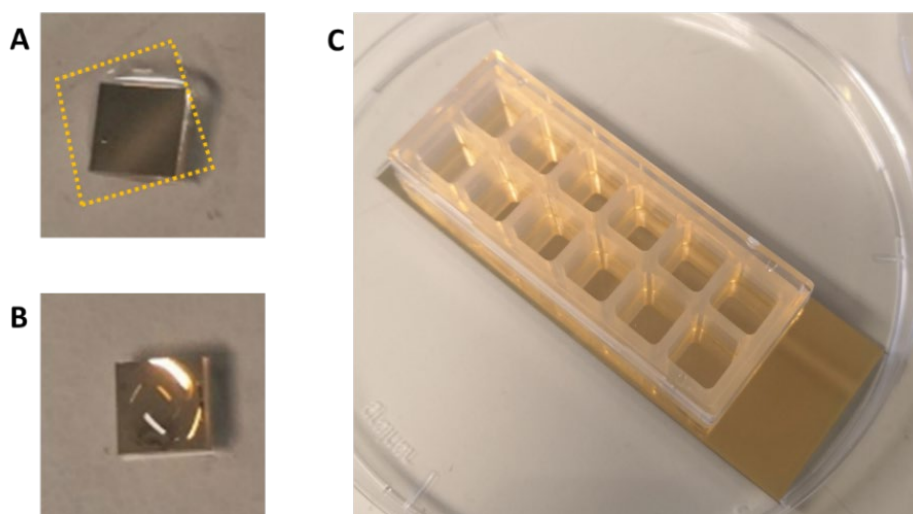


Figure 21 – Illustration des différentes méthodes de dépôt des peptides en solution sur différentes surfaces dorées. A : dépôt avec lamelle de verre, indiquée par les pointillés, sur un échantillon de 0.25 cm². B : dépôt par goutte sur un échantillon de 0.25 cm². C : dépôt en utilisant les chambres Ibidi® 12-wells de 12 puits de 0.56 cm².¹¹⁵

Par conséquent, dans un souci de praticité et d'uniformité une autre solution a été employée et le produit «12-wells chamber» d'Ibidi® a été employé (voir Figure 21C).¹¹⁵ En plus d'être biocompatibles, amovibles et auto-collantes sans employer d'adhésif, ces cuves en silicones permettent d'obtenir des bioréacteurs indépendants, où différentes fonctionnalisations et bactéries peuvent être étudiées en parallèle. Cette approche s'est aussi avérée plus avantageuse, car elle minimise la perte de solution peptidique à quelques microlitres, facilite l'identification des zones fonctionnalisées après le rinçage, et permet la récupération et la réutilisation de la solution en excès.

En résumé, deux AMPs ont été sélectionnés afin d'étudier l'impact des paramètres d'immobilisation sur leur activité anti-microbienne. Afin de déterminer les meilleures conditions d'accroches, l'immobilisation des AMPs selon les deux orientations est testée. Finalement, afin d'étudier l'impact de la longueur de l'espaceur sur l'activité des peptides, deux espaceurs seront testés pour le peptide Magainine-1. L'ensemble des séquences utilisées et de leurs caractéristiques est résumé dans le Tableau 4 ci-dessous. Finalement, un protocole de fonctionnalisation des surfaces dorées, illustré en Figure 22, a été optimisé pour la fonctionnalisation multiplexée des différents peptides sur des échantillons de plusieurs cm² et permet de pouvoir étudier simultanément et dans les mêmes conditions les propriétés anti-bactériennes des AMPs.

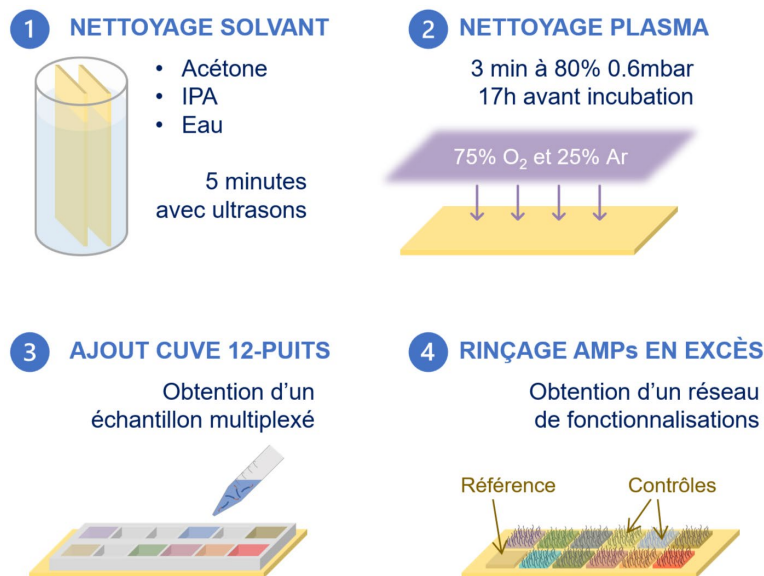


Figure 22 - Description des étapes principales du protocole de fonctionnalisation des échantillons avec des AMPs.
IPA : 2-propanol

CHAPITRE 2 • FONCTIONNALISATION AVEC DES PEPTIDES ANTI-MICROBIENS

Tableau 4 - AMPs commandés et fournis par Genecust et Sb Peptides et le laboratoire DCM. Les tailles théoriques de peptides sont estimées en utilisant l'approximation d'une longueur de $4.0 \pm 0.2 \text{ \AA}$ par acide aminé.¹¹⁶

Nom	Peptide	Orientation	Espaceur	Masse moléculaire	Taille	Solvant
LL37C	<u>LL-37</u>	C-terminal	3 β -alanines	4809.65 g/mol	16.4±8.2 nm	Eau 100%
						<i>H-LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES(β-ala)(β-ala)(β-ala)C-OH</i>
LL37N	<u>LL-37</u>	N-terminal	3 β -alanines	4794.63 g/mol	16.4±8.2 nm	Eau 100%
						<i>SHC3-(β-ala)(β-ala)(β-ala)LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-OH</i>
M3C	<u>Magainine I</u>	C-terminal	3 β -alanines	2726.57 g/mol	10.8±5.4 nm	Eau 100%
						<i>H-GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS(β-ala)(β-ala)(β-ala)C-OH</i>
M3N	<u>Magainine I</u>	N-terminal	3 β -alanines	2711.21 g/mol	10.8±5.4 nm	Eau 100%
						<i>3-MPA*(β-ala)(β-ala)(β-ala)GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS-OH</i>
M10C	<u>Magainine I</u>	C-terminal	10 β -alanines	3224.20 g/mol	13.6±6.8 nm	Eau 100%
						<i>NH2-GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)C-OH</i>
M10N	<u>Magainine I</u>	N-terminal	10 β -alanines	3208.75 g/mol	13.6±6.8 nm	Eau 100%
						<i>3-MPA*(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)-GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS-OH</i>
C-M3C	<u>Contrôle</u> <u>Magainine I</u>	C-terminal	3 β -alanines	2728 g/mol	10.8±5.4 nm	DMSO 15% Tween 15% PBS 70%
						<i>H-GIG<u>E</u>FLHSAG<u>E</u>FG<u>E</u>AFVGEIM<u>E</u>S(β-ala)(β-ala)(β-ala)C-OH</i>
C-M3N	<u>Contrôle</u> <u>Magainine I</u>	N-terminal	3 β -alanines	2713 g/mol	10.8±5.4 nm	DMSO 15% Tween 15% PBS 70%
						<i>3-MPA*(β-ala)(β-ala)(β-ala)GIG<u>E</u>FLHSAG<u>E</u>FG<u>E</u>AFVGEIM<u>E</u>S-OH</i>
C-M10C	<u>Contrôle</u> <u>Magainine I</u>	C-terminal	10 β -alanines	3225 g/mol	13.6±6.8 nm	DMSO 15% Tween 15% PBS 70%
						<i>H-GIG<u>E</u>FLHSAG<u>E</u>FG<u>E</u>AFVGEIM<u>E</u>S(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)C-OH</i>
C-M10N	<u>Contrôle</u> <u>Magainine I</u>	N-terminal	10 β -alanines	3210 g/mol	13.6±6.8 nm	DMSO 15% Tween 15% PBS 70%
						<i>3-MPA*(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)(β-ala)-GIG<u>E</u>FLHSAG<u>E</u>FG<u>E</u>AFVGEIM<u>E</u>S-OH</i>

*3-MPA = acide 3-mercaptopropionique

2.4. Caractérisation des propriétés physico-chimiques des surfaces fonctionnalisées avec des AMPs

2.4.1. Difficultés d'obtenir des données quantitatives et qualitatives

De nombreuses techniques analytiques peuvent être utilisées afin de caractériser les peptides immobilisés en surface : microscopie à effet tunnel, spectroscopie d'impédance électrique, la XPS, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), spectroscopie dichroïque circulaire (CD), etc. Ces méthodes permettent d'apporter des informations cruciales sur la structure et la conformation des peptides. Cependant leur faible sensibilité en surface et leur incapacité *in situ* limitent leur application pour étudier les peptides en temps réel.¹¹⁰ Plus récemment, des techniques telles que la spectroscopie vibrationnelle à somme de fréquence (SFG) ont été utilisées pour étudier les peptides aux interfaces solide/liquide *in situ* et ont permis de déterminer les orientations et structures secondaires de différents peptides.¹¹⁰ D'autres techniques quantitatives ou semi-quantitatives telles que les mesures par micro-balances à quartz (QCM) ou le marquage fluorescent, permettent d'obtenir des données comme l'épaisseur des SAMs et la densité de greffage des AMPs, mais celles-ci sont soit trop peu fiables, soit peu adaptées pour des surfaces possédant plusieurs zones fonctionnalisées avec différents AMPs.

2.4.1.1. XPS

La densité de surface des peptides est un paramètre dépendant intrinsèquement du type de peptide étudié, de la méthode d'accroche ainsi que de l'espaceur utilisé et elle peut être difficilement contrôlable. Elle peut dépendre de la densité des groupes réactifs, les conditions de couplage, de l'encombrement stérique, etc. Une relation linéaire entre la densité de surface et l'efficacité des AMPs a pu être démontrée dans certains cas, et des concentrations trop basses de LL-37 peuvent même supprimer leur activité.⁸⁶ Pouvoir déterminer précisément ces densités est donc pertinent pour prendre du recul sur les résultats de la quantification des propriétés anti-microbiennes des surfaces fonctionnalisées et de mieux comprendre les mécanismes d'interactions avec les membranes une fois greffés.

Comme évoqué précédemment, la XPS a pu être utilisée dans des projets antérieurs pour quantifier la densité de greffage des peptides sur or. Lors de la thèse d'Éric Pardoux, les expériences d'analyse en XPS ont été menées par Vincent Humblot, au Laboratoire de réactivité de surface (Sorbonne Université, Paris). Cependant, cette méthode nécessite des équipements spécifiques, une expertise et une connaissance approfondie en analyse des spectres XPS. Les données quantitatives obtenues dépendent grandement des modèles de fit utilisés et sont donc à considérer avec prudence. La XPS n'a donc pas été utilisée pour quantifier la densité de surface des peptides.

2.4.1.2. Marquage radio-isotopique

L'une des premières méthodes historiques de détection moléculaire a été l'utilisation de radio-isotopes et son utilisation a révolutionné la biochimie moderne.¹¹⁷ Elle a pu être

utilisée au sein du SyMMES pour quantifier la densité d'aptamères greffés sur des surfaces d'or par SAMs en remplaçant un atome de phosphore par un radio-isotope ^{32}P sur le dernier nucléotide thymine des séquences testées.^{118,119} Des densités croissantes dans la gamme de 1 à 8 pmol/cm² ont pu être mesurées pour des solutions de dépôt possédant des concentrations de 0,1 à 30 μM . De manière similaire, le marquage isotopique est une méthode permettant de déterminer la densité de peptides en surface en les marquant avec un isotope tel que le ^{125}I .¹²⁰ Ces approches sont parmi les plus précises pour quantifier l'abondance des protéines et des peptides. Cependant, cette caractérisation nécessite des équipements spécialisés peu disponibles et l'utilisation de molécules marquées par des isotopes soulève des problèmes de sécurité et de santé.

En résumé, les méthodes présentées précédemment permettent toutes d'apporter des précisions quant au comportement des peptides greffés en surface. Cependant, les objectifs du projet sont davantage d'assurer un suivi de la répétabilité du protocole de fonctionnalisation que d'obtenir la réelle quantification de la densité de greffage. Une approche plus empirique, mais plus simple a donc été choisie à cet effet, à savoir la mesure de l'angle de contact.

2.4.2. Mesure de l'énergie de surface

La mesure de l'angle de contact est une méthode empirique permettant de déterminer la capacité d'un liquide à mouiller une surface. En fonction de l'angle mesuré entre la surface horizontale et le point de contact de la goutte, il est possible de remonter à l'énergie de surface du matériau étudié. Par convention, les surfaces dont l'angle de contact avec l'eau est inférieur à 90° sont qualifiées d'hydrophiles, celles dont l'angle est supérieur à 90° sont hydrophobes et finalement les surfaces pouvant atteindre des angles de plus de 150° sont qualifiées de super-hydrophobes. Comme il a été établi précédemment, la mouillabilité de la surface peut jouer un rôle essentiel dans l'adhésion des micro-organismes. La mesure de l'angle de contact des SAMs peptidiques permet d'avoir une estimation de cette énergie et de suivre son évolution en fonction des peptides et de leurs paramètres d'accroche. De plus, cette méthode peut être mise en place facilement et rapidement dans un protocole de routine de vérification de la fonctionnalisation. Elle a donc été utilisée pour contrôler la fonctionnalisation des différents peptides testés.

Les résultats de cette mesure qualitative, illustrés en Figure 23, démontrent une augmentation de l'hydrophilie de la surface fonctionnalisée pour l'ensemble des AMPs en comparaison de l'or plan, à l'exception de LL-37. Il est important de noter que les énergies de surfaces des AMPs ayant la même extrémité d'accroche (N ou C) suivent les mêmes tendances, indépendamment de l'espaceur. Ce résultat illustre bien la présence des peptides en surface et impliquerait que l'auto-assemblage des peptides se fait sans repliement ou « effondrement » de la séquence peptide+espaceur, même pour les espaceurs longs. Le co-mélange des peptides à 50% avec des PEG800 thiolés a démontré

une réduction encore plus importante de l'angle de contact pour tous les peptides, à l'exception de la magainine-1 immobilisée en C-ter.

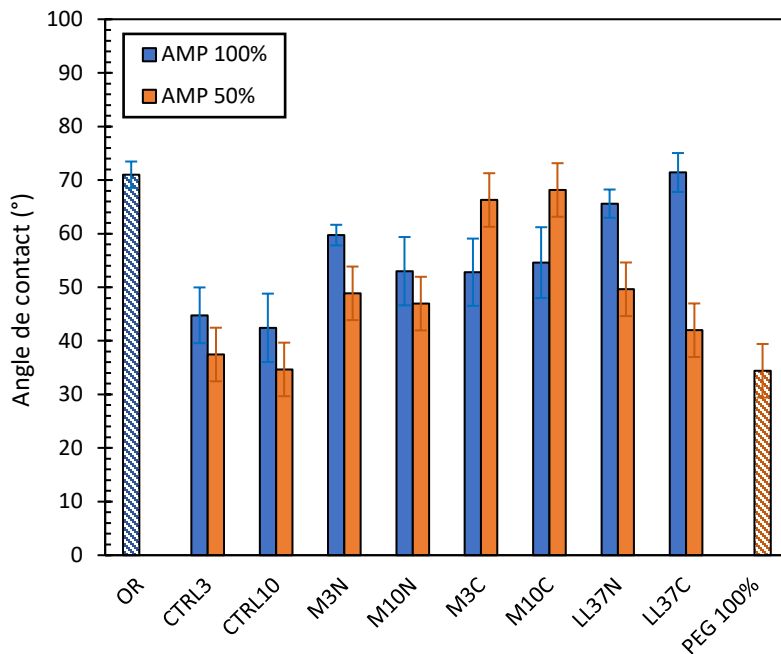


Figure 23 – Évolution de l'angle de contact pour les différentes séquences peptidiques lors de l'auto-assemblage sur surface d'or d'une solution à 100% constituée de peptides et lors d'un co-mélange à 50% avec des PEG800 thiolés. Les peptides CTRL3 et CTRL10 sont les contrôles négatifs anciennement utilisés pour le projet, la leucocine A24 aléatoire avec un espaceur 3 et 10 β -alanine. Les moyennes et barres d'erreurs sont issues de la mesure de 3 gouttes à différents endroits de la surface.

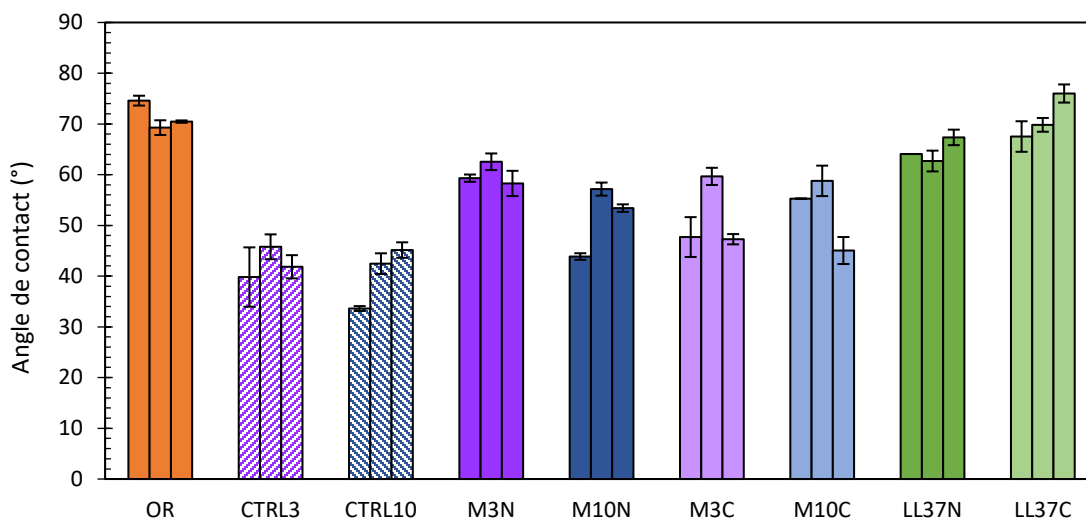


Figure 24 – Variabilité inter-expériences des fonctionnalisations peptidiques. Pour chaque série une nouvelle solution est diluée à la concentration finale de 100 μ M à partir d'un aliquot conservé à -80°C et auto-assemblé sur un substrat neuf, nettoyé au plasma. La mesure d'angle de contact est effectuée 18h après la fonctionnalisation et après rinçage de la surface d'or à l'éthanol. Les moyennes et barres d'erreurs sont issues de la mesure de 3 gouttes à différents endroits de la surface d'or.

Le suivi de l'évolution de l'énergie de surface de la fonctionnalisation au cours de différentes expériences tant à confirmer la répétabilité du protocole de fonctionnalisation. Les résultats illustrés dans la Figure 24 permettent d'établir une gamme de variabilité restreinte de la mesure de l'angle de contact et de faire le suivi et l'identification des problèmes de greffage lors de la fonctionnalisation.

2.5. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, les AMPs (AMP) ont été présentés comme une solution prometteuse pour la création de surfaces anti-microbiennes. Leurs mécanismes variés et l'influence de nombreux paramètres sur leur efficacité et leur durabilité en font des objets d'étude complexes, dont notre connaissance doit être approfondie.

Après une revue intensive de la littérature, une liste restreinte des peptides pertinents pour leur immobilisation sur des surfaces d'or modèles a été établie, et parmi celles-ci un duo de peptide, la cathélicidine humaine LL-37 et la magainine-1, a été sélectionné pour l'étude des paramètres d'immobilisation des AMP.

Une méthode d'immobilisation basée sur la formation de monocouches auto-assemblées à l'aide de thiols sur une surface en verre doré a été sélectionnée et mise en place. La bonne fonctionnalisation des surfaces a été confirmée par mesure d'angle de contact et le suivi de la variation de ce paramètre lors de différentes expériences a permis de confirmer la répétabilité du protocole de fonctionnalisation.

En étudiant l'impact de la longueur de l'espaceur et de l'orientation du peptide sur leur activité anti-microbienne au travers du développement d'une méthodologie standard, nous espérons pouvoir approfondir notre connaissance de leur mécanisme d'interaction avec les membranes et examiner leur combinaison avec d'autres approches, comme la nano-fabrication.

CHAPITRE 3

LES SURFACES NANO- STRUCTURÉES BIO- INSPIRÉES

3.1.	Surfaces nano-structurées : morphologies, propriétés, fabrication et enjeux	75
3.2.	Sélection de la méthode de fabrication des échantillons nano-structurés	86
3.3.	Résultats de l'évaluation de l'influence des paramètres de dépôt	94
3.4.	Échantillons sélectionnés pour la caractérisation de l'activité anti-bactérienne	105
3.5.	Conclusion du chapitre	107

CHAPITRE 3

LES SURFACES NANO-STRUCTURÉES BIO-INSPIRÉES

3.1. Surfaces nano-structurées : morphologies, propriétés, fabrication et enjeux

3.1.1. Surfaces naturelles

Les êtres vivants sont le produit de milliards d'années d'adaptation à leur environnement. Chaque caractéristique, chaque comportement a été façonné par l'évolution pour maximiser leurs chances de survie. L'épiderme est la première barrière de protection des êtres-vivants contre les agressions extérieures, il est donc attendu de le voir développer des mécanismes de défense. Chez les insectes par exemple, la pollution de leurs ailes par des particules étrangères peut nuire à leur fonctionnalité et donc à leur survie. Chez de nombreuses espèces animales et végétales, l'épiderme présente des micro- et nano-structures, qui leur confère différentes propriétés : surface super-hydrophobe, super-hydrophile, auto-nettoyantes¹²¹, anti-adhésives, anti-corrosives, anti-givre^{122,123}, auto-réparatrices, etc. Les surfaces pouvant posséder ces propriétés variées sont souvent classifiées en deux types d'activité : biocide ou anti-salissure.

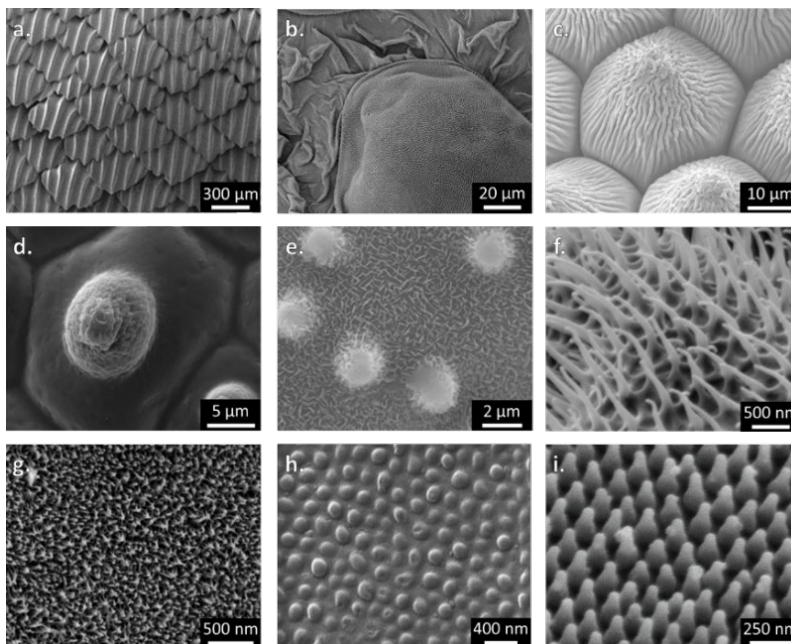


Figure 25 - Images MEB de micro- et nano-structures anti-microbiennes naturelles présentes chez différentes espèces animales et végétales **a.** Peau de requin, superhydrophobe¹²⁴ **b. et f.** Peau de gecko, superhydrophobe¹²⁵ **c.** Pétale de rose, superhydrophobe¹²⁶ **d.** Feuille de lotus, superhydrophobe¹²⁶ **e.** Feuille de riz, superhydrophobe¹²⁶ **g.** Aile de libellule, superhydrophobe¹²⁷ **h.** Ailes de cigales, hydrophile¹²⁸ **i.** Ailes de cigales, hydrophobe¹²⁹. Images reproduites

avec permission des éditeurs ^(124,125,127,128) ou en libre accès ^(126,129) <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
Recadrés à partir des originaux).

Ces surfaces présentent des morphologies diverses : piliers, fils, colonnes, pores, cônes, spinules (petites épines molles) et pointes. Les nano-piliers sont largement les plus étudiés, représentant environ 45% des études.¹³⁰ Cette structuration peut se retrouver à l'échelle nanométrique (1 – 1000 nm) mais aussi micrométrique (1 – 30 µm). Quelques nano-structurations naturelles sont illustrées en Figure 25.

L'une des études pionnières concernant l'exploration de la nano-structuration naturelle est celle des propriétés et des mécanismes des ailes de cigales par Ivanova *et al.*⁵³ Il y est notamment démontré qu'indépendamment de la chimie de surface de l'aile, c'est réellement l'interaction physique avec les piliers présents en surface qui est responsable de l'effet bactéricide. Contrairement à d'autres approches anti-microbiennes, comme la fonctionnalisation chimique, ce type de surface bénéficie donc d'une action passive, ne nécessitant pas d'activation ou de régénération. Afin de tirer profit de cette découverte et de mieux en comprendre les mécanismes, plusieurs équipes de recherche ont décidé de s'inspirer de surfaces naturelles afin de fabriquer des surfaces artificielles possédant des propriétés similaires.

3.1.2. Surfaces synthétiques et méthode de fabrication

Un certain nombre de surfaces artificielles ont été directement inspirées des nano-structures des surfaces naturelles.¹³¹ En 2006, Zhang *et al.* ont fait partie des premiers à essayer de reproduire des nano-structures d'ailes de cigales, en utilisant la lithographie par nano-impression.¹³² Depuis, une variété de méthodes inspirées de domaines comme la microélectronique, l'électrochimie, le biomédical et les technologies de l'information a pu être appliquée à la nano-structuration bio-inspirée.

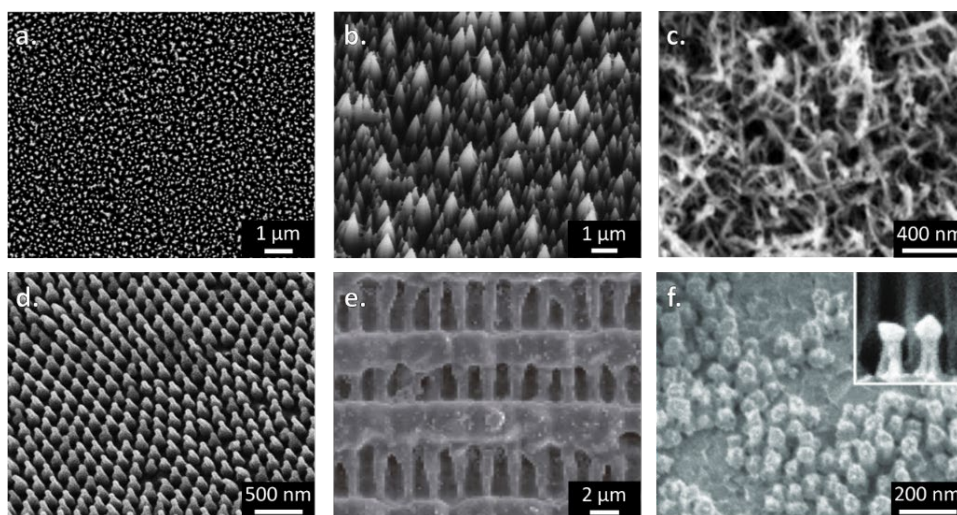


Figure 26 - Images MEB de micro- et nano-structures anti-microbiennes synthétiques **a.** Silicium noir, gravure par ions réactifs¹³³ **b.** Diamant, gravure par ions réactifs¹³⁴ **c.** Titane, gravure hydrothermale¹³⁵ **d.** PMMA, lithographie¹³⁶ **e.** Polystyrène, ablation par interférences laser directes (DLIP)¹³⁷ **f.** Or, gravure plasma et électrodépôt¹³⁸. Images

reproduites avec permission des éditeurs ^(134,136-138) ou en libre accès ^{(133,135 ; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> Recadrés à partir des originaux).}

La grande diversité de ces techniques a permis de développer des structurations aux dimensions et à la morphologie diverses, comme illustré en Figure 26. Les matériaux les plus utilisés pour réaliser ces surfaces sont le silicium, le diamant, le graphène, les métaux (acier inoxydable, dioxyde de titane, or, oxyde de zinc, etc) et certains polymères organiques.^{54,139}

Prêt de 40% des études évaluant les propriétés bactéricides de structures bio-inspirées utilisent comme matériau le titane, souvent employé dans le biomédical, et 35% le silicium, utilisé classiquement comme substrat en fabrication.¹⁴⁰ Les méthodes de fabrication sont souvent catégorisées en méthodes « top-down » et « bottom-up », illustrées en Figure 27.

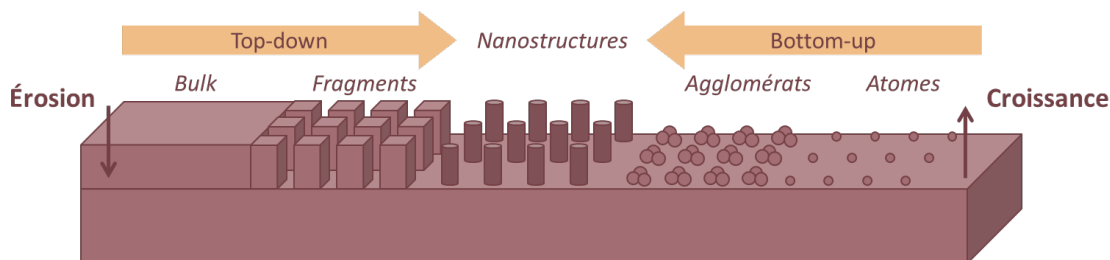


Figure 27 – Principes et étapes des approches de fabrication « top-down » et « bottom-up »

Pour générer les nano-structures, l'approche « top-down » est basée sur la décomposition ou l'érosion de la surface brute du matériau, là où l'approche « bottom-up » implique l'assemblage d'atomes en structures plus grandes par croissance du matériau. Pour la fabrication de surfaces bio-inspirées, des méthodes de fabrication appartenant aux deux catégories sont utilisées. Les techniques les plus répandues, leurs avantages et leurs inconvénients sont résumés dans le Tableau 5.¹⁴⁰⁻¹⁴² L'approche « bottom-up » présente l'avantage d'être plus économique, facile à utiliser et offre un contrôle optimal des paramètres de dépôt, permettant ainsi d'obtenir une grande diversité de morphologies. Cependant elles présentent souvent plus de défauts structurels que les méthodes « top-down » et sont plus difficilement applicables à des substrats de grande taille.¹⁴¹

De nombreux autres processus existent afin de micro et nano-structurer des surfaces. Leur développement ces dernières années, en grande partie motivé par l'intérêt croissant dans le domaine de la microélectronique, a permis d'obtenir un catalogue de surfaces anti-bactériennes de plus en plus étendu, utilisant différentes morphologies et différents matériaux. Les propriétés des surfaces fabriquées dépendent intrinsèquement des matériaux et des techniques de structuration employées et la relation entre surface et effets anti-bactérien est encore en cours d'élucidation de nos jours.

CHAPITRE 3 • LES SURFACES NANO-STRUCTURÉES BIO-INSPIRÉES

Tableau 5 – Spécificités des méthodes de fabrication les plus répandues pour la production de surfaces bactéricides nano-structurées bio-inspirées.

Technique	Résolution	Avantages	Inconvénients
LITHOGRAPHIES			
Avec masque			
Optique	90 nm	Polyvalence, grand débit	Résolution limitée par la longueur d'onde, équipement coûteux, uniquement possible sur surfaces planes
Par nano-implosion	30 nm	Grandes surfaces, grand débit et permettant de hauts ratios d'aspect	Nombreuses étapes et contrôle nécessaires des paramètres, difficilement industrialisable, matériaux compatibles limités
À rayon X	50 nm	Grand débit, haut ratio d'aspect	Coûteux, fabrication des masques difficiles
Sans masque			
À faisceau d'électrons	<10 nm	Haute résolution, grand contrôle de la morphologie	Technique lente donc faible débit, peu adapté à l'industrialisation et technologie coûteuse
GRAVURES			
Hydrothermale	10 nm	Contrôle des paramètres géométriques, fabrication de grandes surfaces, peu coûteux.	Difficultés à prédire la morphologie
Plasma	1 µm	Grand débit	Coût élevé, instrumentation complexe
À ions réactifs (RIE)	10 nm	Plus grande précision et spécificité que plasma, grand débit	Coût élevé, instrumentation complexe
Humide	5 µm	Grand nombre de matériaux, sélectif, simple	Souvent isotropique, pauvre résolution
MÉTHODES ÉLECTROCHIMIQUES			
Anodisation	10 nm	Processus simple, grand débit, nano-structures homogènes et hautement organisées	Matériaux limités et faible contrôle de la géométrie

La section suivante vise à expliciter les hypothèses et débats qui entourent la compréhension de l'influence des paramètres de surface sur leurs propriétés anti-microbiennes. Les paramètres dont il est question sont détaillés en Figure 28.

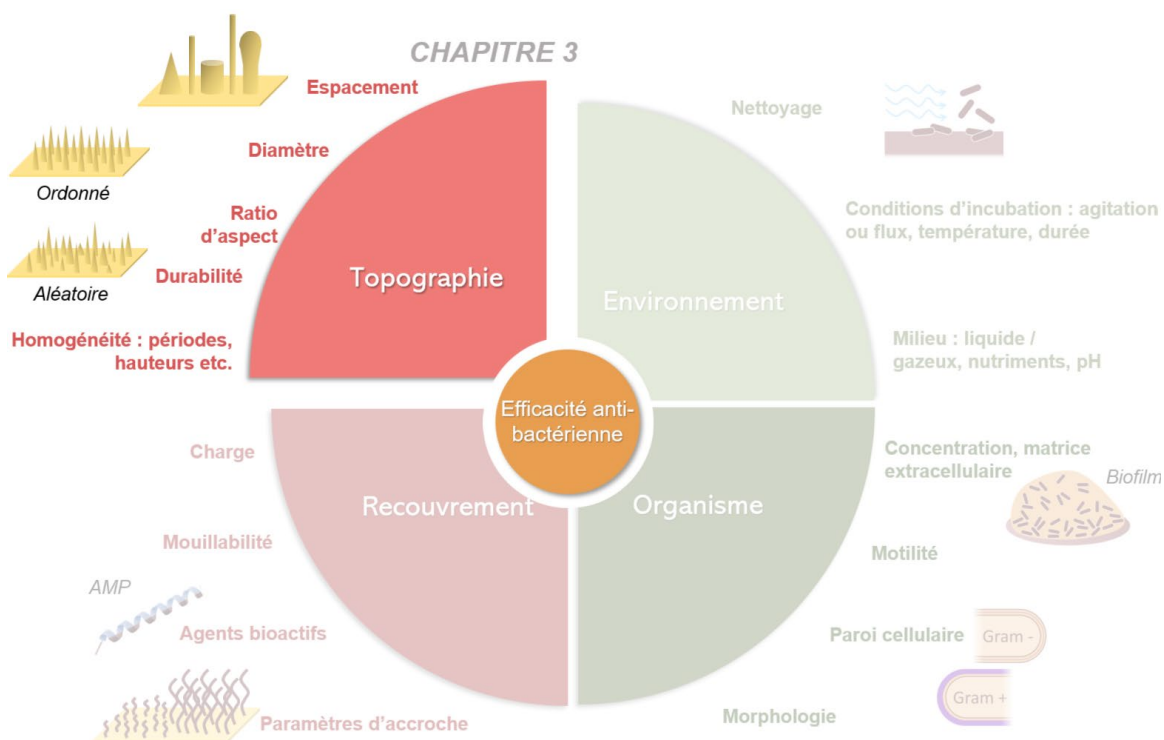


Figure 28 – Les différents facteurs pouvant influencer les propriétés anti-bactériennes d'une surface sont nombreux et peuvent être séparés en trois catégories : les paramètres environnementaux, ceux relatifs à la surface et ceux dépendants du micro-organisme ciblé.

3.1.3. Propriétés et mécanismes des surfaces nano-structurées anti-microbiennes

3.1.3.1. Nanostructures anti-salissures

Les nano-structures anti-salissures sont la plupart du temps super-hydrophobes, c'est-à-dire que l'angle de contact entre une goutte d'eau et la surface est supérieur à 150° . Quand les surfaces super-hydrophobes sont totalement immergées, des bulles d'air remplissent les vallées de la structuration et l'eau repose uniquement sur l'apex des nano-structures, ce qui empêche les bactéries en solution d'adhérer à la surface. Généralement, une grande rugosité de surface et un matériau avec une faible énergie de surface permettent la formation de surfaces super-hydrophobes. Grâce à cette propriété, les surfaces sont naturellement auto-nettoyantes car l'adhésion et la contamination de la surface par les micro-organismes est empêchée, comme illustrée en Figure 29. Ce phénomène est connu sous le nom d' « effet lotus ».^{34,125,143,144}

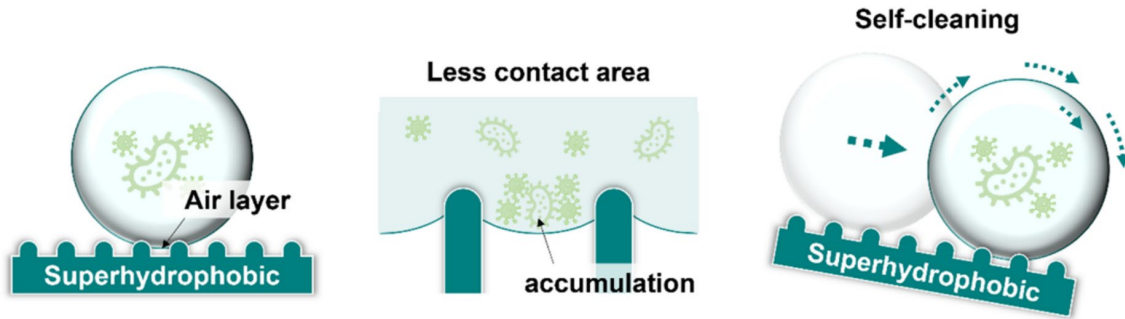


Figure 29 - Mécanismes anti-microbien d'une gouttelette sur les surfaces superhydrophobes. Recadrée à partir de la figure de Lee et al, sous licence [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).³⁴

3.1.3.2. Nanostructures mécano-bactéricides

Dans le domaine des surfaces biocides, les surfaces nano-structurées possèdent une place à part. En effet, il a été initialement postulé puis prouvé que leurs propriétés anti-bactériennes découlent d'un effet mécanique directement lié à leur topologie. Pour les ailes de cigales par exemple, il a été vérifié expérimentalement qu'aucune chimie de surface n'entrait en jeu lors des interactions avec les bactéries, en recouvrant l'aile d'une couche d'or, un matériau inerte envers les bactéries.⁵³ La pénétration des bactéries par les nano-structures observées sur les ailes de cigales a été proposée comme premier mécanisme bactéricide par Ivanova et al (voir Figure 30 a).⁵³ Un second mécanisme d'action, basé sur la déformation de la membrane bactérienne a été avancé par l'équipe de Baulin en 2013 (voir Figure 30 b).¹⁴⁵

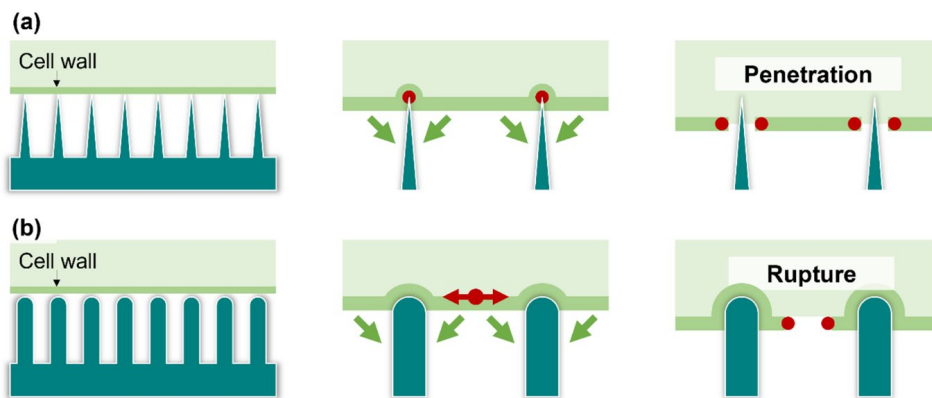


Figure 30 - Mécanismes des surfaces bactéricides. (a) Durant le mécanisme de pénétration, la paroi cellulaire des bactéries est pénétrée par l'apex affûté des nano-structures de la surface bactéricide. (b) Durant le mécanisme d'étirement, les parois cellulaires des bactéries peuvent subir une tension d'étirement et une déformation accrue lorsqu'elles sont en contact avec l'apex de plusieurs nano-structures. Les flèches vertes indiquent la direction du mouvement de la paroi cellulaire sur les structures de surface, et les points rouges indiquent les points de rupture de la paroi cellulaire. Reproduit à partir de la figure de Lee et al, sous licence [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).³⁴

Un trop grand étirement de la membrane cellulaire entraînerait sa rupture aux points d'inflexion entre les nano-structures, ce qui induit un choc osmotique et la mort de la

bactérie.¹⁴⁶ Les paramètres favorisant ce mécanisme seraient donc ceux augmentant la force appliquée en ces points (et donc la courbure de la membrane entre les structures). Selon cette théorie, l'efficacité des nano-structures serait majoritairement influencée par la surface en contact avec les bactéries. Une grande surface de contact amènerait la membrane de la cellule à plus se déformer entre les nano-structures et à conduire à sa rupture plus facilement. Une troisième théorie présentée par Bandara *et al.* avance que les interactions fortes entre les bactéries et la surface, favorisées par la nano-structuration, peuvent provoquer la mort de la cellule lorsque celle-ci tenterait de se déplacer. Des surfaces propices à l'augmentation des forces d'interactions seraient responsables du cisaillement et de la déformation de la membrane bactérienne des bactéries motiles.¹⁴⁷ Ces trois mécanismes d'actions démontrent l'importance des forces mécaniques ayant lieu à l'interface entre la cellule et la surface. Cependant, il a clairement été établi depuis qu'ils ne sont pas seuls responsables de l'activité bactéricide des surfaces. En particulier, un bon nombre d'études ont indiqué que l'interaction de cellules avec des nano-structures peut également induire un stress oxydant et provoquer leur mort cellulaire.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Cette activité biochimique induite ne doit donc pas être négligée et est un facteur dominant dans l'activité bactéricide.

Pour résumer, ces différentes hypothèses démontrent essentiellement que les mécanismes d'interactions entre les bactéries et les surfaces sont bien plus complexes qu'initialement prévu et ne sont pas entièrement élucidés. Les paramètres pouvant influencer l'efficacité des surfaces sont nombreux et souvent interdépendants. Dans la prochaine sous-partie, l'influence de certains de ces paramètres est détaillée.

3.1.3.3. Facteurs influençant l'activité anti-bactérienne des surfaces nano-structurées

a. Facteurs dépendant de la surface

Comme il est illustré en Figure 28, l'efficacité mécano-bactéricide d'une surface dépend du matériau employé, de sa topologie et de la géométrie des micro- et nano-structures qui la composent. L'élucidation des mécanismes d'interactions entre les structures et les bactéries en fonction de leur géométrie est encore balbutiante du fait de leur complexité. Certaines tendances semblent pouvoir être généralisées, cependant beaucoup de discussions persistent encore quant à l'impact de chaque paramètre.

Géométrie des structures. La hauteur des structures semble être un élément majeur de l'activité anti-bactérienne. Il a été établi qu'afin de posséder une activité anti-bactérienne, les structures présentes en surface doivent posséder une hauteur minimale, en dessous de laquelle les forces exercées sur la membrane bactérienne ne sont pas suffisantes pour avoir un effet quelconque sur la cellule.¹⁵¹ Cette théorie semble avoir été confirmée expérimentalement par plusieurs études, indiquant selon les espèces des hauteurs minimales entre 120 et 220 nm.^{152,153} L'augmentation de la hauteur des nano-structures semblerait être corrélée avec celle de leur efficacité, cependant une augmentation au-delà

d'un certain seuil critique ne semble pas augmenter l'effet bactéricide, et des hauteurs trop importantes pourraient même réduire l'efficacité de la surface. Ce plateau de l'effet pourrait être expliqué par le fait que les bactéries n'interagissent qu'avec la partie supérieure de la nano-structure.

Cependant, des nano-structures d'une hauteur dépassant la profondeur de pénétration des bactéries pourraient empêcher leur accès aux débris cellulaires entre les structures, empêchant ainsi la formation de puits de nutriments accessibles pour les bactéries vivantes. L'accumulation de débris cellulaires est un enjeu clé de la nano-structuration car elle peut masquer l'effet des nano-structures et favoriser la croissance de bactéries. Ce paramètre pourrait donc influencer la durabilité de la surface, en plus de son effet bactéricide.

Il semble également que la largeur (ou diamètre) des nano-structures joue un rôle significatif dans l'effet anti-bactérien des surfaces. Cependant il est important de noter que ce paramètre est différent selon la forme des nano-structures étudiées. Une colonne possède un diamètre constant, tandis qu'un pic présente un diamètre de pointe et un diamètre de base. De même, des structures en forme d'écailles n'auront pas la même largeur selon la direction considérée et la hauteur de mesure. Il est donc important de faire preuve de vigilance quant à la signification des termes employés dans les différentes études. Afin de ne pas biaiser les comparaisons, il serait plus simple de comparer l'influence du ratio d'aspect, de l'espacement et de l'angularité des nano-structures.

Le ratio d'aspect correspond au ratio entre la hauteur et la largeur (ou diamètre) d'une structure. Un grand nombre d'études se sont penchées sur l'impact du ratio d'aspect sur l'activité bactéricide des structures, mais il n'existe toujours pas de consensus sur le sujet. En effet, un plus grand ratio d'aspect pourrait favoriser les mécanismes de rupture et de pénétration de la membrane.^{154,155} Ce rapport élevé peut aussi être associé à de plus grands effets bactéricides par le biais de stockage d'énergie élastique causée par la déformation des structures au contact des bactéries.¹⁵⁴ Cependant, une augmentation du ratio d'aspect est souvent associée à une diminution de la rigidité du matériau, ce qui peut déformer les structures, voir les faire s'affaisser ou se regrouper et donc annuler l'activité anti-bactérienne.^{156,157} Ce lien entre ratio d'aspect et déformation dépend cependant du matériau utilisé et ne peut pas être généralisé à toutes les surfaces.¹⁵⁶

La densité et l'espacement de micro- et nano-structures serait aussi un acteur clef de l'activité bactéricide des surfaces. La sédimentation de débris de bactéries entre les structures est problématique, car en plus de créer des puits de nutriments pour les autres bactéries, cela peut minimiser le contact avec les pointes de structures et l'effet d'étirement de la membrane. Afin d'éviter ce phénomène, une première solution à envisager est d'avoir un espacement plus faible que la taille moyenne d'une bactérie.¹⁵⁸ Plusieurs groupes de recherche se sont penchés sur la création de modèles théoriques afin de déterminer les paramètres optimaux des nano-structures, cependant les différentes

simulations donnent des résultats contradictoires et deux courants opposés sont apparus. Dans un premier temps, il a été simulé et théorisé que maximiser l'espacement des structures pouvait augmenter la déformation de la membrane bactérienne et augmenter leur activité bactéricide.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Cependant cette hypothèse a rapidement été réfutée expérimentalement et il semblerait plutôt que réduire l'espacement entre les structures augmenterait l'effet bactéricide et qu'un espacement inférieur à 200 nm serait donc préférable.^{162,163} Il a notamment été avancé par Wu *et al.* qu'il existerait un espacement et une densité optimale de 40 piliers par μm^2 avec une rugosité d'environ 40 nm.¹⁶⁴

Le diamètre de la pointe et l'angularité d'une structure sont fréquemment considérés comme des paramètres essentiels dans l'interaction avec les cellules. L'angularité (ou tranchant, « sharpness » en anglais) est liée à l'inverse du rayon de pointe de la structure. L'apex des structures est le premier élément en contact avec les bactéries, cependant selon le modèle d'interaction avec les membranes envisagé (pénétration ou étirement) son influence est discutée différemment. Pour les études se basant sur le modèle d'action par pénétration, un diamètre de pointe réduit et une grande angularité seraient favorables à la rupture de la membrane par augmentation de la pression en un point, comme illustré en Figure 30a.^{133,159,161,165} En particulier, Velic *et al.*, ont simulé que la membrane bactérienne subit de plus grandes déformations pour des rayons de diamètre de pointe entre 20 et 60 nm, ce qui indiquerait qu'une grande angularité serait plus efficace que des structures arrondies.¹⁶³ Une autre simulation indique des diamètre de pointe optimaux entre 100 et 160 nm.¹⁶⁶ Les études basées sur le modèle d'étirement de la membrane démontrent en revanche qu'un diamètre de pointe plus élevé augmenterait la surface de contact avec la bactérie et par conséquent la déformation de la membrane en suspension entre les structures et favoriserait donc sa rupture (voir Figure 30b).^{167,168} Expérimentalement, il semble se confirmer que les nano-structures ayant une grande angularité sont plus efficaces pour tuer les bactéries, mais leur adhésion est aussi impactée car une plus faible surface est en contact avec les bactéries. Leur efficacité semblerait aussi dépendre grandement de leur densité et des conditions et forces extérieures.^{169,170} Ainsi, il est difficile de tirer des conclusions claires de ses études quant à l'impact seul de l'angularité.

Finalement, l'organisation aléatoire ou ordonnée des nano-structures peut aussi avoir des effets sur les propriétés anti-microbiennes, mais peu d'études se sont penchées sur le sujet.

Propriétés intrinsèques du matériau. L'effet anti-bactérien d'un matériau peut être directement lié aux propriétés mécaniques du matériau utilisé. Comme souligné précédemment, des nano-structures avec un ratio d'aspect plus élevé sont moins rigides et peuvent être déformées au contact des bactéries.¹⁵⁵ Or, la déformation des structures dépend intrinsèquement de la rigidité du matériau initiale.¹⁵⁴ Afin d'optimiser l'efficacité des nano-structures, la sélection d'un matériau rigide par nature permet de pouvoir

conserver l'effet anti-bactérien pour de plus grands ratios d'aspect. L'effet anti-bactérien d'un matériau rigide comme les nano-tubes de carbone est moins impacté par leur hauteur que pour un matériau relativement mou, tel que le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), comme illustré en Tableau 6. Celui-ci peut présenter un effet anti-bactérien satisfaisant pour certaines hauteurs mais perdre son activité pour des ratio d'aspect plus importants. Il a cependant été démontré théoriquement que la déflexion, la déformation et la libération d'énergies mécaniques pour des matériaux moins rigides peuvent être à l'origine de déformations chez les bactéries équivalentes ou supérieures à celles générées par des nano-structures plus rigides ayant un plus faible ratio d'aspect.¹⁴⁶

Tableau 6 – Résumé de modules d'Young caractérisant la rigidité de différents matériaux

Matériau	Module d'Young (GPa)
PMMA	1.5 – 5
Os humain	10 – 30
Or polycristallin	60 – 75
Titane	100 – 120
Platine	140
Acier inoxydable	200
Nanotubes de carbone	200 – 4 000

En dehors des surfaces structurées, la mouillabilité des surfaces est dictée par l'énergie de surface du matériau employé, en comparaison avec celle de l'espèce considérée. L'utilisation d'une surface plane hydrophobe (comme l'oxyde d'indium et d'étain, ou ITO) ou hydrophile (comme le verre) peut impacter grandement l'accroche des bactéries. Ce paramètre a clairement démontré un effet durant l'étape initiale d'adhésion, où les bactéries plus hydrophobes semble adhérer plus fortement aux surfaces hydrophobes, tandis que les cellules hydrophiles adhèrent plus fortement aux surfaces hydrophiles.¹⁷¹ Cependant, les conséquences de ce paramètre sur le plus long terme ne sont pas clairement définies, car les étapes d'adhésion avancées impliquent un comportement biologique de la part des bactéries (pili, EPS, etc).¹⁷² De plus, la mouillabilité de la surface peut agir conjointement avec les nano-structures, car il a été démontré dans certaines études que les surfaces hydrophiles peuvent favoriser l'action mécano-bactéricides des nano-structures.^{130,169} La mouillabilité du matériau joue donc un rôle complexe dans l'adhésion des bactéries et est étroitement lié aux propriétés biologiques intrinsèques à l'espèce étudié et aux autres propriétés de la surface. Il est aussi important de souligner que l'effet des surfaces hydrophiles et hydrophobes dépend fortement des conditions extérieures (surfaces immergées ou non), de l'hygrométrie et de l'énergie de surface du matériau utilisé.

En conclusion, l'impact de la géométrie des structures et du matériau utilisé est largement discuté dans de nombreuses publications. Cependant, il n'existe actuellement aucun consensus sur les dimensions optimales pour obtenir un effet bactéricide efficace. Certains critères, tels que l'angularité des structures et leur grand rapport d'aspect, peuvent être avantageux sous certaines conditions. Il est essentiel de garder à l'esprit que l'efficacité des surfaces dépend de nombreux autres paramètres interdépendants qui nécessitent une caractérisation approfondie.

b. Paramètres expérimentaux de l'évaluation de l'effet anti-bactérien

Le choix des paramètres expérimentaux, comme les conditions d'évaluation des propriétés anti-bactériennes et le choix des micro-organismes testés, a un impact majeur sur les résultats de la caractérisation. La motilité de l'espèce, par exemple, a été démontrée comme pouvant être un paramètre permettant aux bactéries de résister à l'efficacité de certaines nano-structurations. Elle peut même détruire les nano-structures, par exemple en faisant plier les nano-piliers sur les ailes de libellules, favorisant l'adhésion de la cellule.¹⁷³ Nowlin *et al.* ont démontré que lors de l'incubation de cellules de levure sur des ailes de libellule, des rayures apparaissent sur la surface nano-structurée, ce qui peut aussi affecter la durabilité des surfaces.¹²⁸ La rigidité de la membrane bactérienne, variant en fonction des espèces et des caractéristiques de leur paroi (à Gram positif ou négatif), jouerait aussi un rôle décisif dans leur résistance à l'effet mécano-bactéricide des nano-structures. Les bactéries Gram positives et négatives ont des parois à la composition et à l'épaisseur différentes, entre 15 et 80 nm pour les positives et 6 - 15 nm pour les négatives. Ces différences impactent grandement la rigidité et la flexibilité de la paroi cellulaire. Le mécanisme d'étirement proposé par Baulin *et al.* serait par exemple plus efficace pour des bactéries ayant une membrane plus flexible, comme les Gram négatives.¹⁴⁵ En outre, plusieurs études ont rapporté que la paroi cellulaire d'une bactérie est capable de se régénérer et de restaurer son intégrité, sa vitalité et sa reproduction après avoir été perforée à plusieurs reprises.¹⁷⁴

Bien que l'action mécano-bactéricide des nano-structures soit le plus souvent mise en avant, il a clairement été établi qu'elle n'est pas seule responsable de l'activité bactéricide des surfaces. En particulier, un bon nombre d'études ont indiqué que l'interaction de cellules avec des nano-structures peut également induire une cascade de réactions biologiques et provoquer leur mort cellulaire.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ C'est le cas des cellules de *S. aureus* et d'*E. coli* perforées par des nano-structures de dioxyde de titane, dont la mort cellulaire est provoquée par un stress oxydant après exposition. Cette activité biochimique induite ne doit donc pas être négligée et est un facteur dominant dans l'activité bactéricide.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰

Concernant l'environnement, là aussi les propriétés des surfaces dépendent grandement de paramètres extérieurs à la nano-structuration. Une étude réalisée par Valieil *et al.* en 2020 a démontré que les surfaces se situant à une interface air-liquide ont tendance à provoquer une mort considérable des bactéries à cette interface¹⁶⁹. Cela est supposément

causé par la tension de surface, pressant les bactéries contre les nano-piliers et donc augmentant les risques de rupture de leurs membranes. L'adhésion des bactéries dépend aussi énormément des protéines présentes dans le milieu, formant la plupart du temps une couche sur la surface et permettant la création de nouveaux sites favorisant l'adhésion des micro-organismes.¹⁷⁵

3.1.4. Défis et perspectives des mécanismes d'actions de la nano-structuration

Le nombre de paramètres pouvant influencer l'efficacité des surfaces anti-bactériennes est immense. Avec la progression de notre compréhension des mécanismes d'interaction surface/cellule, de nouveaux paramètres sont découverts régulièrement. Afin de créer efficacement des surfaces anti-bactériennes durables et compétitives, il est nécessaire d'élucider l'impact de ces paramètres, ou à minima d'en avoir conscience. La plupart des mécanismes proposés sont souvent issus de modèles biophysiques théoriques encore largement incomplets, ou d'observation expérimentales tels que des micrographies électroniques montrant des bactéries perforées.¹⁶³ L'absence de procédures standardisées pour évaluer les propriétés anti-bactériennes entrave la compréhension et l'acquisition d'une connaissance globale des mécanismes d'interaction entre les micro-organismes et les surfaces nano-structurées. Cela est autant vrai dans la compréhension de l'interaction des bactéries avec des surfaces structurées qu'avec des surfaces fonctionnalisées chimiquement.^{52,58,170} En plus d'une compréhension plus étendue de l'impact des caractéristiques morphologiques des structures sur l'efficacité anti-bactérienne des surfaces, l'impact du comportement des espèces microbiennes a aussi besoin d'être étudié plus en détail.¹³¹ Finalement, bien que la création de surface structurée soit prometteuse, la fabrication à grande échelle de ces matériaux ainsi que le contrôle de la qualité et de l'uniformité de leurs caractéristiques restent des défis à relever.¹³¹

3.2. Sélection de la méthode de fabrication des échantillons nano-structurés

3.2.1. Contraintes imposées par le substrat

Comme il a été illustré dans la littérature, les paramètres optimaux pour obtenir un effet anti-bactérien satisfaisant sont très différents en fonction de l'espèce testée et du matériau. Afin de trouver de potentielles synergies entre les nano-structures et leur fonctionnalisation avec différents peptides, il est nécessaire d'explorer l'espace des combinaisons possibles, et donc de pouvoir tester un grand nombre de géométries.

Le protocole de caractérisation de propriétés anti-bactériennes développé durant le projet impose de pouvoir tester des échantillons avec une surface de plusieurs cm², possédant une partie nano-structurée et une partie non-structurée de référence. De plus, l'utilisation de deux échantillons par caractérisation et la nécessité d'avoir des répliques des

expériences mettent en évidence la nécessité de pouvoir produire un grand nombre d'échantillons similaires.

Concernant le choix du matériau, une nano-structuration en or a été sélectionnée. L'or est un matériau biocompatible, accessible et bien connu en nano-structuration, notamment au travers de la fabrication de nano-particules d'or. De plus, son utilisation permet d'utiliser la fonctionnalisation peptidique par SAM thiolés directement sur les échantillons nano-structurés, sans avoir recours à de nouvelles étapes chimiques de greffage. Finalement, il pourrait être intéressant dans les perspectives du projet de conserver une nano-structuration intégralement en or, afin d'étudier certains échantillons en utilisant de l'imagerie par Résonance des Plasmons de Surface (SPRi). Bien qu'en général l'efficacité anti-microbienne soient testées sur des structures d'au moins 100 nm (et donc supérieure à la profondeur de pénétration de l'onde utilisée pour la SPRi), une nano-structuration moins haute combinée à de la SPRi pourrait apporter de nouvelles informations sur l'interaction des bactéries avec ces structures. La sensibilité de cette méthode peut notamment être améliorée grâce à la micro et nano-structuration.¹⁷⁶

Cependant, l'utilisation de l'or est largement moins répandue en nano-fabrication que le silicium ou le titane, une veille bibliographique des méthodes de fabrication des nano-structures en or a donc été effectuée, conditionnée par les critères précédents.

3.2.2. Procédés de fabrication des nano-structures d'or dans la littérature

Comme il a été exposé, les méthodes de fabrications sont diverses mais elles sont souvent adaptées à des matériaux « classiques » tel que le silicium ou le titane et de nombreuses nano-structures dorées ont été fabriquées en recouvrant des structures en silicium avec de l'or.

Dans un premier temps, les méthodes de fabrication classiques en micro-électroniques telles que les techniques de gravure sèche et humide sont considérées.¹⁷⁷ Les méthodes de gravure sèches telle que la gravure ionique réactive (RIE) sont très intéressantes, mais la faible volatilité des sous-produits de l'or a rendu difficile la mise au point de procédés.¹⁷⁸ De par les difficultés d'utiliser la gravure sèche avec l'or, la gravure humide est encore très largement utilisée pour nano-structurer ce matériau. Cependant, la nature isotrope de la gravure humide rend difficile la création de nano-structures, les hauteurs et épaisseurs caractéristiques des structures obtenues étant généralement de 10 à 100 μm .^{178,179} D'autres méthodes, telles que la nano-structuration par laser femtoseconde, la lithographie électronique, le micro-patterning et les traitements thermiques sont aussi souvent utilisés, mais ces procédés présentent souvent des désavantages comme le coût des équipements, leurs accessibilités et les temps de fabrication élevés.¹⁸⁰⁻¹⁸²

L'électrodépôt par réduction de sels d'or s'est imposé comme une méthode simple, économiquement accessible et rapide pour structurer de larges échantillons. Elle ne

nécessite qu'une cellule électrochimique, des sels d'or et un potentiostat pour fonctionner et permet de fabriquer des échantillons en l'espace de quelques minutes.

Dans une étude par Chattaway *et al.*, il a été possible de former des piliers en électrodéposant de l'or dans les nano-pores d'une membrane en polycarbonate.¹⁸³ De la même manière, Wu *et al.* ont fabriqué des nano-piliers, des nano-rings et des nano-pépites en combinant l'électrodépôt d'or avec une matrice poreuse d'aluminium ayant subi ou non une gravure plasma. Ces méthodes ont permis d'obtenir des structures variées, avec des paramètres géométriques très différents.

Ces structures ont démontré une activité bactéricide contre *Staphylococcus aureus*, avec une réduction d'un facteur 1000 de la viabilité des bactéries adhérees sur les structures par rapport à l'or plan. Ces méthodes présentent l'avantage de contrôler plutôt strictement la morphologie du dépôt, cependant elles restent relativement longues et aléatoires en raison de l'étape de fabrication de la membrane poreuse.

La formation de nano-pics par électrodépôt de sels d'or, combiné à un agent directionnel inorganique (servant à orienter le dépôt en interagissant avec certaines facettes de l'or) a été sélectionné comme étant la méthode la plus adaptée à la fabrication d'échantillon nano-structurés. Cette technique, décrite pour la première fois par Plowman *et al* en 2006, permet de structurer en une seule étape, sans altérer la chimie de surface, contrairement aux méthodes d'électrodépôt utilisant des additifs organiques.^{184,185} Elle permet de générer des nano-pics et des dendrites de différentes formes.¹⁸⁶⁻¹⁸⁹ Dans une étude réalisée par Elbourne *et al*, il a été observé que les nano-structures déposées par électrolyse présentaient une activité biocide, conduisant à une réduction de 88 % de la viabilité de *Pseudomonas aeruginosa* après 18 heures, en utilisant des nano-pointes de 300 nm de haut.¹⁹⁰ Toutefois, l'utilisation de cette technique pour des surfaces supérieures à quelques mm² n'a pas encore été étudiée de manière approfondie et son efficacité n'a été testée que pour une espèce bactérienne.

3.2.3. Fabrication des surfaces par électrodépôt

3.2.3.1. Objectifs et étapes

Afin de créer les échantillons nano-structurés possédant des morphologies pertinentes pour la création de surfaces anti-microbienne et utilisables en combinaison avec la fonctionnalisation, plusieurs objectifs doivent être remplis. Dans un premier temps, la conception et la mise en place d'un montage expérimental basé sur le principe de l'électrodépôt et permettant de nano-structurer de larges échantillons à la chaîne sont nécessaires. Une caractérisation pertinente devra de même être mise en place pour pouvoir quantifier les paramètres géométriques de la nano-structuration (hauteur, densité, forme, etc.). Afin de prédire les caractéristiques morphologiques des nano-structures et pouvoir créer des échantillons pertinents pour cette étude, il semble de plus important de comprendre et d'étudier l'impact des différents paramètres de l'électrodépôt

sur les échantillons obtenus. Une fois ces paramètres maîtrisés, le montage et les conditions de dépôt peuvent être optimisés afin d'obtenir une librairie de morphologies variées ayant des caractéristiques intéressantes pour la création de surfaces anti-microbiennes. Finalement, il est nécessaire de s'assurer de la reproductibilité des échantillons et de la stabilité du montage afin de produire des échantillons de confiance sans avoir besoin de confirmer systématiquement leurs morphologies avec la caractérisation.

3.2.3.2. Principe et définitions

L'électrodépôt est un procédé électrochimique dans lequel un ion métallique en solution (électrolyte) est réduit et déposé à la surface d'une électrode de travail (WE) sous l'effet d'un courant passant entre celle-ci et une contre-électrode (CE). Ce procédé, souvent connu sous le nom d'électro-plaquage, permet de créer des films minces, mais peut aussi permettre de créer des dépôts plus ou moins rugueux et des nano-structures. Le phénomène est régi par l'équation suivante :



Avec l'ion métallique M^{n+} est réduit à un atome métallique M^0 après avoir gagné n électrons.

Les différentes étapes de formation du film métallique à la surface de l'électrode sont illustrées dans la Figure 31. Dans un premier temps les ions métalliques solvatés se déposent préférentiellement dans les défauts, des sites énergiquement favorables car présentant une énergie de nucléation plus faible. À proximité de l'électrode, l'ion va être réduit en adatome (atome isolé au contact de la surface d'un cristal) grâce au transfert d'électron, puis va former des groupements d'atomes métalliques, puis des grains, créant ainsi un recouvrement solide rugueux en surface.^{191,192}

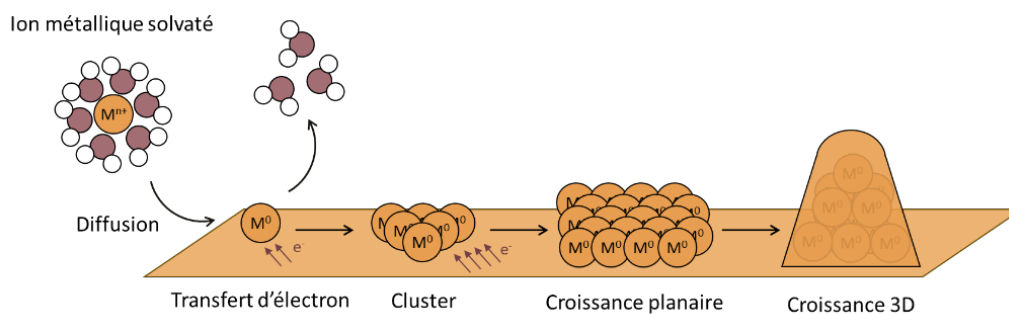


Figure 31 - Schéma des principales étapes de nucléation et de croissance des nano-structures à la surface de l'électrode de travail lors de l'électrodépôt.

3.2.3.3. Paramètres influençant le dépôt électrochimique

De nombreux facteurs sont responsables du dépôt et peuvent l'influencer, la prochaine section abordera les plus importants. La compréhension et la maîtrise de ces

paramètres est un enjeu prédominant afin de trouver les conditions de dépôt critiques pour obtenir des structures dont les formes et dimensions sont pertinentes pour ce projet.

a. Potentiel/courant et durée du dépôt

Lors de l'électrodépôt, le potentiel présent entre l'électrode de travail et la contre-électrode induit un courant ionique : les ions se déplacent et se déposent sous forme réduite sur la surface de l'électrode de travail. Le courant lors du dépôt est donc l'image de la cinétique de dépôt, il est donc essentiel de pouvoir le contrôler et le mesurer pour contrôler la structuration de la surface. Le courant est lié au potentiel appliqué entre les électrodes par la loi de Tafel, avec un comportement exponentiel tant que l'apport des espèces n'est pas limité. Il est possible de réaliser l'électrodépôt en mode galvanostat (où un courant constant est imposé) ou en mode potentiostat (où un potentiel constant est imposé). La quantité d'atomes N électrodéposés est directement liée au courant I passant au travers de l'électrode de travail et à la durée du dépôt t :

$$N = \frac{ne}{Q}, \text{ avec la charge } Q = \int I(t)dt \quad (1)$$

n est le nombre d'électrons nécessaires pour réduire un atome métallique et e est la charge d'un électron, égal à $-1,6 \times 10^{-19}$ C. Il est possible de calculer théoriquement l'épaisseur déposée h en utilisant l'équation liant la quantité de matière N et sa densité d (g/m^3) à la charge Q :

$$\begin{cases} N = \frac{mN_a}{M} \\ d = \frac{m}{Sh} \end{cases} \text{ soit } N = \frac{dShN_a}{M}$$

$$\Leftrightarrow h = \frac{M}{NdSN_a} \stackrel{(1)}{\Leftrightarrow} \frac{MQ}{ndSN_a e}, \text{ donc } \boxed{h = \frac{MQ}{ndSF}}$$

Avec m la masse électrodéposée (g), M la masse atomique de l'atome déposé, S la surface de l'électrode (m^2), F la constante de Faraday telle que $F = N_a e = 96\,485,34$ C et N_a le nombre d'Avogadro égal à $6,02 \times 10^{23}$.

En intégrant le courant pendant le dépôt il est donc possible de déterminer théoriquement la charge pour en déduire la quantité d'atome déposés et l'épaisseur moyenne du dépôt réalisé. La modification de la durée de dépôt permet d'accumuler la quantité de matière en le prolongeant ou de se limiter uniquement aux premières étapes de nucléation en le raccourcissant.

b. Concentrations en ions métalliques et en additifs

La concentration en électrolyte va directement influencer le courant de dépôt. En augmentant la concentration d'ions métalliques lors du dépôt, les cinétiques de réactions vont être accélérées. Cette vitesse de dépôt va directement impacter la géométrie du dépôt, avec une croissance dendritique pouvant être favorisée dans certains cas.¹⁹³

Une autre manière de modifier directement la formation des structures est d'orienter la croissance à l'aide d'agents directionnels. Des additifs organiques et inorganiques, tels que de la cystéine ou du plomb (utilisé dans ce projet), peuvent être employés afin d'orienter le dépôt et de modifier sa rugosité.^{187,192,194} En ayant une meilleure affinité de liaison avec certaines orientations cristallines du matériau électrodéposé, ces agents limitent les sites et facettes accessibles aux ions métalliques et donc orientent la croissance du dépôt.

c. Agitation

L'agitation exerce une influence fondamentale sur le dépôt, car elle permet de renouveler les ions dans la couche de diffusion en surface de l'électrode de travail. Lors du dépôt, les ions dans la double-couche et dans la couche de diffusion vont être rapidement consommés. Si les espèces ne sont pas activement renouvelées, la concentration à l'interface décroît et la cinétique diminue jusqu'à atteindre un nouvel équilibre. Le dépôt est donc limité par la vitesse de diffusion des ions en solution (Figure 32).

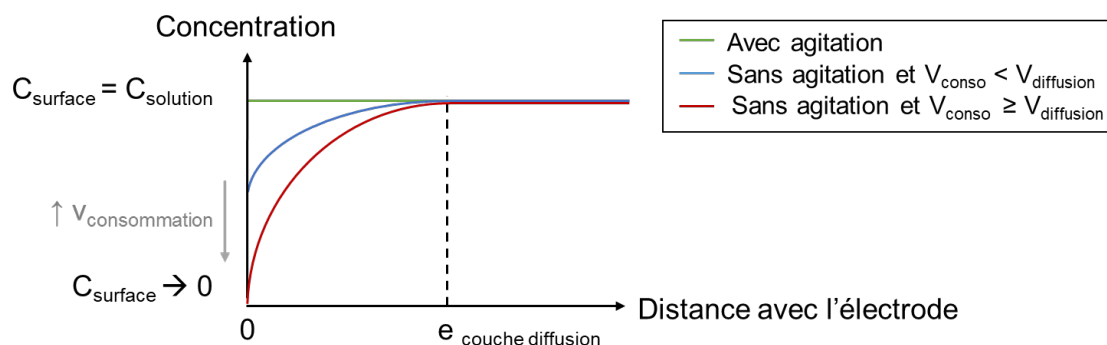


Figure 32 - Profils de concentration des espèces ioniques en fonction de la distance avec la surface de l'électrode avec et sans agitation.

Lors d'un dépôt sous agitation, la couche de diffusion est réduite et les espèces proches de la surface sont renouvelées plus efficacement, ce qui permet une plus grande vitesse de dépôt lorsque le régime stationnaire est établi. Ce dépôt est donc principalement limité par la vitesse de consommation des espèces.

d. Autres paramètres

Il est important de noter que de nombreux autres paramètres tels que le pH, l'utilisation d'un courant pulsé, la propreté et la rugosité de la surface de l'électrode de travail et la température de l'électrolyte peuvent impacter le dépôt de différentes façons. La température, par exemple, permet d'influencer les courants de convection et donc de faciliter le déplacement des ions vers la surface. Cependant dans ce projet, l'étude de l'impact des paramètres a été limitée aux concentrations en électrolyte, en additif, à la durée du dépôt et au potentiel appliqué. Les autres paramètres ne seront donc pas abordés plus en détail.

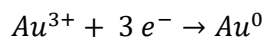
3.2.3.4. Avantages et défis des dépôts métalliques par voie électrochimique

L'électrodépôt est une méthode de structuration très avantageuse du fait de son accessibilité, de sa facilité de mise en œuvre et de son adaptabilité au substrat devant être structuré. Elle permet de modifier la topologie d'un matériau très rapidement (quelques secondes à plusieurs minutes) pour des coûts relativement faibles comparés aux coûts des appareils de nano et micro-fabrication classiques. Le contrôle des paramètres de dépôt présente aussi l'avantage de pouvoir influencer et modifier la structuration du matériau, cependant le grand nombre de ces paramètres complique l'optimisation du système. Il est donc souvent nécessaire de réaliser une étude systématique de leur influence sur la morphologie du dépôt. La littérature a déjà amplement démontré l'utilité de l'électrodépôt de sels d'or pour nano-structurer des échantillons, cependant son utilisation est limitée pour le moment aux micro-électrodes et une étude plus poussée pour la nano-structuration de grandes surfaces est nécessaire.

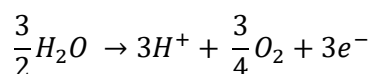
3.2.3.5. Montage expérimental de la cellule électrochimique

a. Réactifs

Afin de nano-structurer les substrats dorés, un processus utilisant une combinaison d'acide tétrachloroaurique (HAuCl_4) et d'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) a été utilisé.¹⁸⁴ Lors de l'électrodépôt cathodique, les ions d'or sont réduits à la surface de l'électrode de travail selon la réaction suivante :



À la contre-électrode, la réaction d'oxydation la plus probable pour une électrode inerte dans un électrolyte aqueux est l'électrolyse de l'eau :



Cette réaction permet de fournir trois électrons à l'anode et ainsi de compléter le circuit électrique en maintenant l'équilibre des charges.¹⁹² Les ions Pb^{2+} présents dans l'électrolyte permettent d'orienter le dépôt d'or Au^0 dans la direction [111]. En effet, ces ions ont une affinité particulière pour les facettes (100) et (110) de l'or polycristallin, ce qui limite la réduction de l'or sur ces facettes. Les ions AuCl_4^- possèdent quant à eux une plus grande affinité pour les facettes (111), ce qui permet d'orienter le dépôt selon un plan préférentiel et donc de favoriser l'apparition de nano-pics.¹⁸⁴ Le plomb étant toxique pour les organismes, son utilisation ici peut être questionnée. Cependant, il a été démontré par plusieurs études par spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX) et spectroscopie photoélectronique X (XPS) que le plomb n'est pas incorporé dans le dépôt et n'est pas présent à la surface de l'échantillon après électrodépôt.^{184,187,188,190}

b. Cellule électrochimique et électrodes

Afin d'optimiser la nano-structuration pour des échantillons de plusieurs cm^2 , une cellule personnalisée a été conçue. Celle-ci est composée d'un béccher de 250 mL à bord haut, sans bec, d'un capuchon adapté et d'un système trois-électrodes (contre-électrode, électrode de travail et électrode de référence). Afin d'optimiser la reproductibilité de l'expérience, le capuchon permettant le positionnement précis des électrodes a été conçu avec SolidWork puis fabriqué par impression 3D avec de la résine Onyx, résistante à la plupart des acides. Le bouchon est composé de deux trous adaptés à l'électrode de référence et à la contre-électrode ; d'une fente adaptée aux substrats utilisées ainsi que de deux trous plus petits permettant d'assurer un flux d'azote et de dégazer la solution. Afin de minimiser l'impact des lignes du champ électrique sur le dépôt, les électrodes sont alignées le long d'un axe horizontal. La contre-électrode est éloignée au maximum de l'électrode de travail afin de minimiser l'impact de la réaction ayant lieu à la cathode. Les différentes électrodes sont immobilisées sur le bouchon à l'aide d'élastiques. La Figure 33 illustre le montage expérimental complet ainsi que le schéma électrochimique et la réaction ayant lieu pendant l'électrodépôt.

Une cellule à trois électrodes est une configuration classique en électrochimie. Le courant circule principalement entre l'électrode de travail (WE) et la contre-électrode (CE) tandis que l'électrode de référence (RE) permet de contrôler et de mesurer le potentiel de l'électrode de travail par rapport à un potentiel standard connu (voir Figure 33B). Dans cette expérience, une électrode Ag/AgCl a été utilisée comme électrode de référence et une tige de graphite comme contre-électrode. Les contre-électrodes inertes comme le graphite ou le platine sont d'un usage courant en électrochimie. Elles présentent les avantages d'être durables et nécessitant peu d'entretien car, comme leur nom l'identifie, la réaction fournissant les électrons n'entraîne pas l'altération de l'électrode en elle-même. L'utilisation d'une contre-électrode métallique de même nature que l'élément à déposer est également une stratégie employée. L'oxydation (dissolution) de cette dernière permet de compenser la quantité d'ion retiré de la solution par la réduction ce qui assure une concentration stable de l'électrolyte.

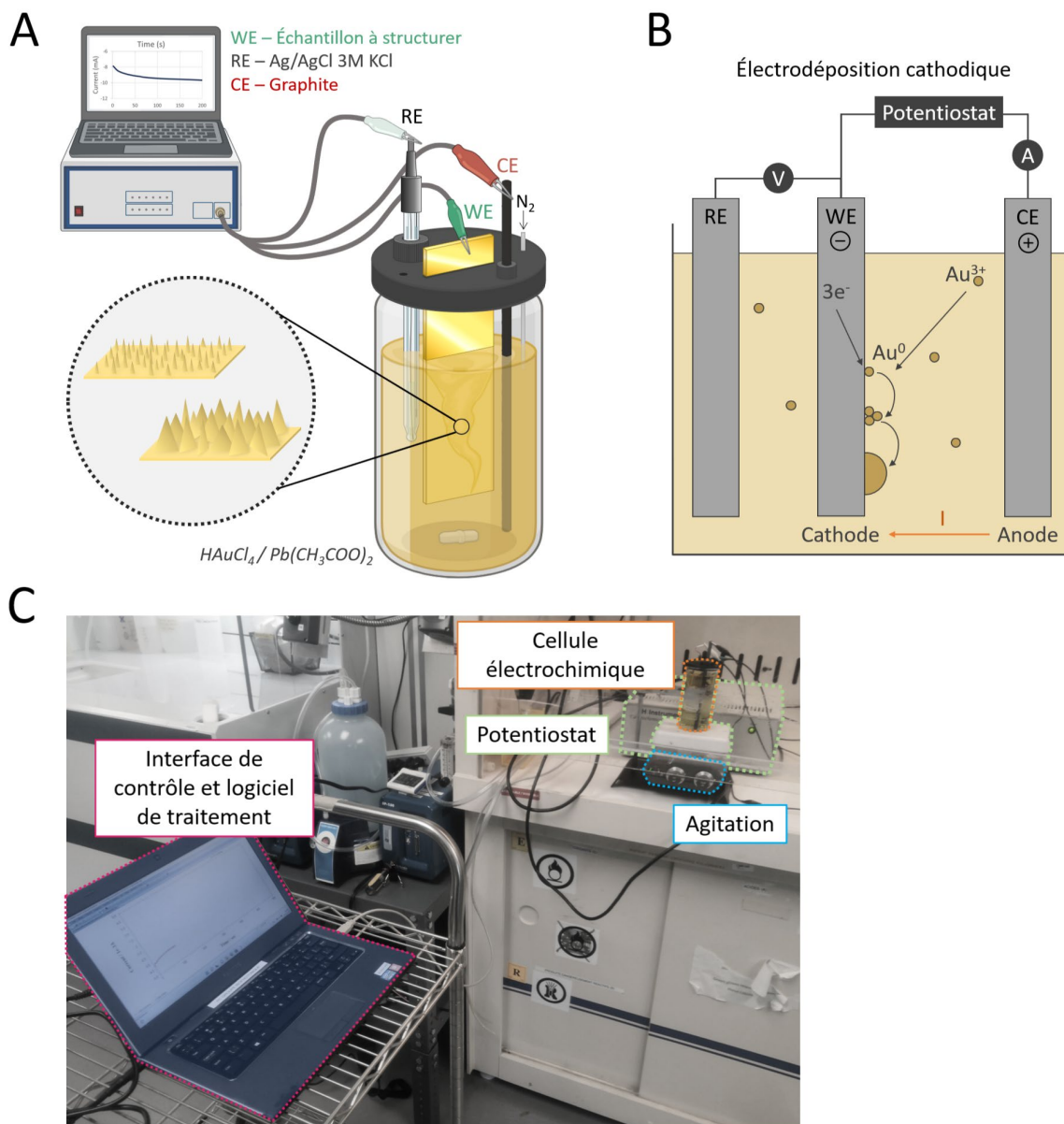


Figure 33 – **A.** Schématisation du banc d'électrodépôt utilisé pour structurer les échantillons. **B.** Principe de l'électrodépôt cathodique employée. **C.** Photographie du banc de dépôt final et de ses éléments.

3.3. Résultats de l'évaluation de l'influence des paramètres de dépôt

3.3.1. Paramètres expérimentaux testés

Durant l'optimisation du dépôt, les principaux paramètres testés sont l'agitation, la concentration en sels d'or et en additif, la durée du dépôt et le potentiel utilisé entre les électrodes de travail et de référence. Pour les premiers dépôts, des valeurs classiques de la littérature ont été utilisées, tels qu'une concentration de 6,8 mM pour HAuCl_4 , 1 mM pour $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ et un potentiel de dépôt de 0,05V. À partir des résultats préliminaires, il a ensuite été décidé d'explorer des concentrations plus élevées pour l'or, jusqu'à 100 mM,

pour différentes durées de dépôt et concentration en Pb afin d'établir les paramètres optimaux pour obtenir les morphologies souhaitées. Dans un premier temps, les paramètres permettant d'obtenir un dépôt homogène sur toute la surface ont été investigués, avec la création de plusieurs séries d'échantillons, puis la caractérisation d'un large espace de paramètres de dépôt a été le sujet d'un stage de Master 2. Ceci a permis d'établir précisément les paramètres à utiliser pour produire différentes nano-structurations, ayant à priori un impact sur les propriétés anti-microbiennes des surfaces. Le protocole d'électrodépôt est détaillé est [Annexe I](#). Une partie des résultats présentés ci-dessous sont issus du stage de Master 2 de Sara Héllis.

La caractérisation précise des propriétés de surfaces nano-structurées produites est un enjeu majeur pour pouvoir comprendre les mécanismes entre nano-structures et propriétés anti-microbiennes. Avant et après structuration, les surfaces sont donc caractérisées au Microscope Électronique à Balayage (MEB) et au Microscope à Force Atomique (AFM), apportant ainsi des informations complémentaires sur l'état de la surface. La voltampérométrie cyclique est aussi utilisée pour quantifier la surface électro-active avant et après dépôt. Les paramètres des acquisitions et le traitement des données sont précisés en [Annexe J](#).

3.3.2. Effet de l'agitation

Pour rappel, l'agitation joue un rôle majeur sur la répartition des ions dans l'électrolyte et particulièrement dans la couche de diffusion. Cet effet a été confirmé expérimentalement en mesurant et en comparant le courant surfacique moyen lors de l'électrodépôt avec et sans agitation (voir Figure 34). La concentration d' HAuCl_4 utilisée pour cette expérience est de 6,8 mM, avec 1 mM de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ et une agitation de 1000 rpm et le potentiel de travail appliqué est de 0.05V.

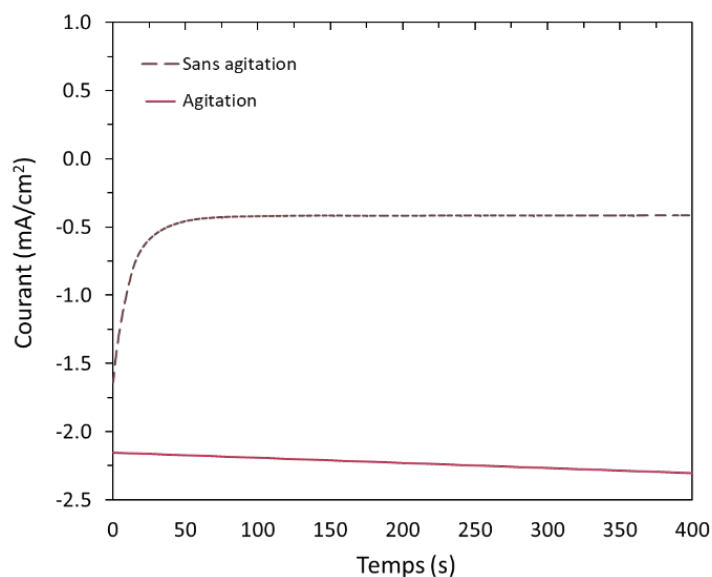


Figure 34 – Courant surfacique mesuré sans (– –) et avec (–) agitation de 1 000 tours/min lors de l'électrodépôt à 0.05V de 6,8 mM d' HAuCl_4 + 1 mM de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

Pendant l'électrodépôt sans agitation, le courant est initialement de $-1,7 \text{ mA/cm}^2$, puis décroît rapidement jusqu'à se stabiliser vers $-0,5 \text{ mA/cm}^2$. Durant la première phase de dépôt, la vitesse de consommation des ions Au^{3+} à la surface de l'électrode est plus importante que la vitesse de diffusion des espèces. Cela entraîne une diminution de la concentration d'ions près de la surface, ce qui limite la génération de courant, jusqu'à ce que la vitesse de consommation des ions soit égale à leur vitesse de diffusion, stabilisant ainsi le courant généré.

Avec agitation en revanche, la quantité d'ion aux abords de la surface est sans cesse renouvelée par la convection, diminuant l'épaisseur de la couche de diffusion. Avec une agitation suffisante, la vitesse de consommation des espèces n'est plus limitée par celle de diffusion des espèces et le courant généré est donc uniquement dépendant de la cinétique de réaction des ions sur la surface. Celle-ci peut être différente en fonction de la concentration en sels. En considérant les différentes concentrations pouvant être utilisées sur le banc d'électrochimie, une agitation de 1 000 rpm a été considérée suffisante pour le bon renouvellement des espèces pendant le dépôt. Une agitation plus faible ne permettrait pas de renouveler suffisamment rapidement les espèces ioniques.

Les micrographies MEB des surfaces électrodéposées avec et sans agitation présentent des nano-structures avec des morphologies différentes, illustrées en Figure 35. En augmentant le courant surfacique (et donc la vitesse de dépôt) grâce à l'agitation, on observe une densité de pics plus importante sur les bords de l'échantillon. Le ratio de surface R_s calculé à partir des voltamogrammes démontre aussi une augmentation de la surface active plus importante pour l'échantillon agité ($R_s = 3$) que pour celui non-agité ($R_s = 2$).

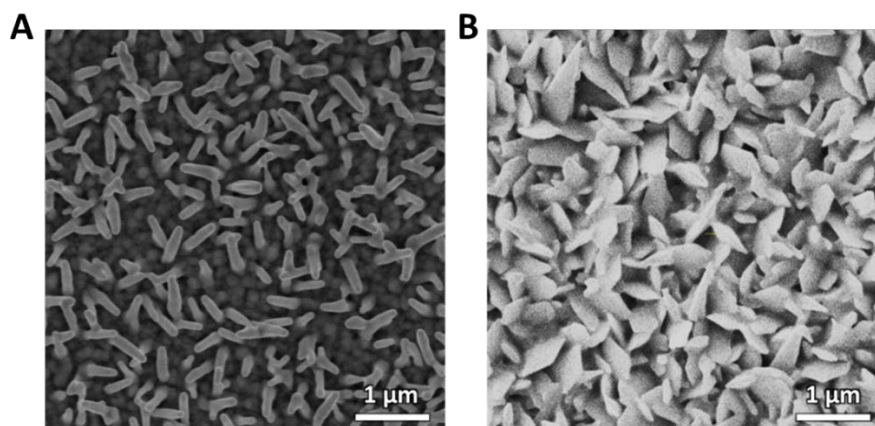


Figure 35 - Micrographies MEB après électrodépôt d'or **A**. Sans agitation ; **B**. Avec une agitation de 1 000 tour/min (droite).

Le reste des expériences présentées dans ce chapitre sont réalisées avec une agitation de 1 000 rpm.

3.3.3. Effet de la concentration en HAuCl_4

Les effets de cinq concentrations ont été examinés : 6,8; 12,5; 25; 50 et 100 mM. La concentration de 6,8 mM a été étudiée en premier car elle correspond à une valeur de référence dans la littérature.^{190,195}

3.3.3.1. Impact de la concentration d' HAuCl_4 sur le courant surfacique

La mesure du courant surfacique pendant le processus d'électrodépôt pour les différentes concentrations d'or a confirmé l'influence de cette variable. En plus de modifier la valeur moyenne du courant sur l'ensemble du dépôt (et donc la charge totale), la concentration d' HAuCl_4 affecte directement la forme du profil du courant, comme illustré dans la Figure 36.

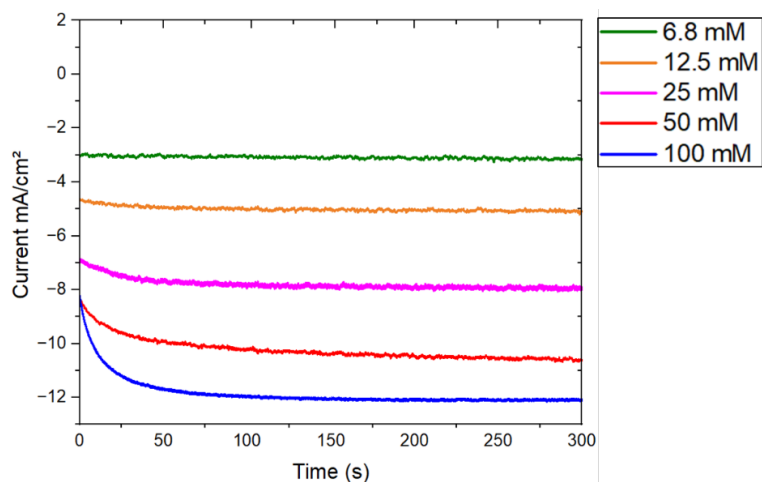


Figure 36 – Profiles de la densité de courant lors d'un dépôt de 300 secondes pour différentes concentrations d' HAuCl_4

Pour les concentrations les plus faibles, on observe un courant pratiquement constant car la vitesse de consommation des ions est plus faible. À mesure que la concentration d' HAuCl_4 augmente, une première phase d'augmentation de la vitesse de dépôt apparaît avant une stabilisation. Ce phénomène est probablement le résultat de l'augmentation de la surface active après les premières phases de nucléation des nanostructures.

Cette phase transitoire du courant, montre que la concentration n'est pas le seul paramètre intervenant dans le dépôt et que la structuration plus ou moins rapide de la surface a un impact directement sur la densité de courant. Pour les fortes concentrations, la nano-structuration apparaissant dès les premières secondes de dépôt augmente la surface active de l'échantillon, ce qui rend plus de sites accessibles pour le dépôt, augmentant ainsi le courant total.

La densité de courant est directement liée au taux de dépôt, on obtiendra donc des dépôts plus importants pour la même durée de dépôt en utilisant des solutions plus concentrées. Les densités de courant obtenues pour les différentes concentrations en HAuCl_4 sont résumées dans le Tableau 7.

Tableau 7 – Densité moyenne de courant pendant l'électrodépôt à un potentiel de 0,05V pour différentes concentrations en H₂AuCl₄.

Concentration [Au] (mM)	Courant surfacique moyen (mA/cm ²)
100	-12,7 ± 0,7
50	-10,1 ± 1,1
25	-7,0 ± 0,4
12,5	-4,5 ± 0,8
6,8	-2,6 ± 0,2

La mesure de la densité de courant initiale a été réalisée pour plusieurs conditions de dépôt : une concentration en Pb(CH₃COO)₂ de 0,5 et 1 mM et une durée de dépôt de 100 et 300 secondes. Pour l'ensemble de ces conditions, des tendances similaires d'évolution de la densité de courant par rapport à la concentration ont été observées, illustrées en Figure 37. Les mêmes tendances sont observables pour les densités moyennes et finales ([Annexe D](#) et [Annexe E](#)). Ces résultats permettent de conclure que pour ces concentrations, la présence de plomb n'impacte pas les cinétiques de dépôt. Grâce à ces résultats, il sera possible de prédire la densité de courant pour une concentration visée et permettre de fabriquer plus précisément des morphologies souhaitées.

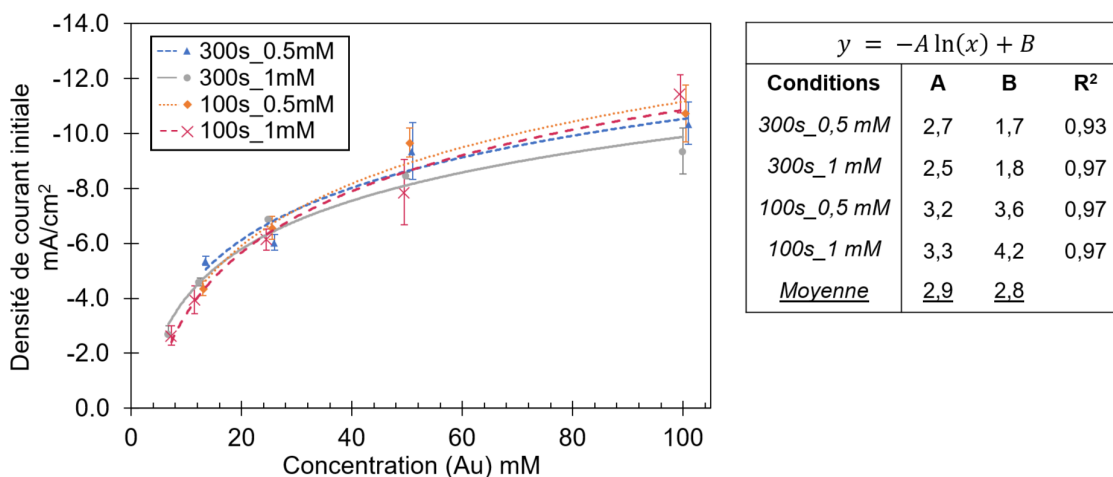


Figure 37 – Profil de l'impact de la concentration en H₂AuCl₄ sur la densité de courant initiales lors de l'électrodépôt à un potentiel de 0,05 V pour différentes concentrations en Pb(CH₃COO)₂ et différentes durées de dépôt.

3.3.3.2. Impact de la concentration d'H₂AuCl₄ sur l'homogénéité des dépôts sur des lames de microscope

Il est important de rappeler que la densité de courant peut varier localement en surface du substrat. Les bords et coins sont des zones de plus fortes densités de courant. En effet, ils sont exposés à un électrolyte mieux renouvelé dont la concentration locale est plus proche de celle de la solution loin de l'électrode de travail et à des concentrations des lignes de champs électrique. En conséquence des effets de bords sont observés sur

l'échantillon. Ils se traduisent comme illustré par la Figure 38 par des surplus d'épaisseur de dépôts sur les bords.

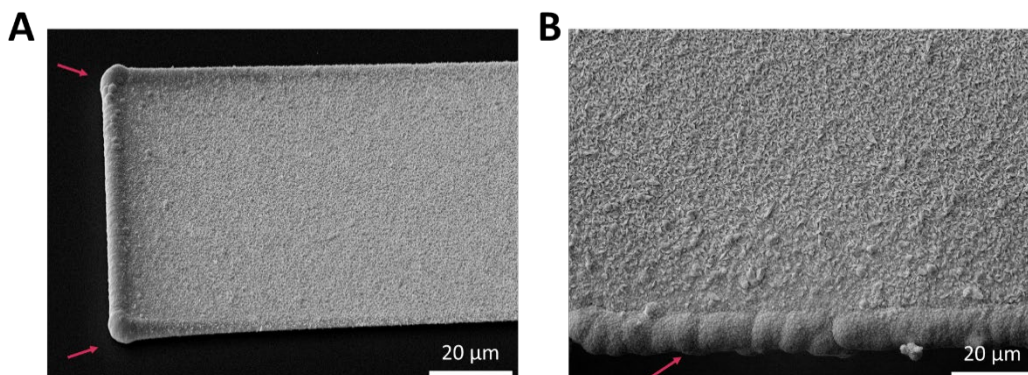


Figure 38 – Micrographies MEB illustrant les effets de bords. **A.** Ligne d'or de 60 nm de large, fabriquée par lithographie électronique sur une lame de microscope dorée puis électrodéposée. **B.** Bord d'une lame de microscope dorée électrodéposée. Les flèches → indiquent les zones où des effets de bords sont visibles.

Afin de nano-structurer uniformément une surface, l'aire de celle-ci nécessite d'être prise en compte. En effet, la taille de la zone à structurer va directement modifier la répartition des lignes de champ. Des surfaces milli-métriques la taille des substrats employés influence aussi la densité de courant et peut donc rendre les échantillons difficiles à nano-structurer de manière uniforme. Ici, les substrats sont des lames de verre, avec une surface immergée d'environ 12 cm².

Pour la concentration d'H_{Au}Cl₄ la plus faible (6,8 mM), des nano-structures sont uniquement visibles sur les bords extrêmes des échantillons, quelques microns à partir du bord (voir Figure 39). Leurs densités, hauteurs et surfaces de la zone nano-structurée peuvent augmenter avec la durée de dépôt, mais même pour des dépôts de 13 minutes il n'a pas été possible d'obtenir un échantillon structuré de manière totalement uniforme pour cette concentration.

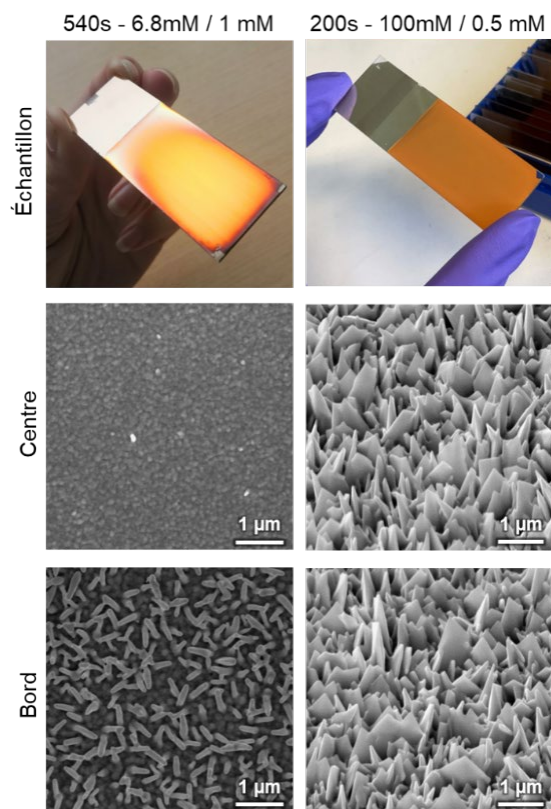


Figure 39 – Photos et micrographies MEB des échantillons électrodéposés et de l’homogénéité du dépôt d’or sur les surfaces nano-structurées.

Pour les concentrations d’ HAuCl_4 les plus importantes (100 mM et 50 mM), l’échantillon est nano-structuré uniformément, la surface de l’échantillon est homogène et les effets de bords sont beaucoup moins visibles. Une accumulation de matière sur la ligne de bord extrême de l’échantillon est visible (voir en Figure 38B), cependant cette zone ne sera pas prise en compte lors de la caractérisation microbiologique grâce à la chambre en silicone apposée sur l’échantillon (voir en Figure 40B). Les micrographies MEB de ces effets de bords, visibles en Figure 40A, permettent d’illustrer l’effet de la densité de courant sur la nucléation de l’or et l’évolution des morphologies en fonction de celle-ci. Les nano-structures les plus éloignées du bord semblent croître de manière unidirectionnelle et former des nano-pics. En se rapprochant du bord, là où la densité de courant est plus importante, les structures vont se former plus rapidement, et une croissance dendritique est de plus en plus visible du fait de la forte concentration d’ HAuCl_4 et des cinétiques de dépôt plus rapides sur les extrémités des échantillons.

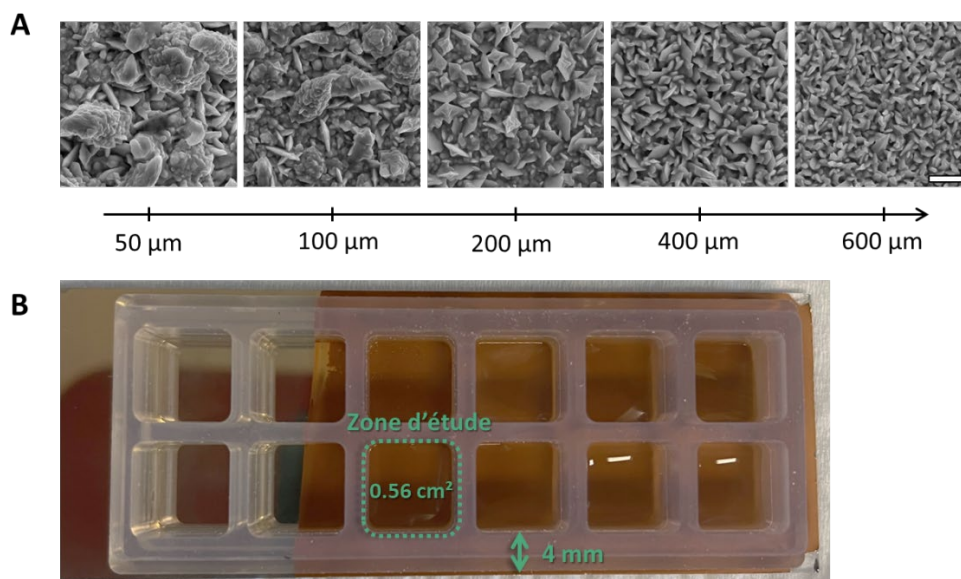


Figure 40 – **A.** Évolution de la morphologie des nano-structures, créées avec une solution de 50 mM d' HAuCl_4 et 0,5 mM de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ à un potentiel de 0,05 V, par rapport à la distance avec le bord de l'échantillon (gauche). Le trait blanc d'échelle correspond à 2 μm . **B.** Photographie des zones d'études des surfaces nano-structurées. La région non-uniforme du dépôt n'est pas considérée car incluse dans les 4 mm de marge de la cuve.

En augmentant la concentration d' HAuCl_4 , il est donc possible de pouvoir homogénéiser la nano-structuration sur toute la surface de l'échantillon, bien que l'épaisseur d'or sous les nano-structures électrodéposées est probablement différente entre le bord et le centre de l'échantillon.

3.3.3.3. Impact de la concentration d' HAuCl_4 sur la morphologie des nano-structures

L'augmentation de la concentration d' HAuCl_4 s'accompagnant d'une augmentation de la densité de courant, il est attendu d'observer un dépôt de matière plus important pour les solutions concentrées. La Figure 41 illustre l'augmentation quasi-linéaire de la hauteur moyenne des nano-structures formées sur la surface pour différentes concentrations d' HAuCl_4 . Les valeurs de hauteurs moyennes sont obtenues par AFM et représentent l'altitude moyennes des pics par rapport au creux le plus bas mesuré sur l'image (on utilisera hauteur moyenne dans le reste du manuscrit par soucis de simplicité). Une augmentation des hauteurs moyennes des pics avec la concentration d' HAuCl_4 est visible. De plus, les mêmes tendances sont observées pour les dépôts de 300 secondes comme pour les dépôts de 100 secondes, sauf pour la concentration de 100 mM qui n'augmente pas significativement par rapport à la concentration de 50 mM pour 100 secondes de dépôt. Concernant la morphologie des nano-structures d'or électrodéposé observable au MEB, la forme la plus répandue sur les échantillons est une forme de pic, relativement affuté.

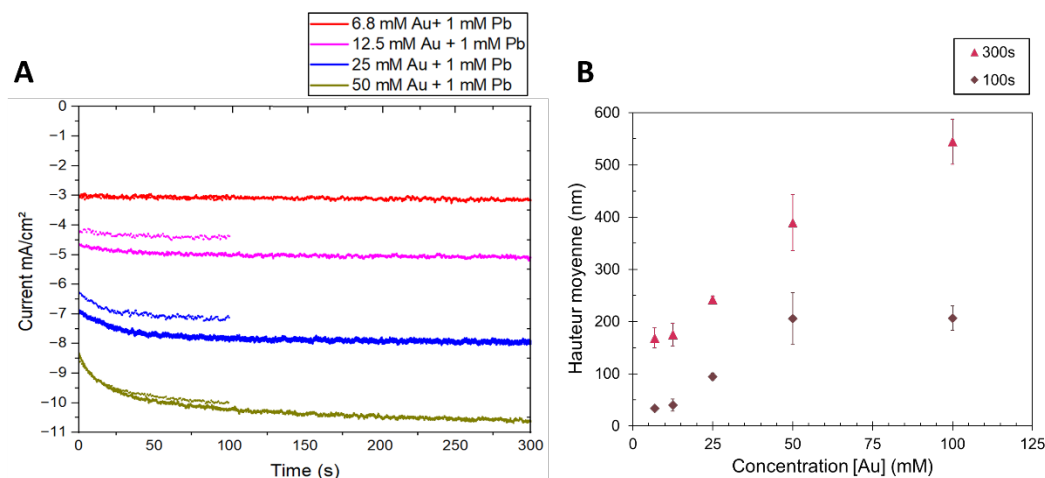


Figure 41 – Impact de la concentration en HAuCl_4 pour des dépôts de 100 et 300 secondes et des solutions à 1 mM de Pb sur **A**. La densité de courant **B**. La hauteur moyenne des nano-structures

L'augmentation en concentration est corrélée avec une augmentation de la taille de ces pics ainsi qu'une diminution de leur densité, pour les deux durées de dépôt. On peut observer en Figure 42 la formation de pics dès 12,5 mM pour 300 secondes de dépôt et dès 25 mM pour 100 secondes. Les pics ne semblent pas avoir d'orientation privilégiée et présentent une distribution de hauteurs et de largeurs relativement importante (voir Figure 43).

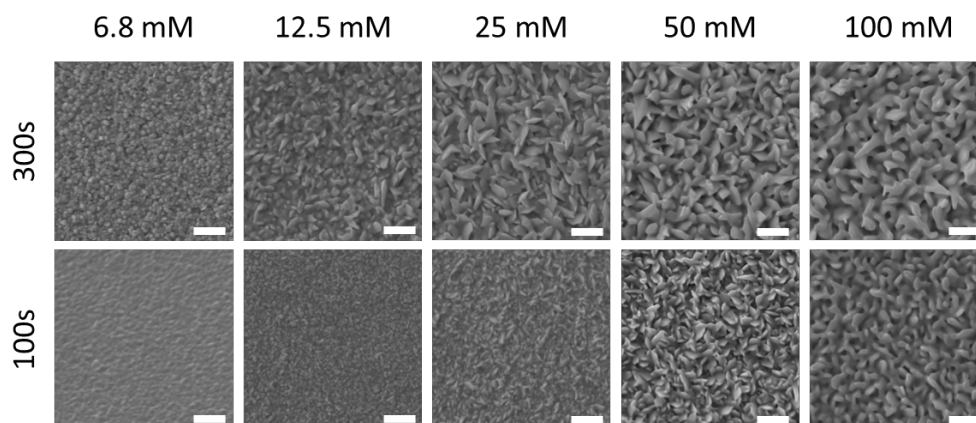


Figure 42 – Micrographies MEB des surfaces nano-structurées pour différentes concentrations et durée de dépôt. Les images sont prises au centre de l'échantillon, avec un grossissement x 15 000. Le trait blanc d'échelle correspond à 1 μm .

Pour les concentrations d' HAuCl_4 les plus élevées, l'élargissement dans une direction privilégie des pics semble mener à l'apparition de formes d'écailles, comme il est illustré par les pics colorés en Figure 43. Les écailles semblent être orientées de manière aléatoire et non-spécifique aux conditions de dépôt.

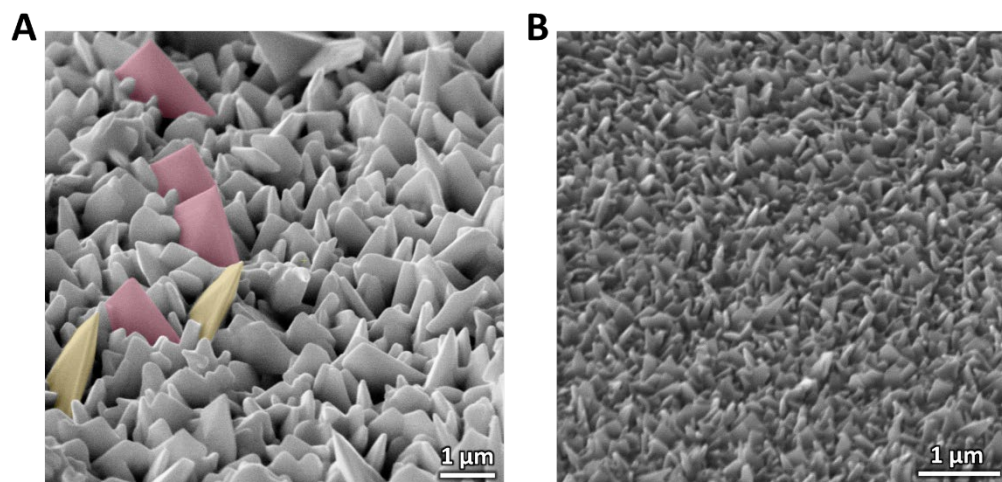


Figure 43 – Micrographies MEB des surfaces nano-structurées avec une solution à 50 mM d' HAuCl_4 et 0,5 mM de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ avec une durée de **A.** 300s de dépôt ; **B.** 100s de dépôt. Les images sont prises au centre de l'échantillon, avec un grossissement $\times 15\,000$ et une inclinaison de 45° de l'échantillon par rapport à l'axe vertical du détecteur. Les nano-structures colorées représentent les nano-écailles formées pour les plus fortes concentrations et dont l'axe d'élargissement est orienté parallèlement (rouge) ou perpendiculairement (jaune) au détecteur.

Les caractérisations MEB et AFM sont cohérentes avec les résultats du ratio de surface active, calculé en intégrant le pic de réduction apparaissant lors de la voltampérométrie cyclique avant et après dépôt. En effet, il peut être observé en Figure 44 que le pic de réduction des échantillons après dépôt augmente avec la concentration et que le ratio de surface active en découlant suit les mêmes tendances. Pour la plus forte concentration, dépendamment de la durée de dépôt, la surface nano-structurée est 3,5 à 4,5 fois plus importante que celle du substrat initial. Cependant, le ratio étant moyenné sur toute la surface de l'échantillon, celui-ci ne tient pas compte de l'hétérogénéité de la structuration pour les plus faibles concentrations, ni des effets de bords.

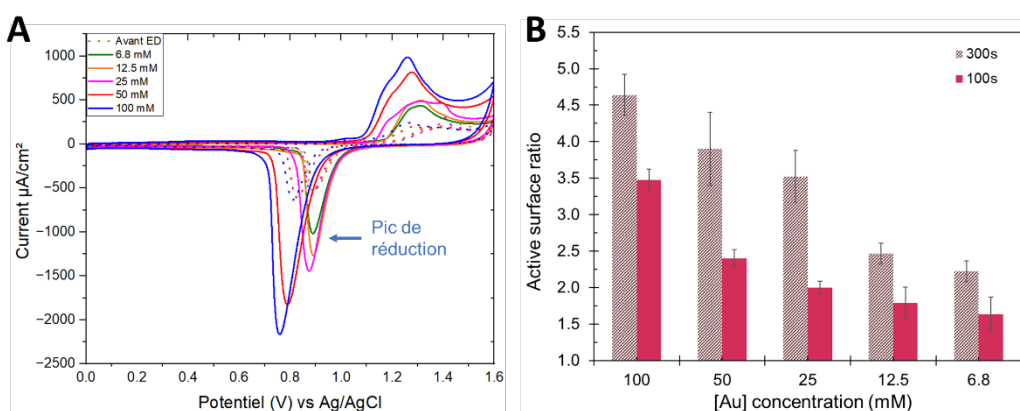


Figure 44 – **A.** Voltampérométries des échantillons avant et après dépôt ; **B.** Évolution du ratio entre les surfaces actives avant et après électrodépôt.

3.3.4. Impact de la durée de dépôt

Afin de comprendre l'impact de la durée de dépôt sur la morphologie des structures, deux durées de dépôt de 100 et 300 secondes ont été appliqués pour chaque concentration étudiée. Pour certaines concentrations d' HAuCl_4 comme 6,8 mM, un plus grand nombre de durée de dépôt a été testé : 50s, 100s, 300s, 600s et 800s.

Les résultats de la caractérisation MEB illustrés en Figure 42 démontrent qu'appliquer des durées de dépôt plus longs (300 secondes vs 100 secondes) permet de structurer les surfaces même avec des concentrations faibles. Pour deux durées de dépôt différents à la même concentration, la vitesse de dépôt est constante et c'est la charge totale qui va définir la taille des structures. Plus la durée de dépôt augmente, plus la quantité de matière déposée à la surface s'accumule, la durée de dépôt influence donc directement le stade de croissance des nano-structures.

Pour le dépôt à 6,8 mM d' HAuCl_4 , l'évaluation de la hauteur de pics par AFM démontre bien une croissance linéaire des structures en fonction du durée (voir Figure 45A). A partir des images MEB obtenues, il est donc possible d'établir une valeur seuil au-dessus de laquelle la nano-structuration de la surface est efficace (voir Figure 45B), même pour la plus basse concentration.

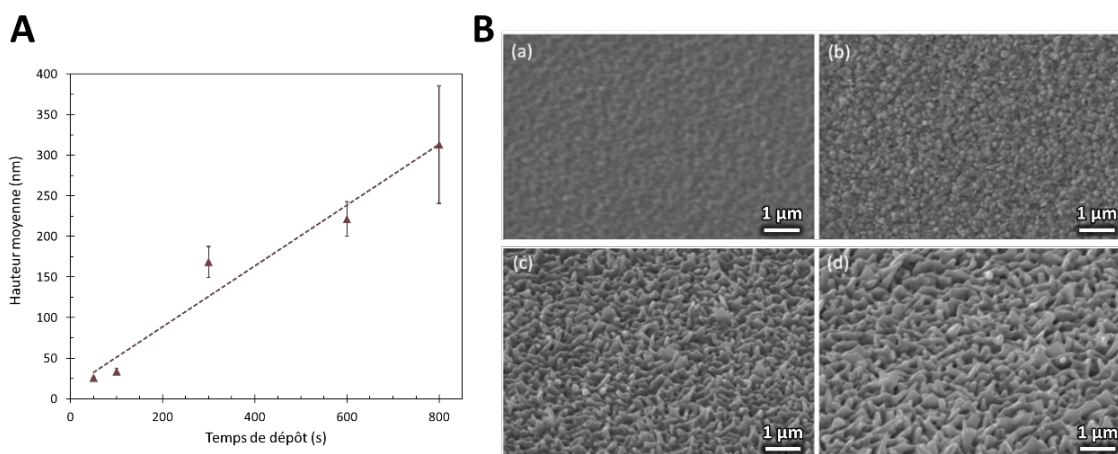


Figure 45 – **A**. Quantification AFM de la hauteur des pics ; **B**. Micrographies MEB des surfaces nano-structurées avec 6,8 mM d' HAuCl_4 et 0,5 mM de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ pour différentes durées de dépôt : (a) 100s (b) 300s (c) 600s (d) 800s.

3.3.5. Impact de la concentration en $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

L'agent directionnel $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ permet d'orienter le dépôt de l'or. Pour évaluer son impact sur la morphologie des structures, deux concentrations ont été évaluées, 0,5 mM et 1 mM.

L'augmentation de la quantité de plomb dans la solution ne semble pas impacter significativement la densité de courant pour les différentes concentrations, comme en atteste la Figure 37. De plus, pour les concentrations d' HAuCl_4 les plus hautes (100, 50 et 25 mM), pas de différence significative entre les images MEB et les mesures AFM n'a été

observée. En revanche, pour la concentration d' HAuCl_4 de 12,5 mM, une augmentation de la hauteur moyenne des pics a été observée pour la plus forte concentration en plomb (voir Figure 46).

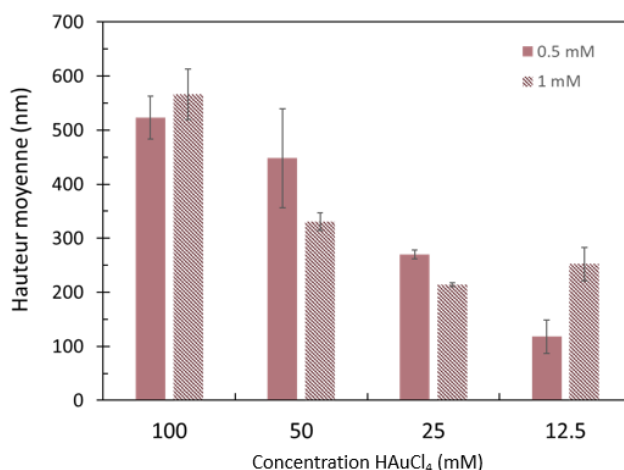


Figure 46 – Quantification de la hauteur moyenne des nano-structures par mesures AFM pour deux concentrations de plomb et quatre concentrations d' HAuCl_4 .

3.3.6. Synthèse des conditions expérimentales optimales

En conclusion, il a été démontré que les nombreux paramètres de l'électrodépôt peuvent influencer le dépôt et la morphologie des nano-structures obtenues. L'agitation de l'électrolyte premièrement, permet de s'affranchir de la condition limitante de la diffusion des espèces durant le dépôt et ainsi d'augmenter la densité du courant pendant celui-ci. La concentration en sels d'or HAuCl_4 est un paramètre pouvant influencer de manière majeure la nano-structuration. Des concentrations supérieures à 12,5 mM permettent d'assurer une nano-structuration homogène sur toute la surface du substrat et la formation de nano-pics de hauteur moyenne variant entre 100 et 600 nm. Augmenter la concentration en sels d'or permet aussi de réduire les durées de dépôt nécessaires pour obtenir les nano-structures. Les durées de dépôt, elles, permettent de contrôler la quantité de matière déposée, et donc de pouvoir arrêter le dépôt des nano-structures à différents stades de croissance. Finalement, l'effet du plomb n'a pas été significatif pour les deux concentrations testées. Sa concentration relative à celle de l'or étant probablement trop faible, évaluer l'effet de concentrations plus importantes pourrait être intéressant afin de créer de nouvelles morphologies.

3.4. Échantillons sélectionnés pour la caractérisation de l'activité anti-bactérienne

Après avoir trouvé les conditions optimales afin d'obtenir une nano-structuration homogène, plusieurs lots de lames avec différentes nano-structures d'or électrodéposé ont été fabriqués et caractérisés afin d'être utilisés durant le protocole d'évaluation des propriétés antibactériennes. Les conditions suivantes ont été retenues :

CHAPITRE 3 • LES SURFACES NANO-STRUCTURÉES BIO-INSPIRÉES

(A) – [Au] = 100 mM, [Pb]=0,5 mM, durée = 300s;

(B) – [Au] = 100 mM, [Pb]=0,5 mM, durée = 100s;

(C) – [Au] = 100 mM, [Pb]=1 mM, durée = 300s;

(D) – [Au] = 50 mM, [Pb]=0,5 mM, durée = 300s.

Les résultats de la caractérisation sont présentés dans le Tableau 8 et la Figure 47.

Tableau 8 - Quantification des aspects morphologiques des nano-structures.

Échantillon	Hauteur (nm)	RMS (nm)	Densité (μm^{-2})	Ratio S_a
A	439 ± 16	115 ± 6	7 ± 1	3,8 ± 0,1
B	156 ± 11	43.6 ± 3	21 ± 2	2,9 ± 0,1
C	425 ± 49	113 ± 16	12 ± 2	3,7 ± 0,3
D	198 ± 10	60 ± 5	40 ± 5	2,8 ± 0,1

Ces surfaces possèdent des caractéristiques distinctes particulièrement intéressantes car affûtées, avec des hauteurs pouvant varier entre 150 et 450 nm et des densités entre 6 et 45 pics/ μm^2 , pour certaines proches de valeurs clés de la littérature. L'orientations aléatoires des pics, avec des morphologies en pics et en écailles présentent là aussi un potentiel intéressant pour l'utilisation de ces surfaces comme surfaces anti-bactériennes.

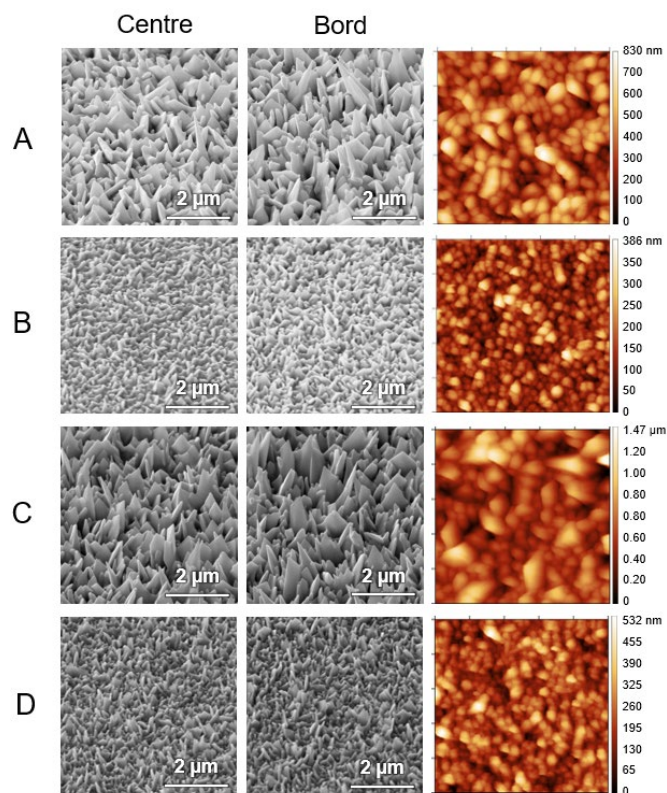


Figure 47 - Micrographies MEB (2 colonnes de gauche) et images AFM (colonne de droite) des quatre nano-structurations après électrodépôt. Les dimensions des images AFM sont 5 μm par 5 μm .

3.5. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, il a été clairement démontré que les nano-structures bio-inspirées sont des substrats de choix pour le développement de surface anti-microbiennes. Leur mécanisme d'action mécano-bactéricide leur permet d'être efficaces contre de nombreux micro-organismes. Les procédés de fabrication actuels permettent de créer une vaste gamme de surfaces synthétiques micro- et nanostructurées, rivalisant presque avec la diversité des surfaces naturelles. Ces méthodes reproduisent parfois ainsi efficacement la complexité des structures observées dans la nature.

Cependant, la nouveauté de ce domaine de recherche entraîne des complications telles que des mécanismes d'action encore en cours de compréhension, de nombreux paramètres pouvant influencer l'efficacité antimicrobienne des surfaces, la fabrication de surfaces synthétiques avec des matériaux peu réalistes dans leurs futures applications, une production d'échantillons limitée et des résultats de caractérisation peu comparables entre les différents laboratoires.

En utilisant l'électrodépôt de sels d'or, nous avons démontré le potentiel de cette méthode pour fabriquer rapidement, simplement et avec une bonne reproductibilité un grand nombre d'échantillons, avec des superficies de plusieurs dizaines de cm^2 . En faisant varier les paramètres de fabrication tels que la concentration d'or et la durée de dépôt, des structures variées ont pu être obtenues, possédant des géométries pertinentes car affutées et mesurant entre 100 et 500 nm avec des densités de pics plus ou moins importantes.

L'étude de l'impact des paramètres de dépôt sur la géométrie des nano-structures a également permis de mieux comprendre les phénomènes de croissance impliqués, facilitant ainsi la fabrication efficace de surfaces nano-structurées spécifiques en appliquant les bonnes conditions de structuration. Ces développements ont finalement abouti à la production de plusieurs dizaines d'échantillons, prêts à être caractérisés pour évaluer leurs éventuelles propriétés anti-microbiennes.

CHAPITRE 4

PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI- MICROBIENNES

4.1. Introduction aux méthodes de caractérisations des surfaces anti-microbiennes	111
4.2. Influences des paramètres environnementaux et cellulaires sur la caractérisation des matériaux	120
4.3. Optimisation des étapes du protocole	132
4.4. Traitement des données de microscopie de fluorescence	141
4.5. Résultats de la caractérisation micro-biologique des échantillons	149
4.6. Conclusion du chapitre	164

CHAPITRE 4

PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

4.1. Introduction aux méthodes de caractérisations des surfaces anti-microbiennes

Compte tenu de l'impact et de la sévérité des conséquences liées à la contamination microbienne, un intérêt tout aussi important s'est développé simultanément pour l'élaboration de méthodes permettant de détecter et de quantifier l'activité microbienne sur les surfaces. Les enjeux contemporains concernant ce sujet sont de pouvoir créer des méthodes rapides, efficaces, précises, avec une grande sensibilité et spécificité, abordables économiquement, faciles d'utilisation et de transport et nécessitant peu de préparation d'échantillon et d'analyse des résultats.

Les propriétés anti-bactériennes des matériaux et des anti-microbiens en développement sont toujours évaluées dans des systèmes de test *in vitro*.¹⁹⁶ Les principales méthodes de détection et caractérisation des micro-organismes peuvent être séparées en trois catégories : les méthodes de culture micro-biologique, celles basées sur la reconnaissance phénotypique et génotypique et finalement les méthodes mettant en œuvre des biocapteurs.

Les méthodes phénotypiques permettent d'identifier les espèces en se basant sur les caractéristiques distinctes (morphologie, coloration de Gram, production de métabolites tels que des gaz, des acides, du sulfure d'hydrogène, etc.) et les bio-capteurs permettent de reconnaître la présence ou non de micro-organismes, mais ces deux approches n'apportent que peu de connaissance sur la viabilité de celles-ci et leur capacité à proliférer. D'autres approches micro-biologiques, comme les dénombrements et la fluorescence, visent plus à quantifier et à séparer les bactéries viables cultivables de celles non cultivables.

4.1.1. Approches quantitatives

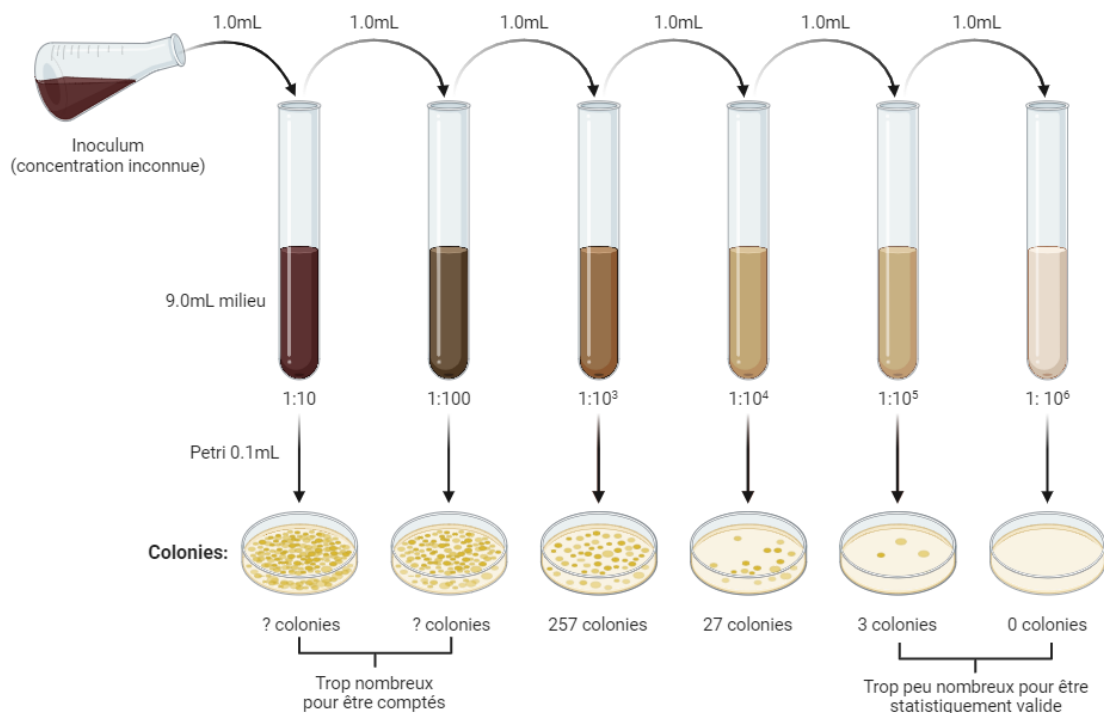
4.1.1.1. Techniques microbiologiques standards

a. Techniques de dénombrement en milieu solide

Les techniques de dénombrement sont des méthodes standards en microbiologie permettant d'énumérer avec précision le nombre de bactéries présentes dans un échantillon liquide source (ou inoculum). Il existe différentes méthodes dérivées de cette approche, mais seulement la plus répandue sera décrite.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Le dénombrement en milieu solide (*Standard Plate Count method* en anglais, ou SPC) est basé sur l'étalement de différentes dilutions de l'inoculum sur des milieux solides favorisant la croissance des organismes dans la solution. Son principe est illustré en Figure 48. Après incubation dans des conditions optimisées pour chaque espèce et souche, les bactéries viables étalées vont former des colonies unitaires distinctes (*Colonie-Forming Unit* en anglais, ou CFU) de quelques millimètres de diamètre, dénombrables à l'œil nu et permettant de remonter à la concentration initiale de l'inoculum. La dilution de celui-ci se fait généralement au dixième et en série afin de maximiser le nombre de plaques énumérables. En effet, les boîtes présentant trop peu de CFUs ne sont pas statistiquement valides et celles contenant trop de CFUs sont difficilement énumérables. Une fourchette de 25 à 250 colonies par plaque est statistiquement valide pour l'analyse des produits laitiers, mais ces bornes peuvent varier en fonction des études, des dilutions appliquées et des applications.^{197,198} Afin d'avoir une confiance statistiquement acceptable dans le SPC, un tripliquât de chaque dilution est nécessaire.



CFU/mL = Nombre de colonies sur la plaque x facteur de la dilution de l'échantillon / volume de l'échantillon

Figure 48 – Principe d'un SPC. Adapté de « *Serial Dilution Procedure* », de *bioRender.com* (2024). Récupéré de <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

Les techniques basées sur la culture microbienne sont considérées comme l'étalon-or de la détection en raison de leur sensibilité, de leur fiabilité et de leur spécificité, qui permettent de détecter la contamination bactérienne à des seuils très bas. L'inconvénient majeur de ces méthodes est cependant la nécessité d'amplifier les échantillons, ce qui nuit

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

grandement à la rapidité de la détection (plusieurs jours). De plus, ces techniques doivent être adaptées à chaque espèce microbienne et à chaque matériau testé et sont coûteuses en consommables, en temps et en main-d'œuvre.

b. Marquages fluorescents de viabilité

La microscopie de fluorescence est une technique répandue en micro-biologie. Elle permet la détection, le dénombrement et l'identification de différents micro-organismes, en temps réel et est utilisable *in vitro* ou *in vivo*. Le principe de la microscopie de fluorescence est basé sur l'utilisation de sondes organiques fluorescentes pouvant se lier rapidement à des analytes cibles spécifiques ou non spécifiques. Ce principe permet une grande sensibilité et sélectivité à un faible coût et une facilité d'utilisation.¹⁹⁹

Un des marquages les plus répandus pour l'étude des bactéries utilise des fluorophores visant des cibles cellulaires et membranaires, afin de déterminer la viabilité des bactéries en fonction de l'intégrité de leur membrane.²⁰⁰ Il existe actuellement plus d'une dizaine de tests fluorescents basés sur le marquage des bactéries « vivantes/mortes ». ²⁰¹ En particulier, le kit de viabilité bactérienne prêt à l'emploi LIVE/DEAD® BacLight™ de Invitrogen est très répandu dans les protocoles de caractérisation des propriétés anti-microbiennes. Son principe de fonctionnement est basé sur l'utilisation de deux sondes :

- Le marqueur SYTO® 9 qui fluorescence en vert, est perméable aux cellules et peut colorer l'ARN et l'ADN dans les cellules bactériennes vivantes et mortes.
- Le marqueur composé d'iodure de propidium (PI), qui fluorescence en rouge et est un colorant nucléaire et chromosomique non perméable aux cellules vivantes.

Tableau 9 – Longueurs d'émission et d'excitation des fluorophores du kit BacLight™.

Fluorophore	Émission	Excitation
SYTO® 9	500 nm	480 nm
PI	635 nm	490 nm

Le marqueur SYTO® 9 est adapté au marquage de toutes les bactéries qu'elles soient intactes ou endommagées. Le PI en revanche ne marque que les bactéries dans lesquelles le colorant peut pénétrer, et donc dont l'intégrité membranaire est compromise. Une modification du spectre d'émission est observée en fonction de la proportion de PI se fixant aux cellules (voir Figure 49). Les bactéries endommagées sont donc capables d'exprimer différentes fluorescences en fonction de l'état de leur membrane.

Le marquage fluorescent des bactéries peut être réalisé en flux ou en statique et peut aussi mettre en œuvre d'autres types de marqueurs fluorescents non-organiques, comme certains nano-matériaux.¹⁹⁹ Les avantages de la microscopie de fluorescence, combinées

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

à sa capacité à discerner et à quantifier les micro-organismes viables et non-viables, en font une technique pertinente et complémentaire aux méthodes de cultures pour l'étude des propriétés anti-microbiennes.

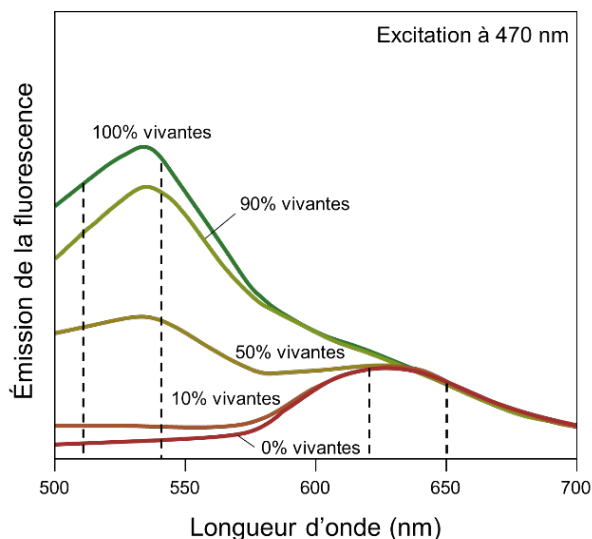


Figure 49 - Principe du marquage fluorescent BacLight™ Live/dead. En fonction de la viabilité relative des bactéries sur la surface, un décalage dans la longueur d'onde d'émission est observé. Reproduit depuis les informations produit du kit BacLight™.²⁰²

c. Autres méthodes de quantification des micro-organismes

D'autres approches sont couramment utilisées pour dénombrer les bactéries, comme la numération microscopique directe, la mesure de la turbidité de la culture ou du poids sec des cellules. Cependant ces techniques ne permettent que d'obtenir un nombre global de bactéries, sans indication sur leur état de viabilité. De plus elles doivent souvent être adaptées à l'espèce étudiée, il faut donc la plupart du temps établir des étalonnages pour chaque micro-organisme.

La densitométrie (ou la mesure de la turbidité) par exemple, est une autre méthode d'évaluation permettant de connaître le nombre de particules dans une solution par mesure de l'absorbance de la lumière entre 550 et 600 nm.²⁰³ Cette technique très répandue en micro-biologie permet d'estimer facilement et rapidement à l'aide d'un densitomètre ou d'un spectromètre le nombre de cellules par unité de volume d'un échantillon. Cependant, la concentration bactérienne déduite des mesures de ces appareils doit souvent être adaptée pour chaque organisme, la turbidité dépendant de la taille et de la forme du micro-organisme. La mesure de turbidité peut être donnée en densité optique ou en McFarland (McF). La norme McFarland permet de normaliser la densité de l'inoculum dans les tests microbiens et compare visuellement l'échantillon testé avec un étalon physique basé sur un mélange de chlorure de baryum et d'acide sulfurique. Selon cette norme la conversion suivante peut être appliquée :

$$0.5 \text{ McF} = 1,5 \times 10^8 \text{ cellules/mL}$$

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Cependant ces conversions ne prennent pas en compte l'impact de la taille et de la forme des micro-organismes et ne représentent qu'une estimation de la concentration d'un échantillon liquide. La méthode souffre d'une grande variabilité, ne rend pas compte de la viabilité des bactéries et ne fonctionne que pour des échantillons très concentrés (au moins 10^7 cellules/mL).²⁰⁴

4.1.1.2. Méthodes d'évaluations *in vitro*

Il existe cinq catégories générales de tests *in vitro* pour évaluer un matériau anti-microbien : les tests de rapport surface/volume élevé, les tests de zone d'inhibition sur agar, les tests de suspension, les tests d'adhésion et les tests de biofilm. Ces derniers sont souvent inspirés des autres tests cités et sont souvent complexes et limités à la caractérisation d'un seul comportement microbien, bien que des tentatives de standardisations soient en cours.⁵⁸ La description des tests *in vitro* se concentrera donc sur les autres méthodes, décrites en Tableau 10 et illustrées en Figure 50.

Tableau 10 – Méthodes d'évaluations *in vitro* standards des propriétés des surfaces anti-microbiennes.

	Méthodes	Description	Quantification	Propriété évaluée
(1)	Tests avec rapport surface/volume élevé	Inoculum placé entre l'échantillon et un autre matériau stérile pour maximiser l'interaction avec les bactéries	SPC	Relargage
(2)	Tests de zone d'inhibition sur agar	Le matériau anti-microbien est placé sur une plaque d'agar inoculée	-	Relargage
(3)	Tests de suspension	Le matériau est incubé directement dans un milieu liquide inoculé et le nombre de CFU viable après incubation est mesuré	SPC	Relargage
(4)	Tests d'adhésion	1. la surface est incubée avec les bactéries, les non-adhérées sont éliminées et la surface avec les cellules adhérentes est ajoutée à un milieu liquide ou une plaque d'agar. 2. un flux de bactéries passe à travers une chambre contenant le matériau, puis live/dead sur les cellules attachées	SPC et fluorescence	Adhésion, bactéricide

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Les méthodes d'essai sont souvent définies par plusieurs organisations comme l'ISO (Organisation internationale de normalisation), la BS (British Standards), l'IBRG (International Biodeterioration Research Group) et l'ASTM (American Society for Testing and Materials).⁵⁸ En 2018, 16 normes industrielles étaient validées pour tester l'efficacité de surfaces anti-microbiennes pour différentes applications.²⁰⁵ Ces méthodes ne sont pas sans inconvénients et chacune d'entre elle a été révisée plusieurs fois au cours des dernières années.

Concernant les tests de rapport surface/volume élevé (1) - Tableau 10, un faible volume de solution bactérienne est mis en contact avec un matériau anti-microbien de grande superficie. La suspension microbienne est ensuite prise en sandwich entre l'échantillon à évaluer et un matériau stérile (lamelle couvre-objet, feuillet plastique, etc.). Le contact forcé des bactéries avec la surface est peu représentatif des conditions réelles de la contamination bactérienne et peut impacter la viabilité des bactéries. De plus, sauf si les bactéries adhérentes sur l'échantillon et le matériau de recouvrement sont entièrement détachées, la quantification du nombre de bactéries viables après contact avec l'échantillon peut être faussée par l'adhésion. Le système tout-en-un Petrifilm® (3M, St. Paul, MN, USA) est une solution commerciale intéressante permettant de s'affranchir de l'impact du matériau de recouvrement. Très répandu dans les tests de contamination de produits agro-alimentaires, ce système consiste en une fine couche d'agar sur une feuille transparente, repliée sur la surface de l'échantillon. L'agar est modifiée avec un colorant (chlorure de tétrazolium) afin de visualiser plus facilement les colonies. Cependant, ce test n'est compatible qu'avec de petits volumes (> 50 µL) peu concentrés et n'est pas utilisable pour tous les échantillons.¹⁹⁶

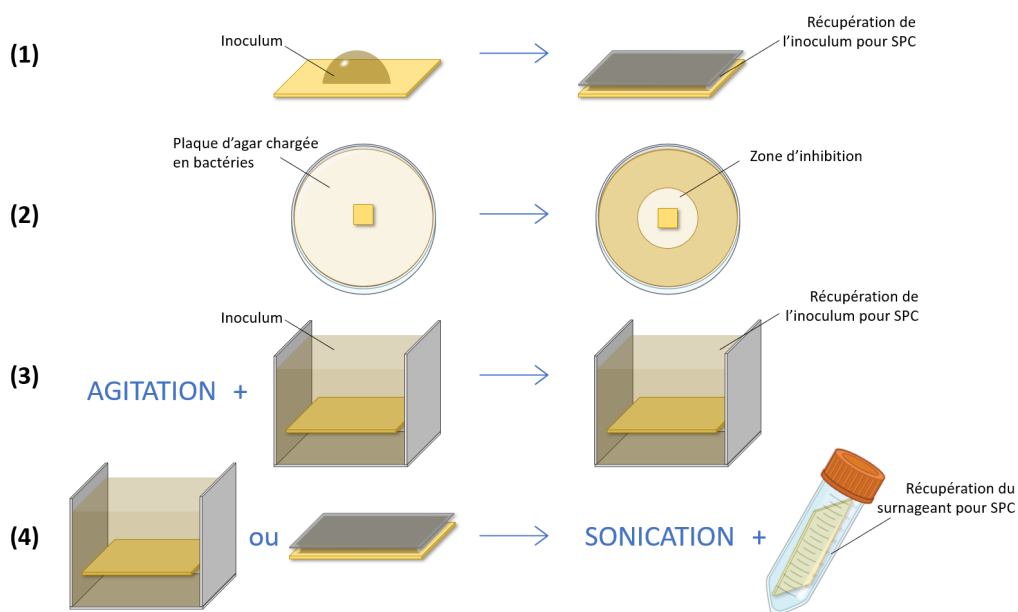


Figure 50 – Illustration du principe de différents procédés d'évaluations d'activité anti-microbienne in vitro. (1) Test de rapport surface/volume élevé. (2) Test de zone d'inhibition sur agar. (3) Test de suspension. (4) Test d'adhésion.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Pour les tests de zone d'inhibition sur agar (2) - Tableau 10, un effet anti-microbien peut être induit avec la pression du matériau sur l'agar, et là encore les conditions sont contraignantes et peu représentatives de celles de l'application finale du matériau (présence de nutriments, ralentissement de relargage, etc.). De plus, cette méthode n'est pas quantitative.¹⁹⁶

Pour les tests de suspension (3) - Tableau 10, d'un côté un volume trop important d'échantillon (quelques mL) peut masquer les effets du relargage, de l'autre l'utilisation de cellules sous leur forme planctonique les rend aussi plus susceptibles aux agents biocides.¹⁹⁶ Certaines normes rendent possible une utilisation de ce test pour évaluer les surfaces bactéricides par contact.¹⁹⁶ Comme pour le test standard décrit précédemment, le matériau à évaluer est placé dans un volume de suspension sous agitation et la réduction du nombre de bactéries en solution est mesurée au bout d'un certain temps. La réduction de la concentration permet d'établir le caractère biocide par contact de la surface. Cependant, cette méthode est critiquée : elle ne permet pas de différencier une réduction de la concentration à cause d'un effet biocide, d'une réduction causée par une grande adhésion des bactéries à la surface.¹⁹⁶ De plus, il n'y a aucune assurance que toutes les bactéries de la solution entrent en contact avec la surface à un moment donné et la réduction du nombre de bactéries en solution est donc souvent insuffisante pour prouver un effet anti-bactérien. Des études approfondies ont finalement démontré que cette méthode n'était pas adaptée à l'évaluation des surfaces tuant par contact.¹⁹⁶

Les méthodes d'adhésion peuvent être réalisées en mode statique ou sous un flux. L'inconvénient principal des essais statiques est que le dénombrement nécessite un rinçage délicat des bactéries non adhérentes. Cette étape peut être critique, car il est reconnu que les interfaces air-liquide peuvent induire des forces permettant de détacher des bactéries adhérentes.⁵⁸ L'utilisation de flux permet de s'affranchir des inconvénients précédents mais les chambres sous flux nécessitent souvent des systèmes de micro-fluidique complexes.

La majorité de ces tests permet donc de quantifier uniquement une propriété anti-microbienne à la fois (relargage ou tuant par contact ou anti-adhésif, etc.), les matériaux pouvant avoir plusieurs actions combinées sont donc rarement caractérisés de manière complète. Cependant, il est possible de combiner plusieurs méthodes pour pouvoir déterminer plus précisément les propriétés de la surface : bien que les méthodes (1), (2) et (3) du Tableau 10 soit uniquement utilisables pour déterminer le relargage (1) et (3) - Tableau 10 peuvent être complétées avec un test d'adhésion (4) - Tableau 10 pour détacher les bactéries adhérentes et déterminer leur viabilité. De la même manière, l'utilisation d'un Petrifilm[®] en combinaison avec un test d'inhibition sur agar permet de discriminer les matériaux tuant par contact de ceux utilisant un relargage, mais il est impossible de quantifier la proportion de chaque propriété si le matériau possède les deux effets.¹⁹⁶

4.1.2. Approches d'imagerie non quantitatives

L'utilisation de méthodes d'imagerie telles que les MEB et AFM est répandue parmi les études visant à caractériser les propriétés anti-microbiennes des matériaux. Bien que ces méthodes ne permettent pas vraiment de quantifier ou de caractériser les effets anti-microbiens, elles peuvent apporter de précieuses informations quant à l'organisation des bactéries sur une surface, les forces de rupture et d'adhésion ou l'effet des agents anti-microbiens ou des nano-structurations sur l'intégrité cellulaire des bactéries, par exemple.^{206,207}

4.1.3. Enjeux du développement d'un protocole complet par caractériser les matériaux anti-microbiens

Comme mis en avant dans les chapitres précédents, le terme "anti-microbien" est utilisé de manière assez vague dans la littérature pour caractériser l'efficacité de différentes surfaces. Ce terme englobe une grande variété de propriétés à caractériser : anti-adhésif, bactéricide, bactériostatique, relargage, etc.

Les approches quantitatives utilisées par les normes telles qu'ISO possèdent chacune des limitations. Afin de dépasser ces inconvénients, de nombreux protocoles sont inspirés des méthodes standards. Cependant, ce déploiement de protocoles spécifique à chaque laboratoire rend problématique la comparaison des résultats, même pour des matériaux similaires.⁵⁸ Il est notamment mis en avant que certains paramètres clefs diffèrent entre les études, comme la concentration de bactéries, le milieu et le temps de croissance au contact des surfaces.⁵⁴ Ces protocoles sont aussi souvent incomplets ou centrés sur la caractérisation d'une seule propriété à la fois (souvent le relargage ou l'adhésion). Ils ne tiennent donc pas compte des différents mécanismes d'action possibles. De plus, les protocoles utilisés ont tendance à différer en fonction du domaine d'étude principal de l'équipe de recherche, comme la fonctionnalisation chimique ou la nano-structuration.

Les méthodes de cultures, bien que considérées comme étant les plus fiables, ne permettent pas de caractériser complètement les propriétés des matériaux anti-microbiens, car elles ne permettent d'estimer que les bactéries viables et cultivables dans un milieu liquide. D'autres méthodes sont donc employées en complément mais celles-ci possèdent elles-aussi leurs biais et désavantages. Les techniques basées sur l'activité catalytique, par exemple, peuvent ne pas être représentatives de la mort cellulaire, car certains biofilms sont capables d'induire un état d'hibernation chez les cellules les composant et réduire leur activité.¹⁹⁶ De même avec les marquages fluorescents, la rupture de l'intégrité de la membrane bactérienne n'est pas toujours synonyme de mort cellulaire car certaines cellules marquées à l'iodure de propidium sont capables de proliférer.¹⁹⁶

Comme souligné dans la très pertinente revue de 2018 de Sjollema *et al*, la difficulté du transfert de technologie entre le développement et l'application des surfaces anti-microbiennes est limitée entre autres par la nécessité d'effectuer des essais statistiques

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

avant la mise sur le marché. La réglementation croissante concernant les tests sur les animaux exige de plus en plus d'obtenir des résultats prometteurs et répétables *in vitro*. Il est donc nécessaire de mettre au point des méthodes de caractérisation complètes et adaptées à la caractérisation de différents mécanismes d'action. Développer un protocole universel, efficace, abordable et applicable à des échantillons possédant des propriétés anti-microbiennes variées est donc un des enjeux majeurs actuellement dans le domaine de la caractérisation des matériaux anti-microbiens.²⁰⁵

De manière plus concrète, il est nécessaire avant de développer un protocole d'établir clairement les questions auxquelles il doit répondre afin de caractériser chaque propriété. Concernant l'aspect anti-salissure ou adhésif de la surface, il est nécessaire d'établir le nombre total de bactéries ayant adhéré sur la surface étudiée par rapport à une référence. Afin de vérifier un effet bactéricide dû au relargage d'espèces actives, une quantification du nombre de bactéries viables avant et après incubation avec le matériau doit être ajoutée au protocole. Pour l'effet bactéricide par contact, la viabilité des bactéries sur la surface après incubation devra être déterminée et finalement, permettre la re-prolifération des bactéries adhérees et quantifier leur capacité à se redévelopper après exposition avec le matériau devrait permettre de séparer un effet bactéricide par contact d'un effet bactériostatique. La quantité de bactéries adhérees sur la surface après un nettoyage devrait aussi permettre de pouvoir établir si la surface est auto-nettoyante ou non.

L'objectif principal de ce chapitre est donc de développer un protocole exhaustif permettant d'apporter des éléments de réponse pour caractériser chaque propriété établie précédemment et de l'utiliser pour caractériser les effets anti-microbiens des échantillons réalisés pendant ce projet. Afin d'y parvenir, tout en ayant un protocole répétable et objectif, il est nécessaire de prendre en compte les différents paramètres intrinsèques aux espèces étudiées et ceux environnementaux pouvant les affecter pendant la caractérisation, comme illustrés en Figure 51.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

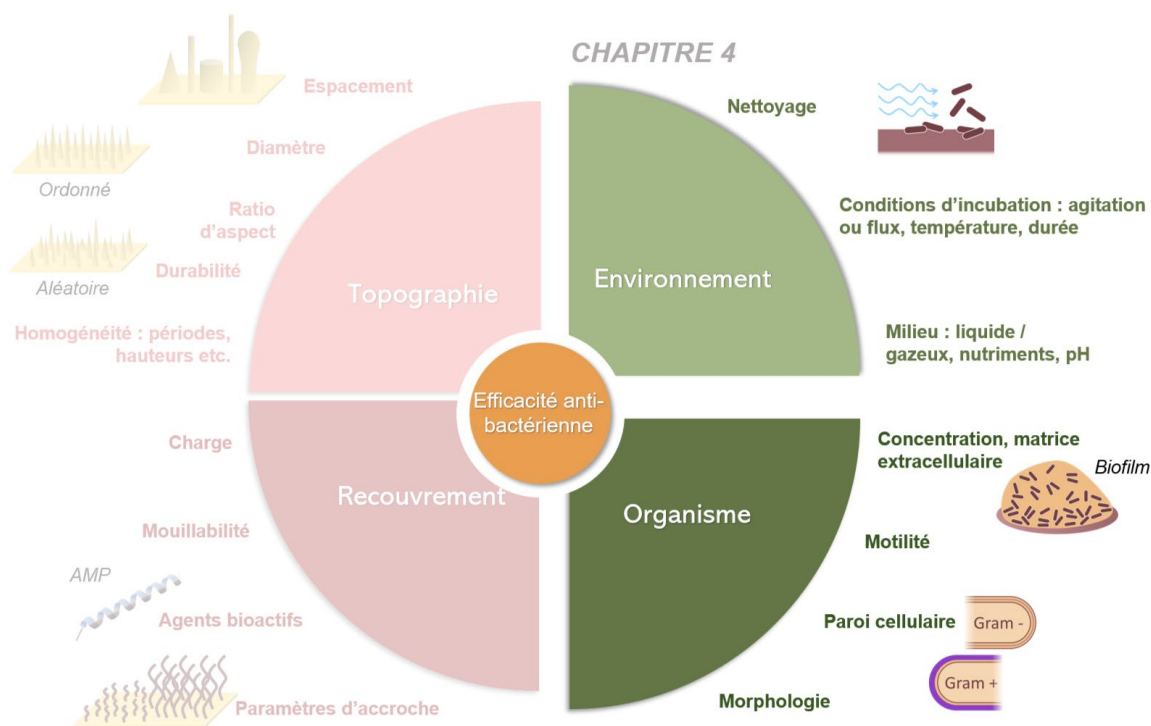


Figure 51 - Les différents facteurs pouvant influencer les propriétés anti-bactériennes d'une surface : focus sur les paramètres environnementaux et ceux dépendants du micro-organisme ciblé.

4.2. Influences des paramètres environnementaux et cellulaires sur la caractérisation des matériaux

4.2.1. Impact des paramètres bactériens

4.2.1.1. Paramètres intrinsèques aux espèces testées

Il a été introduit dans le chapitre précédent que certaines caractéristiques des espèces bactériennes comme leur motilité, leur type de paroi cellulaire et leur morphologie peuvent impacter l'efficacité d'une surface anti-microbienne. De même, différents organismes tels que les virus ou les champignons n'auront pas la même sensibilité à l'activité des surfaces. Afin d'évaluer l'effet large-spectre des surfaces développée, il était donc important de pouvoir tester l'efficacité des surfaces sur une large gamme de micro-organismes, ou à défaut sur des micro-organismes représentatifs de la diversité des cibles.

Dans un premier temps, afin de simplifier le développement du protocole, seulement deux espèces bactériennes sont étudiées, parmi la liste des pathogènes pertinents en [Annexe C](#). *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis* ont donc été sélectionnées pour être les premières espèces testées (présentée dans le Tableau 1). Une fois les conditions d'expérimentation clairement définies pour ces espèces, il pourra être envisagé dans le cadre d'autres travaux d'adapter le protocole pour la caractérisation d'autres micro-organismes.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Comme introduit dans le chapitre 1, ces deux bactéries sont particulièrement intéressantes, car leurs propriétés morphologiques et physiologiques sont très éloignées, que ces espèces sont impliquées dans de nombreuses infections associées aux biomatériaux et sont d'intérêt dans le domaine bio-médical.

Escherichia coli est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet qu'on retrouve généralement dans les infections nosocomiales ou associées aux biomatériaux tels que les endoprothèses biliaires, les filets de renfort de la paroi abdominale (utilisés pour les hernies par exemple) et les cathéters urinaires.²⁰⁵ Cette bactérie est aussi impliquée dans de nombreuses infections liées à la contamination de boissons et de nourriture.²⁰⁸ Sa motilité est active, les bactéries sont capables de recourir à la nage ou l'essaimage pour se déplacer en utilisant de multiples flagelles orientés dans l'axe de son allongement pour se propulser.²⁰⁹ Sa vitesse, pour des liquides avec un faible nombre de Reynolds, peut atteindre les 30 $\mu\text{m/s}$.²⁰⁹ Les bactéries *E. coli* sont capables de former des biofilms rapidement (moins de 2h), même en absence de matière organique.²¹⁰ Avec plus de 250 sérotypes, *E. coli* est une bactérie très polymorphes.²¹¹

Staphylococcus epidermidis est une bactérie à Gram positif sphérique présente dans les infections nosocomiales et associées aux biomatériaux telles que les prothèses articulaires, les greffes vasculaires et les prothèses vocales.²⁰⁵ Sa motilité est passive et est principalement basée sur le glissement causé par la production de surfactant, la formation de comètes et l'éjection.²⁴ Ces bactéries sont aussi capable de formation de biofilm, ce qui aggrave sa prévalence dans les infections associées aux cathéters intraveineux.²¹²

Ces deux espèces sont anaérobies facultatives, ce qui signifie qu'elles peuvent se développer en présence ou non d'oxygène. Leurs temps de génération sont relativement proches, avec généralement 20 min pour *E. coli* et 17 à 38 min pour *S. epidermidis* dans des milieux riches et oxygénés (le temps de génération de certaines bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* peut être de l'ordre de 12 à 16 heures).^{25,213} Ces temps de générations sont à titre indicatif car ils peuvent cependant varier en fonction du type de bactéries utilisées (OGM) et leur provenance. Ces deux espèces, bien que très différentes au niveau de leur caractéristiques phénotypiques, ont donc des conditions de cultures relativement similaires. De plus, il est possible de trouver des sous-espèces de chacune de ses bactéries qui soient de groupe 1, afin de permettre des manipulations hors laboratoire de confinement 2 (voir Tableau 11). Celles-ci ont donc été sélectionnées parmi le catalogue référencé de l'American Type Culture Collection (ATCC) : *Staphylococcus epidermidis* (Winslow and Winslow) Evans ATCC12228 et *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers ATCC11775.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Tableau 11 - Groupes de risque : du plus faible (1) au plus important (4). Adapté depuis le guide des risques biologiques du CNRS, édition mai 2017.²¹⁴

Critère	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Niveau de confinement du laboratoire	1	2	3	4
Pathogène chez l'homme	Non	Oui Probable	Oui Grave	Oui Très grave
Dangereux pour l'opérateur	Non	Oui Modérément	Oui Risque élevé	Oui Risque très élevé
Existence d'un traitement	Pas nécessaire	Oui	Oui généralement	Non
Exemples	<i>E. coli</i> non pathogène	Virus de la rougeole	VIH	Virus Ebola

4.2.1.2. Paramètres de culture

Afin d'avoir des expériences comparables entre différentes bactéries, il est nécessaire de tenter d'uniformiser au maximum le comportement bactérien en fixant leurs conditions de culture.

a. Phase de croissance des bactéries

La croissance d'une population bactérienne est caractérisée par quatre étapes. Dans un premier temps, les bactéries placées dans un nouveau milieu connaissent une phase de latence où aucune croissance n'est observée. Après quelque temps, on observe une phase de croissance exponentielle, où chaque génération de cellules possède le même temps de génération et induisant une augmentation de la population bactérienne. Avec l'appauvrissement en nutriment du milieu, la croissance bactérienne finit par ralentir, des cellules commencent à mourir et une phase stationnaire est observée, où le nombre de nouvelles cellules est équivalent au nombre de cellules mourant. La phase stationnaire est suivie de la phase de mort, au cours de laquelle une diminution progressive de la population bactérienne est observée.²¹³

La phase de croissance des bactéries est un facteur souvent négligé dans l'évaluation des matériaux anti-bactériens. Il a notamment été démontré dans la littérature que des bactéries à différents stades de croissance n'étaient pas affectées dans les mêmes proportions et degrés par des surfaces nano-structurées.⁵⁴ Afin de comparer les études, il est donc important d'uniformiser les protocoles de culture en amont des tests. De plus, cela permet de se placer dans les conditions les plus favorables au développement des bactéries et d'évaluer le pouvoir anti-microbien d'un matériau dans le cas de figure d'une population bactérienne très active.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Dans ce but, il a été décidé d'utiliser des bactéries en phase exponentielle de croissance afin d'avoir une population bactérienne dynamique homogène et minimiser le nombre de cellule mortes dans l'inoculum. Les profils de croissance pour chaque espèce ont donc été établis préliminairement en milieu riche en utilisant du bouillon tryptique de soja (Tryptic Soy Broth en anglais, ou TSB). Dans ces expériences, un échantillon de 3 mL de TSB dans un tube de culture est inoculé avec une colonie bactérienne. L'échantillon est ensuite incubé à 37°C avec une agitation de 300 rotations par minute (rpm). Toutes les 15 minutes, la turbidité est mesurée par densité optique de l'échantillon afin d'établir la cinétique de croissance de la bactérie. Afin de réduire la phase de latence et réduire le temps d'expérimentation le jour même, l'impact d'une pré-culture a aussi été étudié. Pour cela, 3 mL de TSB dans un tube de culture sont inoculés avec une colonie bactérienne et laissée à 37°C sans agitation. Après 17h d'incubation, 300 µL de pré-culture sont ajoutés à 2700 µL de TSB frais. Les résultats du suivi de croissance des espèces avec et sans pré-culture sont illustrés en Figure 52. Sans pré-culture, il peut être observé que le début de la phase exponentielle est vraiment atteint au bout de 30 minutes pour *E. coli* et 250 minutes pour *S. epidermidis*. L'utilisation d'une pré-culture permet de réduire ces temps de latence à moins de 15 minutes pour *E. coli* et 75 minutes pour *S. epidermidis*, et son utilisation a donc été intégrée au protocole final de caractérisation.

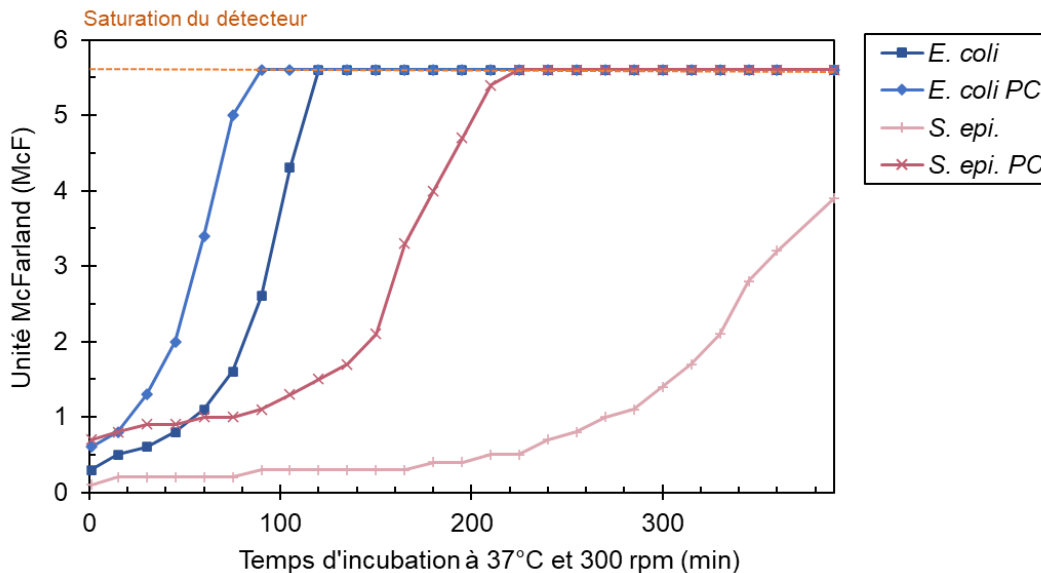


Figure 52 - Courbes de croissance pour *E. coli* et *S. epidermidis* dans du TSB sous agitation, avec pré-culture (PC) ou sans. Les mesures d'OD ont été réalisées à l'aide du densitomètre portable Densimat de bioMérieux.

Dans un premier temps cette expérience a été réalisée en mesurant la densité optique (ou OD) de la solution à l'aide d'un lecteur McFarland. Cette méthode de lecture de la densité optique a permis de fixer les conditions de pré-culture en observant le début de la phase exponentielle de chaque espèce, cependant elle est limitée par sa plage de détection peu étendue. Un densitomètre à 600 nm a donc été utilisé dans la suite du projet. Son

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

utilisation a permis d'établir des profils de croissance plus étendus, de pouvoir accéder à l'intégralité de la phase exponentielle de chaque espèce et de déterminer précisément la conversion entre OD et CFU à l'aide d'un SPC. Les résultats du SPC en phase exponentielle sont les suivants :

Tableau 12 – Conversion OD ↔ CFU après 1h de pré-culture pour *E. coli* et 2h pour *S. epidermidis*, à 37°C et 300 rpm dans du TSB.

<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	OD _{600nm} = 1	8.1 ± 0.8 × 10 ⁸ CFU/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	OD _{600nm} = 1	6.5 ± 0.5 × 10 ⁷ CFU/mL

Les résultats du suivi de croissance des espèces avec pré-culture sont illustrés en Figure 53. Cette expérience a permis de déterminer la durée de la phase stationnaire avec pré-culture, ainsi que de confirmer les temps de génération des espèces bactériennes durant celle-ci, soit 17 minutes pour *E. coli* et 62 minutes pour *S. epidermidis*. Ces temps de générations sont calculés à partir des courbes de croissances des bactéries. Il est possible de revenir au temps de génération des espèces bactériennes entre deux points à partir de la relation suivante :

$$\begin{cases} G = \frac{t}{n} \\ N_B = N_A \times 2^n \end{cases} \leftrightarrow G = \frac{t \times \log(2)}{\log\left(\frac{N_B}{N_A}\right)},$$

avec G le temps de génération, n le nombre de génération, N_A et N_B le nombre de bactéries à l'instant A et B respectivement et t le temps d'incubation entre les deux points.

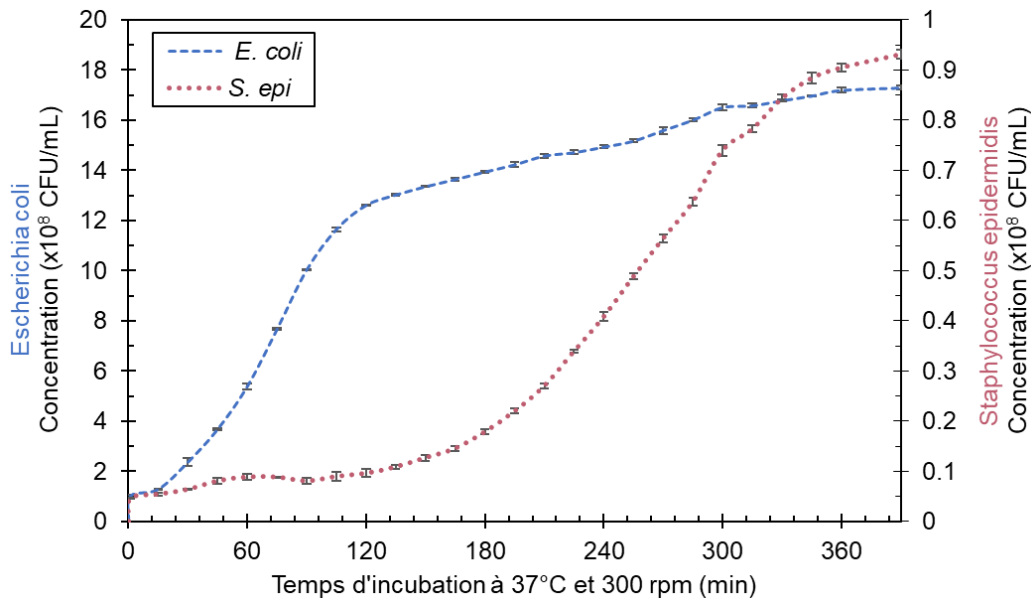


Figure 53 – Courbes de croissance pour *E. coli* et *S. epidermidis* dans du TSB sous agitation. Les mesures ont été réalisées à l'aide du densitomètre photomètre DE N-600 de Biosan, à partir de 3 échantillons issus d'une même pré-culture liquide pour chaque espèce de bactérie et moyennées.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Afin d'utiliser les bactéries quand elles sont dans leur phase exponentielle, il est donc nécessaire d'utiliser une pré-culture sur la nuit puis de faire une culture de minimum 20 minutes pour *E. coli* et 1h pour *S. epi*.

b. Concentration des bactéries

Les tests industriels et microbiologiques standards prévoient généralement l'utilisation d'un inoculum défini en terme de concentration pour chaque espèce, exprimé en CFU par unité de volume. Cependant, cela ne prend pas en compte la surface de l'échantillon testé et donc la densité surfacique de bactéries en interaction avec la surface. Dans le reste du manuscrit, le nombre de bactéries par unité de surface sera définie comme une densité et le nombre de bactéries par unité de volume sera définie comme une concentration pour plus de clarté. De plus, un nombre important d'études ont tenté d'établir une concentration standard à utiliser pour différentes applications. En outre, la concentration d'organismes à partir de laquelle une infection est capable de se déclencher est très variée. Pour certaines organisations de santé, une surface est considérée comme contaminée à partir de 30 bactéries/cm², certaines plaies peuvent s'infecter à partir de 270 bactéries/cm² et la concentration dans l'urine liée à une infection peut varier de 10⁵ à 10⁸ CFU/mL. Il est donc très difficile d'établir une concentration test standard sans prendre en compte l'application finale du matériau et la surface de l'échantillon à tester. En fonction de la taille de surface testée, la concentration initiale peut affecter la distribution des micro-organismes sur la surface. Si la concentration de l'inoculum est trop basse, la détection et l'énumération, la possibilité d'obtenir des événements d'énumération nuls est plus grande et risque d'impacter la moyenne réelle de la densité en surface. Si la concentration de l'inoculum est trop élevée, une saturation peut apparaître, avec l'accumulation et le regroupement de bactéries, ce qui peut introduire une source de variation imprévisible ou inhomogène sur la surface. Il est donc important de trouver un équilibre entre les concentrations expérimentales réalistes liées aux infections et les contraintes spécifiques du système expérimental.

Afin d'observer une adhésion en évitant la formation de biofilm qui pourrait rendre l'énumération par microscopie de fluorescence difficile et impliquerait beaucoup d'étapes de dilution de l'échantillon pour les SPCs, une densité de 1000 bactéries/mm² a été sélectionnée, soit 300 µL d'une solution à la concentration 2 x 10⁵ CFU/mL. Cette concentration a semblé être un compromis acceptable entre les fortes concentrations de 10⁶- 10⁸ CFU/mL classiquement utilisées dans la littérature et dans certaines norme comme la JIS Z 2801 qui sont cependant complètement irréalistes par rapport à des concentrations d'exposition réelles, et des concentrations beaucoup plus basses de 10²- 10⁴ CFU/mL mais cliniquement observables.^{48,113,205,215-218} La concentration a évidemment été adaptée en fonction de la taille de la surface à étudier, afin de toujours correspondre à la même densité bactérienne par échantillon.

4.2.2. Impact des paramètres environnementaux

4.2.2.1. Milieu de culture et temps d'incubation

Dans les méthodes de caractérisation de l'efficacité anti-bactérienne, l'utilisation d'un inoculum liquide est une des techniques les plus répandues avec celle d'un gel inoculé. Bien que ces méthodes soient peu réalistes quant aux conditions réelles de contamination, elles sont accessibles sur un plan technique. En effet, la pulvérisation de bactéries est plus représentative de certaines conditions de contamination que les bactéries en milieu liquide, cependant son utilisation est plus difficile à mettre en œuvre, nécessite un équipement spécialisé, pose des difficultés de contrôle et de reproductibilité de la quantité d'inoculum et peut poser des problèmes de sécurité avec le potentiel relargage de pathogènes dans l'air.⁵⁸ Utiliser un inoculum liquide a donc semblé être plus accessible et son utilisation reste pertinente concernant les enjeux de proliférations dans des secteurs comme le traitement des eaux, les recouvrements aquatiques ou les sondes urinaires.

La sélection du milieu de prolifération des bactéries est là encore un paramètre important pouvant affecter les performances des surfaces. Dans un milieu riche comme le TSB, qui est adapté à la culture d'une large gamme de bactéries, de levures et de moisissures, la prolifération des bactéries est fortement encouragée. Cette croissance induite par la présence de nutriments place le matériau dans les conditions les plus défavorables à son efficacité, avec des bactéries dynamiquement très actives.

Dans plusieurs études, l'utilisation de milieux stériles physiologiques comme un tampon phosphate salin (Phosphate-buffered saline, en anglais ou PBS) ou une solution de NaCl 0.9% permet d'incuber les bactéries avec les surfaces sans risque d'une prolifération exponentielle. Cependant ces milieux ne sont pas optimisés pour la survie des bactéries et selon les espèces ces milieux peuvent même réduire la viabilité des cellules.

D'autres milieux sont optimisés pour empêcher la prolifération des bactéries tout en limitant leur mortalité. C'est le cas des milieux de récupération maximale, tel que le bouillon de sel de tryptone (Tryptone Salt broth, en anglais ou TS) qui possède une composition permettant de limiter le choc physiologique que subissent les cellules bactériennes lorsqu'elles sont introduites dans un milieu physiologique. Ce milieu possède un niveau de peptone suffisant pour assurer la survie des organismes présents pendant 1 à 2 heures, mais aussi empêcher leur multiplication.

L'avantage principal de l'utilisation d'une solution physiologique ou d'un milieu pauvre comme milieu d'incubation avec la surface est que la prolifération est limitée, ce qui permet de comparer plus facilement le nombre de bactéries en début d'expérience et post-incubation. Cela permet d'adapter plus facilement les dilutions pour le SPC et de ne pas former de biofilm qui rendrait l'énumération par fluorescence difficile. Cependant, il

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

est important de s'assurer que pendant la durée de l'expérience, la mortalité des bactéries est due à l'action des surfaces exclusivement, et non au milieu liquide employé.

Afin de contrôler l'effet des différents milieux sur la viabilité des bactéries, 3 échantillons de 2 mL d'une pré-culture dans du TSB sont centrifugés pour chaque espèce et les bactéries sont re-suspendues dans du TSB frais, du TS ou du PBS. Les solutions bactériennes sont ensuite incubées pendant 2h à 37°C avec une agitation de 150 rpm. Un SPC est utilisé pour mesurer la concentration réelle en bactéries vivantes des échantillons au début de l'incubation ($t = 0$) et au bout de 2h. Les résultats de l'énumération sont illustrés en Figure 54.

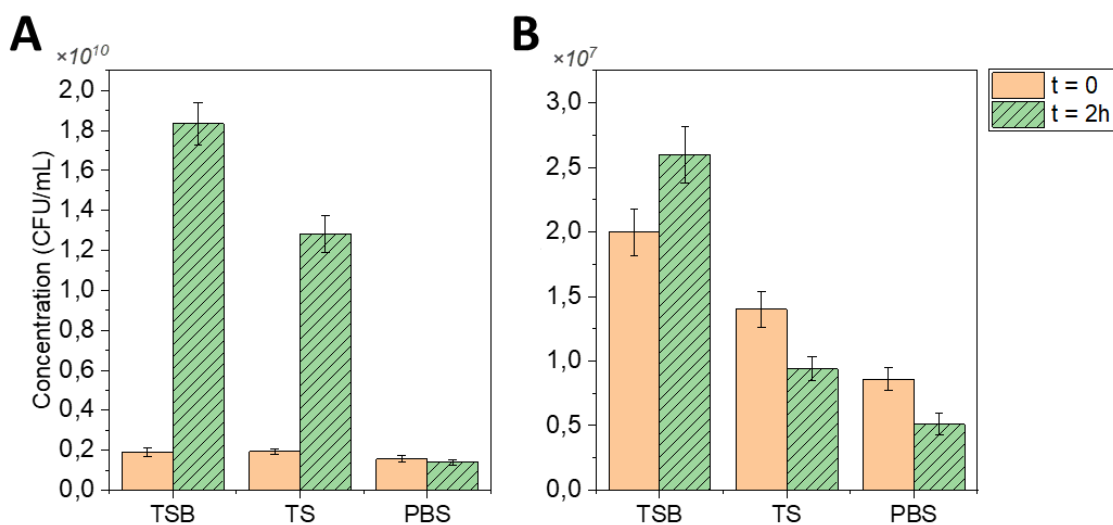


Figure 54 – Mesure par SPC de l'évolution de la concentration en bactéries après 2h d'incubation à 37°C avec une agitation de 150 rpm dans différents milieux pour **A.** *Escherichia coli* ; **B.** *Staphylococcus epidermidis*. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% de l'énumération sur au moins 3 boîtes pour chaque dilution, dont le dénombrement est compris entre 25 et 250 CFU/boîte.

Il peut être observé que pour le milieu riche TSB, une augmentation de la concentration est visible après 2h d'incubation pour les deux espèces bactériennes. Contrairement à ce qui été attendu, une augmentation conséquente de la concentration pour *E. coli* est observée pour le milieu de récupération TS. L'utilisation du PBS en revanche engendre une stagnation de la concentration qui confirme que cette espèce bactérienne ne peut pas proliférer en solution dans ce milieu. Pour *S. epidermidis*, une diminution de la concentration est visible pour le TS comme pour le PBS et cela dès la re-suspension des bactéries dans les différents milieux à $t = 0$.

À la suite de ces expériences, l'utilisation du PBS pour l'incubation a été décidée pour le protocole final. La mortalité engendrée par la sélection de ce milieu pour *S. epidermidis* pourra être remise en perspective avec celle mesurée pour la surface contrôle.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

4.2.2.2. Nettoyage et conditionnement des échantillons pré-caractérisation

Dans une grande partie des protocoles d'évaluation des propriétés antibactériennes des surfaces décrits dans la littérature, l'efficacité est évaluée sans précision sur le pré-traitement ou la stérilisation de l'échantillon préalable à l'exposition aux bactéries. Cependant, cette étape peut grandement modifier les propriétés des surfaces, avec la création de résidus à la suite de l'interaction d'un nettoyant avec une fonctionnalisation ou la modification de la topographie de la surface.

En ce qui concerne la préparation des surfaces préalables à la fonctionnalisation, les surfaces des échantillons sont nettoyées à l'aide de lavages successifs dans différents solvants (Acétone – 2-propanol – Eau) puis d'un plasma composé à 75% d'oxygène (O_2) et à 25% d'argon (Ar), permettant d'éliminer les résidus organiques sur la surface. Après le dépôt des AMPs et l'étape de formation des SAMs pendant 17h, les échantillons fonctionnalisés sont rincés en utilisant le solvant utilisé pour solubiliser les peptides afin d'enlever les résidus d'AMPs n'ayant pas formé de SAMs. Ce rinçage est suivi d'un bain d'eau ultra-pure, puis d'une stérilisation sous poste de sécurité microbiologique avec de l'éthanol à 70° avant caractérisation microbiologique. L'éthanol est un solvant couramment utilisé pour l'auto-assemblage de thiols sur or.^{219,220} Les SAMs sur substrats d'or sont relativement difficiles à nettoyer et des traitements puissants sont nécessaires pour les éliminer : traitement ozone, rayonnement UV, le traitement thermique (plus de 200 °C), méthodes électrochimiques, faisceau laser ou solution de $NH_4OH-H_2O_2 - H_2O$.^{220,221} Le rinçage avec de l'éthanol ne risque donc pas d'interagir avec les thiols lors du nettoyage post-fonctionnalisation.

Par ailleurs, l'impact du plasma $O_2 + Ar$ sur les nano-structures nécessite d'être caractérisé. En effet, certaines études ont démontré une modification de la topologie de surfaces d'or plan après plasma, il est donc possible d'observer un changement dans la topographie des matériaux post-plasma.¹⁰⁴ Sur surface plane, l'augmentation de la rugosité est visible directement après plasma et a tendance à diminuer jusqu'à se rapprocher de la valeur de référence après 24h.¹⁰⁴ Des substrats d'or plans et nano-structurés avec des pics de différentes hauteurs moyennes ont donc été caractérisés par AFM et MEB avant et après passage au plasma (voir Tableau 13).

Tableau 13 – Échantillons utilisés pour l'évaluation de l'impact du traitement plasma sur la topographie des nano-structures dorées.

Nom échantillon	Conditions d'électrodépôt			Hauteur post-fabrication
	Durée	[HAuCl ₄]	[Pb(CH ₃ COO) ₂]	
Référence	0 s	N/A	N/A	~ 2 nm
100s_100:0.5mM	100 s	100 mM	0.5 mM	156 ± 11 nm
300s_100:0.5mM	300 s	100 mM	0.5 mM	439 ± 16 nm

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Les mesures AFM post-plasma ont été réalisées 17h après le traitement plasma, dans l'air et à température ambiante et les résultats sont illustrés en Figure 55 et Figure 56.

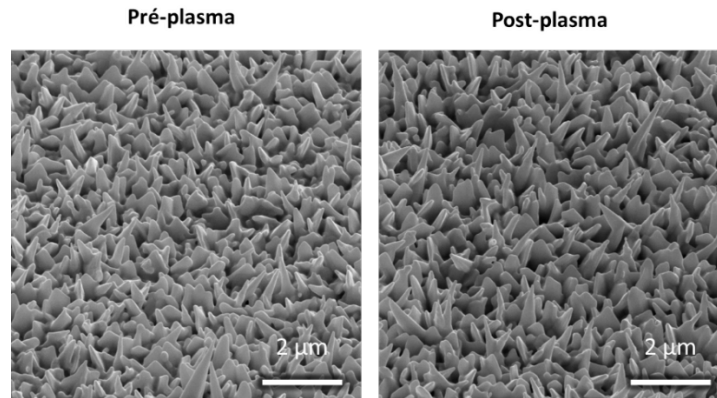


Figure 55 – Micrographies MEB des échantillons nano-structurés (300 secondes avec 100 mM d' HAuCl_4 et 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) avant et 17h après plasma. Les mêmes résultats sont observables pour les échantillons de 100 secondes avec 100 mM d' HAuCl_4 et 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

Pour l'or plan comme pour les deux types d'échantillons nano-structurés, la caractérisation AFM n'a démontré aucune différence significative de hauteur moyenne pour les mesures avant et après plasma, ce qui est confirmé par les micrographies MEB.

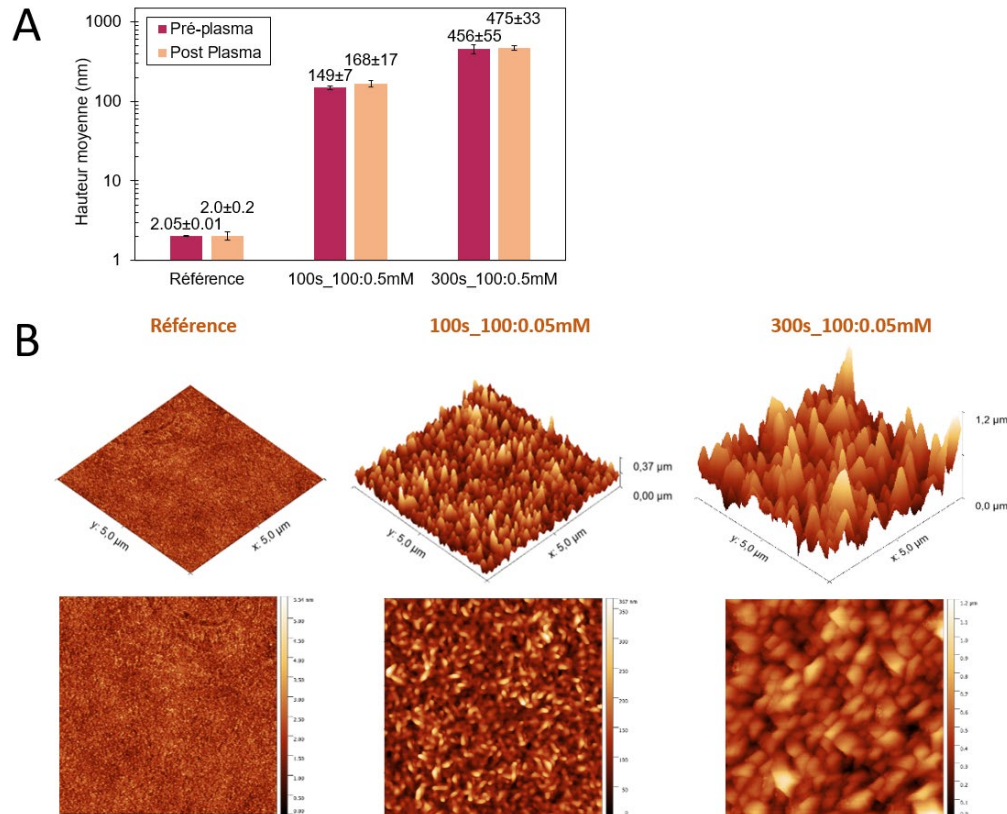


Figure 56 – Caractérisation AFM des échantillons plans et nano-structurés pré- et post-plasma. Les noms des échantillons correspondent à leurs conditions d'ED sous le format temps-de-dépôt_[Au:Pb]. Les images AFM ont été

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

acquises en mode Tapping avec un taux de balayage fixé à 0,5 Hz pour $25 \mu\text{m}^2$ (512×512 lignes). Les moyennes et barres d'erreurs des échantillons sont calculées à partir d'au moins 3 images par échantillons, grâce à la hauteur moyenne obtenue pour chaque image calculée grâce à Gwyddion.

Il a donc été conclu de ces expériences que l'utilisation du plasma pour nettoyer les surfaces des contaminations organiques ne posait pas de problèmes de modification des nano-structures après 17h d'attente post-traitement. Cependant, des expériences complémentaires ont démontré que l'utilisation d'un tel plasma peut avoir d'autres conséquences que la modification topologique des échantillons.

4.2.2.3. Suspicion de présence d'oxyde d'or généré par plasma

Premièrement, un nettoyage plasma augmente la réactivité de la surface et peut drastiquement modifier sa mouillabilité, comme illustré en Figure 57. Ce paramètre peut impacter de manière conséquente l'interaction entre les bactéries et les propriétés de la surface et ne doivent donc pas être modifiées artificiellement par le plasma.

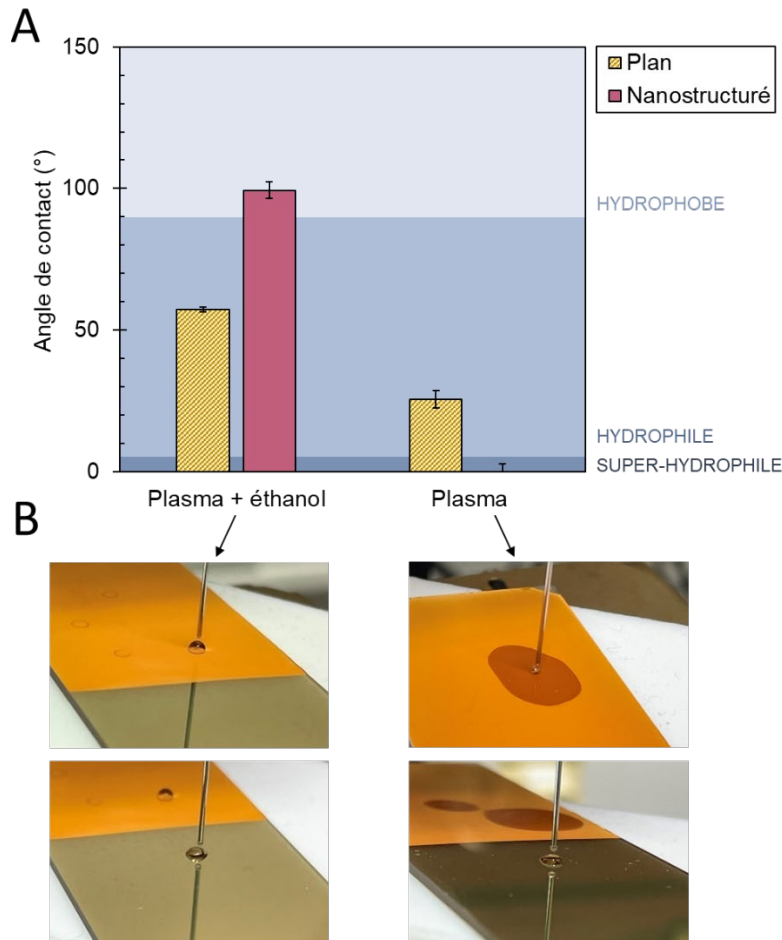


Figure 57 – Évaluation de l'évolution de la mouillabilité de la surface après un traitement plasma oxygène, suivi d'un nettoyage à l'éthanol ou non. **A.** Résultats de la mesure d'angle de contact; **B.** Photographies illustrant la mouillabilité des surfaces pour les deux traitements.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

De plus, lors de l'exposition de surfaces dorées à des radicaux d'oxygène, un oxyde de surface métastable peut se former.^{222,223} La présence d'un tel oxyde lors de la caractérisation microbiologique peut biaiser les résultats, les oxydes métalliques étant connus pour avoir des propriétés anti-microbiennes, notamment grâce à l'apparition de ROS. Cet oxyde est instable, mais l'or peut mettre plusieurs jours à revenir à son état d'origine après un plasma.²²⁴ La couche d'oxyde peut cependant être réduite plus rapidement grâce à un bain d'éthanol pur pendant plusieurs minutes.²²⁵ L'apparition d'un oxyde d'or, réduit par le contact à l'éthanol serait cohérent avec les résultats d'angle de contact, les oxydes métalliques étant en général de nature hydrophile.²²⁶

Afin d'estimer la concentration élémentaire présente en surface post-plasma et post-rinçage éthanol, des mesures d'XPS sur différents échantillons préparés en amont ont été réalisées au CEA-LETI par Nicolas Gauthier et les spectres ont été analysés avec l'aide d'Hippolyte Durand. La présence d'une plus grande quantité d'oxygène en surface a notamment été démontrée, avec une augmentation de près de 14% (en proportion totale) entre une surface passée au plasma uniquement et une surface passée au plasma puis à l'éthanol 70° pendant 15 minutes (voir Figure 58). Les spectres et modèles de fit utilisés sont fournis en [Annexe F](#) et [Annexe G](#).

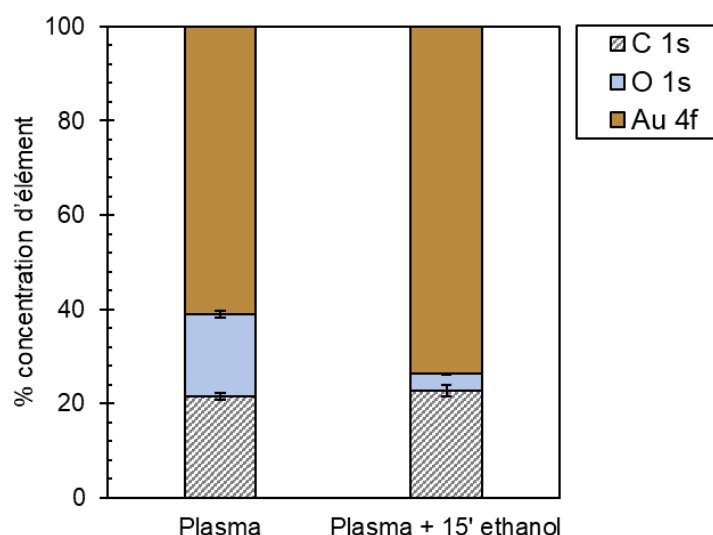


Figure 58 – Quantification basée sur l'analyse des spectres XPS des différences de pourcentage élémentaires cumulé d'oxygène et d'or pour des échantillons passés au plasma, et nettoyés ou non à l'éthanol 70°. Les moyennes sont obtenues à partir de 3 mesures pour chaque échantillon et les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% de la mesure.

Afin d'éliminer la piste d'un potentiel relargage d'or ou d'oxyde d'or à cause du traitement plasma dans l'inoculum lors de la caractérisation, une analyse par spectrométrie d'émission optique par plasma à couplage inductif (ICP-OES) a été effectuée. Cette technique permet de déterminer la composition d'éléments dans des échantillons liquides à l'aide d'un plasma couplé avec un spectromètre. La sensibilité de l'ICP est de l'ordre du

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

µg/L. Les surfaces ayant été nettoyées au plasma ont donc été mises au contact de PBS pendant 2h, puis celui-ci a été récupéré et analysé à l'aide de l'ICP et aucune trace d'or, ni d'aucun autres élément en dehors de ceux présents dans la composition du PBS n'ont pu être détectés.

4.2.2.4. Autres paramètres expérimentaux

Il est important de mentionner qu'une multitude d'autres paramètres peuvent impacter l'efficacité des surfaces pendant leur caractérisation : humidité, température, flux d'air, répartition de l'inoculum, temps d'exposition, etc. Pour les méthodes employant des volumes faibles comme les tests avec rapport surface/volume élevé, l'humidité et la température de la chambre d'incubation sont décisives pour éviter l'évaporation trop rapide du milieu. Pour les tests de suspension et d'adhésion, l'agitation va permettre d'homogénéiser le relargage s'il y en a ou de favoriser l'interaction d'un plus grand nombre de bactéries avec la surface. Le choix de puits ou de contenants adaptés pour les tests de suspension est aussi important. La température quant à elle permet d'accélérer le développement des bactéries dans les milieux riches.⁵⁸

Pendant le développement du protocole, ces paramètres ont donc pu être explorés et adaptés aux différentes méthodes de caractérisation employées.

4.3. Optimisation des étapes du protocole

Afin d'apporter des réponses aux différents objectifs devant être remplis par le protocole, plusieurs méthodes d'évaluation des propriétés anti-microbiennes ont été explorées pour quantifier l'adhésion et la viabilité des bactéries sur la surface et en solution.

4.3.1. Énumération sur gélose

De la littérature, il ressort clairement que les méthodes d'énumération basées sur la culture des bactéries restent les méthodes les plus robustes afin de quantifier la viabilité des bactéries grâce à leur fiabilité, leur faible coût et leur adaptabilité à différentes espèces.²⁰⁵ Cependant, leurs contraintes matérielles telles que le nombre de boîtes à étaler et la quantité de réactif utilisé pour des échantillons inutilisables sont un frein majeur à leur utilisation, en particulier pour les tests avec un nombre important d'échantillons. La nécessité d'utiliser des triplicats et un grand nombre de dilutions afin d'obtenir des résultats statistiquement représentatifs augmente drastiquement le nombre d'étalements à effectuer pour chaque échantillon.

De manière plus pratique et dans le cadre de la caractérisation en parallèle de l'effet anti-microbien de plusieurs AMPs immobilisés sur un matériau, l'utilisation d'un SPC standard pour chaque échantillon reviendrait à étaler plus d'une cinquantaine de plaques par expérience au minimum.

Habituellement pour un SPC standard, 2 à 3 dilutions sont nécessaires pour estimer la concentration d'un échantillon. Limiter le nombre de dilutions en visant uniquement

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

celles statistiquement pertinentes est un moyen de réduire la quantité de consommables utilisés. Pour cela, il est nécessaire de pouvoir connaître approximativement la concentration des échantillons. Or, dans le cadre d'une activité anti-microbienne inconnue, la concentration des échantillons après interaction avec la surface est imprévisible et une plage de dilution large doit être explorée. La mesure de la densité de surface ne pouvant être utilisée qu'avec des échantillons très concentrés, il est donc impossible de réduire la plage de dilution.

Le dénombrement par goutte (Spot Plating Assay, en anglais ou SPA) est une méthode alternative au SPC qui permet de réduire le nombre de manipulations, de consommables et de temps consacrés pour l'étalement des échantillons. Le principe de cette méthode est de réduire l'échelle du SPC pour faire tenir les étalements dans une même plaque. Une goutte de quelques micro-litres, déposées plusieurs fois et pour plusieurs dilutions sur une unique boîte de pétri permet le dénombrement du nombre de bactéries viables dans l'échantillon. Cette méthode a été utilisée efficacement pour dénombrer des solutions et est, avec des paramètres optimaux, similaire et autant statistiquement valable qu'un SPC.²²⁷⁻²³⁰

Afin d'accélérer les dénombrements, cette méthode a donc été employée dans le protocole final à la place des SPC initialement utilisés. Pour cela, des boîtes de Petri de 120 mm de côté ont été utilisées afin de maximiser la surface de la gélose. Après plusieurs tests, il a été établi que jusqu'à 6 gouttes de 30 μ L pouvaient être déposées en série sur la largeur de la boîte, permettant de dénombrer 36 gouttes par boîtes au maximum. Afin de conserver une marge et de ne pas saturer la boîte, 6 gouttes diluées en série, répétées 4 fois ont été utilisées pour chaque échantillon. Le principe d'un SPA standard est illustré en Figure 59.

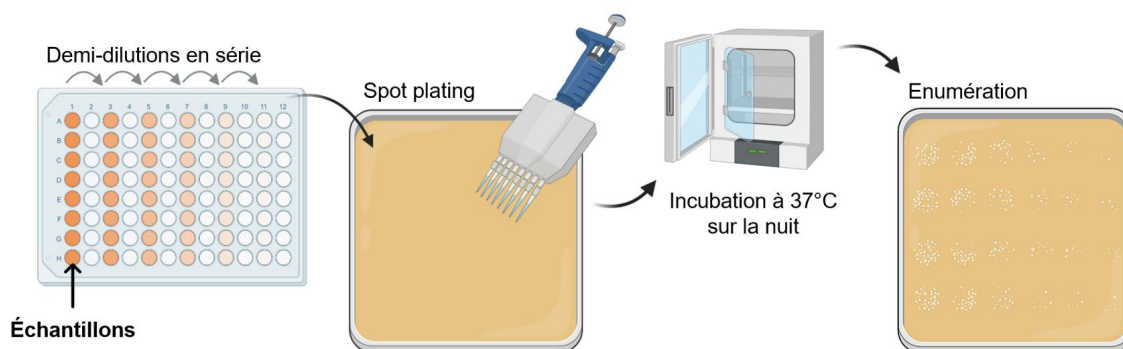


Figure 59 - Déroulement du SPA pour le dénombrement de la concentration en bactéries vivantes des échantillons liquides. Les dilutions en série utilisées peuvent aussi être de dilutions par 5 ou par 10.

La mise en place du SPA dans le protocole a donc permis d'accélérer l'étape d'énumération des bactéries en solution et de permettre de traiter un plus grand nombre d'échantillons en parallèle. Cette étape du protocole pourra être utilisée pour caractériser la concentration exacte de l'inoculum et la viabilité de bactéries dans la solution en contact avec les échantillons.

4.3.2. Microscopie de fluorescence et marqueurs de viabilité

Afin de déterminer le nombre de bactéries ayant adhéré à la surface ainsi que leur état de viabilité, la fluorescence avec marqueurs de membranes telle que le kit live/dead BacLight™ d'Invitrogen semble être une des méthodes les plus pertinentes.

Les surfaces des échantillons (puits) faisant 56 mm², il est impossible de pouvoir couvrir l'entièreté de la surface par microscopie. Le choix de l'objectif du microscope doit donc tenir compte de la résolution nécessaire pour énumérer correctement les bactéries unitaires et de la surface totale couverte par l'image. Après utilisation de plusieurs objectifs, il a été déterminé que le grossissement minimal permettant de discerner les bactéries distinctement tout en couvrant la plus grande surface possible était un grossissement x20. Afin de faire une estimation de la population bactérienne sur la surface, cinq zones aléatoires sur la surface de l'échantillon sont imagées, ce qui représente à ce grossissement 4% de la surface totale de l'échantillon. Pour un grossissement x40, cette proportion tombe à moins de 1%, et pour un grossissement x10, les bactéries sont difficilement discernables quand elles sont regroupées en paquet. Augmenter le nombre de micrographies par échantillon permettrait d'augmenter la superficie couverte et donc la robustesse statistique du dénombrement, cependant avec la mise en parallèle de plusieurs échantillons à imager, cela prendrait trop de temps par échantillon (plus d'une minute par duo d'image, soit environ 1h pour 8 échantillons) et ceux-ci pourrait sécher. De plus, l'impact des fluorophores présents dans le kit live/dead est de plus en plus discuté et remis en question, et il est possible que ces intercalants ai un effet nocif pour la viabilité des bactéries après un certain temps d'exposition.^{201,231} Réduire le temps d'échantillonnage pour la fluorescence est donc nécessaire et limite la quantité d'image obtenues.

Les filtres de fluorescence Cy3 et GFP compatibles avec les longueurs d'onde d'émission et d'excitation des fluorophores, recensés dans le Tableau 14, ont été utilisés. D'autres paramètres liés à l'acquisition des images de fluorescence doivent être adaptés en fonction des échantillons comme les proportions et le volume de chaque marqueur fluorescent.

Tableau 14 – Longueurs d'émission et d'excitation des filtres utilisés et des fluorophores du kit BacLight™.

Filtre/ Fluorophore	Émission	Excitation
Cy3-4040C	570 – 613 nm	513 – 556 nm
GFP-1828A (FITC)	502 – 538 nm	457 – 487 nm
SYTO® 9	500 nm	480 nm
PI	635 nm	490 nm

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Des images non-traitées de fluorescences avec un grossissement x20 sur *E. coli*, obtenues pour une même zone avec les deux marqueurs en utilisant leurs filtres associés sont illustrées en Figure 60.

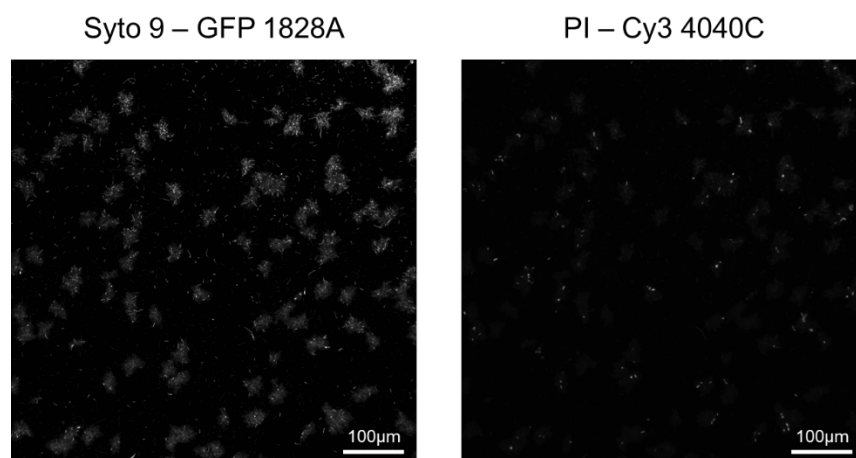


Figure 60 – Exemple d'images types obtenue par microscopie de fluorescence d'*E. coli* sur des surfaces d'or planes.

4.3.3. Récupération des bactéries adhérees aux surfaces

Afin de caractériser l'effet anti-salissure, adhésif ou actif par contact d'une surface, il est nécessaire de pouvoir établir précisément le nombre de micro-organismes ayant adhéré. Un certain nombre de méthodes et de protocoles sont décrits dans la littérature pour réaliser le décrochage des bactéries.

4.3.3.1. Décrochage par ultrasons

Les bains à ultrasons sont couramment utilisés pour le nettoyage de diverses surfaces et leur efficacité a été étudiée pour détacher les bactéries et les biofilms. Le décrochage par ultrasons est donc utilisé dans plusieurs méthodes de caractérisations microbiologiques et notamment dans les normes JIS Z 2801 et ISO 22196.²⁰⁵

En s'inspirant de plusieurs protocoles visant à évaluer l'efficacité anti-microbienne de surfaces fonctionnalisées, différentes expériences de dénombrement des bactéries viables adhérees ont été effectuées.^{99,113,232} Cependant, les résultats peu reproductibles obtenus ont mené à considérer l'impact des ultrasons sur les bactéries ainsi que les différents systèmes de bain ultrasons utilisés.

La viabilité de bactéries avant et après passage 3 minutes dans un bain ultrasons (Elmasonic S15 - 35 W / 37 kHz) a en particulier été évaluée à l'aide d'un SPC. Les résultats démontrent une réduction de la viabilité de l'ordre de 18%, cependant d'autres expériences dans les mêmes conditions ont démontré une augmentation ou une stagnation de la concentration. L'uniformité des ultrasons ainsi que la fréquence et la puissance employées ont donc été remis en cause. La répartition de l'intensité des ultrasons peut être facilement vérifiée par un simple test utilisant une feuille d'aluminium plongée dans le bain, comme illustré en Figure 61. Ce test a été effectué pour

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

plusieurs modèles de bains ultrasons pour vérifier l'homogénéité des ultrasons selon deux plans (profondeur dans le liquide et positionnement dans le bain). Pour tous les modèles, une répartition hétérogène a été observée, avec la majorité de la puissance au centre du bain et en surface. Cela illustre bien le fait que le positionnement de l'échantillon dans le bain et le type de bain utilisé peut impacter fortement son traitement et la reproductibilité de l'expérience.

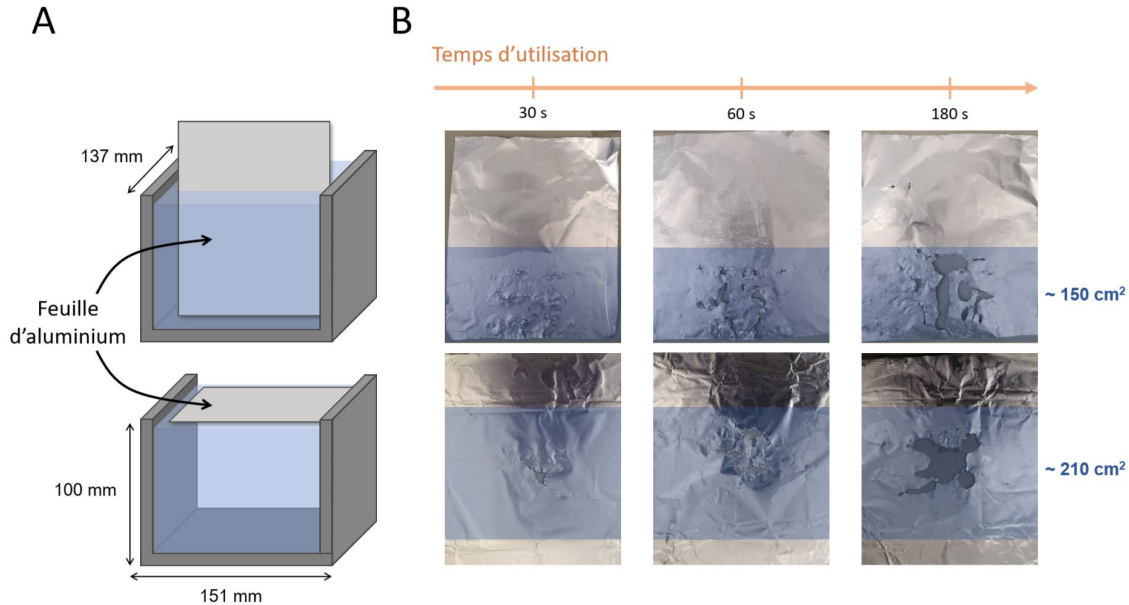


Figure 61 - Test de la feuille d'aluminium pour visualiser la répartition des ultrasons. **A.** Positionnement vertical et horizontal des feuilles dans le bain; **B.** Résultats en fonction du temps de l'effet des ultra-sons sur la surface en contact avec le bain (zone bleue)

Un autre inconvénient de l'utilisation des ultrasons est le réchauffement possible de l'échantillon à cause des phénomènes de cavitation. L'augmentation de la température du milieu peut réduire la viabilité et la croissance des bactérie présentes dans celui-ci ou au contraire promouvoir leur croissance.^{58,233} En fonction de la fréquence et de l'intensité, les bactéries peuvent être impactées différemment, comme illustré dans la Figure 62.

	High frequency (> 500 kHz)		
High intensity (> 5 W/cm ²)	<ul style="list-style-type: none"> Bacteria declumping Bacterial killing 	<ul style="list-style-type: none"> Increase drugs' delivery Stimulate of tissue regeneration 	Low intensity (< 3 W/cm ²)
	<ul style="list-style-type: none"> Acoustic biocidal effect Ultrasonic cleaner of surfaces 	<ul style="list-style-type: none"> Increase drugs' activity Increase bacterial growth 	
	Low frequency (< 500 kHz)		

Figure 62 - Impacts biologiques des ultrasons sur les bactéries en fonction des différents niveaux de fréquence et d'intensité. Reproduit depuis Li et al conformément à la licence [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).²³⁴

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Pour des intensités et des fréquences trop importantes, les bactéries peuvent mourir et la concentration décroître. Dans le cas du bain ultrason Elmasonic, la faible intensité et la basse fréquence utilisées auraient plutôt tendance à augmenter la croissance des bactéries, cependant le manque d'uniformité des ultrasons dans le bain ne permet pas de garantir que cet effet est le même partout, en fonction d'où est placé l'échantillon dans le bain.

De plus, bien que les bains ultrasons soient largement employés, il est difficile de trouver dans la littérature les informations concernant leur puissance et leur fréquence. Celles-ci peuvent aussi différer en fonction des études, ainsi que le niveau d'eau, ce qui rends difficilement comparable les résultats de caractérisation micro-biologiques obtenus. La trop grande variabilité des effets des ultrasons sur les bactéries, couplée avec la difficulté de contrôler précisément leurs paramètres a donc amené à considérer d'autres protocoles de détachement des bactéries.

4.3.3.2. Décrochage par tamponnage

Le tamponnage est une méthode de décrochage des bactéries inspirée des Petrifilm. En apposant l'échantillon contaminé sur une gélose plusieurs fois, les bactéries adhérentes et viables sur la surface sont transférées vers le milieu de culture solide où elles peuvent se développer et être énumérées (voir Figure 63).

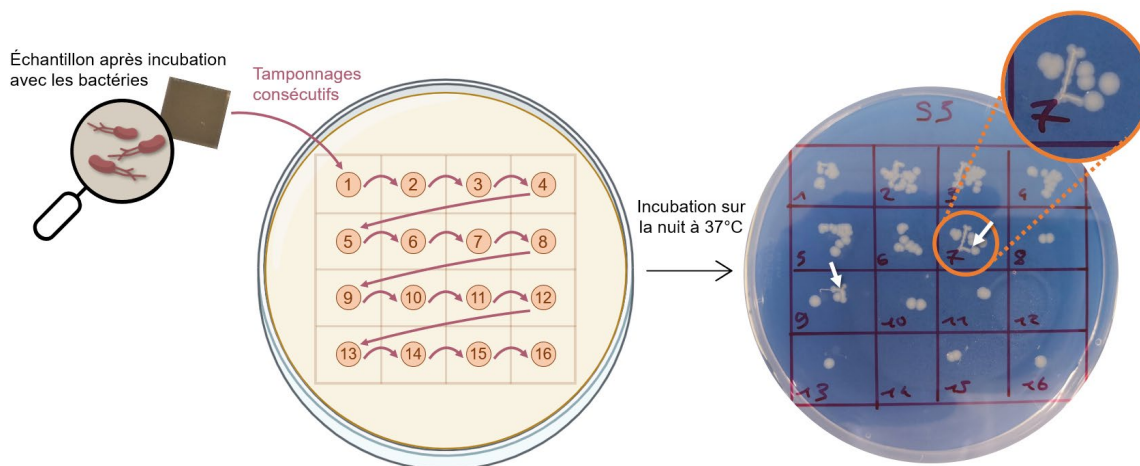


Figure 63 – Méthode de tamponnage pour le décrochage de bactéries adhérentes.

Cependant cette technique a vite été éliminée, car elle ne fonctionne que pour de faibles concentrations et entraîne souvent des amas de bactéries difficilement dénombrables. De plus, cette méthode est particulièrement sensible à la pression employée pour le transfert et est coûteuse en temps, chaque échantillon devant être tamponné plusieurs fois. La gélose est un milieu relativement fragile et les bords des échantillons peuvent générer des coupures dans celle-ci, rendant le dénombrement impossible (illustré par les flèches blanches dans la Figure 63). En outre, le taux de transfert est inconnu et il est possible qu'un certain nombre de bactéries restent adhérentes sur la surface du matériau.

4.3.3.3. Quid d'un protocole de caractérisation de l'activité antimicrobienne sans détachement des bactéries ?

Détacher mécaniquement les bactéries sans affecter leur état de viabilité et en assurant le décrochage de l'ensemble des cellules présentes sur une surface semble complexe et aléatoire. Sans cette caractérisation, il est difficile de distinguer une surface active par contact bactéricide, d'une bactériostatique. De plus, le marquage au PI (kit BacLight™) des bactéries n'est parfois pas représentatif de leur réelle viabilité, ce qui empêche l'utilisation exclusive des résultats de la microscopie de fluorescence pour déterminer la viabilité des bactéries adhérentes. Il devient difficile de déterminer si les bactéries en contact avec la surface sont capables de re-proliférer une fois décrochées. Il a donc fallu trouver une autre solution pour caractériser l'ensemble de ces propriétés sans passer par le décrochage des bactéries. À cet effet, l'utilisation d'une double incubation, sans décrochage mécanique, comme l'ont fait Parreira *et al.* dans leur publication de 2019 semble appropriée.²¹⁵ Le principe de cette méthode est basé sur la ré-incubation d'une surface ayant été en contact avec un inoculum, afin de permettre le décrochage naturel des bactéries adhérentes après la première incubation et leur prolifération. La double incubation, combinée avec la microscopie de fluorescence, permet donc de vérifier la quantité et la viabilité réelle des bactéries se décrochant de la surface après exposition au matériau, sans utiliser d'action mécanique pouvant biaiser leur état.

À la suite d'optimisations, un protocole général de caractérisation des propriétés antimicrobiennes a été utilisé. Les étapes principales de celui-ci sont illustrées en Figure 64 et le protocole détaillé est disponible en [Annexe K](#). Afin de réaliser les expériences avec une viabilité optimale pour les bactéries, une pré-culture est effectuée sur la nuit précédant les expériences. En début d'expérimentation, l'inoculum est enrichi pendant 1h pour *E.coli* et 2h pour *S. epidermidis* afin d'obtenir une solution suffisamment concentrée pour mesurer sa concentration grâce à un spectromètre à 600 nm. La concentration est ensuite ajustée pour chaque espèce bactérienne par des dilutions en séries afin d'inoculer les échantillons avec environ 1000 bactéries/mm², soit $\sim 2 \times 10^5$ CFU/mL pour un puits de 300 μ L d'une superficie de 56 mm².

Une première incubation dans du PBS pendant 2h est effectuée sous agitation afin de permettre aux bactéries d'interagir avec la surface. La quantification du nombre de bactéries viables en solution après l'incubation, combinée avec la quantification de l'adhésion bactérienne par microscopie de fluorescence permet d'évaluer la viabilité en solution et l'adhésion, ainsi que le nombre de bactéries par unité de surface et la proportion de bactéries viables/non-viables (voir Figure 64 et Tableau 15). Une seconde incubation dans du TSB cette fois permet de quantifier le décrochage des bactéries et ainsi leur capacité à proliférer. De cette manière, l'activité bactériostatique, bactéricide ou très adhésive de la surface peut être établie.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

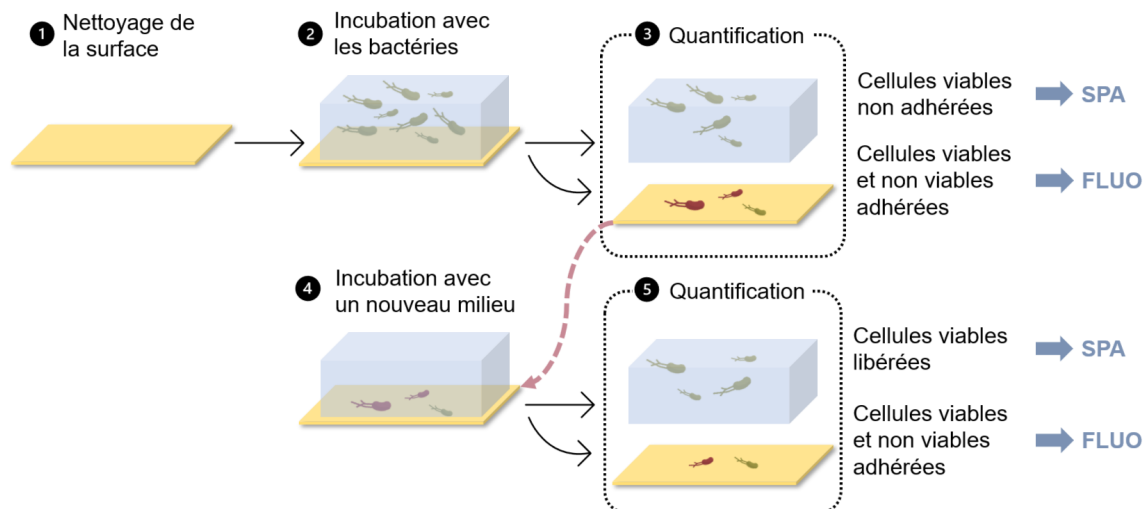


Figure 64 – Étapes principales du protocole final de caractérisation des propriétés anti-microbiennes. Protocole inspiré de Parreira et al.²¹⁵

La force de ce protocole réside dans l'interprétation générale des propriétés anti-microbiennes observées, en fonction des résultats de plusieurs étapes de caractérisation, qui permet de confirmer certains résultats pouvant être biaisés sans le contexte des autres étapes. En combinant les observations réalisées après chaque étape consécutive du protocole, illustrées en Tableau 15, il est possible de suivre précisément l'évolution des bactéries en contact avec la surface. Dans un premier temps, la quantification par SPA du nombre de bactéries viables dans un milieu physiologique tel que le PBS permet d'observer si une évolution de la concentration de l'inoculum a lieu dans les premières étapes d'interaction avec la surface : une réduction (cas **A**) pourrait être causée par le relargage d'un agent biocide par la surface ou par un effet biocide par contact de la surface sur des bactéries. En venant observer par microscopie de fluorescence les bactéries adhérentes à la surface, il est possible de quantifier l'augmentation (cas **C - D**) ou la réduction (cas **E - F**) de l'adhésion de celles-ci, ainsi que l'effet de la surface sur leur viabilité (proportions vivantes/mortes par marquage SYTO® 9/PI), par rapport à un échantillon de référence. L'étape de ré-incubation des surfaces ayant été au contact des bactéries dans un milieu riche tel que le TSB permet dans un second temps de compléter les observations en évaluant la capacité des bactéries adhérentes à repeupler le milieu en se décrochant de la surface (cas **G**). Cette étape peut notamment permettre de faire la différence entre un effet biocide ou bactériostatique par contact : en microscopie de fluorescence, des bactéries abimées et incapables de proliférer ou mortes sont toutes deux marquées au PI, rendant la différenciation entre effet bactéricide et bactériostatique impossible. En observant le détachement et la prolifération de ces bactéries après interaction avec la surface, il est possible de conclure sur la propriété du matériau (cas **G - H**). En combinant la caractérisation du relargage des bactéries par la surface par SPA à une seconde visualisation des bactéries sur la surface après incubation dans un milieu riche

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

par microscopie de fluorescence, il est possible de conclure sur la capacité du matériau à empêcher (cas **K** et **L**) ou non (cas **I** et **J**) la prolifération de bactéries en surface et la formation de biofilm dans des conditions favorables de croissance.

Tableau 15 - Observations pouvant être effectuées à chaque étape de caractérisation du protocole.

Étapes du protocole		Dénombrement	Viabilité	Abbréviation	Observation
Incubation milieu physiologique (PBS)	Liquide	+ ou =		A	Pas d'effet bactéricide en solution
		-		B	Effet biocide en solution
	Surface	+	+	C	Grande adhésion en surface, sans effet bactéricide significatif*
			-	D	Grande adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
		-	+	E	Faible adhésion en surface mais sans effet bactéricide significatif*
			-	F	Faible adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
<div style="text-align: center;">↓</div> Incubation milieu riche (TSB) d'une lame exposée aux bactéries	Liquide	+		G	Relargage et capacité des bactéries à proliférer sous forme planctonique
		-		H	Pas de relargage de bactéries capables de proliférer sous forme planctonique
	Surface	+	+	I	Grande adhésion en surface, sans effet bactéricide significatif*
			-	J	Grande adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
		-	+	K	Faible adhésion en surface mais bactéries viables*
			-	L	Faible adhésion en surface et effet bactéricide significatif*

Afin de faciliter les manipulations à effectuer pour chaque étape, plusieurs optimisations ont été apportées au protocole final. Concernant l'utilisation du SPA, sa mise en place a permis de réduire le nombre de plaques à une par échantillon. Le séchage des géloses avant dépôt, qui peut impacter le diamètre final des plots, ainsi que le temps d'incubation des géloses pour chaque espèce bactérienne ont été optimisés afin de faciliter le dénombrement. En effet, les bactéries ayant des croissances plus ou moins rapides selon les espèces (de plusieurs heures à plusieurs jours), les colonies formées pendant l'incubation peuvent vite devenir trop grosses et rendre difficile le dénombrement, comme il est illustré en Figure 65. En outre, l'utilisation des cuves 12-puits d'Ibidi® a permis de mettre en parallèle les expériences en séparant chaque lame de microscope dorée en 12 zones identiques, chacune de 56 mm² et avec un volume de 300 µL. De cette manière, pour la fonctionnalisation, les 6 AMPs ainsi que les 4 contrôles négatifs ont pu être étudiés simultanément sur une même lame en utilisant le même inoculum. Pour les nano-structures, des triplicats pour chaque espèce peuvent aussi être réalisés sur une seule lame. Cette mise en parallèle des expériences permet notamment d'améliorer la comparabilité des résultats entre les échantillons, obtenus dans les mêmes conditions et le même jour.

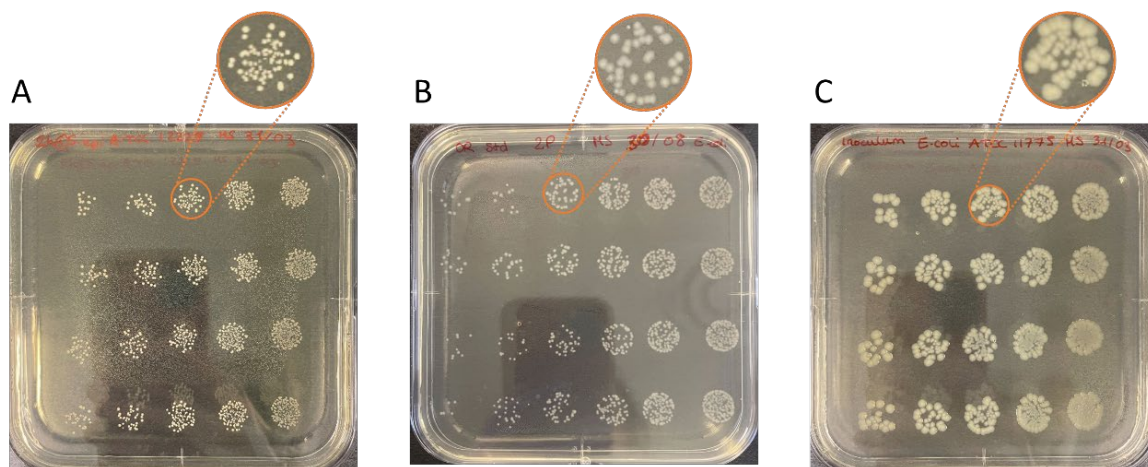


Figure 65 – Résultat d'un SPA pour les deux espèces étudiées après incubation à 37°C. **A.** *Staphylococcus epidermidis* après 17h d'incubation ; **B.** *Escherichia coli* après 8h d'incubation ; **C.** *Escherichia coli* après 17h d'incubation. Une durée d'incubation trop longue comme pour l'échantillon C rend le dénombrement difficile à cause de la taille des colonies.

En conclusion, un protocole rigoureux et reproductible a pu être mis en place afin de caractériser les différentes propriétés anti-microbiennes des échantillons préparés pendant cette thèse. Celui-ci est applicable à des substrats de quelques mm² à plusieurs dizaines de cm², n'est pas spécifique à un matériau en particulier et s'affranchit de nombreux désavantages ayant été mises en avant dans la littérature, comme la caractérisation limitée à une seule propriété de la surface des méthodes standards ou le décrochage mécanique des bactéries pouvant biaiser les résultats.

4.4. Traitement des données de microscopie de fluorescence

La mise en parallèle des expériences jusqu'à 12 surfaces étudiées simultanément, associée à l'utilisation de la microscopie de fluorescence deux fois par expérience avec deux marqueurs différents et en imageant chaque échantillon cinq fois, produit plusieurs centaines d'images de fluorescence par expérience. Afin d'estimer la valeur statistique du dénombrement total associé à chaque fluorophore, les bactéries de chaque image doivent donc être dénombrées.

Pour illustrer visuellement l'adhésion totales sur les surfaces grâce aux images de microscopie obtenues, les images de chaque fluorophore pour une même zone doivent être combinées (une image SYTO[®] 9 avec une image PI). Cependant, une différence d'intensité entre les deux marqueurs peut être observée et la fluorescence du SYTO[®] 9 par exemple peut masquer celle du PI quand les images sont combinées. De plus, les fluorophores live/dead, en particulier le PI, peuvent souffrir de bruit de fond important, différente en fonction de la densité de bactéries sur la surface ou de la concentration en fluorophore en solution.²⁰⁰ Ce bruit de fond peut rendre moins discernables certaines bactéries et doit donc être corrigé.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Il a de plus été observé expérimentalement que de nombreuses bactéries ont une fluorescence intrinsèque aux 2 longueurs d'émission des marqueurs utilisés. Cette observation peut être expliquée par le mécanisme d'action du SYTO[®] 9 (marquant toutes les bactéries) et du PI (marquant les bactéries aux membranes ayant perdu leur intégrité) qui peut engendrer une fluorescence à cheval entre les longueurs d'émission des deux fluorophores. Cependant cette double fluorescence peut fausser le nombre réel de bactéries ayant adhéré à la surface avec certaines bactéries pouvant être dénombrées deux fois.

La correction des images, la combinaison 2 par 2 des deux fluorescences et le dénombrement sont des opérations facilement réalisables à l'aide de logiciels tels que ImageJ. Cependant, ces multiples étapes, ainsi que le nombre important d'images par expérience allongent fortement la durée de traitement des données expérimentales. En passant 3 minutes par images en moyenne, c'est plus de 8h de traitement de données manuelles pour obtenir les résultats d'une expérience, SPA exclue. De plus, identifier et dénombrer les bactéries exprimant une fluorescence pour les deux marqueurs rallonge d'autant plus ce temps de traitement.

La nécessité de développer un programme permettant d'automatiser une partie du traitement des données s'est donc vite imposée. Différentes solutions utilisant les logiciels MatLab et Python ont été testées pour analyser les fichiers d'images accumulées, et c'est finalement ce dernier langage qui a été sélectionné pour développer le programme.

4.4.1. Principe de fonctionnement du programme d'analyse des images avec Python

Afin de commencer à développer le programme, il était important de définir quel type de programme était pertinent et les objectifs que celui-ci devait remplir :

1. Parcourir de manière automatique les images stockées dans plusieurs dossiers pour différentes espèces bactériennes, échantillons et temps d'incubation.
2. Corriger les images pour supprimer le bruit et faciliter l'énumération.
3. Dénombrer le nombre de bactéries sur chaque image.
4. Comparer les images de chaque colorant pour dénombrer les bactéries exprimant les deux fluorescences.
5. Combiner les images deux à deux pour fusionner les deux fluorescences et obtenir une image finale colorée et possédant une échelle.
6. Enregistrer les images finales, ainsi que les dénombrements dans un fichier type tableur des bactéries vertes, rouge ou superposées.

Les points 2. et 3. ont nécessité une attention particulière. Lors des premières expériences réalisées avec le protocole final, il a été observé que plusieurs images « type » pouvaient être obtenues : des bactéries individuelles bien discernables, des images bruitées, des

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

amas, etc. Les histogrammes de répartition des pixels en fonction des nuances de gris obtenus pour les images de fluorescence sont variés et peuvent se ressembler, comme il est illustré en Figure 66.

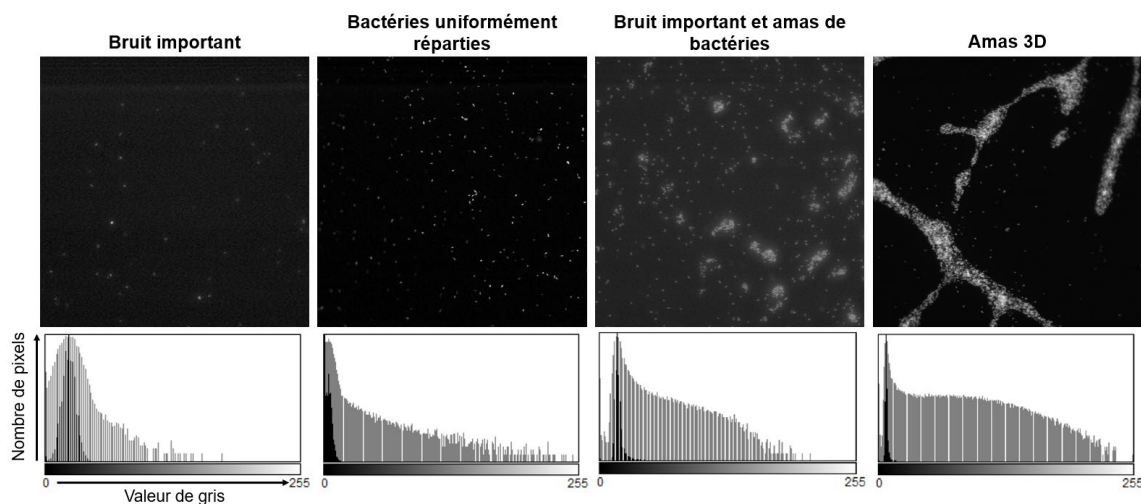


Figure 66 – Illustrations et histogrammes de différentes images brutes pouvant être obtenue par microscopie avec la fluorescence live/dead. Pour les histogrammes, le signal brut est représenté en noir et en log en gris.

Pour les images de fluorescence, cet histogramme présente souvent un pic important vers des nuances proches du noir (0) représentatif du fond. Les pixels représentatifs des bactéries, dont les valeurs se rapprochent de la saturation (255) en fonction de l'intensité de la fluorescence, sont plus réparti sur une plage de valeurs de gris plus étendue et ne forment pas de pic discernable. Les images avec un grand bruit de fond possèdent souvent un histogramme étendu sur de nombreuses valeurs de gris, ce qui rend difficile la distinction des pixels des bactéries de ceux du bruit de fond. Les images fortement contrastées en revanche possèdent un pic plus étroit et souvent plus proche de la valeur 0. Ces histogrammes sont souvent utilisés pour catégoriser des images en plusieurs cas, cependant pour la fluorescence il est difficile de séparer les images avec des amas des autres en se basant uniquement sur leur spectre de valeur de gris.

Concernant le bruit de fond de l'image, celui-ci est particulièrement présent dans les images de fluorescence au PI, qui est connu pour avoir une fluorescence intense même dans sa forme non-liée avec les bactéries.²⁰⁰ De plus pour les bactéries n'exprimant qu'une faible fluorescence, un bruit de fond significatif peut être observé.

Ce bruit peut impacter le dénombrement des bactéries et doit être éliminé pour ne pas biaiser les informations tirées des images, comme illustré en Figure 67. Pour cela il est possible de modifier l'intensité et le contraste de l'image pour réduire l'histogramme aux pixels pertinents. De cette manière, les valeurs des pixels du bruit sont réduites à 0 et celles de bactéries se rapprochent de 255 afin d'être plus discernables. Pour automatiser ce traitement, il nécessaire d'établir plusieurs catégories d'image pour définir un

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

traitement optimal pour chacune d'elles. Cependant, la grande variété d'images et d'histogrammes obtenus ainsi que les variations d'intensité de la fluorescence entre plusieurs bactéries d'une même image à cause de l'inhomogénéité du marquage a rendu la catégorisation difficile.

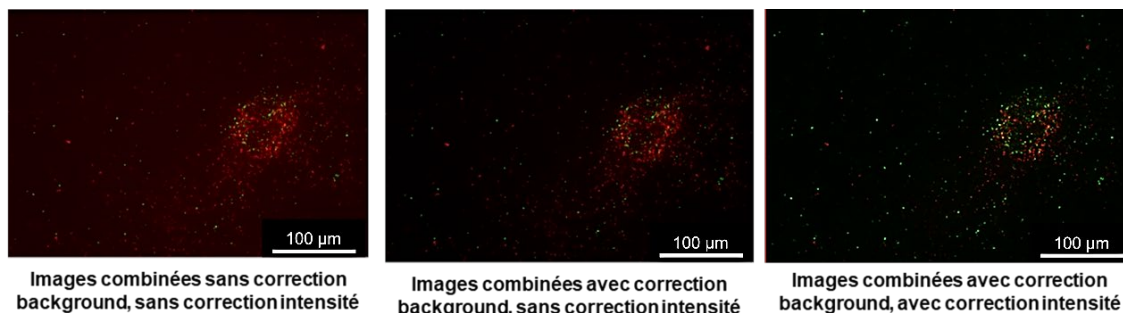


Figure 67 – Influence de la correction du fond et de l'intensité de la fluorescence sur le rendu de l'image finale.

Une autre difficulté a été rencontrée pour le point 3., cité dans les étapes clés du protocole, à propos de la méthode d'énumération. Pour dénombrer les bactéries individuelles, la méthode des maxima basée sur la prééminence des pixels est très efficace. Cependant quand des amas très denses de bactéries sont présents, cette méthode n'est plus valide. Afin de tout de même estimer la densité de bactéries, une autre méthode utilisant un seuil est employée. Cependant, l'automatisation de la sélection du traitement approprié en fonction de l'image est difficile en se basant uniquement sur les histogrammes de celles-ci. Ces deux méthodes sont expliquées plus en détails dans la suite du manuscrit.

Les difficultés rencontrées concernant la catégorisation des images, renforcées par la nécessité de vérifier pour chaque image si le traitement est approprié, a mené à considérer une autre approche que l'automatisation complète. L'utilisation d'une interface avec visualisation pour l'opérateur a semblé judicieux afin de sélectionner les traitements pertinents tout en contrôlant visuellement les images et automatiser le reste des tâches. Un programme Python utilisant le module tkinter (permettant la création d'interfaces graphiques) a donc été développé, et un module permettant d'utiliser le même dénombrement par maxima qu'ImageJ a pu être intégré au code.²³⁵

4.4.2. Étapes clés du programme Python

L'interface programmée est donc constituée d'une fenêtre principale où l'image traitée est affichée, ainsi que de différents volets s'affichant au fur et à mesure des traitements. Une représentation du programme dans son ensemble est illustrée en Figure 68.

Les encadrés numérotés représentent les différents volets s'affichant à droite de l'image. Après chaque validation du traitement de l'image, le volet suivant s'affiche pour continuer le traitement. Un bouton retour permet de revenir sur le traitement validé si

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

celui-ci est remis en question. Le programme prend en entrée le dossier complet d'une expérience à traiter (Figure 68A), c'est-à-dire toutes les images générées pour chaque échantillon et pour chaque incubation.

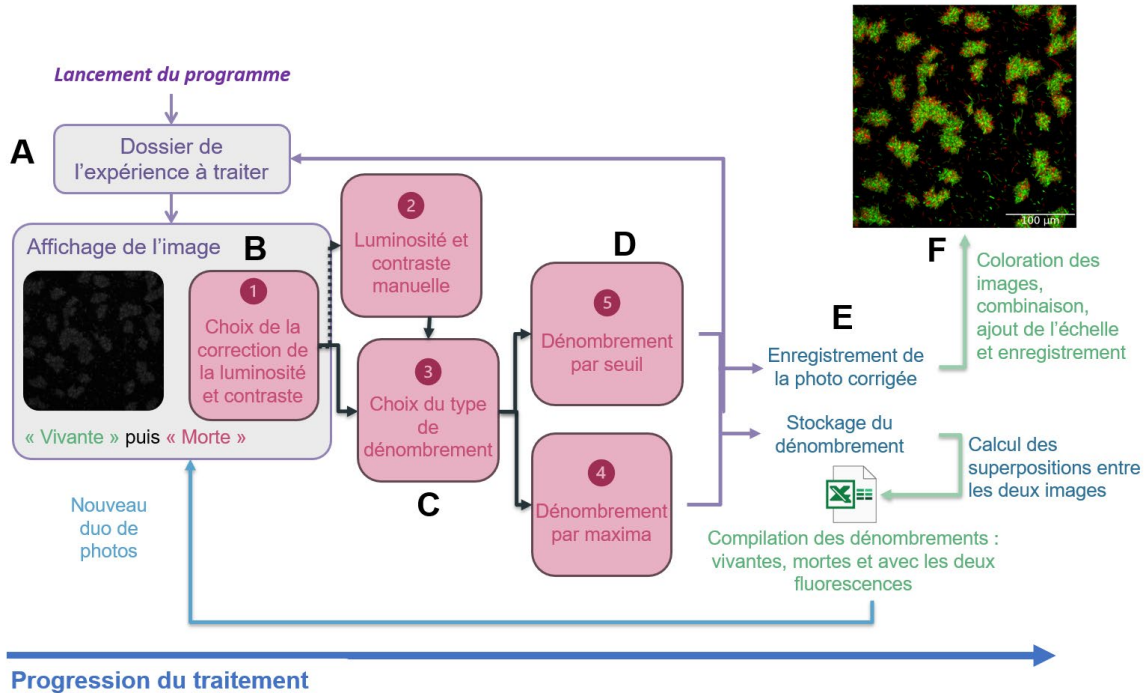


Figure 68 – Schéma de fonctionnement général du programme de traitement des données de fluorescence.

Grâce à la nomenclature des images, celles-ci sont associées deux par deux et une boucle à la fin du traitement de chaque duo permet de les combiner pour obtenir l'image finale et de dénombrer les superpositions. À la fin du traitement de chaque image, les dénombrements sont stockés puis compilés ensemble pour générer un fichier complet à la fin du traitement intégral du dossier. Une vidéo illustrant l'interface de traitement pour quelques images est disponible en scannant le code QR de la Figure 69 ou en utilisant le lien <https://www.youtube.com/watch?v=Hv3RYIXBm8I>.

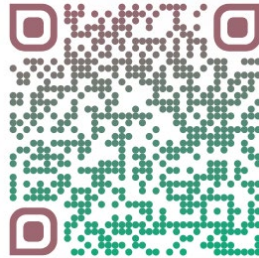


Figure 69 – QR code permettant d'accéder à une vidéo illustrant l'interface principale du programme.

Ce programme semi-automatique et séquentiel est composé de plusieurs étapes de traitement pouvant être adapté aux différentes images et décrites dans les sous-sections suivantes.

4.4.2.1. Correction de l'intensité et du contraste

Pour le traitement de l'image afin de réduire le bruit de fond (Figure 68B et D), un premier volet de sélection apparaît sur l'interface et permet de choisir une méthode de traitement de l'intensité et du contraste automatique ou manuelle, en fonction de l'image. Pour les images correspondant à des cas « simples », c'est-à-dire une population de bactéries avec une fluorescence uniforme et peu de bruit de fond, le traitement automatique ajuste légèrement les paramètres de l'intensité et du contraste. Cela permet de masquer le bruit de fond de l'image en remettant ses pixels à zéro tout en augmentant subtilement l'intensité de la fluorescence des bactéries. Les seuils utilisés pour le traitement automatique ont été définis comme optimaux lors du traitement des images à la main avant la création du programme. Pour la correction manuelle de l'intensité et du contraste, des curseurs permettent d'ajuster le minimum et le maximum de chaque paramètre apparaissent après avoir sélectionné la méthode. L'image affichée est automatiquement mise à jour à chaque modification d'un curseur et permet de visualiser en temps réel le traitement.

4.4.2.2. Choix de la méthode d'énumération

Après validation du traitement de l'image, un nouveau volet apparaît afin de sélectionner la méthode d'énumération appropriée : par maxima ou par seuil (Figure 68C). Les méthodes sont illustrées en Figure 70.

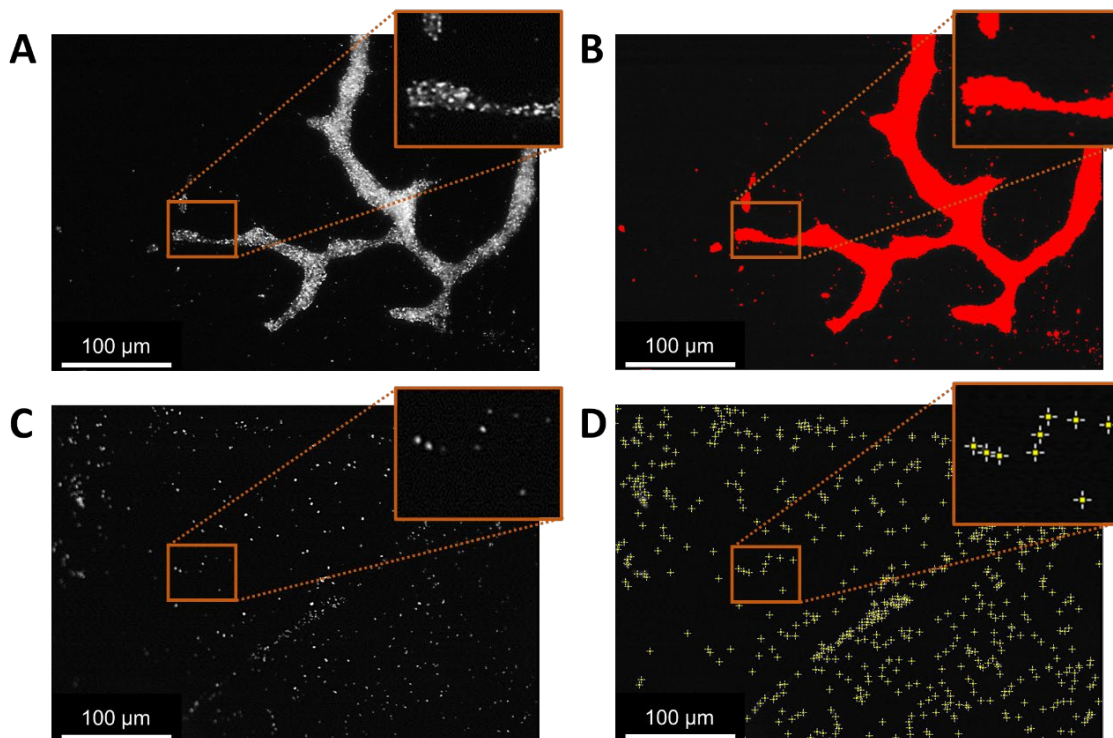


Figure 70 – Illustration des différentes organisations des bactéries pouvant être obtenues par microscopie A. Agglomération et C. Répartition des bactéries distinctes, ainsi que de leurs méthodes de dénombrement appropriées B. Méthode du seuil et D. Méthode des maxima.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Le principe de l'énumération par seuil est de pouvoir faire une approximation du nombre de bactéries dans un amas en comptabilisant le nombre de pixels au-dessus d'un seuil. Une estimation du nombre de bactéries dans l'amas est calculée en divisant la totalité des pixels sélectionnée par la taille d'une bactérie standard en pixel (environ 10 pixels² pour *S. epidermidis* et 20 pixels² pour *E.coli*). Le seuil appliqué peut être ajusté manuellement par l'utilisateur grâce à un curseur et est visualisable en direct sur l'image affichée sur l'interface, comme sur la Figure 70B.

La méthode des maxima, inspirée d'ImageJ, utilise la proéminence pour comptabiliser le nombre de maxima locaux dans une image. En définissant une proéminence spécifique (ou une hauteur culminante), seuls les pixels se distinguant de leur entourage par une valeur supérieure à la proéminence sont comptabilisés. Cette valeur de culminance peut être définie par l'utilisateur et les points sélectionnés sont superposés sur l'image originale comme sur la Figure 70D. Le nombre total de bactéries dénombrées est aussi affiché et mis à jour quand la proéminence est modifiée.

Pour énumérer le plus précisément possible les bactéries, la méthode des maxima est préférée pour les images où les bactéries sont réparties uniformément et celle du seuil est utilisée pour les images présentant des amas. Pour les images intermédiaires à ces deux cas, il a été démontré que l'approximation fournie par la méthode du seuil est relativement proche de l'énumération du nombre de bactéries par la méthode des maxima, comme illustré en Figure 71. Les deux méthodes peuvent donc être utilisées efficacement pour énumérer les bactéries qui ne sont pas sous la forme d'amas trop importants.

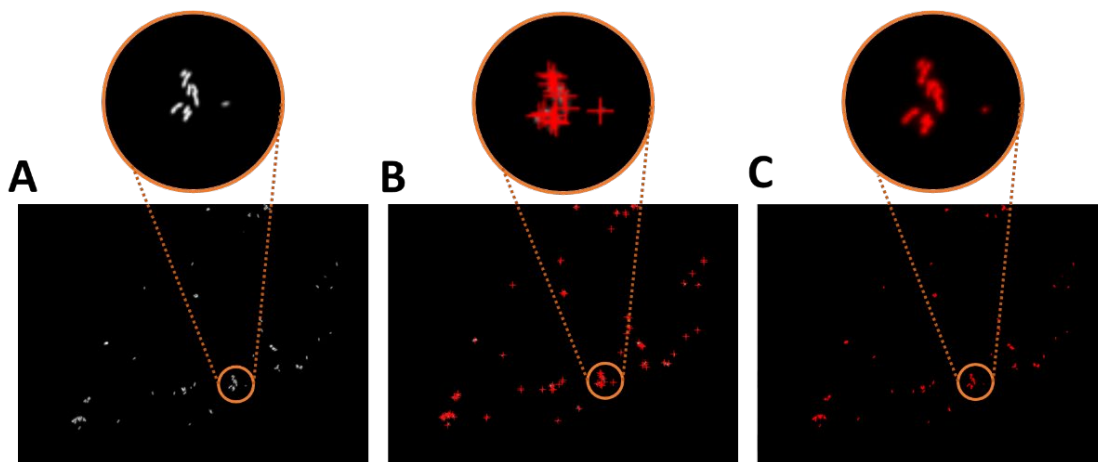


Figure 71 – Différences d'énumération des bactéries sur une partie d'image fluorescente. **A.** Image originale ; **B.** Méthodes des maxima (proéminence = 5 ici) ; **C.** Méthode du seuil (seuil = 100 en valeur de gris ici). La méthode B dénombre un total de 100 bactéries et la méthode C en dénombre 95.

4.4.2.3. Enregistrement automatique après validation

Après la validation de dénombrement, le programme affiche l'image de fluorescence suivante. Celui-ci traite les images zone par zone (2048 pixels x 2044 pixels),

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

en affichant les images obtenues avec les deux fluorophores l'une après l'autre. Une fois le traitement des deux images d'une même zone confirmé, le programme va automatiquement dénombrer les maxima dans les deux longueurs d'onde pour un même pixel, en superposant les 2 images (Figure 68E). Une marge de tolérance de ± 6 pixels par ligne et colonne est ajoutée dans le cas des maxima au cas où il y ait un léger décalage ($<1\%$) entre les deux images. Cette marge peut être modifiée dans le code si besoin, tout comme la taille en pixels des bactéries étudiées.

Les dénombrements des bactéries à fluorescence strictement rouge, strictement verte et possédant les deux fluorescences sont ensuite stockés dans un fichier. Les métadonnées du traitement (valeurs du contraste et de l'intensité corrigés, méthodes de dénombrement, seuil ou proéminence utilisés, etc.) sont de même stockés afin de garder la trace du traitement.

Le programme continue en superposant les deux images, en leur associant chacune une couleur (les images sources étant en valeur de gris) et en ajoutant une échelle de taille sur l'image, adaptée au grossissement de l'objectif de microscope utilisé (Figure 68F). L'image finale est ensuite enregistrée dans un dossier et la boucle du programme recommence pour le duo d'image suivant.

4.4.3. Représentation des données

Grâce à la mise en place d'un programme semi-automatique, la durée du traitement des données de fluorescence a pu drastiquement être réduit, avec en moyenne une centaine d'images traitées en 30 minutes pour un utilisateur expérimenté. Un certain nombre d'améliorations, notamment structurelles, peuvent être apportées au programme. Cependant celui-ci fonctionne de manière satisfaisante pour traiter les données du protocole de caractérisation.

Un autre script permet de représenter les données obtenues grâce au programme. Celui-ci utilise les dénombrements de chaque zone pour revenir à un nombre de bactéries présentes dans chaque puits. Il calcule aussi les pourcentages de réduction ou d'augmentation de la densité par rapport à la référence, ainsi que les proportions des bactéries dans chaque état : mortes, vivantes et superposées (entre les deux états). Ces informations sont réunies sur deux diagrammes en barres empilées, afin de donner la densité totale d'organisme sur la surface et les proportions de viabilité (voir Figure 72). Afin de permettre de visualiser l'hétérogénéité de la densité des bactéries entre les images, des points illustrant les dénombrements pour chaque zone sont superposés aux barres, comme illustré en Figure 72A et B.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

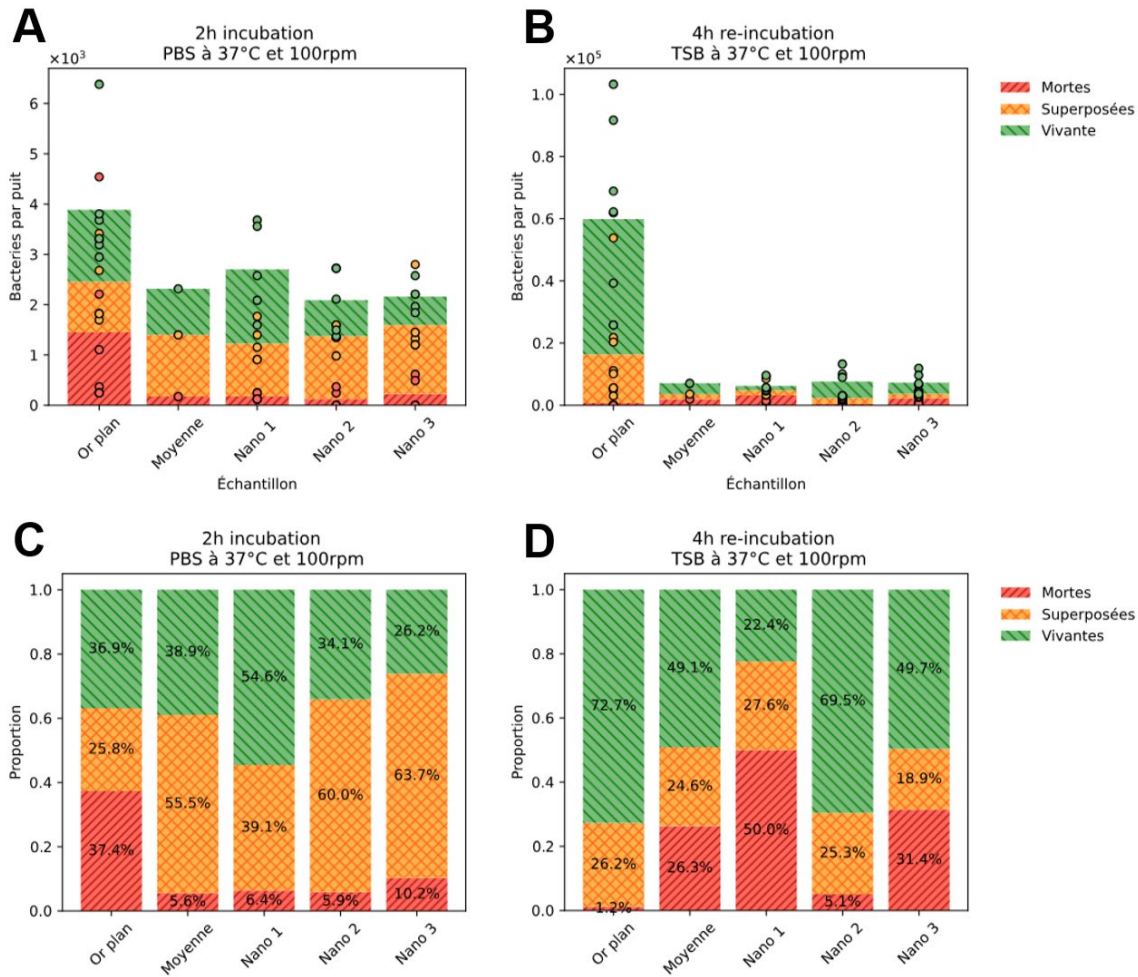


Figure 72 – Exemple de graphique généré pour les dénombrements des bactéries fluorescentes par le programme semi-automatique. **A.** Dénombrement du nombre de bactéries sur la surface d'un puit après l'incubation dans du PBS. **B.** Dénombrement du nombre de bactéries sur la surface d'un puit après l'incubation dans du TSB. **C.** Représentation en pourcentage de la population totale des différents groupes de viabilité de bactéries de A. **D.** Représentation en pourcentage de la population totale des différentes populations de bactéries de B.

4.5. Résultats de la caractérisation micro-biologique des échantillons

Après avoir établi un protocole de caractérisation des propriétés microbiologiques exhaustif ainsi qu'un programme permettant de traiter efficacement les données, le protocole a pu être appliqué aux différents échantillons fonctionnalisés et nano-structurés pour déterminer leurs propriétés anti-microbiennes.

4.5.1. Étude des surfaces nano-structurées

Deux groupes de nano-structures fabriquées par électrodépôt ont été testés à l'aide du protocole de microbiologie, celles du groupe D (voir chapitre 3) de 200 nm et celles du groupe A de 450 nm en moyenne. En fonction du traitement de la surface en amont de la caractérisation, il a pu être observé des résultats très différents.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

4.5.1.1. Effet du plasma et du nettoyage sur les propriétés anti-microbiennes des surfaces nano-structurées

Comme il a été mentionné plus tôt dans ce chapitre, le nettoyage plasma des surfaces nano-structurées augmente la quantité d'oxygène en surface de l'échantillon, probablement par la formation d'un oxyde d'or. Les propriétés anti-microbiennes des échantillons ayant subi ce traitement puis une stérilisation de 30 secondes à l'éthanol 70° préalablement à la caractérisation ont été évaluées à l'aide du protocole établi précédemment.

Staphylococcus epidermidis. Grâce à la quantification SPA (voir Figure 73), on peut remarquer une réduction de près de 95% par rapport à l'or plan de la viabilité dans l'inoculum en contact avec les nano-structures durant l'incubation dans le milieu physiologique (cas **B** - Tableau 15). Cette réduction importante de la viabilité des bactéries en solution par rapport à l'or plan laisse penser au relargage d'un agent biocide par la surface nano-structurée.

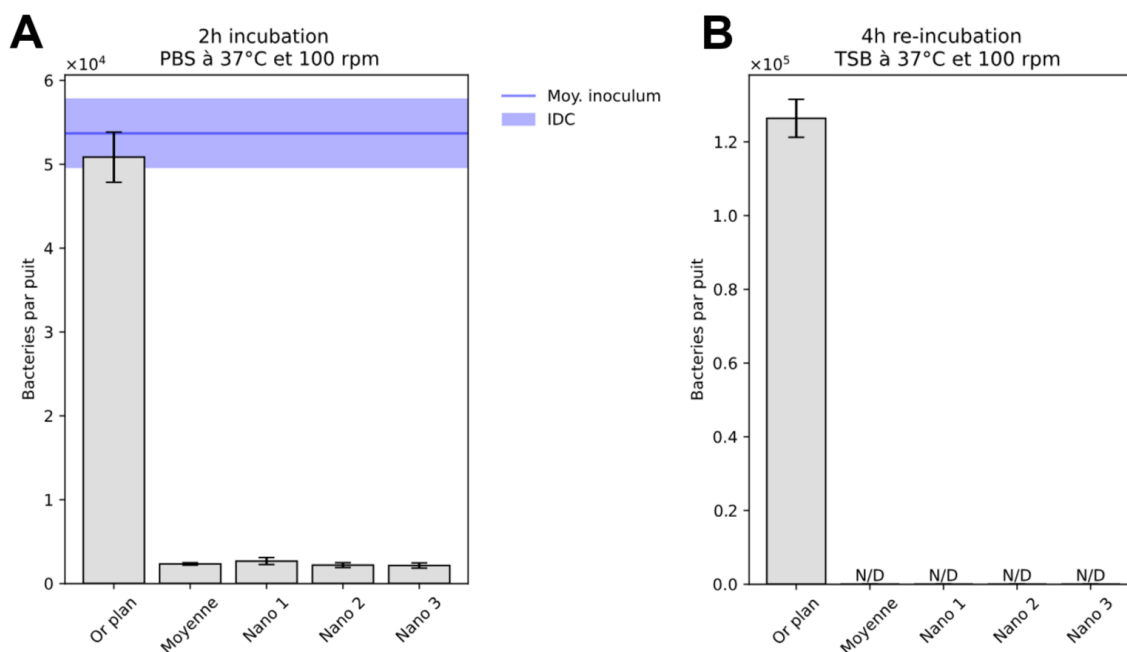


Figure 73 – Nombre de bactéries viables en solution dans un puits, dénombrées par SPA pour *S. epidermidis* **A.** Après 2h en milieu physiologique (PBS) ; **B.** Après 4h de ré-incubation de la surface contaminée dans un milieu riche (TSB).

Pour la ré-incubation de la surface contaminée dans un milieu riche (TSB) favorisant la prolifération des bactéries, des résultats similaires sont observés. Là où les bactéries adhérentes sur l'or plan sont capables d'être libérées sous forme planctonique et de proliférer dans le TSB, celles adhérentes aux surfaces nano-structurées ne se re-développent pas (cas **H** - Tableau 15). Avec la caractérisation par microscopie de fluorescence (voir Figure 74), il peut être observé que les bactéries tendent à adhérer à la surface plane, mais aussi sur les surfaces nano-structurées, en grande quantité : on retrouve presque autant

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

de bactéries adhérentes sur la totalité de la surface qu'en solution dans le volume du puits. De telles densités de bactéries en surface montrent une augmentation du nombre de micro-organismes pendant les 2 premières heures d'incubation en milieu physiologique (cas **D** - Tableau 15). Bien que les expériences de croissance des espèces bactériennes dans le PBS aient indiqué que la viabilité de *S. epidermidis* avait plutôt tendance à diminuer en solution après 2h dans le PBS par rapport à sa concentration initiale, l'adhésion aux surfaces peut favoriser la prolifération des bactéries, ce qui expliquerait leur forte densité en surface observées pour les expériences au contact des substrats.

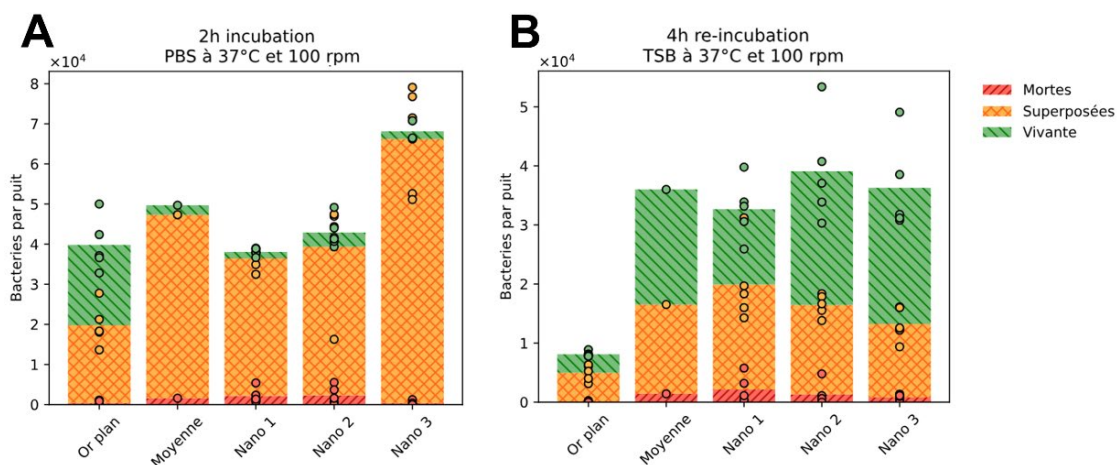


Figure 74 – Nombre et répartition des bactéries vivantes, mortes et superposées, en surface dans un puits, dénombrées par fluorescence pour *S. epidermidis* **A**. Après 2h en milieu physiologique (PBS) ; **B**. Après 4h de ré-incubation de la surface contaminée dans un milieu riche (TSB).

Malgré la différence relativement faible de bactéries en surface entre les échantillons nano-structurés et l'or plan (moins de 25% en moyenne), on observe cependant une plus grande proportion de bactéries marquée au PI (mortes + superposées sur le graphique) pour les nano-structures, en moyenne 95%, contre 50% pour l'or plan. Cela laisserait entendre un effet bactéricide ou bactério-statique par contact ou causé par le relargage d'un agent biocide sur la membrane des bactéries. Pour la ré-incubation en milieu riche, en revanche, on observe un plus grand nombre de bactéries sur les échantillons nano-structurés, avec une proportion assez importante de bactéries marquées au SYTO® 9 et donc potentiellement viables : 54% en moyenne, contre 40% pour l'or plan (cas **I** - Tableau 15). Les observations des différentes étapes du protocole pour *Escherichia coli* sont synthétisées en Tableau 16 (lignes grisées). Les différents résultats semblent indiquer l'action d'un agent biocide relargué en solution et efficace en solution et sur les bactéries adhérentes en surface dans un milieu physiologique. La ré-incubation dans un milieu riche a permis de montrer que les bactéries adhérentes ne sont plus capables de proliférer sous forme planctonique, bien que leur viabilité sur la surface semble augmenter avec le nouveau milieu, ce qui laisse penser à une atténuation de l'effet bactéricide par relargage grâce au changement de milieu ou effet protecteur des protéines contenues dans le TSB.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Tableau 16 - Tableau récapitulatif des observations durant les différentes étapes du protocole de caractérisation micro-biologique sur *S. epidermidis* pour une surface nano-structurées passée au plasma et nettoyées 30s à l'éthanol 70°.

Étapes du protocole		Dénombrement	Viabilité	Abbréviation	Observation
Incubation milieu physiologique (PBS)	Liquide	+ ou =	[Hatched]	A	Pas d'effet bactéricide en solution
		-		B	Effet biocide en solution
	Surface	+	+	C	Grande adhésion en surface, sans effet bactéricide significatif*
				-	D
		-	+	E	Faible adhésion en surface mais sans effet bactéricide significatif*
				-	F
Incubation milieu riche (TSB) d'une lame exposée aux bactéries	Liquide	+	[Hatched]	G	Relargage et capacité des bactéries à proliférer sous forme planctonique
		-		H	Pas de relargage de bactéries capables de proliférer sous forme planctonique
	Surface	+	+	I	Grande adhésion en surface, sans effet bactéricide significatif*
				-	J
		-	+	K	Faible adhésion en surface mais bactéries viables*
				-	L

Escherichia coli. La caractérisation de l'effet anti-microbien de la surface nano-structurée passée au plasma puis à l'éthanol 70° pendant 30 secondes a été effectuée dans les mêmes conditions. Des tendances encore plus fortes que pour *S. epidermidis* sont observées pour *E. coli*, avec une concentration de bactéries en solution inférieure à la limite de détection de la SPA (cas **B** - Tableau 15) : aucune colonie n'est observée dès la première demi-dilution (données non-illustrées).

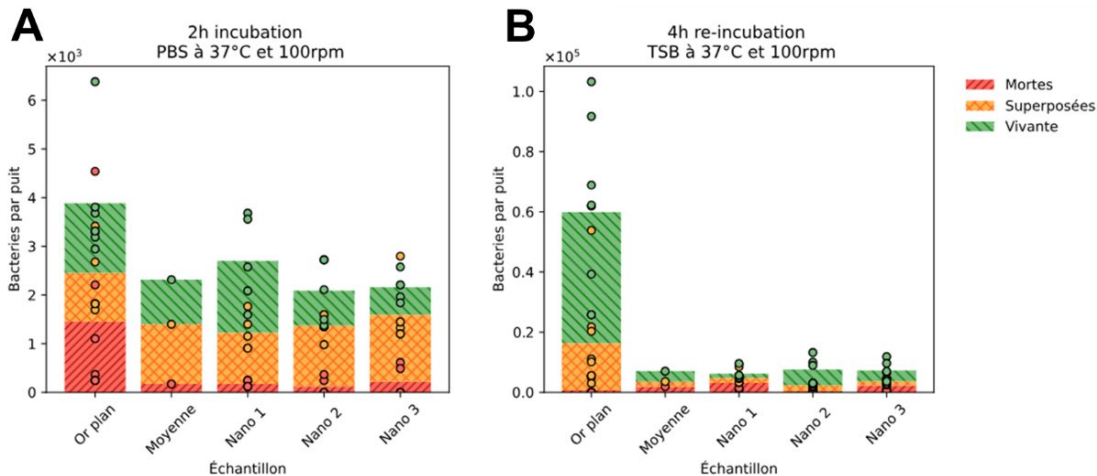


Figure 75 - Nombre et répartition des bactéries vivantes, mortes et superposées, en surface dans un puits, dénombrées par fluorescence pour *E. coli* **A**. Après 2h en milieu physiologique (PBS); **B**. Après 4h de ré-incubation de la surface contaminée dans un milieu riche (TSB).

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

De la même manière, les bactéries adhérentes ne sont pas capables de re-proliférer durant la ré-incubation dans le milieu riche (cas **H** - Tableau 15). Cependant, certaines différences par rapport à *S. epidermidis* peuvent être observées par fluorescence, illustrées en Figure 75. Après incubation avec la surface dans le milieu physiologique, une plus faible quantité de bactéries adhèrent aux surfaces nano-structurées en comparaison de l'or plan. Là encore, environ 50% des bactéries semblent viables sur la surface dorée plane et ces résultats sont cette fois similaires sur l'or nano-structuré, aucun effet biocide n'est observé par rapport à la surface de référence (cas **E** - Tableau 15). Lors de la ré-incubation dans le TSB, les bactéries viables sur la surface nano-structurée ne semblent pas proliférer, contrairement à l'or plan qui voit sa population bactérienne en surface augmenter. De plus, les bactéries adhérentes possèdent là encore une viabilité proche de 50% (cas **L** - Tableau 15). Les résultats des différentes étapes du protocole, synthétisés dans le Tableau 17, semblent indiquer là encore le relargage d'un agent biocide par la surface, avec un effet biocide persistant en milieu riche même sur les bactéries adhérentes.

Tableau 17 - Tableau récapitulatif des observations durant les différentes étapes du protocole de caractérisation micro-biologique sur *E.coli* pour une surface nano-structurées passée au plasma et nettoyées 30s à l'éthanol 70°.

Étapes du protocole		Dénombrement	Viabilité	Abbréviation	Observation
Incubation milieu physiologique (PBS)	Liquide	+ ou =		A	Pas d'effet bactéricide en solution
		-		B	Effet biocide en solution
	Surface	+	+	C	Grande adhésion en surface, sans effet bactéricide significatif*
			-	D	Grande adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
		-	+	E	Faible adhésion en surface mais sans effet bactéricide significatif*
			-	F	Faible adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
Incubation milieu riche (TSB) d'une lame exposée aux bactéries	Liquide	+		G	Relargage et capacité des bactéries à proliférer sous forme planctonique
		-		H	Pas de relargage de bactéries capables de proliférer sous forme planctonique
	Surface	+	+	I	Grande adhésion en surface, sans effet bactéricide significatif*
			-	J	Grande adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
		-	+	K	Faible adhésion en surface mais bactéries viables*
			-	L	Faible adhésion en surface et effet bactéricide significatif*

La même caractérisation a été menée sur des échantillons passés au plasma sans nettoyage à l'éthanol 70° post-plasma. Dans ce cas, une réduction importante du nombre de bactéries en solution (énumérées par SPA) par rapport à la concentration initiale de l'inoculum est visible pour tous les échantillons, même l'or plan. Aucune re-prolifération n'est observée après avoir incubé les surfaces ayant été au contact des bactéries dans le TSB. Ces résultats, combinés à ceux de la caractérisation des échantillons nettoyés

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

à l'éthanol post-plasma, montrent que l'effet bactéricide généré par l'action du plasma sur l'or est plus difficilement nettoyable sur les nano-structures que sur l'or plan. Après un nettoyage de 30 secondes à l'éthanol, l'or plan semble retrouver un comportement normal, là où les surfaces nano-structurées semblent relarguer un agent biocide. Cette différence d'effet est probablement causée par la forte rugosité des échantillons nano-structurés, rendant plus difficile la réduction de l'oxyde d'or.

Afin d'éliminer cet effet, indépendamment de l'action induite par les nano-structures, l'étape de simple rinçage de 30 secondes a été remplacée par un bain de 10 à 15 minutes à l'éthanol 70°. Une différence de coloration de l'or nano-structuré après plasma, invisible pour des lavages plus courts car uniforme sur la surface, a été observée durant ce nettoyage intensif et semble disparaître à la fin de la durée prolongée du nettoyage à l'éthanol (voir Figure 76)

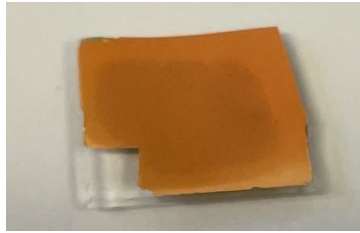


Figure 76 – Apparition d'une différence de coloration sur l'échantillon nano-structuré pendant le nettoyage de 10 minutes à l'éthanol 70°.

Afin de confirmer l'élimination de l'agent biocide grâce au bain d'éthanol et de comparer l'efficacité des rinçages rapides et longs, des tests supplémentaires ont été effectués. Une première expérience a été réalisée pour comparer la viabilité des bactéries après 2h en contact avec des échantillons dorés plan et nano-structurés ayant subi les deux types de nettoyage. Pour cela, un SPA sur l'inoculum avant et après incubation avec les surfaces est utilisé (voir Figure 77).

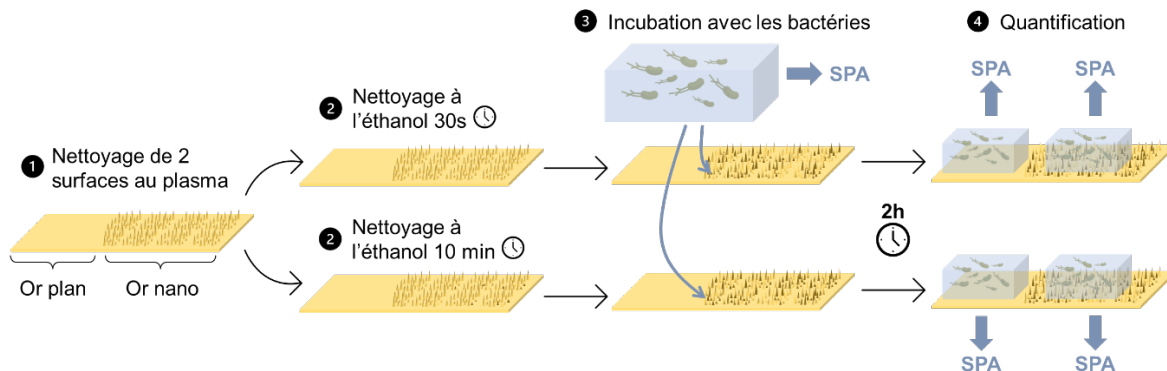


Figure 77 – Schéma de l'expérience d'évaluation de l'effet d'un nettoyage long ou court sur l'activité biocide des surfaces planes et nano-structurées. Un SPA est réalisé avant et après incubation avec des bactéries.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Les résultats de cette expérience, illustrés en Figure 79A démontrent que pour les nano-structures ayant subi le nettoyage long, l'effet biocide est réduit et on obtient une concentration proche de celle de l'inoculum après 2h. Les nano-structures ayant été nettoyées rapidement ont, en revanche, un effet bactéricide confirmé, avec une réduction de 84% de la viabilité en solution. L'activité de l'or plan sur les bactéries en solution, en revanche, n'est pas statistiquement différente pour les deux traitements ce qui confirme qu'un lavage court est efficace sur les échantillons non-nanostructurés.

Une seconde expérience a été effectuée pour confirmer que l'activité bactéricide est majoritairement due au relargage d'un agent dans le milieu liquide, et non pas à un effet biocide par contact des surfaces (voir Figure 78). Pour cela, une solution de PBS stérile est mise en contact pendant 2h avec les nano-structures passées au plasma, sans lavage éthanol pré-caractérisation. Après cette durée d'incubation, le PBS est ensuite récupéré et un inoculum bactérien y est ajouté jusqu'à une concentration d'environ 2×10^5 CFU/mL. Afin d'avoir un contrôle négatif pour cette expérience, la même chose est effectuée pour un échantillon de PBS n'ayant pas été au contact des nano-structures. Un suivi temporel de l'évolution de la viabilité dans les deux milieux PBS a ensuite été effectué grâce à un SPA réalisé toutes les 30 minutes.

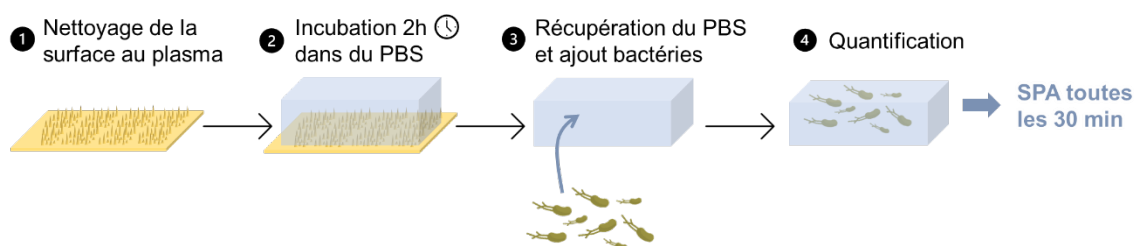


Figure 78 - Schéma de l'expérience d'évaluation de l'effet d'un nettoyage long ou court sur l'activité biocide des surfaces planes et nano-structurées. du SPA avant et après incubation avec des bactéries ; B. Suivi cinétique de la viabilité dans du PBS ayant été en contact avec les surfaces.

Les résultats du suivi temporel sont présentés en Figure 79B et démontrent que pour le PBS ayant été au contact des nano-structures, une réduction de l'ordre de 96% est visible dès 30 minutes. La concentration de bactéries viables en solution continue de diminuer dans le temps, jusqu'à atteindre 99.8% après 120 minutes. Une légère décroissance de la viabilité des bactéries est observée pour le PBS de référence n'ayant pas été au contact avec les nano-structures, mais cet effet est probablement lié à la réduction de la croissance bactérienne en milieu PBS.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

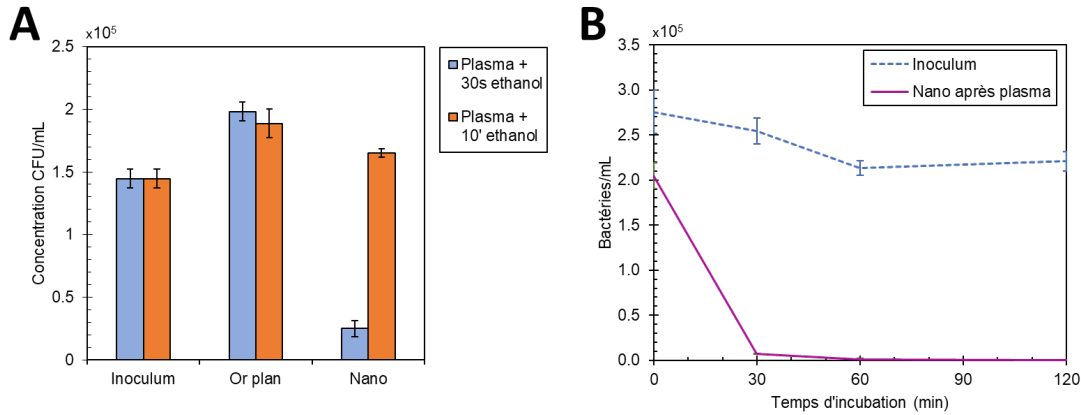


Figure 79 – **A.** Dénombrement par SPA du nombre de bactéries viables en solution après 2h d'incubation avec des surfaces ayant subi différents traitements. **B.** Evolution temporelle de la concentration de bactéries viables en PBS par SPA.

Ces expériences permettent de conclure qu'après plasma, l'or relargue un agent biocide très efficace dans le PBS. Afin d'éliminer cet agent, un nettoyage à l'éthanol 70° de quelques secondes pour l'or plan et de plusieurs minutes pour l'or nano-structuré doit être utilisé. Après avoir intégré le nettoyage long à l'éthanol post-plasma pour les surfaces nano-structurées, l'efficacité propre à celles-ci a pu être évaluée.

4.5.1.2. Propriétés anti-microbiennes des nano-structures de 150 nm non-fonctionnalisées

Dans un premier temps, le protocole de microbiologie a été utilisé pour déterminer les propriétés anti-bactériennes des nano-structures du groupe B (Tableau 8, 150 nm).

Escherichia coli. L'énumération par SPA des surnageants, illustrée en Figure 80, a démontré pour l'incubation de 2h en PBS qu'en moyenne la quantité de bactéries planctoniques pour les échantillons nano-structurés n'est pas significativement différent de l'inoculum de départ. Cependant une légère réduction est observée en solution pour les bactéries en contact avec l'or plan. (cas **A** - Tableau 15). Pour la ré-incubation de 4h de la surface en milieu riche en revanche, on observe une augmentation plus importante du nombre de bactéries en solution pour les surfaces nano-structurées, de l'ordre de +114% en moyenne par rapport à l'or plan, ce qui démontre la capacité des bactéries à se détacher des surfaces nano-structurées et à proliférer sous forme planctonique. (cas **G** - Tableau 15).

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

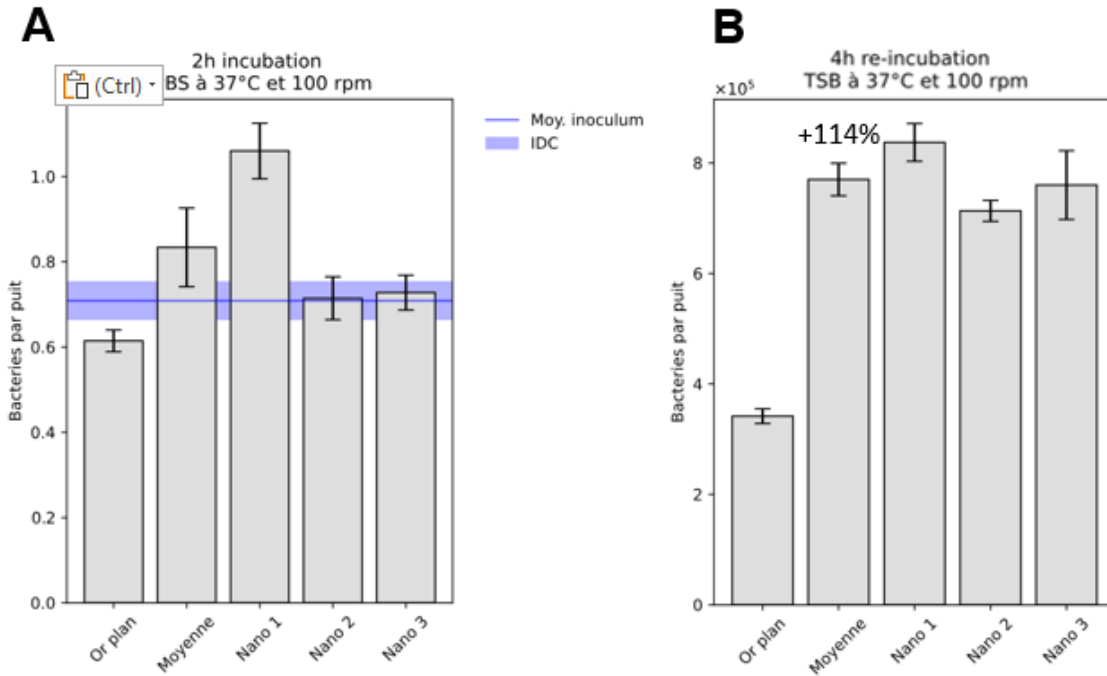


Figure 80 - Nombre de bactéries viables en solution dans un puits, dénombrées par SPA pour *Escherichia coli* **A**. Après 2h en milieu physiologique (PBS) ; **B**. Après 4h de ré-incubation de la surface contaminée dans un milieu riche (TSB)

Les dénombrements par fluorescence des bactéries adhérentes, illustrés en Figure 81, confirment ces tendances, avec des taux d'adhésion similaires après 2h en PBS entre l'or plan et les nano-structures, autant en termes de densité que de proportions vivantes/mortes/superposées (cas C - Tableau 15).

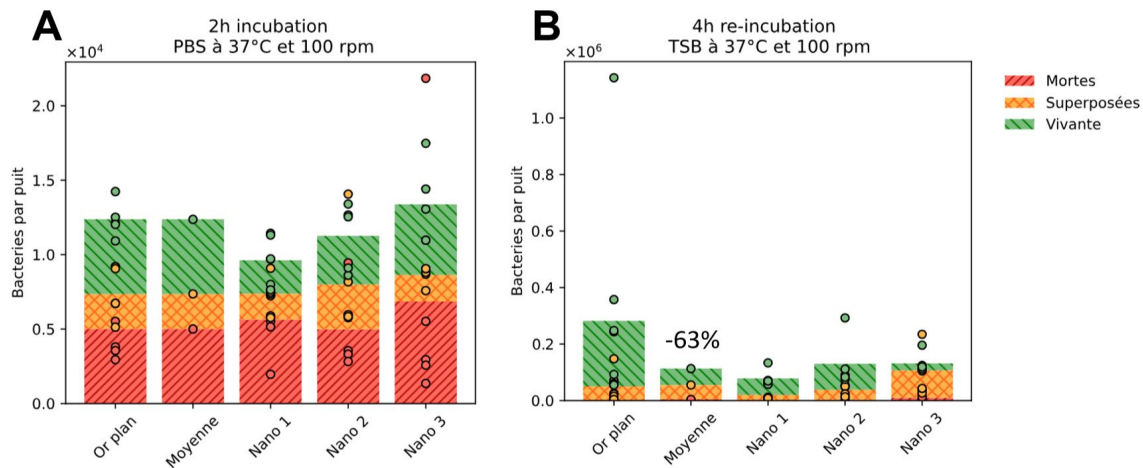


Figure 81 - Nombre et répartition des bactéries vivantes, mortes et superposées, en surface dans un puits, dénombrées par fluorescence pour *Escherichia coli* **A**. Après 2h en milieu physiologique (PBS) ; **B**. Après 4h de ré-incubation de la surface contaminée dans un milieu riche (TSB).

Cependant, pour la remise en incubation dans le TSB, une réduction de 63% en moyenne des bactéries adhérentes est visible par rapport à l'or plan, indiquant une préférence pour

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

les bactéries à se décrocher et à proliférer en solution plutôt que sur la surface nanostructurées. La proportion de bactéries viables en plus faible pour les nanostructures que pour l'or plan (cas **L** - Tableau 15). De plus, il semble que les bactéries aient plutôt tendance à se regrouper pour former des micro-colonies sur l'or plan alors qu'elles sont plus uniformément réparties sur les nano-structures, comme en atteste la Figure 82.

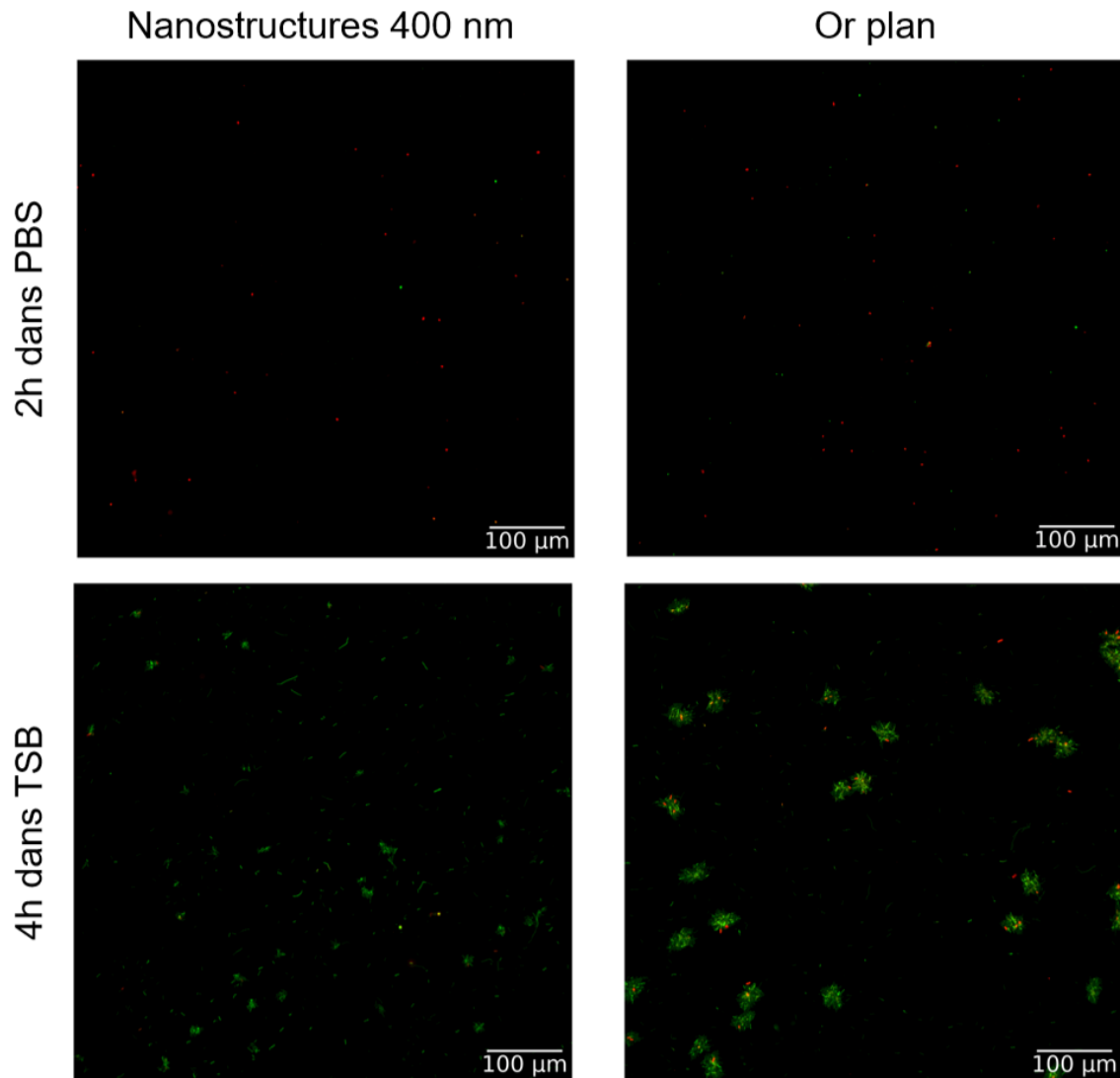
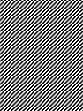
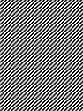


Figure 82 – Images de microscopie utilisant la fluorescence live/dead pour *Escherichia coli*.

Les résultats des différentes étapes du protocole, synthétisés dans le Tableau 18, semblent indiquer un effet plutôt bactériostatique des nano-structures de 150 nm sur *Escherichia coli*, avec une diminution de l'adhésion sur le long terme par rapport à l'or plan et une tendance à proliférer en solution plutôt qu'en surface.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Tableau 18 - Tableau récapitulatif des observations durant les différentes étapes du protocole de caractérisation micro-biologique sur *E. coli* pour une surface nano-structurées avec des pics de 150 nm en moyenne.

Étapes du protocole		Dénombrement	Viabilité	Abbréviation	Observation
Incubation milieu physiologique (PBS)	Liquide	+ ou =		A	Pas d'effet bactéricide en solution
		-		B	Effet biocide en solution
	Surface	+	+	C	Grande adhésion en surface, sans effet bactéricide significatif*
			-	D	Grande adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
		-	+	E	Faible adhésion en surface mais sans effet bactéricide significatif*
			-	F	Faible adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
Incubation milieu riche (TSB) d'une lame exposée aux bactéries	Liquide	+		G	Relargage et capacité des bactéries à proliférer sous forme planctonique
		-		H	Pas de relargage de bactéries capables de proliférer sous forme planctonique
	Surface	+	+	I	Grande adhésion en surface, sans effet bactéricide significatif*
			-	J	Grande adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
		-	+	K	Faible adhésion en surface mais bactéries viables*
			-	L	Faible adhésion en surface et effet bactéricide significatif*

***Staphylococcus epidermidis*.** Des tendances similaires ont été observées pour le *S. epidermidis* sur des nano-structures de 150 nm. Les résultats de la quantification des bactéries viables en solution après 2h dans du PBS semble ne pas indiquer de différence avec l'or plan (cas **A** - Tableau 15). En revanche, à l'inverse d'*E. coli*, une diminution de 25% en moyenne de la concentration de bactéries viables en solution après la ré-incubation dans le TSB est observée (cas **H** - Tableau 15). Cette différence pourrait être expliquée par la motilité active d'*Escherichia coli* qui lui permettrait de se détacher plus facilement de la surface que *S. epidermidis* qui n'est pas motile activement.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

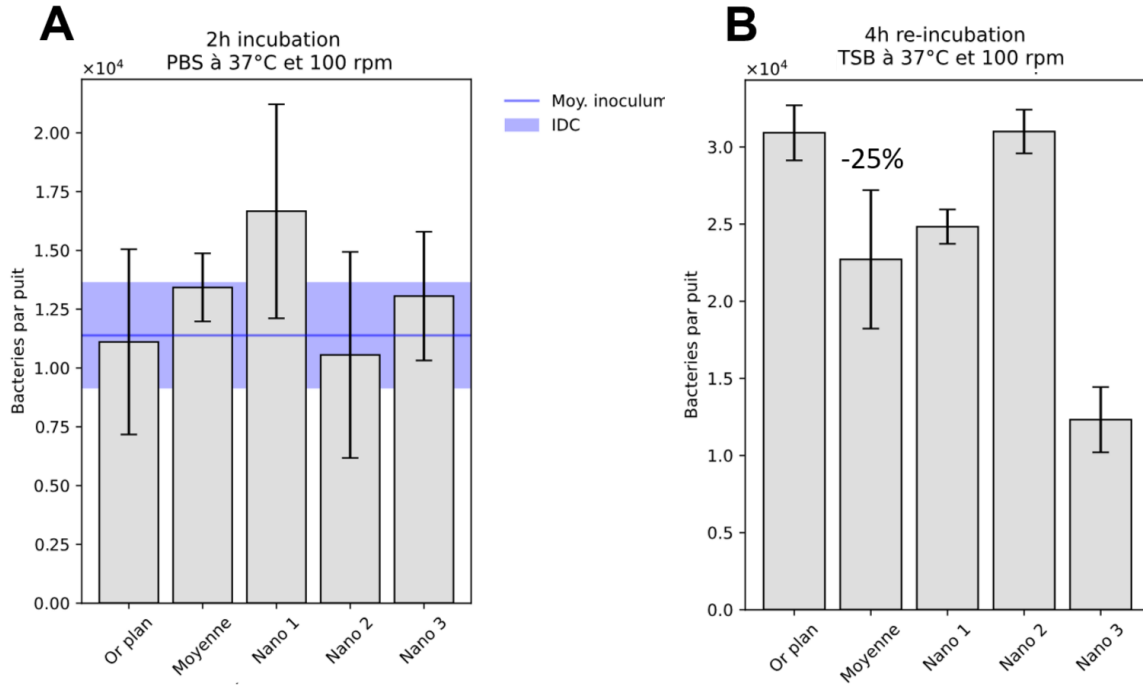


Figure 83 - Nombre de bactéries viables en solution dans un puits, dénombrées par SPA pour *Staphylococcus epidermidis* **A**. Après 2h en milieu physiologique (PBS) ; **B**. Après 4h de ré-incubation de la surface contaminée dans un milieu riche (TSB)

Grâce aux résultats de microscopie de fluorescence (voir Figure 84), on observe un taux d'adhésion et de bactéries viables similaires à l'or plan au bout de 2h (cas **D** - Tableau 15).

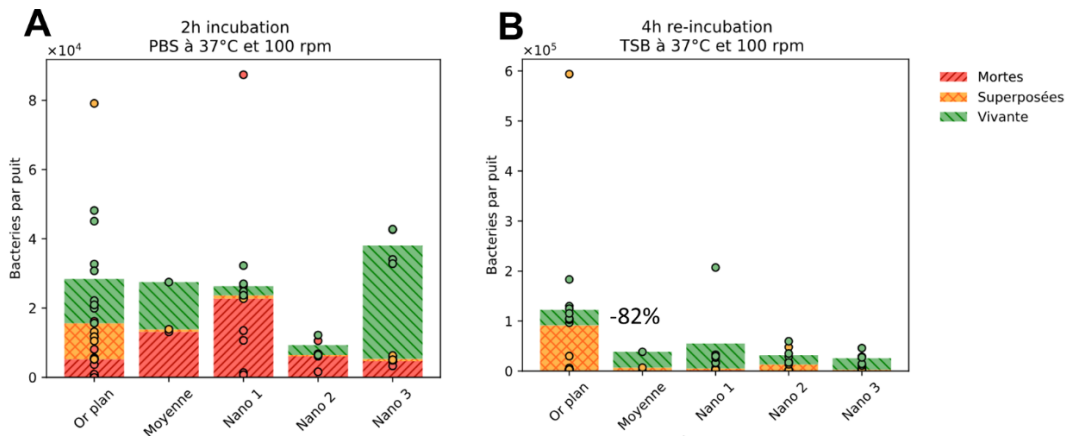


Figure 84 - Nombre et répartition des bactéries vivantes, mortes et superposées, en surface dans un puits, dénombrées par fluorescence pour *Staphylococcus epidermidis* **A**. Après 2h en milieu physiologique (PBS) ; **B**. Après 4h de ré-incubation de la surface contaminée dans un milieu riche (TSB).

Cependant, après la ré-incubation dans du TSB, une réduction de l'adhésion bactérienne de 82 % en moyenne est observable, bien que les bactéries adhérentes semblent plus viables pour les nano-structures (cas **K** - Tableau 15). Les différentes observations obtenues, synthétisées dans le Tableau 19, semblent indiquer un effet plutôt bactéricide par contact

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

des nano-structures de 150 nm sur *Staphylococcus epidermidis*, avec une diminution de la viabilité en solution des bactéries relarguées par la surface par rapport à l'or plan et une tendance à moins proliférer sur la surface nano-structurée.

Tableau 19 - Tableau récapitulatif des observations durant les différentes étapes du protocole de caractérisation micro-biologique sur *S. epidermidis* pour une surface nano-structurées avec des pics de 150 nm en moyenne.

Étapes du protocole		Dénombrement	Viabilité	Abbréviation	Observation	
Incubation milieu physiologique (PBS)	Liquide	+ ou =		A	Pas d'effet bactéricide en solution	
		-		B	Effet biocide en solution	
	Surface	+	+		C	Grande adhésion en surface, sans effet bactéricide significatif*
			-		D	Grande adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
		-	+		E	Faible adhésion en surface mais sans effet bactéricide significatif*
			-		F	Faible adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
Incubation milieu riche (TSB) d'une lame exposée aux bactéries	Liquide	+		G	Relargage et capacité des bactéries à proliférer sous forme planctonique	
		-		H	Pas de relargage de bactéries capables de proliférer sous forme planctonique	
	Surface	+	+		I	Grande adhésion en surface, sans effet bactéricide significatif*
			-		J	Grande adhésion en surface, avec effet bactéricide significatif*
		-	+		K	Faible adhésion en surface mais bactéries viables*
			-		L	Faible adhésion en surface et effet bactéricide significatif*

Les résultats des expériences présentées semblent indiquer que les nano-structures sont peu favorables au développement des bactéries à leur surface et affectent leur capacité à proliférer à leur contact. Ces effets dépendent néanmoins de l'espèce étudiée. Les résultats pour les structures de 200 nm restent à être effectués afin de vérifier si la différence de hauteur moyenne des pics peut impacter les propriétés anti-bactériennes des surfaces.

4.5.2. Propriétés anti-microbiennes des surfaces planes fonctionnalisées avec des AMPs

Parmi les expériences de caractérisation des AMPs, l'étude de l'impact de la longueur de l'espaceur et de leur orientation de greffage sur l'efficacité de peptides, ainsi que la comparaison de l'efficacité de LL-37 et de la Magainine 1, ont été réalisées. Cependant, les dizaines d'expériences menées ne permettent pas de conclure précisément quant à l'efficacité individuelle de chaque peptide. La mise en évidence tardive du relargage d'un agent biocide post-plasma, ainsi que les différentes optimisations ayant été ajoutées au protocole final de caractérisation des propriétés anti-microbiennes au cours de la thèse ont limité le nombre d'expériences exploitables. De plus, les effets de peptides, plus subtils que ceux des nano-structures ou du plasma, sont plus difficiles à quantifier par fluorescence du fait de bruits de fond pouvant apparaître pour certaines

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

fonctionnalisations et des débris cellulaires pouvant être engendré par l'interaction avec les AMPs.

Des tendances générales sont tout de même visibles, avec un nombre de bactéries viables en solution souvent similaire pour les AMPs à l'or non-fonctionnalisé après 2h dans du PBS, comme illustré en Figure 85. Ces observations permettent de supposer que l'effet biocide des AMPs n'agit que peu sur les bactéries en solution, et est plutôt actif sur les bactéries adhérentes. Pour le LL-37 fixé par son terminal C, en revanche, on peut observer une diminution de la viabilité dans le PBS après 2h, ainsi qu'un faible relargage des bactéries en solution après ré-incubation dans le TSB. Ces résultats laissent supposer une action biocide par contact, avec une forte interaction des bactéries avec le peptide. Ces hypothèses semblent être confirmées par les résultats de la caractérisation par microscopie de fluorescence, illustrés en Figure 86, où un grand nombre de bactéries adhérentes sont visibles sur le LL-37 en comparaison avec l'or plan après 2h dans le PBS. Pendant la ré-incubation avec le TSB une augmentation drastique de la mortalité des bactéries adhérentes pendant la ré-incubation est aussi observée.

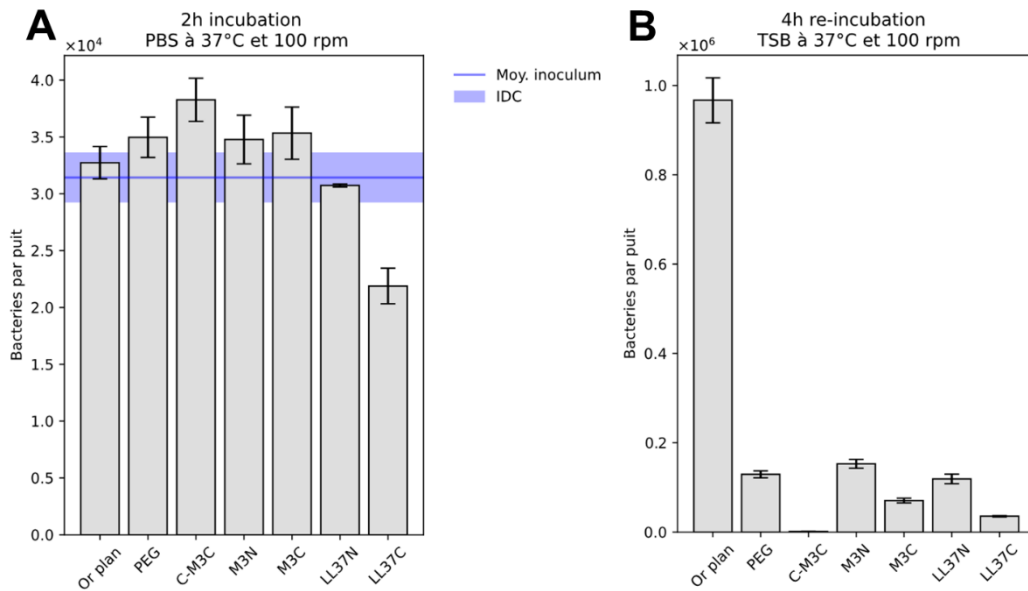


Figure 85 - Nombre de bactéries viables en solution dans des puits, dénombrées par SPA pour *Escherichia coli* **A**. Après 2h en milieu physiologique (PBS) ; **B**. Après 4h de ré-incubation de la surface contaminée dans un milieu riche (TSB)

Pour les autres AMPs, une faible adhésion sur la surface est observée après 2h dans le PBS et un faible relargage de bactéries viables en solution sont généralement observés. Ce relargage est similaire aux performances d'une fonctionnalisation PEG, servant de contrôle positif grâce à ses propriétés anti-adhésives. Le nombre de bactéries adhérentes, très faible sur le PEG après incubation dans le PBS mais aussi dans le TSB, confirme son efficacité sur la réduction de l'accroche des bactéries.

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

Le peptide contrôle C-M3C semble exprimer une plus faible interaction avec les bactéries, visible par l'augmentation de la concentration de bactéries viables en PBS. Durant la ré-incubation de la surface dans le milieu riche, l'absence de prolifération des bactéries pour le peptide contrôle peut découler de la faible accroche de celles-ci sur le peptide non-chargé pendant l'incubation avec le PBS, probablement à cause de la réduction du nombre de charges positives dans la séquence du peptide. Ces hypothèses sont confirmées par les résultats de microscopie de fluorescence, où une adhésion similaire au PEG est visible en milieu riche. Cependant, ces résultats restent à confirmer car l'adhésion des bactéries dans le PBS semblent plus importante que pour l'or plan, avec une grande viabilité.

Ces résultats démontrent l'efficacité de la fonctionnalisation peptidique pour limiter l'accroche sur la surface et le relargage des bactéries. Un effet biocide clair peut être observé pour toutes les séquences. L'utilisation d'un espaceur court de 3 β -alanines pour immobiliser les AMPs semblent donc ne pas entraver leur activité anti-microbienne, et cela pour les deux sens d'orientation des peptides.

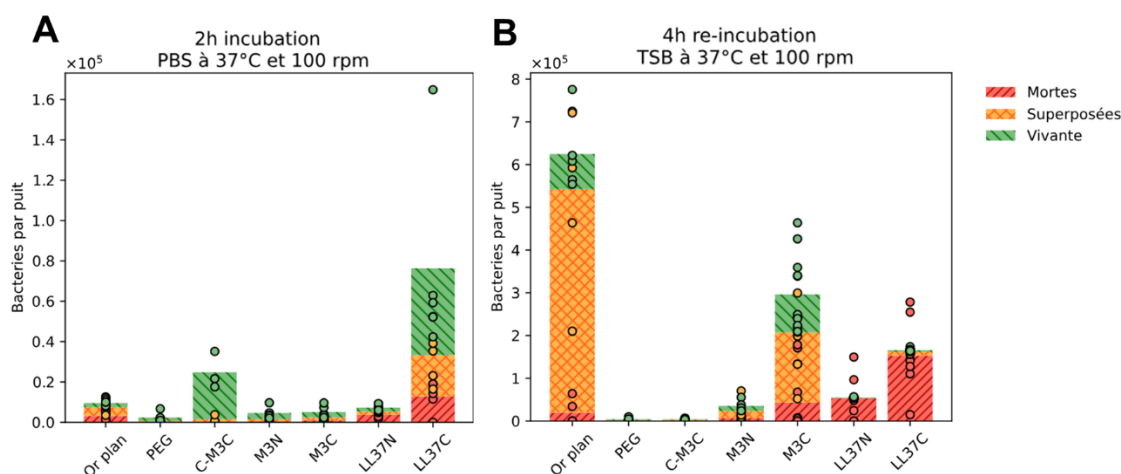


Figure 86 - Nombre et répartition des bactéries vivantes, mortes et superposées, en surface dans un puits, dénombrées par fluorescence pour *Escherichia coli* **A**. Après 2h en milieu physiologique (PBS) ; **B**. Après 4h de ré-incubation de la surface contaminée dans un milieu riche (TSB).

Ces résultats de la caractérisation des propriétés des AMPs sont encourageants, cependant pour conclure sur les effets individuels de chaque AMPs, un plus grand nombre d'expériences est nécessaires, sur les deux espèces bactériennes.

4.5.3. Combinaison de la fonctionnalisation peptidique avec les nanostructures

Pour la combinaison des approches, aucun résultat consolidé n'a été obtenu jusqu'à présent. En effet, un grand nombre d'expériences réalisées ont été biaisées par l'impact du nettoyage plasma, présenté précédemment et mis en évidence tardivement. Il peut être néanmoins intéressant de constater que pour les expériences réalisées sans

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

lavage rigoureux post-plasma, les auto-assemblages d'AMPs semblent empêcher ou diminuer le relargage d'agent biocide dans la solution, comme illustré en Figure 87.

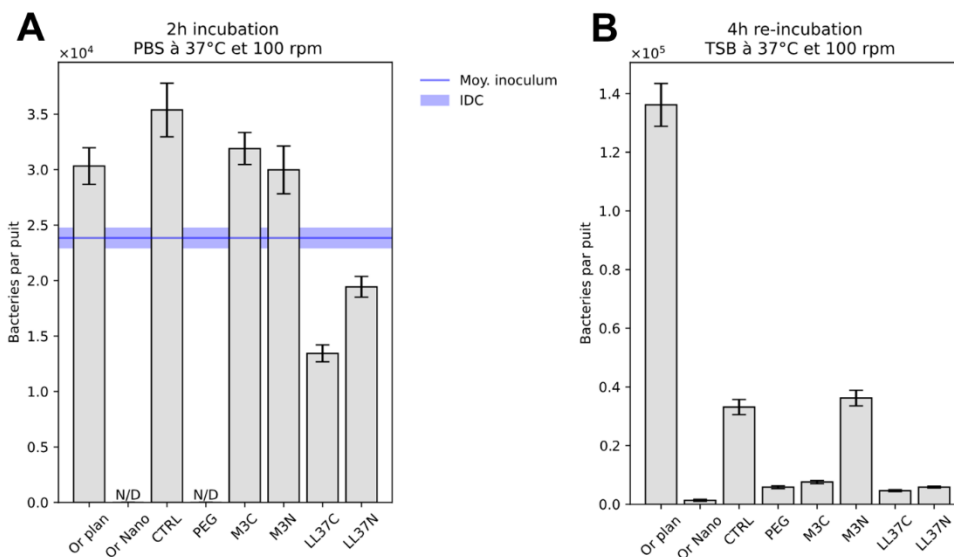


Figure 87 - Nombre de bactéries viables en solution dans un puits, dénombrées par SPA pour *Escherichia coli* **A.** Après 2h en milieu physiologique (PBS) ; **B.** Après 4h de ré-incubation de la surface contaminée dans un milieu riche (TSB). Ces résultats sont obtenus pour un lavage éthanol court, insuffisant pour empêcher le relargage d'un agent biocide par les nanostructures.

4.6. Conclusion du chapitre

L'élaboration d'un protocole de caractérisation des propriétés anti-microbiennes des surfaces, visant à être exhaustif et adaptable à divers matériaux anti-microbiens tout en permettant l'analyse en parallèle de nombreux échantillons, a mis en évidence la complexité de cette tâche.

Les méthodes de culture traditionnelles se sont avérées souvent peu pratiques pour un grand nombre d'échantillons en raison de la quantité de manipulations et de réactifs nécessaires et ont nécessité d'être adaptées. De plus, le détachement mécanique des bactéries adhérentes à la surface, crucial pour évaluer leur nombre et leur viabilité, s'est avéré être un défi. Cependant, en combinant séquentiellement plusieurs méthodes, comme la culture en milieu liquide et la microscopie de fluorescence, il a été possible de surmonter les biais et limitations potentiels liés à cette étape délicate.

L'utilisation d'une double incubation dans le protocole de caractérisation a confirmé la robustesse et la fiabilité de cette méthode, démontrant sa capacité à identifier avec précision les propriétés anti-microbiennes spécifiques d'une surface en combinant les résultats des différentes étapes de caractérisation. Celle-ci a notamment permis de mettre en avant les variations d'effets des nano-structures sur les différentes espèces bactériennes utilisées, avec un comportement plutôt bactério-statique pour *E. coli* et bactéricide pour *S. epidermidis*. Pour les deux espèces, une diminution de l'adhésion sur

CHAPITRE 4 • PROTOCOLE DE CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-MICROBIENNES

les surfaces en milieu riche est observable, indicatrice de matériaux défavorisant la prolifération de bactéries sur leur surface.

L'impact crucial de l'utilisation d'un plasma O_2/Ar sur l'efficacité des nano-structures a aussi été mis en évidence, avec la formation et le relargage d'un agent biocide pouvant réduire de 99% la population bactérienne en moins d'une heure. L'identification exacte de la nature de cet agent reste encore à être effectuée, mais les résultats obtenus ouvrent des perspectives intéressantes pour le développement de surfaces anti-microbiennes efficaces. L'élimination de cet agent biocide grâce à une étape de lavage post-plasma à l'éthanol 70° pendant plusieurs minutes a aussi été confirmé.

Les expériences réalisées ont permis de mettre en avant les différentes propriétés des surfaces développées durant cette thèse. Les surfaces nano-structurées ont démontré une activité bactéricide par contact et bactériostatique, différentes en fonction des espèces. Cela permet de conclure que de telles topologies peuvent avoir des effets anti-microbiens et méritent d'être investiguées plus en profondeur. Les AMPs ont aussi démontré des tendances biocides encourageantes, en particulier pour le LL-37 greffé par son N-ter. De plus, les premiers résultats démontrent qu'un espaceur court est suffisant pour conserver l'activité de la magainine 1 et du LL-37. Bien que des expériences supplémentaires soient nécessaires pour valider les premières tendances observées pour les AMPs et les nano-structures, les résultats actuels témoignent de l'efficacité du protocole pour évaluer les effets anti-bactériens des surfaces. Ces conclusions ouvrent des perspectives prometteuses pour le projet en cours, en suggérant des axes d'amélioration potentiels pour renforcer la robustesse et la reproductibilité du protocole.

CHAPITRE 5

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1. Caractérisation complémentaire des SAMs et élargissement de la fonctionnalisation à d'autres AMPs	171
5.2. Exploration d'autres micro- et nano-structures dorées	171
5.3. Optimisation de la caractérisation microbiologique	173
5.4. Autres améliorations ou pistes à explorer	174
5.5. Conclusion générale et perspectives long-terme	175

CHAPITRE 5

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours des travaux réalisés durant cette thèse, de nombreux domaines gravitant autour de la création de surfaces anti-microbiennes efficaces ont été explorés.

Les principaux défis rencontrés durant ce projet découlent directement de la complexité des mécanismes d'interaction entre les cellules microbiennes et les surfaces. Afin de définir plus précisément le sujet, le premier chapitre a établi clairement les différentes propriétés anti-microbiennes pouvant être observées, les approches existantes pour conférer ces propriétés aux surfaces et les limitations de certaines approches.

Dans le chapitre 2, dédié aux peptides antimicrobiens (AMPs), leur potentiel pour créer des surfaces anti-microbiennes efficaces a été exploré. La diversité des mécanismes d'action des AMPs et l'impact de plusieurs paramètres sur leur efficacité ont été mis en évidence, soulignant la nécessité d'une compréhension approfondie et d'une caractérisation précise et robuste. Une revue exhaustive de la littérature a permis d'élaborer une liste de peptides pertinents pour la fonctionnalisation de surface, parmi lesquels les AMPs LL-37 et magainine-1 ont été initialement sélectionnés pour une étude approfondie. Il est également apparu clairement, à partir des travaux existants, que les paramètres d'immobilisation des AMPs jouent un rôle crucial dans la préservation de leur activité, justifiant ainsi une étude approfondie pour définir les espaceurs et les orientations d'ancrage les plus favorables. Les mesures d'angle de contact ont confirmé la répétabilité du protocole de fonctionnalisation et la formation adéquate des monocouches auto-assemblées.

Dans le chapitre 3, l'intérêt des nano-structures bio-inspirées pour le développement de surfaces anti-microbiennes, notamment grâce à leur mécanisme mécano-bactéricide, est mis en évidence. Bien que les procédés de structuration actuels permettent de produire une variété de surfaces, la complexité de leurs mécanismes d'action, les nombreux paramètres géométriques influençant l'efficacité anti-microbienne, la production limitée d'échantillons et la caractérisation souvent incomplète des propriétés de ces surfaces compliquent leur exploitation. L'utilisation de l'électrodépôt de sels d'or a permis de démontrer avec succès son potentiel en permettant une fabrication rapide, simple et reproductible de nombreux échantillons aux nano-structures variées. L'étude des paramètres de dépôt a permis d'améliorer notre compréhension et de faciliter la production efficace de surfaces nano-structurées spécifiques. Finalement, ces avancées ont abouti à la création de plusieurs dizaines d'échantillons.

Pour finir, l'élaboration d'un protocole exhaustif de caractérisation des propriétés anti-microbiennes des surfaces, adaptable à divers matériaux anti-microbiens et permettant l'analyse en parallèle de nombreux échantillons, a permis de dépasser certains désavantages des méthodes de caractérisation classiques. Afin de contourner les problèmes de répétabilité des protocoles utilisant le détachage mécanique des bactéries adhérentes à la surface, l'utilisation séquentielle de méthodes telles que la culture en milieu liquide et la microscopie de fluorescence a été mise en place. L'incorporation d'une double incubation dans le protocole de caractérisation a confirmé la robustesse et la fiabilité de cette méthode, permettant une identification précise des propriétés anti-microbiennes spécifiques d'une surface en combinant les résultats des différentes étapes de caractérisation. Ce protocole a permis de révéler des variations d'effets des nano-structures sur différentes espèces bactériennes, avec un comportement bactériostatique pour *E. coli* et bactéricide pour *S. epidermidis*. Il a aussi permis de confirmer l'effet biocide des AMPs sur les bactéries pour un espaceur court. L'impact crucial du plasma O_2/Ar sur l'activité des nano-structures a aussi pu être souligné, avec la formation d'un agent biocide réduisant significativement la population bactérienne. Bien que l'identification précise de cet agent reste à confirmer, les résultats suggèrent des perspectives intéressantes pour le développement de surfaces anti-microbiennes efficaces. Malgré la nécessité de réaliser des expériences supplémentaires pour valider les tendances observées pour les AMPs et les nano-structures, les résultats actuels attestent de l'efficacité du protocole pour évaluer les effets anti-bactériens des surfaces et les premiers résultats sont prometteurs, autant pour les AMPs que pour les nano-structures.

Plus généralement, les travaux réalisés durant cette thèse ont permis d'explorer de manière approfondie différentes stratégies de conception de surfaces anti-microbiennes, mettant en lumière la pertinence de certaines approches. En particulier, les recherches menées ont pu mettre en avant la complexité de la conception et de la caractérisation de surfaces anti-microbiennes, ainsi que la multitude de paramètres spécifiques à chaque étape de développement et pouvant impacter fortement l'efficacité des surfaces développées. Cette thèse a aussi permis de souligner l'absence de protocoles standardisés de caractérisation de l'efficacité anti-microbienne des surfaces. Ce manque rend les comparaisons entre équipes de recherche difficiles et ce constat nous a donc conduit à développer un protocole reproductible et qui permet d'adresser un grand nombre de caractérisations. La quantité de résultats obtenus grâce à ce protocole a aussi permis de faire ressortir la nécessité de recourir à des méthodes d'analyses semi-automatiques pour les résultats de fluorescence, afin d'accélérer le traitement des données tout en conservant un maximum d'informations sur les images obtenues.

Ces diverses conclusions ouvrent des perspectives intéressantes pour la suite du projet et les expériences réalisées ont permis d'identifier des axes d'amélioration pour renforcer la robustesse et la reproductibilité du protocole.

5.1. Caractérisation complémentaire des SAMs et élargissement de la fonctionnalisation à d'autres AMPs

Dans un premier temps, la variabilité des résultats de caractérisation des propriétés anti-microbiennes concernant les peptides amène à approfondir notre connaissance des paramètres de la fonctionnalisation peptidique. Afin de conclure quant aux effets de l'espaceur et de l'orientation sur l'efficacité des AMPs, il est nécessaire d'intégrer au projet la caractérisation des SAMs pour confirmer une fonctionnalisation homogène et reproductible. La possibilité d'erreur de synthèse, de mauvaise solubilisation ou purification pour les peptides synthétisés à façon doit pouvoir être confirmée ou non, de manière à éliminer les paramètres variables avant la caractérisation. Pour cela l'utilisation de QCM ou des tests de colorimétrie semi-quantitatif pourraient être utilisés (comme le sulfo-SDTB ou un test de Bradford modifié) pour estimer la densité surfacique d'AMPs et vérifier leur attachement correct.^{88,236}

Le choix des peptides tels que la magainine 1 et le LL-37, souvent utilisés dans la littérature, était stratégique pour la fonctionnalisation afin de comparer les résultats obtenus avec ceux d'autres études. Cependant, pour la création de surfaces anti-microbiennes efficaces, d'autres peptides et combinaisons de peptides devront être considérés et testés seuls ou en combinaison avec les nano-structures. Des AMPs pertinents pouvant être explorés sont recensés dans la liste réduite en [Annexe B](#). En fonction du peptide étudié, certains pourraient démontrer de meilleurs résultats une fois greffés en surface que les deux peptides initialement évalués.

Une fois la répétabilité du protocole de caractérisation pour les peptides confirmée, il sera intéressant d'explorer d'autres paramètres de la fonctionnalisation peptidique, comme différentes combinaisons de peptides anti-microbiens pour tenter d'élargir le spectre d'action et l'efficacité, ou envisager de tester d'autres concentrations d'AMPs. L'expérimentation avec d'autres approches de fonctionnalisation, axées sur des espèces hydrophobes ou anti-adhésives par exemple, peut également ouvrir des perspectives intéressantes pour améliorer les propriétés des surfaces anti-microbiennes. En somme, ces améliorations et perspectives visent à affiner les méthodologies existantes, à diversifier les peptides testés, et à explorer de nouvelles approches de fonctionnalisation pour progresser vers des surfaces anti-microbiennes plus efficaces et adaptées à une variété d'applications.

5.2. Exploration d'autres micro- et nano-structures dorées

Parmi les différents approfondissements pouvant être explorés dans le domaine de la nano-structuration, élargir le domaine d'étude des paramètres de dépôt semble pertinent pour tenter d'accéder à d'autres dimensions de nano-pics ou à des morphologies différentes. Plus spécifiquement, il pourrait être intéressant d'envisager des concentrations en agent directionnel $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ beaucoup plus élevées. Les

expériences réalisées à 0,5 mM à 1 mM ne démontrent pas de différences significatives de la nano-structuration entre ces deux concentrations, ce qui peut être causé par les concentrations d'or élevées employées. Des concentrations de plomb de plusieurs mM pourraient donner des résultats intéressants pour différentes concentrations d'or. Cependant il sera nécessaire de vérifier que cela n'impacte pas les résultats de la caractérisation micro-biologique, le plomb étant très toxique. Envisager un autre agent directionnel non-toxique, comme des cystéines, semble important dans le futur du projet. D'autres types de matériaux, comme l'argent et le titane pourraient aussi être utilisés afin de se rapprocher des matériaux plus pertinents pour des applications liées à la santé.

Une autre approche pouvant donner des résultats intéressants pour la création de surfaces anti-microbiennes est l'exploration de la combinaison de nano-structuration avec une micro-structuration. Ces structures, existantes déjà dans la nature comme sur la peau des geckos par exemple (voir Figure 88), pourraient permettre de conférer d'autres propriétés aux surfaces, comme un effet auto-nettoyant ou anti-adhésif.¹²⁵ Ce type de doubles structurations à différentes échelles peut être réalisé, en combinant plusieurs méthodes, comme la lithographie électronique et l'électrodépôt. C'est ce qui a été fait durant le projet sur des surfaces dorées où des lignes et des disques de plusieurs dizaines de microns ont été électrodéposés uniquement sur les structures en utilisant une résine compatible avec la solution d' HAuCl_4 . Certaines des structures obtenues sont illustrées en Figure 89.

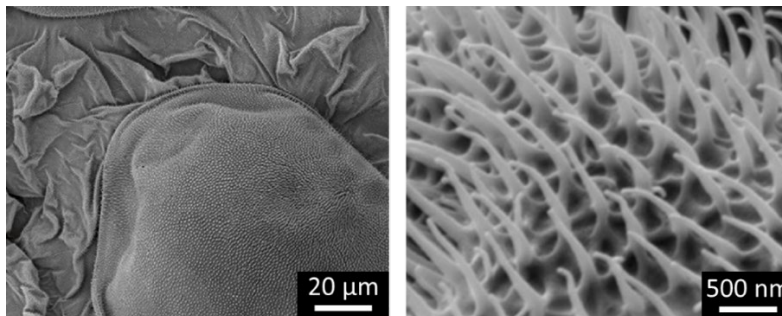


Figure 88 – Image SEM des régions du dôme épidermique (écailles) et des zones entre les écailles sur la région dorsale du lézard. Les spinules (minuscules poils) sont à peine visibles à la surface de la peau. Reproduit avec permission de l'éditeur à partir des figures de Watson et al.¹²⁵

Concernant les optimisations possibles pour le processus d'électrodépôt, la variation de la densité de courant a été identifiée comme étant un paramètre influent sur la vitesse de formation et la taille des nano-structures. L'exploration de dépôts en mode galvanostatique plutôt que potentiostatique est intéressante afin d'améliorer la maîtrise des résultats.

Ces ajustements méthodologiques visent à enrichir la diversité des morphologies pouvant être obtenues et à offrir des perspectives pour l'élaboration de surfaces aux propriétés améliorées, contribuant ainsi à l'évolution des approches nano-structurées dans le domaine des surfaces anti-microbiennes.

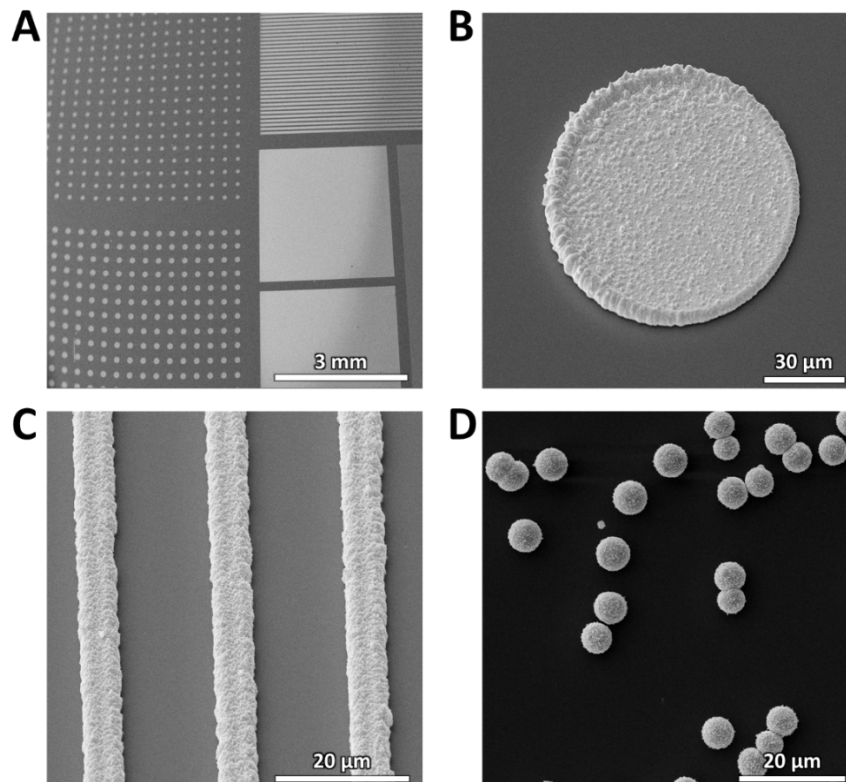


Figure 89 – Structures obtenues par lithographie électronique puis par électrodépôt. L'échantillon se compose de lignes de 6 et 60 μm de large, de plots de 30 μm , 90 μm et 120 μm de diamètre et de carrés de 9mm^2 . **A.** Image générale de l'échantillon ; **B.** Plot de 60 μm de diamètre ; **C.** Lignes de 6 μm de large ; **D.** Micro-particules générées spontanément par décollement de l'or lors de l'électrodépôt.

5.3. Optimisation de la caractérisation microbiologique

Dans le volet de la caractérisation microbiologique, quelques améliorations et explorations expérimentales peuvent aider à renforcer la rigueur des résultats obtenus et à élargir ainsi la compréhension des propriétés et des performances des surfaces anti-microbiennes étudiées.

Premièrement, l'étape de rinçage dans le protocole de caractérisation est une des parties les plus délicates de celui-ci. Plusieurs méthodes de rinçage ont été testées (pipetages, bains, etc.) mais cette étape nécessite encore d'être perfectionnée. En effet, les interfaces eau/air peuvent fortement influencer la viabilité et la répartition des bactéries sur la surface, ce qui peut fausser le dénombrement par fluorescence.⁵⁸ Il pourrait être pertinent d'imaginer un système permettant le rinçage et le marquage fluorescent des bactéries sans exposer les échantillons à ces changements de conditions, ce qui peut être rendu particulièrement difficile pour les matériaux hydrophobes. De plus, pour optimiser les résultats de cette étape, la récupération des solutions de rinçage est aussi recommandée, permettant ainsi d'évaluer les proportions de bactéries perdues, mais cette amélioration doit être intégrée de manière à ne pas accroître la complexité du protocole, déjà long. Cette

optimisation pourrait être intégrée à un système permettant de tester le protocole dans des conditions de flux.

De la même manière que pour les peptides, étendre la caractérisation microbiologique à d'autres micro-organismes tels que ceux pouvant être trouvés en [Annexe C](#), comme des *Enterobacter* ou des *Candida*, est un enjeu permettant de confirmer l'efficacité large spectre de la fonctionnalisation et de la nano-structuration. Les conditions de culture devront évidemment être adaptées à chaque espèce. En plus de tester de nouvelles espèces microbiennes, évaluer la toxicité des surfaces envers les cellules de mammifère semble nécessaire et doit être intégré à la caractérisation afin d'établir plus clairement les surfaces pouvant être utilisées pour des dispositifs médicaux et autres applications bio-médicales. Cela permettrait de comparer la toxicité de certains peptides immobilisés en surface vs en solution.

Afin de mieux appréhender les mécanismes ayant lieu à l'interface entre les cellules et les surfaces, des techniques innovantes et complémentaires au protocole d'évaluation des propriétés anti-microbiennes peuvent être envisagées. La SP_{Ri}, en particulier, est une méthode optique de détection intéressante pour caractériser les interactions entre les micro-organismes et les surfaces, sans utilisation de biomarqueur et en temps réel. Une version Haute Résolution (HR) de cette méthode a notamment été développée au laboratoire SyMMES et a pu être employée pour la détection précoce de bactéries.²³⁷ L'utilisation d'une telle méthode, combinée avec des AMPs pourrait permettre de faire le suivi du comportement de bactéries individuelles pour différentes fonctionnalisations et ainsi de venir comparer plus en profondeur les interactions de celles-ci avec plusieurs surfaces. De même, l'optimisation de l'électrodépôt ou d'un autre procédé pour obtenir des structures anti-bactériennes de moins de 100 nm (limite de détection de la SPR) pourrait permettre d'utiliser cette méthode pour mieux comprendre les interactions avec les nano-structures.

5.4. Autres améliorations ou pistes à explorer

Parmi les pistes à explorer, l'identification de l'agent biocide généré par plasma demeure un défi, malgré les analyses d'ICP et d'XPS ayant éliminé certaines hypothèses de toxicité. Les tentatives de titrage colorimétrique pour vérifier la formation de peroxyde d'hydrogène après l'interaction avec les nano-structures plasma ont été entravées par des volumes d'échantillons réduits et une sensibilité insuffisante de la technique pour les faibles concentrations d'actif (inférieur à 0,1 mM).

De plus, pour améliorer le traitement des données de microscopie de fluorescence obtenue lors du protocole microbiologique, l'intégration de modules de reconnaissance de forme et de taille dans les méthodes d'énumération des bactéries pourrait permettre de renforcer la fiabilité du dénombrement, permettant une séparation plus précise entre les bactéries intactes, les débris cellulaires et toute contamination de la surface.

L'utilisation de techniques d'imagerie telles que le MEB ou l'AFM pour illustrer les interactions entre les bactéries, les nano-structures et les peptides pourrait aussi offrir des perspectives prometteuses pour enrichir la caractérisation et la compréhension des interactions avec les différentes surfaces.

Enfin, l'exploration de la possibilité de recycler les échantillons nano-structurés en les nettoyant ou en utilisant des méthodes de décrochage des SAMs permettrait de pouvoir réutiliser les échantillons nano-structurés et peut contribuer à des pratiques expérimentales plus durables, alignées avec les préoccupations environnementales contemporaines.

5.5. Conclusion générale et perspectives long-terme

Grâce à cette thèse, le potentiel de la fonctionnalisation chimique avec des AMPs mais aussi des nano-structures a été mis en avant. Afin de confirmer la pertinence de ces approches, il était nécessaire de pouvoir établir une méthodologie complète permettant l'évaluation des propriétés anti-microbiennes. En examinant différentes méthodes, les limitations et biais de certaines ont été mis en lumière et la base d'un protocole se voulant exhaustif a été établie. La généralisation d'un tel protocole permettrait de comparer les résultats de différentes études et de pouvoir améliorer les standards et les normes visant la caractérisation des matériaux anti-microbien. Bien que ce protocole nécessite encore plusieurs améliorations, il a cependant permis de mettre en avant des différences de comportement et d'activité pour différents échantillons. Les surfaces antimicrobiennes sont un vaste sujet avec de nombreuses applications possibles et mettre en avant la compréhension des différents effets anti-microbiens sur différentes espèces permettrait d'approfondir notre compréhension de ces mécanismes et de pouvoir prédire les matériaux les plus pertinents en fonction de chaque application. Les perspectives à long terme de cette thèse sont multi-dimensionnelles, allant de la recherche fondamentale à des applications pratiques potentielles qui pourraient contribuer significativement à la lutte contre les infections microbiennes. Avec la standardisation des protocoles d'évaluation des propriétés anti-microbiennes, il sera possible d'approfondir nos connaissances des interactions surface/cellules et de pouvoir comparer objectivement et plus précisément l'efficacité de matériaux très différents. L'exploration d'autres fonctionnalisations, spécifiques aux applications des surfaces, pourraient permettre de réaliser des protections durables et bio-compatibles. L'utilisation d'agents favorisant la cicatrisation ou l'intégration des surfaces dans le corps humain pourraient permettre de concevoir des implants et des prothèses plus facilement intégrées et moins sujettes aux infections. Des matériaux plus résistants, utilisables pour les surfaces à contact répété peuvent aussi être étudié et pourraient permettre de limiter la propagation de virus et d'infections nosocomiales.

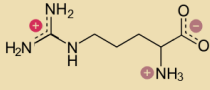
ANNEXES

A. Catégorisation selon leurs propriétés des 21 acides aminés naturels

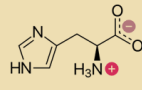
Acides aminés avec des chaînes latérales chargées

+ Positivement

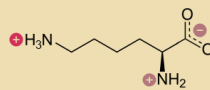
- Négativement



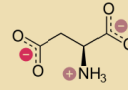
Arginine
R Arg



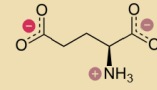
Histidine
H His



Lysine
K Lys

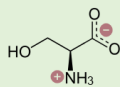


Acide aspartique
D Asp

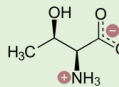


Acide glutamique
E Glu

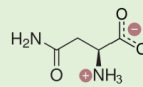
Acides aminés avec des chaînes latérales polaires non chargées



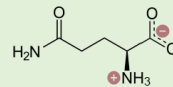
Sérine
S Ser



Thréonine
T Thr

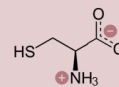


Asparagine
N Asn



Glutamine
Q Gln

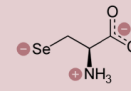
Cas spéciaux



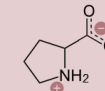
Cystéine
C Cys



Glycine
G Gly

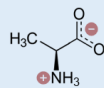


Sélocystéine
U Cys

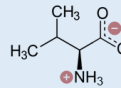


Proline
P Pro

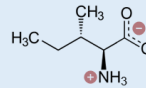
Acides aminés avec des chaînes latérales hydrophobes



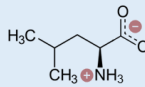
Alanine
A Ala



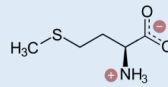
Valine
V Val



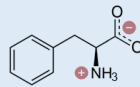
Isoleucine
I Ile



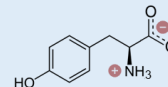
Leucine
L Leu



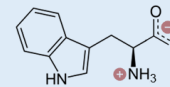
Méthionine
M Met



Phénylalanine
F Phe



Tyrosine
Y Tyr



Tryptophane
W Trp

B. Listes réduites d'AMPs pertinents pour le projet de thèse

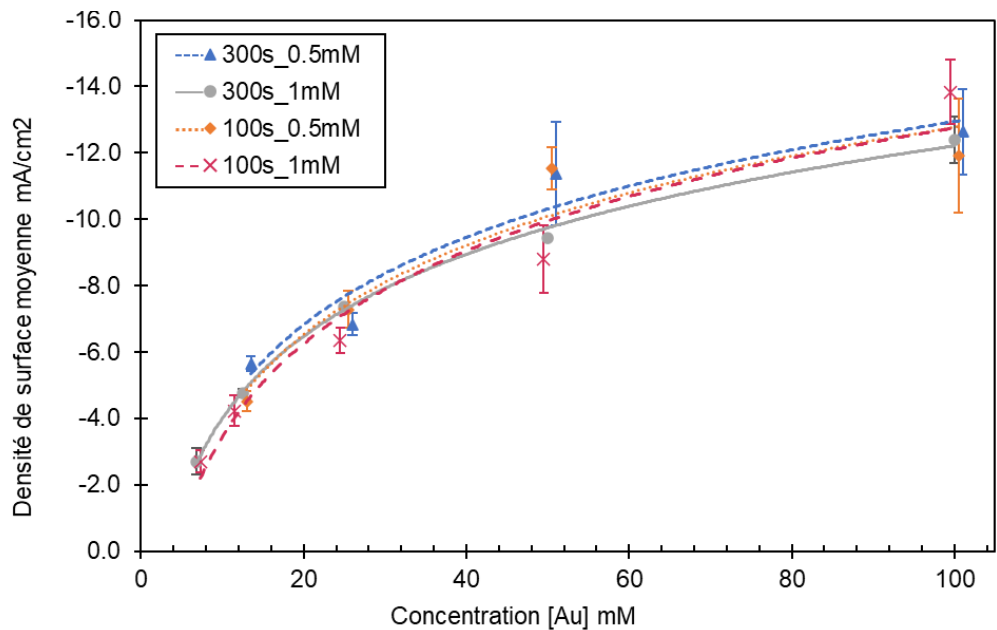
Peptides	Séquence	Critères de sélection					
		Absence Cystéine	Linéarité	Longueur chaîne	Efficacité immobilisé	Non-toxicité humains	Cible la membrane
Mag 1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	✓	✓	23	✓	-	✓
Mag II	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	✓	✓	23	✓	✓	✓
MSI-78*	GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK	✓	✓	22	✓	✓	-
Gram A	VGALAVVVWLWLWLW	✓	✓	15	✓	✓	✓
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	✓	✓	37	✓	✓	-
KR-20, KS-30, RK-31*	KRIVQRIKDFLRNLPRTES, KSKEKIGKEFKRIV QRIKDFLRNLPRTES, RSKK EKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	✓	✓	20, 30, 31	-	-	-
KR-12	KRIVQRIKDFLR	✓	✓	12	✓	✓	-
Nisin A	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHSIHVSK	×	×	34	✓	✓	✓
Nisin Z	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCNCSIHVSK	×	×	34	✓	✓	✓
Melimine*	TLISWIKNKRKQRPRVSRRRRRRGRRRR	✓	-	29	✓	✓	✓
Mel 4*	KNKRKRRRRRRGGRRRR	✓	-	17	✓	✓	✓
Temporin-Sha	FLSGIVGMLGKLF	✓	✓	13	✓	-	✓
[K3]SHa et D-[K3]SHa	FLKGIVGMLGKLF	✓	✓	13	✓	-	✓
Tet213	KRWWKWWRRRC	×	✓	10	✓	-	✓
HLf1-11	GRRRRSVQWCA	×	✓	11	✓	✓	✓

×
-
✓
 * synthétique

C. Listes réduites des micro-organismes pertinents pour le projet de thèse

Règne	Classe	Gram	Ordre	Famille	Genre	Abondances ISS	Abondance Mal. Nos.	Niveau de sécurité bio
Bactérie	Gammaproteobacteria	Négatif	Enterobactéries	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	1	1	2
					Salmonella		2	2
					Shigella		3	2
					Yersinia pestis		3	2 ou 3
					Klebsiella pneumoniae		1	2
			Enterobacter	1	2			
			Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Serratia marcescens	3	1	
					Morganellaceae	3	2	
					Pseudomonadaceae	1	2 ou 3	
					Moraxellaceae	1	2	
	Legionellales	Legionellaceae			1	2		
	Alpha Proteobacteria	Négatif	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacterium	1	3	1
					Microvirga		3	1 ou 2
					Meganema		3	1
Bacilli	Positif	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus aureus (methicillin-resistant)	1	1	2	
				Staphylococcus epidermidis		1	1	
				Staphylococcus saprophyticus		1	1	
				Staphylococcus lugdunensis		1	2	
				Bacillus cereus		2	2	
		Bacillus subtilis	3	1				
		Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	2	2		
Enterococcaceae	1			2				
Clostridia	Positif	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Clostridioides difficile		1	2	
Champignons	Microbotryomycetes	-	Sporidiobolales	Sporidiobolaceae	Rhodotorula mucilaginosa	1		2
	Eurotiomycetes	-	Eurotiales	Trichocomaceae	Penicillium chrysogenum	1		1
					Aspergillus	1	1	1
	Saccharomycetes		Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Candida		1	1
Tremellomycetes	-	Tremellales	Tremellaceae	Cryptococcus	1		2	

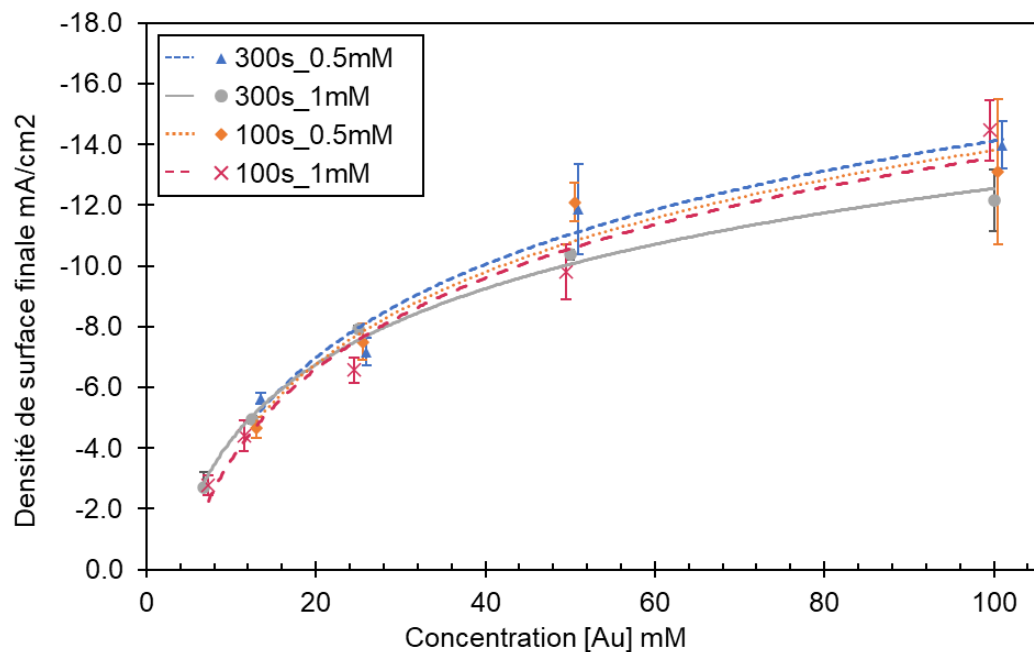
D. Profils de l'impact de la concentration en H_{AuCl}4 sur la densité de courant moyenne lors de l'électrodépôt pour différentes concentrations en Pb(CH₃COO)₂ et différentes durées de dépôt.



$$y = -A \ln(x) + B$$

Conditions	A	B	R ²
300s_0.5 mM	3,8	4,6	0,94
300s_1 mM	3,6	4,2	0,998
100s_0.5 mM	3,9	5,1	0,92
100s_1 mM	4,0	5,8	0,96
<u>Moyenne</u>	<u>3,8</u>	<u>4,9</u>	

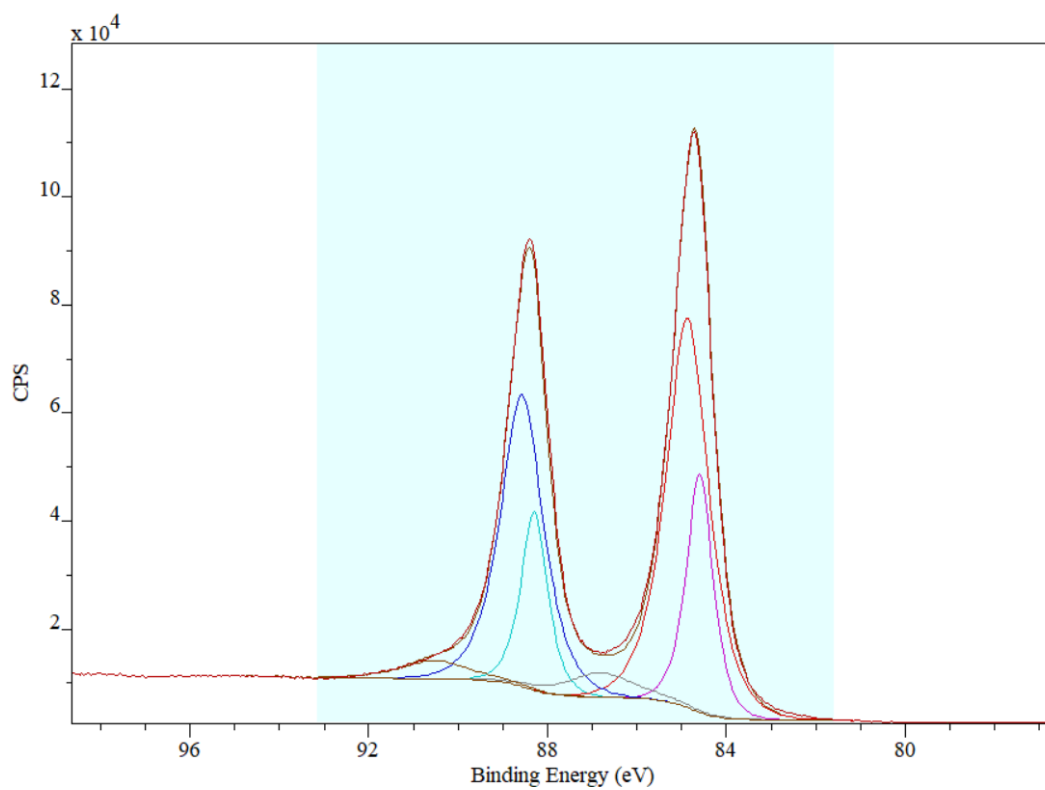
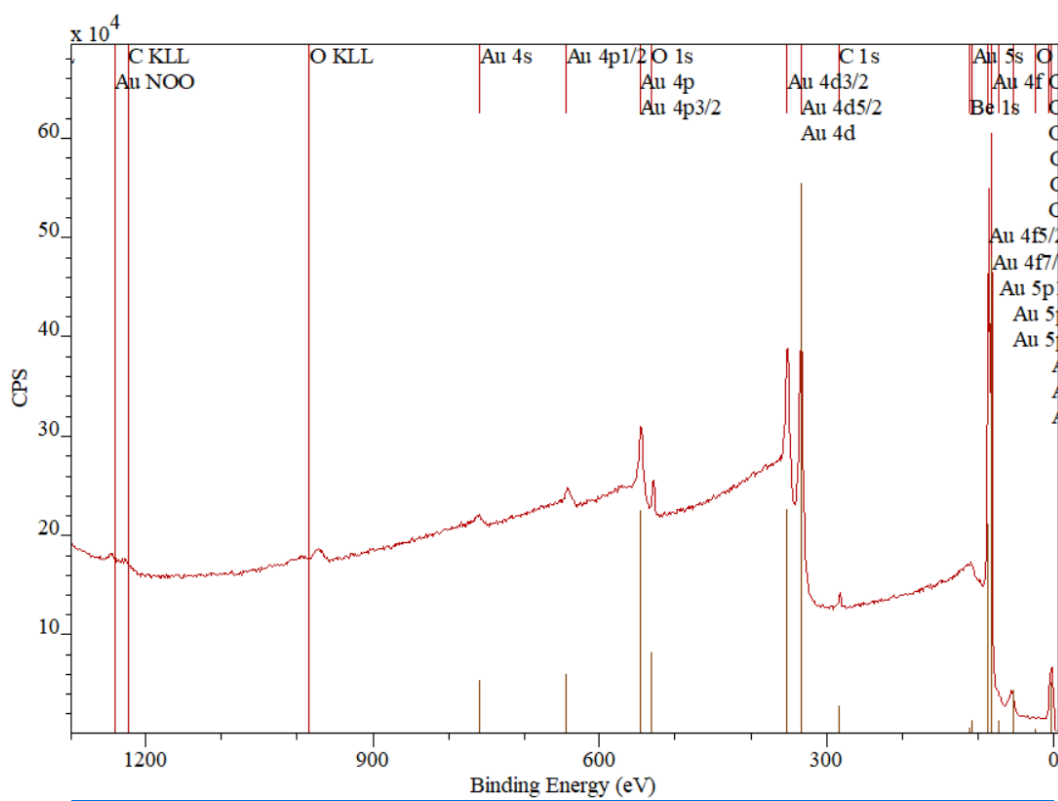
E. Profils de l'impact de la concentration en H_{AuCl}4 sur la densité de courant finale lors de l'électrodépôt pour différentes concentrations en Pb(CH₃COO)₂ et différentes durées de dépôt.

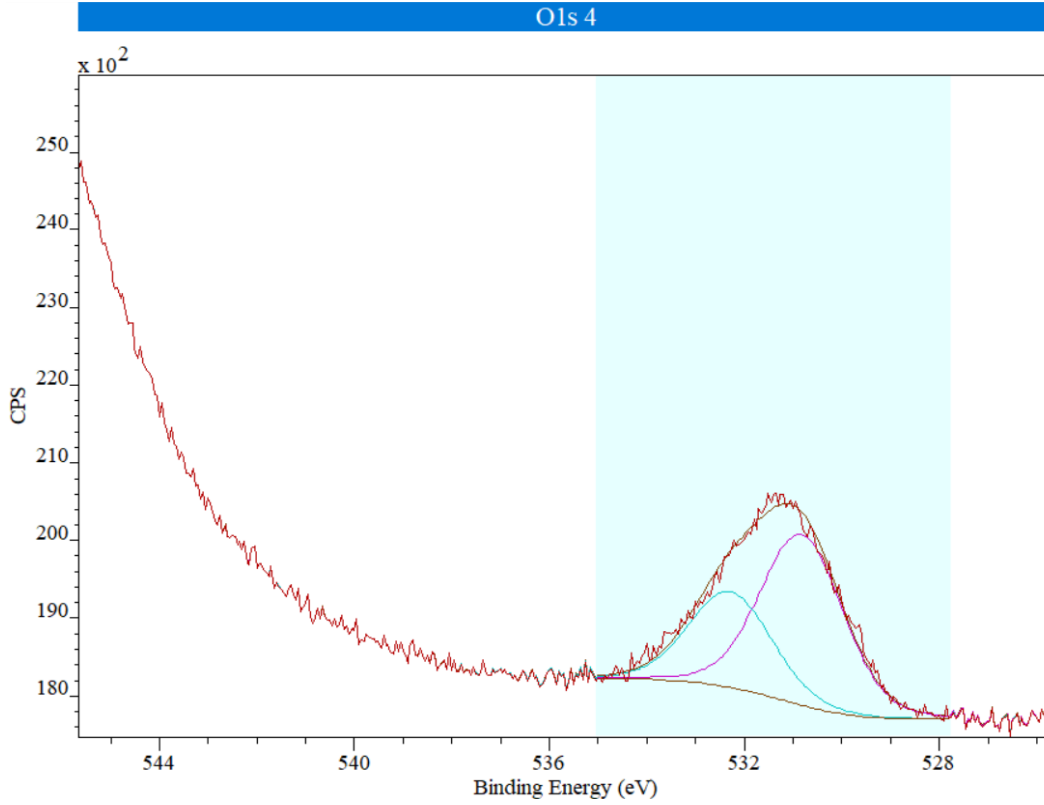


$$y = -A \ln(x) + B$$

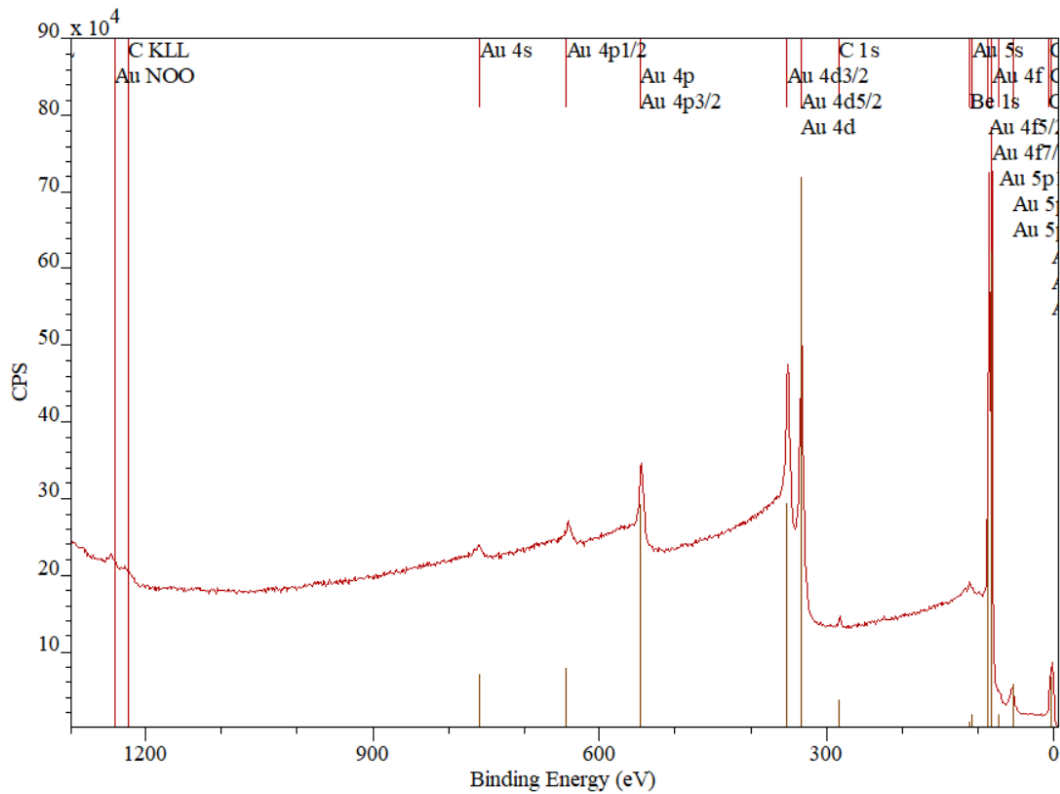
Conditions	A	B	R ²
300s_0,5 mM	4,4	6,3	0,96
300s_1 mM	3,6	4,0	0,99
100s_0,5 mM	4,4	6,4	0,95
100s_1 mM	4,3	6,4	0,97
<u>Moyenne</u>	<u>4,2</u>	<u>5,8</u>	

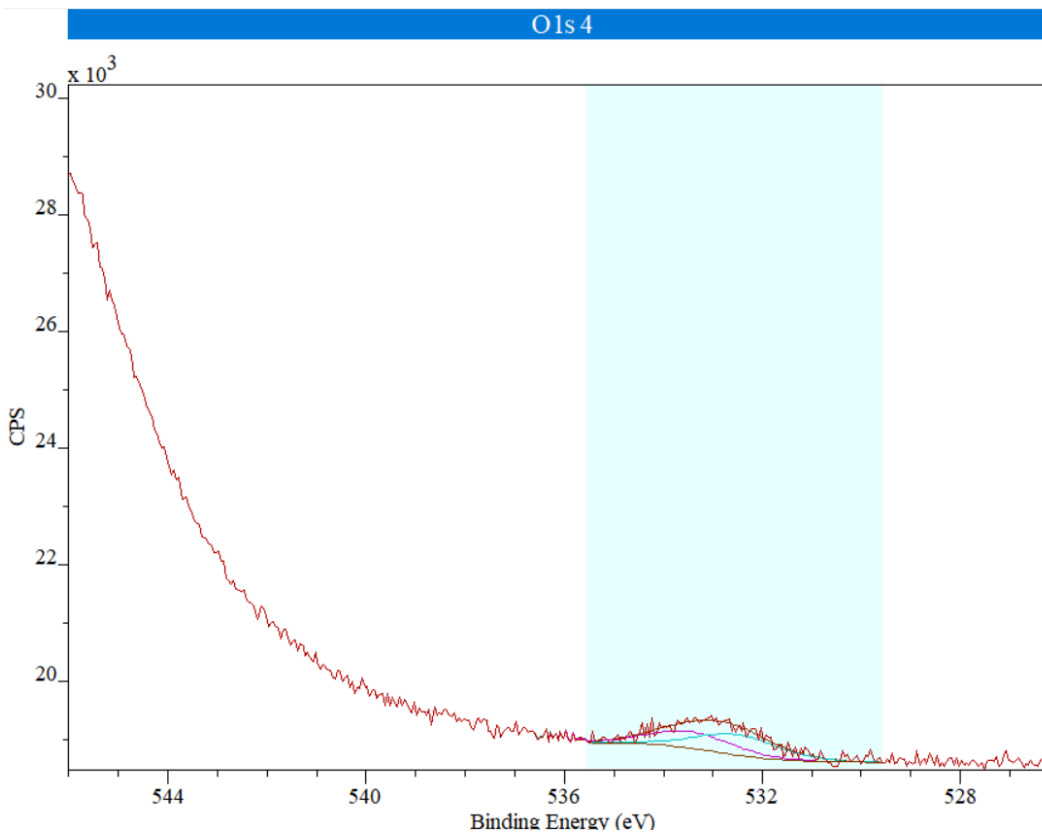
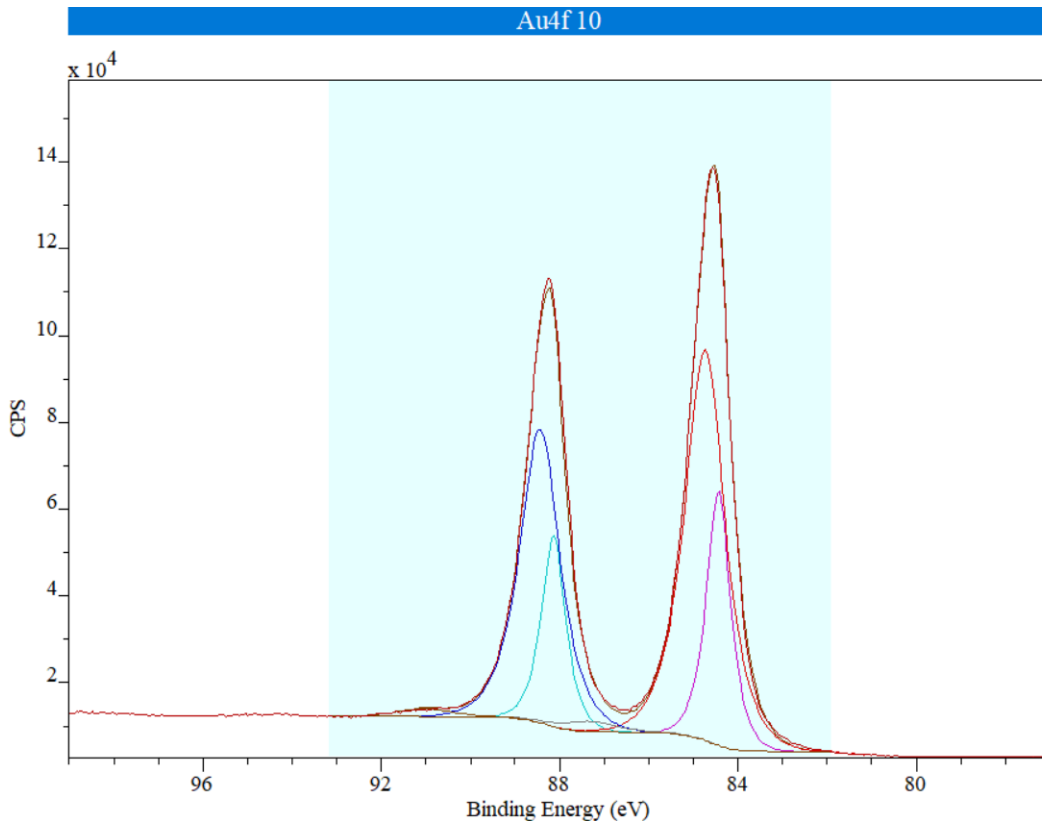
F. Spectres XPS des échantillons nano-structurés post-plasma





G. Spectres XPS des échantillons nano-structurés post-plasma ayant subi un nettoyage 10 minutes à l'éthanol 70°





H. Préparation des surfaces dorées fonctionnalisées avec des AMPs

1. Matériels

- Lames dorées
- Pistolet argon
- Générateur de plasma
- Bain ultrason
- Chambre humide nitrate de potassium 94%
- Puits en silicone 12 – wells, removable de Ibidi®
- Ethanol 70%,
- Eau distillée,
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X ;
- Peptides thiolés en solution

2. Nettoyage des surfaces pré-fonctionnalisation

Avant fonctionnalisation, les lames sont rincées de manière successive 5 minutes dans des bains ultrasons d'acétone, puis d'IPA et finalement d'eau ultra pure. Les échantillons sont ensuite séchés au pistolet argon avant d'être nettoyés à l'aide d'un plasma O₂/Ar minimum 17h avant la fonctionnalisation.

- Pression : 0.6 mbar (générateur pulsé)
- Fréquence : 13.56 mHz
- Puissance : 40 watts (75% O₂ et 25% Ar) à 80%
- Temps : 3 min puis conservé dans une boîte de pétri hermétique, à température ambiante

3. Préparation des SAMs

Avant utilisation, les AMPs aliquotés du réfrigérateur à -80°C sont laissés à température ambiante jusqu'à totale décongélation. Les aliquots de peptides sont ensuite passés au bain ultrasons pendant 5 minutes afin de bien homogénéiser les solutions. Les peptides sont ensuite dilués dans du PBS ou de l'EDI, à une concentration finale de 100, 50 ou 10µM. Pour l'étape d'auto-assemblage, les puits en silicone Ibidi® sont déposés sur la lame dorée préalablement nettoyée, en veillant à appliquer une pression modérée et uniforme sur toute la surface. Ensuite, 30 µL de solution peptidique sont ajoutés à chaque puits, en vérifiant quand l'entièreté de la superficie du fond du puits est recouverte. Un couvercle adapté au produit Ibidi est ajouté sur les puits en silicone. Les échantillons sont finalement conservés dans une chambre humide pendant 17h à 25°C pour l'auto-assemblage (nitrate de potassium à 94% d'humidité).

4. Nettoyage des surfaces post-fonctionnalisation

Après l'auto-assemblage, les lames dorées sont nettoyées en les passant 1 minute dans un bain de PBS / 1 minute dans un bain d'EDI / 10 à 15 minute dans un bain d'éthanol 70°. Elles sont ensuite laissées sécher sous environnement stérile.

I. Fabrication des surfaces dorées nano-structurées par électrodépôt

1. Matériels

a. Appareils utilisés

- Bain ultrason (Brandson 200)
- Agitateur magnétique avec barreaux aimantés
- Support immobilisateur pour la cellule électrochimique
- Potentiostat CHI604C (CHIInstrument)
- Ordinateur portable

b. Électrodes

- Contre-électrode de platine – Basi
- Contre-électrode de graphite 6mm Ø – Northern Materials Innovations ltd
- Électrode de référence argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl 3M KCl; BASi, cat. no. MF-2056)

c. Consommables et verrerie

- Tube Téflon thermorétractable, transparent, 12 pouces (BASi, cat. no. MF-2027)
- Unité de filtrage (VWR Vacuum filtration 250 mL 0.2µm, cat. no. 10040-464)
- Lames de microscope Fisherfinest (Fisherbrand, cat. no. 12-550C)
- Capuchon en Onyx
- Cellules porte-lames en verre
- Cellule électrochimique (bêchers sans bec de 250 mL)
- Élastiques d'immobilisation des électrodes
- Gaufres de silicium et boîtes de transport
- Scotch de dépôt
- Flacon de stockage de l'électrode de référence avec bouchon (BASi, cat. no. MR-5275)

d. Réactifs et produits

- Acide tétrachloroaurique(III) trihydrate $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – Fischer Scientific
- Acétate de plomb(II) trihydraté $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – Fischer Scientific
- Acétone $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ – HoneyWell,
- Acide chlorhydrique 37% HCl – Regent
- OptiClear™ – Life Science Product,
- 2-propanol $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ – High Purity Products
- Acide sulfurique 98% (wt/wt) H_2SO_4 – Sigma-Aldrich
- Eau désionisée Milli-Q (18 MΩ/cm).

2. Nettoyage des substrats

Avant évaporation, avant voltamétrie cyclique et après électrodépôt, les substrats sont lavés en utilisant des bains ultrasons consécutifs de 5 minutes. Les substrats sont placés dans la cellule porte-lame en verre puis nettoyé en utilisant, dans l'ordre : de l'OptiClear™, de l'acétone, du 2-propanol et de l'eau déionisée. L'eau déionisée est préalablement filtrée avec une unité de filtrage VWR Vacuum.

3. Préparation des substrats pré-électrodépôt

Les lames de verres Fisherfinest sont nettoyées comme décrit dans la sous-partie précédente. Elles sont ensuite immobilisées 2 par 2 sur des gaufres de silicium à l'aide de scotch de dépôt et envoyée au service des évaporations de l'IMDQ (Infrastructure matériaux et dispositifs quantiques) du Département de Physique de l'Université de Sherbrooke. Dans l'ordre, une couche d'accroche de 3 nm de titane est évaporée avec rotation à une vitesse de 0,05 nm/s, puis une couche d'or de 30 nm est évaporée avec rotation à une vitesse de 0,2 nm/s.

4. Voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique (CV) fait partie des méthodes classiques utilisées en électrochimie et permet de fournir des indications quant aux comportements oxido-réductifs de certaines espèces. Le principe de cette méthode est de caractériser la réponse en courant résultant de la variation linéaire du potentiel appliqué entre les électrodes de référence et de travail. Un voltampérogramme classique est illustré en Figure 90.

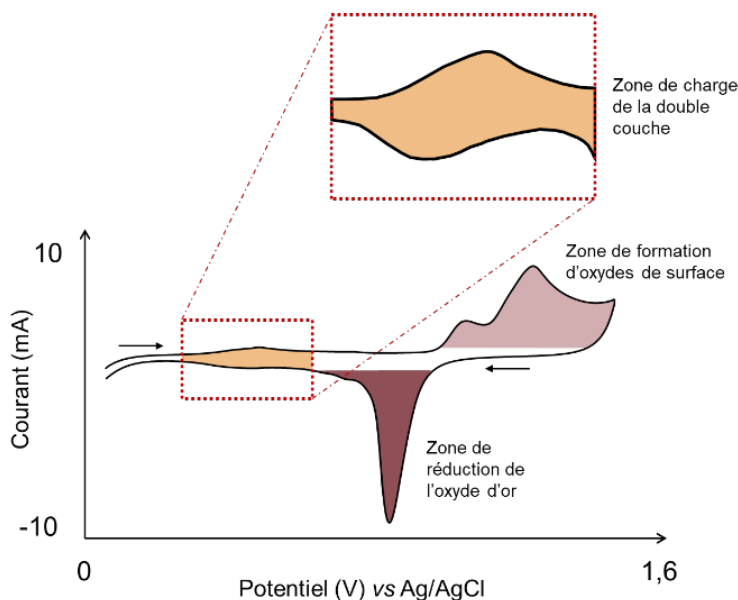


Figure 90 – Illustration des régions d'intérêt d'un voltampérogramme théorique de l'or après une voltampérométrie cyclique dans H_2SO_4 .

ANNEXES •

Lors du balayage vers des potentiels positifs, la double couche de l'électrode de travail va se charger puis sa surface va être oxydée. Quand le balayage évolue vers les potentiels négatifs, la couche d'oxyde formée va ensuite être réduite.²³⁸ La voltampérométrie cyclique est utilisée pour mesurer la surface électrochimique avant et après chaque électrodépôt. En supposant que l'oxygène chimisorbé forme une couche monoatomique de ratio 1 avec les atomes de métal de la surface, la charge associée à la réduction de la couche d'oxyde est donc proportionnelle à la densité surfacique en atomes métalliques. Pour l'or polycristallin la densité surfacique de charge est classiquement de $390 \pm 10 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. La surface électro-active est donc calculée en intégrant le pic de réduction du voltampérogramme et en la divisant par la densité de charge d'une monocouche d'oxyde d'or.²³⁹

Une contre-électrode en platine est utilisée et la cellule à trois électrodes est plongée dans une solution de H_2SO_4 à 0,5 M sous agitation à 600 tr/min. Trois cycles de 0 à 1,6 V sont enregistrés et moyenné pour extraire la charge du pic de réduction.

Les voltampérogrammes obtenus peuvent aussi apporter des informations concernant la présence et la proportion des facettes cristallines de l'or. Les différents pics composant le pic d'oxydation peuvent chacun être associé à une orientation cristallographique, comme résumé dans le Tableau 20.^{240,241}

Tableau 20 – Potentiels des pics associés aux facettes de l'or polycristallin dans 0.1 M de H_2SO_4 . Inspiré de Jeyabharathi et al.²⁴⁰

Facettes de l'or	Potentiel du pic d'oxydation (V vs Ag/AgCl dans 3M KCl)
(100)	1,14
(110)	1,2
(111)	1,35

La cellule électrochimique est placée sur la plaque de l'agitateur magnétique et sécurisé à l'aide du support en métal comme illustré en Figure 92. Dans le capuchon en Onyx, l'électrode de référence est insérée dans le trou **1** (voir Figure 94) et l'électrode de travail (substrat doré) dans le trou **2** de manière à immerger environ 2/3 de la surface totale. L'embout long d'arrivée de gaz est inséré dans le trou **3** et sécurisé avec des élastiques. Finalement, la contre-électrode en platine est placée dans l'adaptateur en Onyx **5** puis insérée dans le trou du capuchon prévu à cette effet. Toutes les électrodes sont connectées aux pinces correspondantes du potentiostat CH Instrument 604C. Le bécet sans bec est rempli avec 250 mL d' H_2SO_4 à 0.5 M et la solution est purgée pendant 10 min en faisant buller l'arrivée d'azote. Le flux d'azote est ensuite réduit et la solution est mise sous agitation à 600 tours/min. Après quelques minutes de stabilisation, la voltamétrie

ANNEXES •

cyclique est effectuée. Les paramètres suivants sont imposés à l'aide de l'interface CHI604C :

- Potentiel initial : 0
- Potentiel final : 1,6 V
- Polarité du scan : positive
- Vitesse du scan : 0,1 V/s
- Nombre de segment : 6
- Intervalle d'échantillonnage : 0,1 V
- Sensibilité : 0,01 A/V

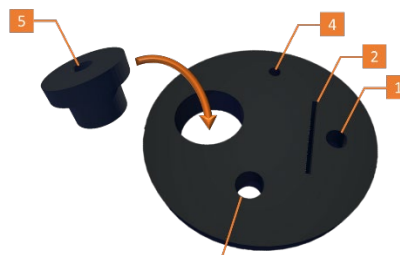


Figure 91 - Schéma SolidWork du capuchon en Onyx

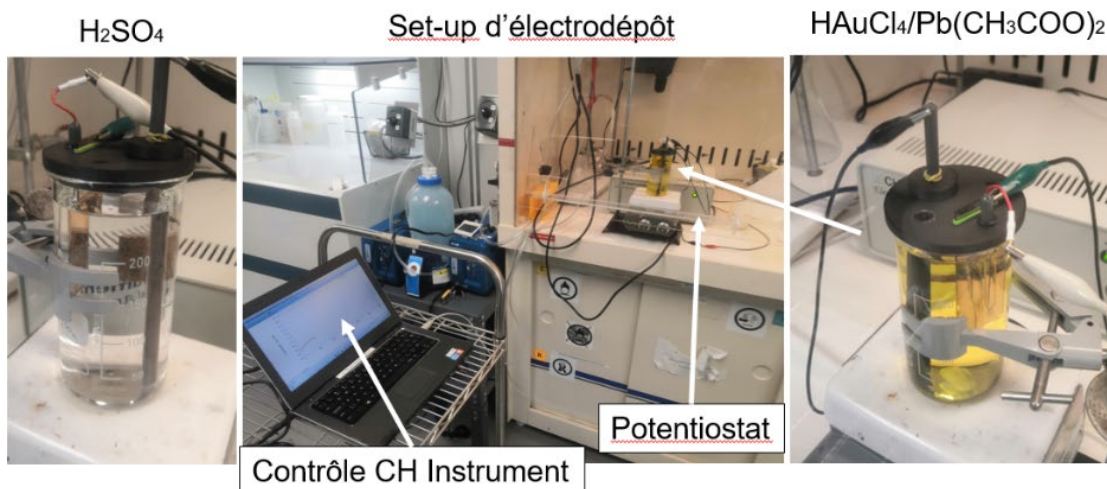


Figure 92 - Montage expérimental d'électrodépôt

Après l'acquisition, les voltamogrammes sont enregistrés sous formats .txt et .bin pour leur traitement. Les CV sont enregistrées de la même manière après l'électrodépôt. Entre chaque changement de solutions, les échantillons sont nettoyés dans de l'eau déionisée filtrée pendant plusieurs minutes à 1000 tours/min.

5. Électrodépôt

Pour procéder à l'électrodépôt, la contre-électrode de platine est remplacée par la contre-électrode de graphite. La cellule électrochimique est rempli avec la solution d' $HAuCl_4/Pb(CH_3COO)_2$ désirée et celle-ci est dégazée pendant 10 minutes. La solution d'électrodépôt est ensuite mis sous agitation de 1000 tours/min. L'électrodépôt est effectué utilisant l'interface CHI604C en mode chrono-ampérométrie avec les paramètres suivants :

- Intervalle d'échantillonnage : 0.009 sec
- Sensibilité : 0,1 A/V

Le potentiel appliqué et la durée de l'électrodépôt sont adaptés à chaque expérience. Après l'acquisition, les courbes de courants sont enregistrées sous formats .txt et .bin pour leur traitement.

J. Caractérisation des nanostructures post-électrodépôt

1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les micrographies MEB ont été acquises à l'aide de l'instrument Axia™ ChemiSEM™ à des inclinaisons de 0° et 45°. La distance de travail entre le détecteur et l'échantillon peut aller jusqu'à 8 mm, avec un grossissement de x 15000, un temps d'acquisition de 1 µs, une intensité de 12 pA et une tension d'accélération de 30 kV. Pour évaluer l'homogénéité de la surface nanostructurée, au moins 4 micrographies ont été prises à différentes distances du centre de l'échantillon. Des mesures de spectroscopie X à dispersion d'énergie (EDX) ont également été réalisées sur l'Axia™. Les images ont été analysées avec le logiciel ImageJ.

2. Microscope à force atomique (AFM)

Les images AFM ont été acquises à l'aide du Dimension Icon Scanasyst (Veeco, Bruker) en mode Tapping avec des sondes ScanAssist-Air. Le taux de balayage a été fixé à 0,5 Hz et au moins 3 images/échantillon de 25µm² (512 x 512 lignes) ont été acquises. Les images ont été analysées avec le logiciel Gwyddion.

K. Caractérisation micro-biologique des propriétés anti-microbiennes des surfaces

1. Matériels

- 2 lames identiques à tester,
- Plasma O₂,
- Chambre 12-puits amovible en silicone IBIDI®
- Ethanol 70%,
- Eau distillée stérile,
- PBS stérile 1X,
- TSB (Tryptic Soy Broth / Bouillon Tryptone Soja) stérile,
- Densitomètre 600nm,
- Centrifugeuse MiniSpin
- Matériel stérile (oëze, pinces, pipettes graduées, etc.),
- Géloses TSA (Trypcase Soy Agar / Gélose Trypcase-Soja),
- Kit BacLight™ Live/Dead pour bactéries,
- Microscope à fluorescence.

2. Pré-culture

Inoculation de 5 mL de TSB avec une colonie bactérienne à l'aide d'une oëze et incubation 18h à 37°C sans agitation.

3. Culture

Diluer 300 µL de solution de pré-culture dans 9mL de TSB et incuber plusieurs heures en fonction de l'espèce étudiée afin d'attendre la phase exponentielle de croissance. A 37°C sous agitation constante (300 rpm), pour *Escherichia coli* attendre 1h et pour *Staphylococcus epidermidis* attendre au minimum 2h.

Prélever 2 mL de l'inoculum et transférer dans un Eppendorf stérile pour centrifuger 10 min à 5 000 x g (soit 9 000 rpm avec la centrifugeuse Minispin). Vider le surnageant et le remplacer par 2 mL de PBS, puis re-suspendre les bactéries en vortexant quelques secondes. Mesurer la concentration bactérienne à l'aide du densitomètre 600nm. Prélever 1 mL de la solution bactérienne et le diluer au 10e dans 9mL de PSB. Répéter l'opération plusieurs fois pour finalement obtenir une concentration finale proche de 2×10^5 CFU/mL.

4. Incubation en milieu physiologique

Déposer 300µL de l'inoculum dans chaque puits Ibidi® et incuber 2h à 37 °C sous agitation constante (100 rpm). Bien fixer le couvercle des puits pour éviter l'évaporation. Diluer l'inoculum jusqu'à une concentration permettant d'énumérer précisément la concentration initiale par SPA (voir étape 6).

5. Incubation en milieu riche

ANNEXES •

Nettoyer les puits et la lame en les immergeant dans du PBS puis retirer les puits et nettoyer la lame en la plaçant dans un Falcon de 50 mL et en agitant 20 fois le tube. Remettre de nouveaux puits en silicone sur la lame au même endroit et les remplir avec 300µL de TSB stérile puis incuber 4h à 37°C sous agitation constante (100 rpm).

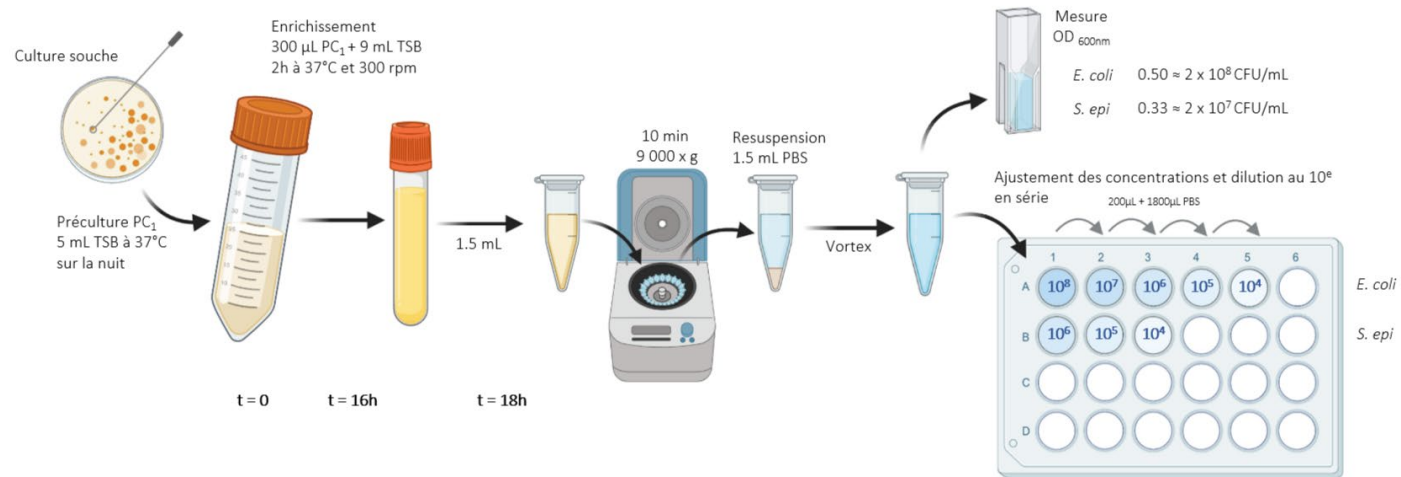
6. Caractérisation du surnageant par SPA

Prélever 200µL de solution de chaque puit afin de les quantifier par énumération. Avant le SPA, faire sécher sans couvercle les géloses 5 minutes sous la PSM (15 min si elles viennent d'être coulées). Effectuer six demi-dilutions de la solution en parallèle dans une plaque 96-puits en prélevant successivement 150 µL de la dilution précédente et en la diluant dans 150 µL de PBS. Laisser une colonne de la plaque 96-puits vide entre chaque dilution. À l'aide d'une multi-pipette de 12 canaux, prélever 30 µL de chaque puits de la ligne de dilution en série et les déposer sur une gélose carrée. Répéter cette étape quatre fois pour chaque ligne afin de déposer en tout 120 µL pour chaque dilution de l'échantillon. Répéter la SPA pour les autres échantillons : un échantillon = une ligne de la plaque 96 = 4 lignes de plots par gélose. Laisser sécher les géloses déposées à 20°C sous PSM pendant 15 min avec couvercle, puis les mettre en incubation. Après 24h d'incubation (ou plus ou moins en fonction de l'espèce) faire l'énumération des géloses.

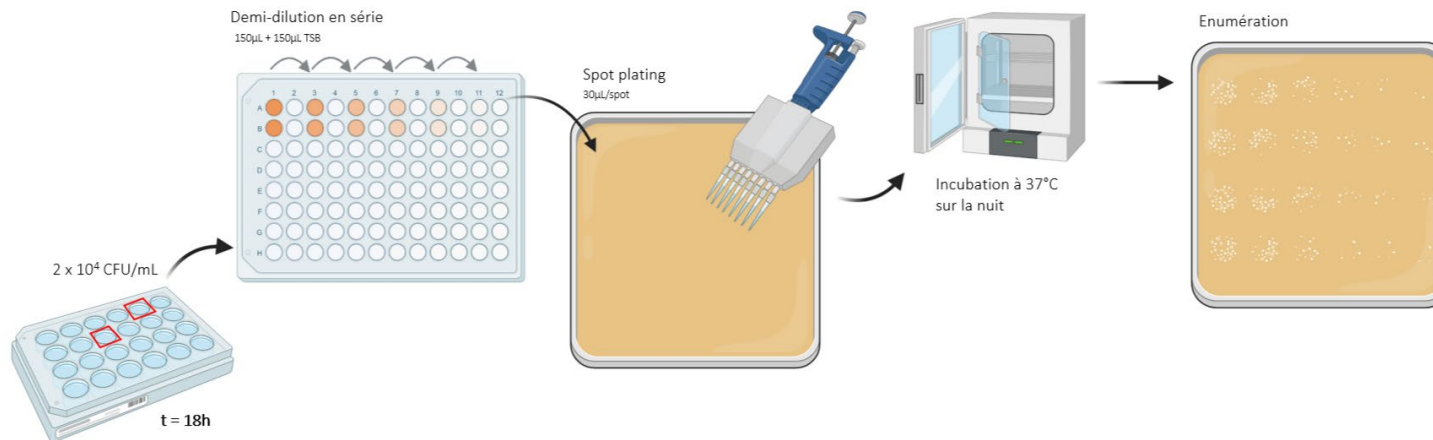
7. Caractérisation par microscopie de fluorescence

Nettoyer les puits et la lame en les immergeant dans du PBS puis retirer les puits et nettoyer la lame en la plaçant dans un Falcon de 50 mL et en agitant 20 fois le tube. Sortir les colorants du kit BacLight™ aliquotés à 1:10 du congélateur et les laisser revenir à température ambiante à l'abri de la lumière. Centrifuger afin de récupérer un maximum de solution puis passer 5 minutes au bain à ultrason. Mélanger 3µL de chaque colorant dans un Eppendorf et ajuster à 200 µL avec de l'eau distillée puis centrifuger 1 minute et conserver à l'abri de la lumière. Sortir la lame du Falcon et déposer 10µL de solution BacLight™ par zone de puits puis recouvrir d'une lamelle et laisser incuber au moins 15 minutes à l'abri de toute lumière. Au microscope à fluorescence avec un grossissement x20, prendre 5 prises de vues par puits.

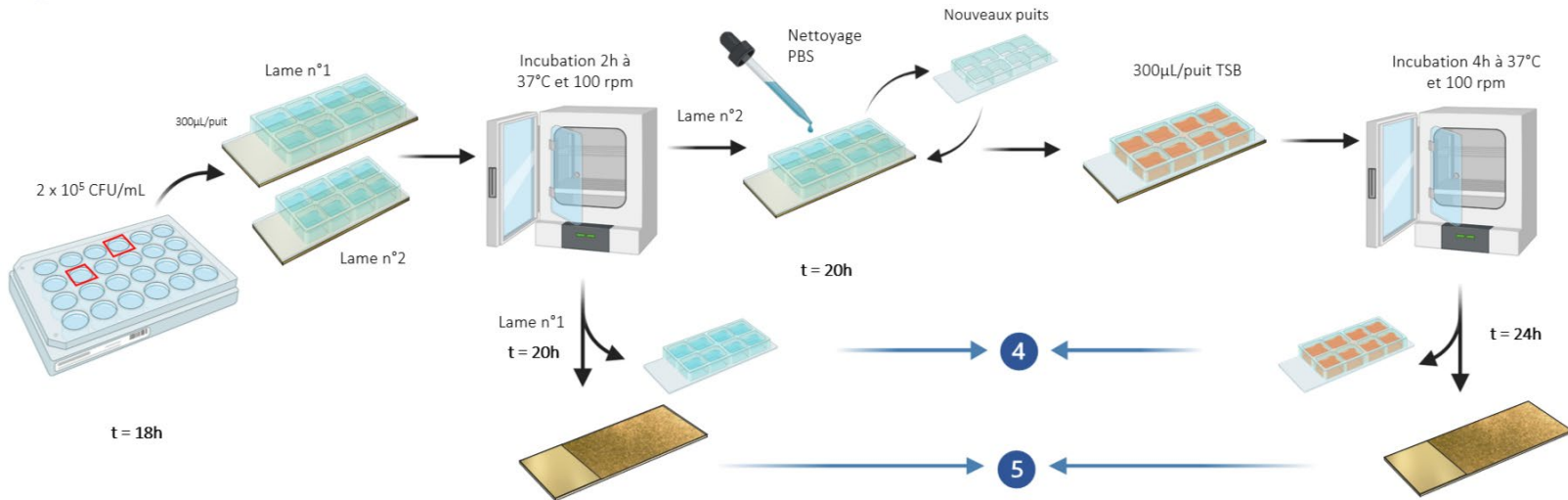
1 Préparation de l'inoculum à 2×10^5 CFU/mL



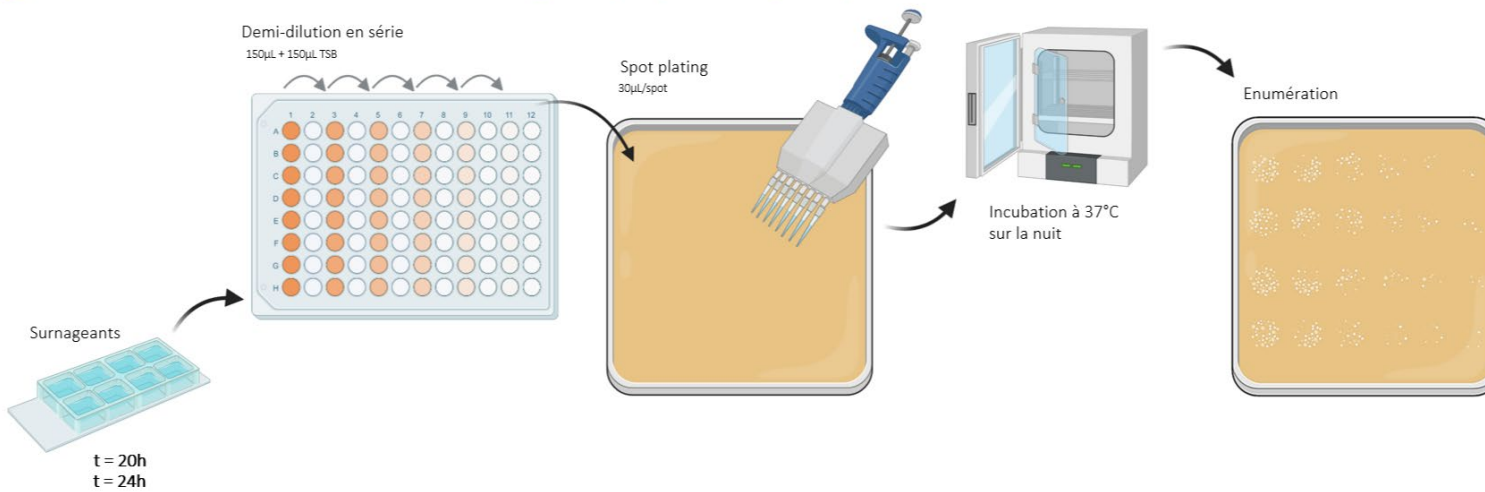
2 Mesure de la concentration exacte de l'inoculum par Spot Plating Assay



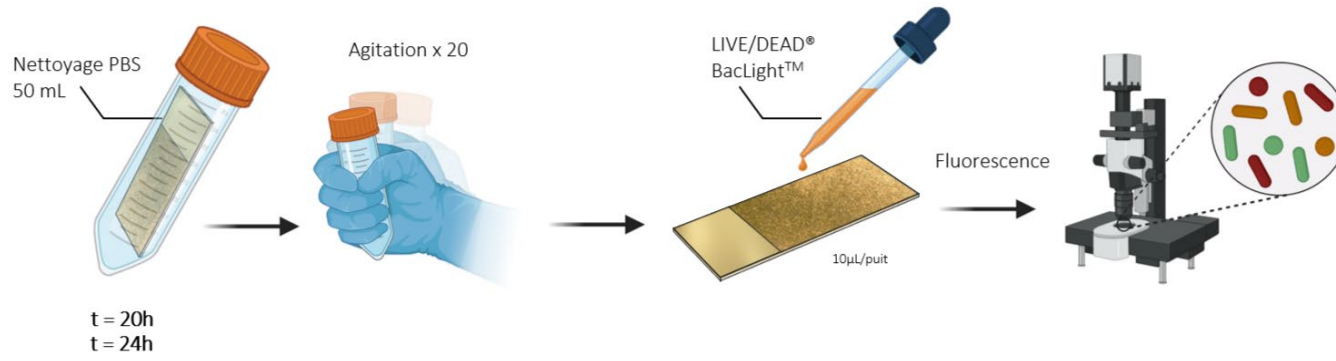
3 Ensemencement de deux lames et incubations



4 Mesure de la concentration exacte des surnageants par Spot Plating Assay



5 Enumération par fluorescence des bactéries en surface



RÉFÉRENCES

- (1) Cavalazzi, B.; Lemelle, L.; Simionovici, A.; Cady, S. L.; Russell, M. J.; Bailo, E.; Canteri, R.; Enrico, E.; Manceau, A.; Maris, A.; Salomé, M.; Thomassot, E.; Bouden, N.; Tucoulou, R.; Hofmann, A. Cellular Remains in a ~3.42-Billion-Year-Old Subseafloor Hydrothermal Environment. *Sci. Adv.* **2021**, *7* (29), eabf3963. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf3963>.
- (2) Dodd, M. S.; Papineau, D.; Grenne, T.; Slack, J. F.; Rittner, M.; Pirajno, F.; O'Neil, J.; Little, C. T. S. Evidence for Early Life in Earth's Oldest Hydrothermal Vent Precipitates. *Nature* **2017**, *543* (7643), 60–64. <https://doi.org/10.1038/nature21377>.
- (3) Lavoie, J.; IRSST (Quebec). *Guide de prévention contre la prolifération microbienne dans les systèmes de ventilation guide technique*; Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec: Montreal, 2010.
- (4) *Biomaterials Associated Infection*; Moriarty, T. F., Zaat, S. A. J., Busscher, H. J., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1031-7>.
- (5) Vishwakarma, V. Impact of Environmental Biofilms: Industrial Components and Its Remediation. *J. Basic Microbiol.* **2020**, *60* (3), 198–206. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900569>.
- (6) Cámara, M.; Green, W.; MacPhee, C. E.; Rakowska, P. D.; Raval, R.; Richardson, M. C.; Slater-Jefferies, J.; Steventon, K.; Webb, J. S. Economic Significance of Biofilms: A Multidisciplinary and Cross-Sectoral Challenge. *Npj Biofilms Microbiomes* **2022**, *8* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00306-y>.
- (7) Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*; Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2019. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>.
- (8) Carlet, J.; Le Coz, P. *Proposals of the special working group for keeping antibiotics effective*; Ministère de la Santé et de la Prévention, 2015; pp 1–77. https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_carlet_anglais.pdf (accessed 2024-01-11).
- (9) *Ministère de la Santé et de la Prévention* -. Ministère de la Santé et de la Prévention. <http://sante.gouv.fr/> (accessed 2024-01-11).
- (10) Le Conseil des académies canadiennes (CAC). *Quand Les Antibiotiques Échouent*; Le Conseil des académies canadiennes (CAC), 2019. <https://www.rapports-cac.ca/reports/les-incidences-socioeconomiques-potentielles-de-la-resistance-aux-antimicrobiens-au-canada/> (accessed 2023-11-13).
- (11) *World Health Organization (WHO)*. <https://www.who.int> (accessed 2024-01-11).

RÉFÉRENCES •

- (12) WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed 2021-11-02).
- (13) De Oliveira, D.; Forde, B.; Kidd, T.; Harris, P.; Schembri, M.; Beatson, S.; Paterson, D.; Walker, M. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. May 13, 2020, pp 1–49. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>.
- (14) Tacconelli, E. GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS. 7.
- (15) Bloom, D. E.; Cadarette, D. Infectious Disease Threats in the Twenty-First Century: Strengthening the Global Response. *Front. Immunol.* **2019**, *10*.
- (16) Doron, S.; Gorbach, S. L. Bacterial Infections: Overview. 11.
- (17) Kramer, A.; Assadian, O. Survival of Microorganisms on Inanimate Surfaces. *Use Biocidal Surf. Reduct. Healthc. Acquir. Infect.* **2014**, 7–26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08057-4_2.
- (18) Bixler, G. D.; Bhushan, B. Biofouling: Lessons from Nature. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2012**, 370 (1967), 2381–2417. <https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0502>.
- (19) Yasir, M.; Dutta, D.; Hossain, K. R.; Chen, R.; Ho, K. K. K.; Kuppusamy, R.; Clarke, R. J.; Kumar, N.; Willcox, M. D. P. Mechanism of Action of Surface Immobilized Antimicrobial Peptides Against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 3053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03053>.
- (20) Raofi, S.; Pashazadeh Kan, F.; Rafiei, S.; Hosseinipalangi, Z.; Noorani Mejareh, Z.; Khani, S.; Abdollahi, B.; Seyghalani Talab, F.; Sanaei, M.; Zarabi, F.; Dolati, Y.; Ahmadi, N.; Raofi, N.; Sarhadi, Y.; Masoumi, M.; sadat Hosseini, B.; Vali, N.; Gholamali, N.; Asadi, S.; Ahmadi, S.; Ahmadi, B.; Beiramy Chomalou, Z.; Asadollahi, E.; Rajabi, M.; Gharagozloo, D.; Nejatifar, Z.; Soheylirad, R.; Jalali, S.; Aghajani, F.; Navidriahy, M.; Deylami, S.; Nasiri, M.; Zareei, M.; Golmohammadi, Z.; Shabani, H.; Torabi, F.; Shabaninejad, H.; Nemati, A.; Amerzadeh, M.; Aryankhesal, A.; Ghashghaee, A. Global Prevalence of Nosocomial Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* **2023**, *18* (1), e0274248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274248>.
- (21) Suetens, C.; Latour, K.; Kärki, T.; Ricchizzi, E.; Kinross, P.; Moro, M. L.; Jans, B.; Hopkins, S.; Hansen, S.; Lyytikäinen, O.; Reilly, J.; Deptula, A.; Zingg, W.; Plachouras, D.; Monnet, D. L.; the Healthcare-Associated Infections Prevalence Study Group. Prevalence of Healthcare-Associated Infections, Estimated Incidence and Composite Antimicrobial Resistance Index in Acute Care Hospitals and Long-Term Care Facilities: Results from Two European Point Prevalence Surveys, 2016 to 2017. *Eurosurveillance* **2018**, *23* (46). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800516>.

RÉFÉRENCES •

- (22) Kadner, R. J.; Rogers, K. Bacteria - Prokaryotes, Microbes, Cells. *Encyclopedia Britannica*; 2023.
- (23) Gómez-Gómez, J.-M.; Manfredi, C.; Alonso, J.-C.; Blázquez, J. A Novel Role for RecA under Non-Stress: Promotion of Swarming Motility in *Escherichia Coli* K-12. *BMC Biol.* **2007**, 5 (1), 14. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-14>.
- (24) Pollitt, E. J. G.; Diggle, S. P. Defining Motility in the Staphylococci. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, 74 (16), 2943–2958. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2507-z>.
- (25) Gibson, B.; Wilson, D. J.; Feil, E.; Eyre-Walker, A. The Distribution of Bacterial Doubling Times in the Wild. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2018**, 285 (1880), 20180789. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0789>.
- (26) Gottenbos, B.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J. Initial Adhesion and Surface Growth of *Staphylococcus Epidermidis* and *Pseudomonas Aeruginosa* on Biomedical Polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 50 (2), 208–214. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(200005\)50:2<208::aid-jbm16>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(200005)50:2<208::aid-jbm16>3.0.co;2-d).
- (27) Gram Positive vs Gram Negative. from Technology Networks. <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007> (accessed 2022-01-18).
- (28) Rodríguez-Beltrán, J.; DelaFuente, J.; León-Sampedro, R.; MacLean, R. C.; San Millán, Á. Beyond Horizontal Gene Transfer: The Role of Plasmids in Bacterial Evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, 19 (6), 347–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00497-1>.
- (29) Shineh, G.; Mobaraki, M.; Perves Bappy, M. J.; Mills, D. K. Biofilm Formation, and Related Impacts on Healthcare, Food Processing and Packaging, Industrial Manufacturing, Marine Industries, and Sanitation—A Review. *Appl. Microbiol.* **2023**, 3 (3), 629–665. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3030044>.
- (30) Shree, P.; Singh, C. K.; Sodhi, K. K.; Surya, J. N.; Singh, D. K. Biofilms: Understanding the Structure and Contribution towards Bacterial Resistance in Antibiotics. *Med. Microecol.* **2023**, 16, 100084. <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2023.100084>.
- (31) Rumbaugh, K. P.; Sauer, K. Biofilm Dispersion. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, 18 (10), 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>.
- (32) Garrett, T. R.; Bhakoo, M.; Zhang, Z. Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces. *Prog. Nat. Sci.* **2008**, 18 (9), 1049–1056. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>.
- (33) Tuson, H. H.; Weibel, D. B. Bacteria–Surface Interactions. *Soft Matter* **2013**, 9 (17), 4368. <https://doi.org/10.1039/c3sm27705d>.
- (34) Lee, M.-S.; Hussein, H. R.; Chang, S.-W.; Chang, C.-Y.; Lin, Y.-Y.; Chien, Y.; Yang, Y.-P.; Kiew, L.-V.; Chen, C.-Y.; Chiou, S.-H.; Chang, C.-C. Nature-Inspired Surface Structures Design for Antimicrobial Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24 (2), 1348. <https://doi.org/10.3390/ijms24021348>.

RÉFÉRENCES •

- (35) Uneputty, A.; Dávila-Lezama, A.; Garibo, D.; Oknianska, A.; Bogdanchikova, N.; Hernández-Sánchez, J. F.; Susarrey-Arce, A. Strategies Applied to Modify Structured and Smooth Surfaces: A Step Closer to Reduce Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Colloid Interface Sci. Commun.* **2022**, *46*, 100560. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100560>.
- (36) *Module - Bactériologie - Annexe*. <http://www.unsof.org/media/bacterio/html/annexe-10.html> (accessed 2020-11-17).
- (37) Girmaye, D.; Abdeta, D.; Tamiru, Y. Review on Bacterial Biofilms and Its Impact. **2018**, *10*.
- (38) Pankey, G. A.; Sabath, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *38* (6), 864–870. <https://doi.org/10.1086/381972>.
- (39) Rigo, S.; Cai, C.; Gunkel-Grabole, G.; Maurizi, L.; Zhang, X.; Xu, J.; Palivan, C. G. Nanoscience-Based Strategies to Engineer Antimicrobial Surfaces. *Adv. Sci.* **2018**, *5* (5), 1700892. <https://doi.org/10.1002/advs.201700892>.
- (40) Hasan, J.; Crawford, R. J.; Ivanova, E. P. Antibacterial Surfaces: The Quest for a New Generation of Biomaterials. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31* (5), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.017>.
- (41) Dafforn, K. A.; Lewis, J. A.; Johnston, E. L. Antifouling Strategies: History and Regulation, Ecological Impacts and Mitigation. *Mar. Pollut. Bull.* **2011**, *62* (3), 453–465. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.012>.
- (42) Xu, Y.; Yang, L.; Zhang, H. Bio-Inspired Surfaces for Fouling Resistance, A Review. *E3S Web Conf.* **2021**, *294*, 05002. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202129405002>.
- (43) Rodríguez-Hernández, J. Antimicrobial/Antifouling Surfaces Obtained by Surface Modification. In *Polymers against Microorganisms*; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 95–123. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47961-3_5.
- (44) Makvandi, P.; Wang, C.; Zare, E. N.; Borzacchiello, A.; Niu, L.; Tay, F. R. Metal-Based Nanomaterials in Biomedical Applications: Antimicrobial Activity and Cytotoxicity Aspects. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30* (22), 1910021. <https://doi.org/10.1002/adfm.201910021>.
- (45) Lemire, J. A.; Harrison, J. J.; Turner, R. J. Antimicrobial Activity of Metals: Mechanisms, Molecular Targets and Applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11* (6), 371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>.
- (46) Rodríguez-Hernández, J. *Polymers against Microorganisms*; Springer International Publishing: Cham, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47961-3>.
- (47) Gyawali, R.; Ibrahim, S. A. Natural Products as Antimicrobial Agents. *Food Control* **2014**, *46*, 412–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>.

RÉFÉRENCES •

- (48) Glinel, K.; Jonas, A. M.; Jouenne, T.; Leprince, J.; Galas, L.; Huck, W. T. S. Antibacterial and Antifouling Polymer Brushes Incorporating Antimicrobial Peptide. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (1), 71–77. <https://doi.org/10.1021/bc800280u>.
- (49) Chouhan, S.; Sharma, K.; Guleria, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines* **2017**, *4* (3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>.
- (50) Glinel, K.; Thebault, P.; Humblot, V.; Pradier, C. M.; Jouenne, T. Antibacterial Surfaces Developed from Bio-Inspired Approaches. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (5), 1670–1684. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.011>.
- (51) Erdem Büyükkiraz, M.; Kesmen, Z. Antimicrobial Peptides (AMPs): A Promising Class of Antimicrobial Compounds. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *132* (3), 1573–1596. <https://doi.org/10.1111/jam.15314>.
- (52) Hawi, S.; Goel, S.; Kumar, V.; Pearce, O.; Ayre, W. N.; Ivanova, E. P. Critical Review of Nanopillar-Based Mechanobactericidal Systems. *ACS Appl. Nano Mater.* **2022**, *5* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1021/acsnm.1c03045>.
- (53) Ivanova, E. P.; Hasan, J.; Webb, H. K.; Truong, V. K.; Watson, G. S.; Watson, J. A.; Baulin, V. A.; Pogodin, S.; Wang, J. Y.; Tobin, M. J.; Løbbe, C.; Crawford, R. J. Natural Bactericidal Surfaces: Mechanical Rupture of *Pseudomonas Aeruginosa* Cells by Cicada Wings. *Small* **2012**, *8* (16), 2489–2494. <https://doi.org/10.1002/sml.201200528>.
- (54) Catley, T. E.; Corrigan, R. M.; Parnell, A. J. Designing Effective Antimicrobial Nanostructured Surfaces: Highlighting the Lack of Consensus in the Literature. *ACS Omega* **2023**, *8* (17), 14873–14883. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c08068>.
- (55) Duan, S.; Wu, R.; Xiong, Y.-H.; Ren, H.-M.; Lei, C.; Zhao, Y.-Q.; Zhang, X.-Y.; Xu, F.-J. Multifunctional Antimicrobial Materials: From Rational Design to Biomedical Applications. *Prog. Mater. Sci.* **2022**, *125*, 100887. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2021.100887>.
- (56) Alves, D.; Olívia Pereira, M. Mini-Review: Antimicrobial Peptides and Enzymes as Promising Candidates to Functionalize Biomaterial Surfaces. *Biofouling* **2014**, *30* (4), 483–499. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.889120>.
- (57) Bragg, R.; Jansen, A.; Coetsee, M.; van der Westhuizen, W.; Boucher, C. Bacterial Resistance to Quaternary Ammonium Compounds (QAC) Disinfectants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *808*, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1774-9_1.
- (58) Cunliffe, A. J.; Askew, P. D.; Stephan, I.; Iredale, G.; Cosemans, P.; Simmons, L. M.; Verran, J.; Redfern, J. How Do We Determine the Efficacy of an Antibacterial Surface? A Review of Standardised Antibacterial Material Testing Methods. *Antibiotics* **2021**, *10* (9), 1069. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091069>.

RÉFÉRENCES •

- (59) Azeredo, J.; Azevedo, N. F.; Briandet, R.; Cerca, N.; Coenye, T.; Costa, A. R.; Desvaux, M.; Di Bonaventura, G.; Hébraud, M.; Jaglic, Z.; Kačániová, M.; Knöchel, S.; Lourenço, A.; Mergulhão, F.; Meyer, R. L.; Nychas, G.; Simões, M.; Tresse, O.; Sternberg, C. Critical Review on Biofilm Methods. *Crit. Rev. Microbiol.* **2017**, *43* (3), 313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>.
- (60) Rigo, S.; Hürlimann, D.; Marot, L.; Malmsten, M.; Meier, W.; Palivan, C. G. Decorating Nanostructured Surfaces with Antimicrobial Peptides to Efficiently Fight Bacteria. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3* (3), 1533–1543. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01154>.
- (61) Li, T.; Wang, N.; Chen, S.; Lu, R.; Li, H.; Zhang, Z. Antibacterial Activity and Cytocompatibility of an Implant Coating Consisting of TiO₂ Nanotubes Combined with a GL13K Antimicrobial Peptide. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 2995–3007. <https://doi.org/10.2147/IJN.S128775>.
- (62) Dinca, V.; Kasotakis, E.; Catherine, J.; Mourka, A.; Ranella, A.; Ovsianikov, A.; Chichkov, B. N.; Farsari, M.; Mitraki, A.; Fotakis, C. Directed Three-Dimensional Patterning of Self-Assembled Peptide Fibrils. *Nano Lett* **2008**, *8* (2), 7.
- (63) Zhu, C.; Zhang, W.; Fang, S.; Kong, R.; Zou, G.; Bao, N.-R.; Zhao, J.-N.; Shang, X.-F. Antibiotic Peptide-Modified Nanostructured Titanium Surface for Enhancing Bactericidal Property. *J. Mater. Sci.* **2018**, *53* (8), 5891–5908. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1669-2>.
- (64) Chen, W.; Yang, S.; Li, S.; Lang, J. C.; Mao, C.; Kroll, P.; Tang, L.; Dong, H. Self-Assembled Peptide Nanofibers Display Natural Antimicrobial Peptides to Selectively Kill Bacteria without Compromising Cytocompatibility. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (32), 28681–28689. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b09583>.
- (65) Raheem, N.; Straus, S. K. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2866. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02866>.
- (66) Michel, A.-S. A la découverte des Peptides Antimicrobiens. Doctorat en pharmacie, UNIVERSITÉ Henri Poincaré, Nancy, 2010.
- (67) Wang, G. The Antimicrobial Peptide Database Is 20 Years Old: Recent Developments and Future Directions. *Protein Sci.* *32* (10), e4778. <https://doi.org/10.1002/pro.4778>.
- (68) Wang, G.; Zietz, C. M.; Mudgapalli, A.; Wang, S.; Wang, Z. The Evolution of the Antimicrobial Peptide Database over 18 Years: Milestones and New Features. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2022**, *31* (1), 92–106. <https://doi.org/10.1002/pro.4185>.
- (69) Ramazi, S.; Mohammadi, N.; Allahverdi, A.; Khalili, E.; Abdolmaleki, P. A Review on Antimicrobial Peptides Databases and the Computational Tools. *Database J. Biol.*

RÉFÉRENCES •

- Databases Curation **2022**, 2022, baac011.
<https://doi.org/10.1093/database/baac011>.
- (70) APD3 - University of Nebraska, Medical Center. ANTIMICROBIAL PEPTIDE DATABASE. <https://aps.unmc.edu/> (accessed 2023-12-04).
- (71) Pirtskhalava, M.; Armstrong, A. A.; Grigolava, M.; Chubinidze, M.; Alimbarashvili, E.; Vishnepolsky, B.; Gabrielian, A.; Rosenthal, A.; Hurt, D. E.; Tartakovsky, M. DBAASP v3: Database of Antimicrobial/Cytotoxic Activity and Structure of Peptides as a Resource for Development of New Therapeutics. *Nucleic Acids Res.* **2021**, 49 (D1), D288–D297. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>.
- (72) Sidorczuk, K.; Gagat, P.; Pietluch, F.; Kała, J.; Rafacz, D.; Bąkała, L.; Słowik, J.; Kolenda, R.; Rödiger, S.; Fingerhut, L. C. H. W.; Cooke, I. R.; Mackiewicz, P.; Burdukiewicz, M. Benchmarks in Antimicrobial Peptide Prediction Are Biased Due to the Selection of Negative Data. *Brief. Bioinform.* **2022**, 23 (5), bbac343. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac343>.
- (73) Medvedeva, A.; Teimouri, H.; Kolomeisky, A. B. Predicting Antimicrobial Activity for Untested Peptide-Based Drugs Using Collaborative Filtering and Link Prediction. *J. Chem. Inf. Model.* **2023**, 63 (12), 3697–3704. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00137>.
- (74) Bin Hafeez, A.; Jiang, X.; Bergen, P. J.; Zhu, Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22 (21), 11691. <https://doi.org/10.3390/ijms222111691>.
- (75) Chen, N.; Jiang, C. Antimicrobial Peptides: Structure, Mechanism, and Modification. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, 255, 115377. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115377>.
- (76) Zhang, Q.-Y.; Yan, Z.-B.; Meng, Y.-M.; Hong, X.-Y.; Shao, G.; Ma, J.-J.; Cheng, X.-R.; Liu, J.; Kang, J.; Fu, C.-Y. Antimicrobial Peptides: Mechanism of Action, Activity and Clinical Potential. *Mil. Med. Res.* **2021**, 8 (1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>.
- (77) Huan, Y.; Kong, Q.; Mou, H.; Yi, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* **2020**, 11.
- (78) Kumar, P.; Kizhakkedathu, J.; Straus, S. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules* **2018**, 8 (1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>.
- (79) Wang, S.; Zeng, X.; Yang, Q.; Qiao, S. Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17 (5), 603. <https://doi.org/10.3390/ijms17050603>.
- (80) Buda De Cesare, G.; Cristy, S. A.; Garsin, D. A.; Lorenz, M. C. Antimicrobial Peptides: A New Frontier in Antifungal Therapy. *mBio* **2020**, 11 (6), e02123-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02123-20>.

RÉFÉRENCES •

- (81) Mazurkiewicz-Pisarek, A.; Baran, J.; Ciach, T. Antimicrobial Peptides: Challenging Journey to the Pharmaceutical, Biomedical, and Cosmeceutical Use. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (10), 9031. <https://doi.org/10.3390/ijms24109031>.
- (82) Carratalá, J. V.; Serna, N.; Villaverde, A.; Vázquez, E.; Ferrer-Mirallas, N. Nanostructured Antimicrobial Peptides: The Last Push towards Clinics. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *44*, 107603. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107603>.
- (83) Soni, A.; Brightwell, G. Nature-Inspired Antimicrobial Surfaces and Their Potential Applications in Food Industries. *Foods* **2022**, *11* (6), 844. <https://doi.org/10.3390/foods11060844>.
- (84) Costa, F.; Carvalho, I. F.; Montelaro, R. C.; Gomes, P.; Martins, M. C. L. Covalent Immobilization of Antimicrobial Peptides (AMPs) onto Biomaterial Surfaces. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (4), 1431–1440. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.005>.
- (85) Rashid, R.; Veleba, M.; Kline, K. A. Focal Targeting of the Bacterial Envelope by Antimicrobial Peptides. *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, *4*, 55. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00055>.
- (86) Onaizi, S. A.; Leong, S. S. J. Tethering Antimicrobial Peptides: Current Status and Potential Challenges. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29* (1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.012>.
- (87) Di Somma, A.; Moretta, A.; Canè, C.; Cirillo, A.; Duilio, A. Antimicrobial and Antibiofilm Peptides. *Biomolecules* **2020**, *10* (4), 652. <https://doi.org/10.3390/biom10040652>.
- (88) Gabriel, M.; Nazmi, K.; Veerman, E. C.; Amerongen, A. V. N.; Zentner, A. Preparation of LL-37-Grafted Titanium Surfaces with Bactericidal Activity. **2006**, *3*.
- (89) Wang, G.; Mishra, B.; Epand, R. F.; Epand, R. M. High-Quality 3D Structures Shine Light on Antibacterial, Anti-Biofilm and Antiviral Activities of Human Cathelicidin LL-37 and Its Fragments. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2014**, *1838* (9), 2160–2172. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.016>.
- (90) Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J. PubChem 2023 Update. *Nucleic Acids Res.* 51st ed. 2023, pp D1373–D1380.
- (91) Neville, F.; Cahuzac, M.; Konovalov, O.; Ishitsuka, Y.; Lee, K. Y. C.; Kuzmenko, I.; Kale, G. M.; Gidalevitz, D. Lipid Headgroup Discrimination by Antimicrobial Peptide LL-37: Insight into Mechanism of Action. *Biophys. J.* **2006**, *90* (4), 1275–1287. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.067595>.
- (92) Sancho-Vaello, E.; Gil-Carton, D.; François, P.; Bonetti, E.-J.; Kreir, M.; Pothula, K. R.; Kleinekathöfer, U.; Zeth, K. The Structure of the Antimicrobial Human Cathelicidin LL-37 Shows Oligomerization and Channel Formation in the Presence of Membrane Mimics. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 17356. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74401-5>.
- (93) Nicolas, M.; Beito, B.; Oliveira, M.; Martins, M.; Gallas, B.; Salmain, M.; Boujday, S.; Humblot, V. Strategies for Antimicrobial Peptides Immobilization on Surfaces to

RÉFÉRENCES •

- Prevent Biofilm Growth on Biomedical Devices. *Antibiotics* **2021**, 11, 13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010013>.
- (94) Moravej, H.; Moravej, Z.; Yazdanparast, M.; Heiat, M.; Mirhosseini, A.; Moosazadeh Moghaddam, M.; Mirnejad, R. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microb. Drug Resist.* **2018**, 24 (6), 747–767. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>.
- (95) Pinto, I. B.; dos Santos Machado, L.; Meneguetti, B. T.; Nogueira, M. L.; Espínola Carvalho, C. M.; Roel, A. R.; Franco, O. L. Utilization of Antimicrobial Peptides, Analogues and Mimics in Creating Antimicrobial Surfaces and Bio-Materials. *Biochem. Eng. J.* **2019**, 150, 107237. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107237>.
- (96) Meng, X. KR-12 Coating of Polyetheretherketone (PEEK) Surface via Polydopamine Improves Osteointegration and Antibacterial Activity in Vivo. *J. Mater. Chem. B* **2020**, 15.
- (97) Huang, H. W. Molecular Mechanism of Antimicrobial Peptides: The Origin of Cooperativity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2006**, 1758 (9), 1292–1302. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.001>.
- (98) Peyre, J.; Humblot, V.; Méthivier, C.; Berjeaud, J.-M.; Pradier, C.-M. Co-Grafting of Amino-Poly(Ethylene Glycol) and Magainin I on a TiO₂ Surface: Tests of Antifouling and Antibacterial Activities. *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116 (47), 13839–13847. <https://doi.org/10.1021/jp305597y>.
- (99) Humblot, V.; Yala, J.-F.; Thebault, P.; Boukerma, K.; Hequet, A.; Berjeaud, J.-M.; Pradier, C.-M. The Antibacterial Activity of Magainin I Immobilized onto Mixed Thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials* **2009**, 30 (21), 3503–3512.
- (100) Héquet, A. Optimized Grafting of Antimicrobial Peptides on Stainless Steel Surface and Biofilm Resistance Tests. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, 84 (2), 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.01.012>.
- (101) Xue, Y.; Li, X.; Li, H.; Zhang, W. Quantifying Thiol–Gold Interactions towards the Efficient Strength Control. *Nat. Commun.* **2014**, 5 (1), 4348. <https://doi.org/10.1038/ncomms5348>.
- (102) Häkkinen, H. The Gold–Sulfur Interface at the Nanoscale. *Nat. Chem.* **2012**, 4 (6), 443–455. <https://doi.org/10.1038/nchem.1352>.
- (103) Pardoux, E. Détection à large spectre de pathogènes bactériens à l'aide de peptides antimicrobiens, 2020.
- (104) Ferial, M. Biopuce à aptamères : application à la détection de petites molécules par imagerie de résonance plasmonique de surface. Thèse de doctorat, Université de Grenoble, Grenoble, 2014.
- (105) Humblot, V.; Yala, J.-F.; Thebault, P.; Boukerma, K.; Héquet, A.; Berjeaud, J.-M.; Pradier, C.-M. The Antibacterial Activity of Magainin I Immobilized onto Mixed Thiols Self-Assembled Monolayers. **2009**, 10.

RÉFÉRENCES •

- (106) Coin, I.; Beyermann, M.; Bienert, M. Solid-Phase Peptide Synthesis: From Standard Procedures to the Synthesis of Difficult Sequences. *Nat. Protoc.* **2007**, 2 (12), 3247–3256. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.454>.
- (107) Carratalá, J. V.; Serna, N.; Villaverde, A.; Vázquez, E.; Ferrer-Mirallas, N. Nanostructured Antimicrobial Peptides: The Last Push towards Clinics. *Biotechnol. Adv.* **2020**, 44, 107603. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107603>.
- (108) Bagheri, M.; Beyermann, M.; Dathe, M. Immobilization Reduces the Activity of Surface-Bound Cationic Antimicrobial Peptides with No Influence upon the Activity Spectrum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53 (3), 1132–1141. <https://doi.org/10.1128/AAC.01254-08>.
- (109) Pardoux, É.; Boturyn, D.; Roupioz, Y. Antimicrobial Peptides as Probes in Biosensors Detecting Whole Bacteria: A Review. *Molecules* **2020**, 25 (8), 1998. <https://doi.org/10.3390/molecules25081998>.
- (110) Han, X.; Liu, Y.; Wu, F.-G.; Jansensky, J.; Kim, T.; Wang, Z.; Brooks, C. L.; Wu, J.; Xi, C.; Mello, C. M.; Chen, Z. Different Interfacial Behaviors of Peptides Chemically Immobilized on Surfaces with Different Linker Lengths and via Different Termini. *J Phys Chem B* **2014**, 9.
- (111) Rai, A.; Pinto, S.; Evangelista, M. B.; Gil, H.; Kallip, S.; Ferreira, M. G. S.; Ferreira, L. High-Density Antimicrobial Peptide Coating with Broad Activity and Low Cytotoxicity against Human Cells. *Acta Biomater.* **2016**, 33, 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.035>.
- (112) Gao, G.; Yu, K.; Kindrachuk, J.; Brooks, D. E.; Hancock, R. E. W.; Kizhakkedathu, J. N. Antibacterial Surfaces Based on Polymer Brushes: Investigation on the Influence of Brush Properties on Antimicrobial Peptide Immobilization and Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules* **2011**, 12 (10), 3715–3727. <https://doi.org/10.1021/bm2009697>.
- (113) Masurier, N.; Tissot, J.-B.; Boukhriss, D.; Jebors, S.; Pinese, C.; Verdié, P.; Amblard, M.; Mehdi, A.; Martinez, J.; Humblot, V.; Subra, G. Site-Specific Grafting on Titanium Surfaces with Hybrid Temporin Antibacterial Peptides. *J. Mater. Chem. B* **2018**, 6 (12), 1782–1790. <https://doi.org/10.1039/C8TB00051D>.
- (114) Al-Ani, A. The Influence of PEG-Thiol Derivatives on Controlling Cellular and Bacterial Interactions with Gold Surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, 11.
- (115) 12 Well Chamber | Chamber Slide for Immunofluorescence. *ibidi*. <https://ibidi.com/chamber-slides/46-12-well-chamber-removable.html> (accessed 2022-01-19).
- (116) Ainavarapu, S. R. K.; Brujic, J.; Huang, H.; Wiita, A.; Lu, H.; Li, L.; Walther, K.; Carrión-Vázquez, M.; Li, H.; Fernandez, J. Contour Length and Refolding Rate of a Small Protein Controlled by Engineered Disulfide Bonds. *Biophys. J.* **2007**, 92, 225–233. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091561>.

RÉFÉRENCES •

- (117) Charollais, E. 50 Ans de Marquage Isotopique En Biochimie (de La Recherche Fondamentale Aux Analyses Médicales de Routine). **1986**. <https://doi.org/10.5169/SEALS-740355>.
- (118) Daniel, C.; Roupioz, Y.; Gasparutto, D.; Livache, T.; Buhot, A. Solution-Phase vs Surface-Phase Aptamer-Protein Affinity from a Label-Free Kinetic Biosensor. *PLoS ONE* **2013**, 8 (9), e75419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075419>.
- (119) Daniel, C. Biopuce à aptamères anti-thrombine : exploration d'une technique alternative de détection. Thèse de doctorat, Université de Grenoble, Grenoble, 2013. <https://theses.hal.science/tel-00954086> (accessed 2024-01-10).
- (120) Hou, X.; Hu, Y.; He, J. Isotopic Tracing for Calculating the Surface Density of Arginine–Glycine–Aspartic Acid-containing Peptide on Allogeneic Bone. *Orthop. Surg.* **2013**, 5 (1), 51–55. <https://doi.org/10.1111/os.12029>.
- (121) Lai, C.-J.; Chen, Y.-J.; Wu, M.-X.; Wu, C.-C.; Tang, N.-T.; Hsu, T.-F.; Lin, S.-H.; Li, H.-F.; Yang, H. Self-Cleaning and Anti-Fogging Hierarchical Structure Arrays Inspired by Termite Wing. *Appl. Surf. Sci.* **2023**, 616, 156484. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2023.156484>.
- (122) Meuler, A. J.; McKinley, G. H.; Cohen, R. E. Exploiting Topographical Texture To Impart Icephobicity. *ACS Nano* **2010**, 4 (12), 7048–7052. <https://doi.org/10.1021/nn103214q>.
- (123) Mishchenko, L.; Hatton, B.; Bahadur, V.; Taylor, J. A.; Krupenkin, T.; Aizenberg, J. Design of Ice-Free Nanostructured Surfaces Based on Repulsion of Impacting Water Droplets. *ACS Nano* **2010**, 4 (12), 7699–7707. <https://doi.org/10.1021/nn102557p>.
- (124) Liu, Y.; Li, G. A New Method for Producing “Lotus Effect” on a Biomimetic Shark Skin. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, 388 (1), 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.08.033>.
- (125) Watson, G. S.; Green, D. W.; Schwarzkopf, L.; Li, X.; Cribb, B. W.; Myhra, S.; Watson, J. A. A Gecko Skin Micro/Nano Structure – A Low Adhesion, Superhydrophobic, Anti-Wetting, Self-Cleaning, Biocompatible, Antibacterial Surface. *Acta Biomater.* **2015**, 21, 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.03.007>.
- (126) Honig, F.; Vermeulen, S.; Zadpoor, A. A.; de Boer, J.; Fratila-Apachitei, L. E. Natural Architectures for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *J. Funct. Biomater.* **2020**, 11 (3), 47. <https://doi.org/10.3390/jfb11030047>.
- (127) Kamarajan, B. P.; Ananthasubramanian, M.; Sriramajayam, L.; Boppe, A. Behavior of *Pseudomonas Aeruginosa* Strains on the Nanopillar Topography of Dragonfly (*Pantala Flavescens*) Wing under Flow Conditions. *Biointerphases* **2021**, 16 (5), 051002. <https://doi.org/10.1116/6.0001303>.
- (128) Nowlin, K.; Boseman, A.; Covell, A.; LaJeunesse, D. Adhesion-Dependent Rupturing of *Saccharomyces Cerevisiae* on Biological Antimicrobial Nanostructured Surfaces.

RÉFÉRENCES •

- J. R. Soc. Interface* **2015**, 12 (102), 20140999. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0999>.
- (129) Román-Kustas, J.; Hoffman, J. B.; Alonso, D.; Reed, J. H.; Gonsalves, A. E.; Oh, J.; Hong, S.; Jo, K. D.; Dana, C. E.; Alleyne, M.; Miljkovic, N.; Cropek, D. M. Analysis of Cicada Wing Surface Constituents by Comprehensive Multidimensional Gas Chromatography for Species Differentiation. *Microchem. J.* **2020**, 158, 105089. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105089>.
- (130) Modaresifar, K.; Azizian, S.; Ganjian, M.; Fratila-Apachitei, L. E.; Zadpoor, A. A. Bactericidal Effects of Nanopatterns: A Systematic Review. *Acta Biomater.* **2019**, 83, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.059>.
- (131) Cai, Y.; Bing, W.; Xu, X.; Zhang, Y.; Chen, Z.; Gu, Z. Topographical Nanostructures for Physical Sterilization. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2021**. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00906-9>.
- (132) Zhang, G.; Zhang, J.; Xie, G.; Liu, Z.; Shao, H. Cicada Wings: A Stamp from Nature for Nanoimprint Lithography. *Small* **2006**, 2 (12), 1440–1443. <https://doi.org/10.1002/sml.200600255>.
- (133) Ivanova, E. P.; Hasan, J.; Webb, H. K.; Gervinskas, G.; Juodkasis, S.; Truong, V. K.; Wu, A. H. F.; Lamb, R. N.; Baulin, V. A.; Watson, G. S.; Watson, J. A.; Mainwaring, D. E.; Crawford, R. J. Bactericidal Activity of Black Silicon. *Nat. Commun.* **2013**, 4 (1), 2838. <https://doi.org/10.1038/ncomms3838>.
- (134) Fisher, L. E.; Yang, Y.; Yuen, M.-F.; Zhang, W.; Nobbs, A. H.; Su, B. Bactericidal Activity of Biomimetic Diamond Nanocone Surfaces. *Biointerphases* **2016**, 11 (1), 011014. <https://doi.org/10.1116/1.4944062>.
- (135) Bhadra, C. M.; Khanh Truong, V.; Pham, V. T. H.; Al Kobaisi, M.; Seniutinas, G.; Wang, J. Y.; Juodkasis, S.; Crawford, R. J.; Ivanova, E. P. Antibacterial Titanium Nano-Patterned Arrays Inspired by Dragonfly Wings. *Sci. Rep.* **2015**, 5 (1), 16817. <https://doi.org/10.1038/srep16817>.
- (136) Dickson, M. N.; Liang, E. I.; Rodriguez, L. A.; Vollereaux, N.; Yee, A. F. Nanopatterned Polymer Surfaces with Bactericidal Properties. *Biointerphases* **2015**, 10 (2), 021010. <https://doi.org/10.1116/1.4922157>.
- (137) Valle, J.; Burgui, S.; Langheinrich, D.; Gil, C.; Solano, C.; Toledo-Arana, A.; Helbig, R.; Lasagni, A.; Lasa, I. Evaluation of Surface Microtopography Engineered by Direct Laser Interference for Bacterial Anti-Biofouling. *Macromol. Biosci.* **2015**, 15 (8), 1060–1069. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500107>.
- (138) Wu, S.; Zuber, F.; Brugger, J.; Maniura-Weber, K.; Ren, Q. Antibacterial Au Nanostructured Surfaces. *Nanoscale* **2016**, 8 (5), 2620–2625. <https://doi.org/10.1039/C5NR06157A>.
- (139) Modaresifar, K.; Azizian, S.; Ganjian, M.; Fratila-Apachitei, L. E.; Zadpoor, A. A. Bactericidal Effects of Nanopatterns: A Systematic Review. *Acta Biomater.* **2019**, 83, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.059>.

RÉFÉRENCES •

- (140) Ishantha Senevirathne, S. W. M. A.; Hasan, J.; Mathew, A.; Jaggesar, A.; Yarlalagadda, P. K. D. V. Trends in Bactericidal Nanostructured Surfaces: An Analytical Perspective. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, 4 (10), 7626–7642. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00839>.
- (141) Paras; Yadav, K.; Kumar, P.; Teja, D. R.; Chakraborty, S.; Chakraborty, M.; Mohapatra, S. S.; Sahoo, A.; Chou, M. M. C.; Liang, C.-T.; Hang, D.-R. A Review on Low-Dimensional Nanomaterials: Nanofabrication, Characterization and Applications. *Nanomaterials* **2023**, 13 (1), 160. <https://doi.org/10.3390/nano13010160>.
- (142) Biswas, A.; Bayer, I. S.; Biris, A. S.; Wang, T.; Dervishi, E.; Faupel, F. Advances in Top-down and Bottom-up Surface Nanofabrication: Techniques, Applications & Future Prospects. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, 170 (1), 2–27. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.11.001>.
- (143) Bhushan, B.; Nosonovsky, M.; Jung, Y. C. Lotus Effect: Roughness-Induced Superhydrophobic Surfaces. In *Nanotribology and Nanomechanics*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; pp 995–1072. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77608-6_19.
- (144) Ensikat, H. J.; Ditsche-Kuru, P.; Neinhuis, C.; Barthlott, W. Superhydrophobicity in Perfection: The Outstanding Properties of the Lotus Leaf. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2011**, 2 (1), 152–161. <https://doi.org/10.3762/bjnano.2.19>.
- (145) Pogodin, S.; Hasan, J.; Baulin, V. A.; Webb, H. K.; Truong, V. K.; Phong Nguyen, T. H.; Boshkovikj, V.; Fluke, C. J.; Watson, G. S.; Watson, J. A.; Crawford, R. J.; Ivanova, E. P. Biophysical Model of Bacterial Cell Interactions with Nanopatterned Cicada Wing Surfaces. *Biophys. J.* **2013**, 104 (4), 835–840. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.12.046>.
- (146) Linklater, D. P.; Baulin, V. A.; Juodkazis, S.; Crawford, R. J.; Stoodley, P.; Ivanova, E. P. Mechano-Bactericidal Actions of Nanostructured Surfaces. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, 19 (1), 8–22. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0414-z>.
- (147) Bandara, C. D.; Singh, S.; Afara, I. O.; Wolff, A.; Tesfamichael, T.; Ostrikov, K.; Oloyede, A. Bactericidal Effects of Natural Nanotopography of Dragonfly Wing on Escherichia Coli. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9 (8), 6746–6760. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b13666>.
- (148) Hong, Y.; Zeng, J.; Wang, X.; Drlica, K.; Zhao, X. Post-Stress Bacterial Cell Death Mediated by Reactive Oxygen Species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, 116 (20), 10064–10071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901730116>.
- (149) Jenkins, J.; Mantell, J.; Neal, C.; Gholinia, A.; Verkade, P.; Nobbs, A. H.; Su, B. Antibacterial Effects of Nanopillar Surfaces Are Mediated by Cell Impedance, Penetration and Induction of Oxidative Stress. *Nat. Commun.* **2020**, 11 (1), 1626. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15471-x>.

RÉFÉRENCES •

- (150) Zhao, X.; Drlica, K. Reactive Oxygen Species and the Bacterial Response to Lethal Stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **2014**, *21*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.008>.
- (151) Watson, G. S.; Green, D. W.; Watson, J. A.; Zhou, Z.; Li, X.; Cheung, G. S. P.; Gellender, M. A Simple Model for Binding and Rupture of Bacterial Cells on Nanopillar Surfaces. *Adv. Mater. Interfaces* **2019**, *6* (10), 1801646. <https://doi.org/10.1002/admi.201801646>.
- (152) Linklater, D. P.; Saita, S.; Murata, T.; Yanagishita, T.; Dekiwadia, C.; Crawford, R. J.; Masuda, H.; Kusaka, H.; Ivanova, E. P. Nanopillar Polymer Films as Antibacterial Packaging Materials. *ACS Appl. Nano Mater.* **2022**, *5* (2), 2578–2591. <https://doi.org/10.1021/acsnm.1c04251>.
- (153) Cui, Q.; Liu, T.; Li, X.; Song, K.; Ge, D. Nanopillared Polycarbonate Surfaces Having Variable Feature Parameters as Bactericidal Coatings. *ACS Appl. Nano Mater.* **2020**, *3* (5), 4599–4609. <https://doi.org/10.1021/acsnm.0c00645>.
- (154) Linklater, D. P.; De Volder, M.; Baulin, V. A.; Werner, M.; Jessl, S.; Golozar, M.; Maggini, L.; Rubanov, S.; Hanssen, E.; Juodkakis, S.; Ivanova, E. P. High Aspect Ratio Nanostructures Kill Bacteria via Storage and Release of Mechanical Energy. *ACS Nano* **2018**, *12* (7), 6657–6667. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01665>.
- (155) Shahali, H.; Hasan, J.; Mathews, A.; Wang, H.; Yan, C.; Tesfamichael, T.; Yarlagadda, P. K. D. V. Multi-Biofunctional Properties of Three Species of Cicada Wings and Biomimetic Fabrication of Nanopatterned Titanium Pillars. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (8), 1300–1310. <https://doi.org/10.1039/C8TB03295E>.
- (156) Ivanova, E. P.; Linklater, D. P.; Werner, M.; Baulin, V. A.; Xu, X.; Vrancken, N.; Rubanov, S.; Hanssen, E.; Wandiyanto, J.; Truong, V. K.; Elbourne, A.; Maclaughlin, S.; Juodkakis, S.; Crawford, R. J. The Multi-Faceted Mechano-Bactericidal Mechanism of Nanostructured Surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117* (23), 12598–12605. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916680117>.
- (157) Ganjian, M.; Angeloni, L.; Mirzaali, M. J.; Modaresifar, K.; Hagen, C. W.; Ghatkesar, M. K.; Hagedoorn, P.-L.; Fratila-Apachitei, L. E.; Zadpoor, A. A. Quantitative Mechanics of 3D Printed Nanopillars Interacting with Bacterial Cells. *Nanoscale* **2020**, *12* (43), 21988–22001. <https://doi.org/10.1039/D0NR05984F>.
- (158) Hochbaum, A. I.; Aizenberg, J. Bacteria Pattern Spontaneously on Periodic Nanostructure Arrays. *Nano Lett.* **2010**, *10* (9), 3717–3721. <https://doi.org/10.1021/nl102290k>.
- (159) Mirzaali, M. J.; Dongen, I. C. P. van; Tümer, N.; Weinans, H.; Yavari, S. A.; Zadpoor, A. A. In-Silico Quest for Bactericidal but Non-Cytotoxic Nanopatterns. *Nanotechnology* **2018**, *29* (43), 43LT02. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aad9bf>.
- (160) Maleki, E.; Mirzaali, M. J.; Guagliano, M.; Bagherifard, S. Analyzing the Mechano-Bactericidal Effect of Nano-Patterned Surfaces on Different Bacteria Species. *Surf.*

RÉFÉRENCES •

- Coat. Technol.* **2021**, 408, 126782.
<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.126782>.
- (161) Xue, F.; Liu, J.; Guo, L.; Zhang, L.; Li, Q. Theoretical Study on the Bactericidal Nature of Nanopatterned Surfaces. *J. Theor. Biol.* **2015**, 385, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.08.011>.
- (162) Modaresifar, K.; Kunkels, L. B.; Ganjian, M.; Tümer, N.; Hagen, C. W.; Otten, L. G.; Hagedoorn, P.-L.; Angeloni, L.; Ghatkesar, M. K.; Fratila-Apachitei, L. E.; Zadpoor, A. A. Deciphering the Roles of Interspace and Controlled Disorder in the Bactericidal Properties of Nanopatterns against *Staphylococcus Aureus*. *Nanomaterials* **2020**, 10 (2), 347. <https://doi.org/10.3390/nano10020347>.
- (163) Velic, A.; Jaggesar, A.; Tesfamichael, T.; Li, Z.; Yarlagadda, P. K. D. V. Effects of Nanopillar Size and Spacing on Mechanical Perturbation and Bactericidal Killing Efficiency. *Nanomaterials* **2021**, 11 (10), 2472.
<https://doi.org/10.3390/nano11102472>.
- (164) Wu, S.; Zuber, F.; Maniura-Weber, K.; Brugger, J.; Ren, Q. Nanostructured Surface Topographies Have an Effect on Bactericidal Activity. *J. Nanobiotechnology* **2018**, 16 (1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0347-0>.
- (165) Linklater, D. P.; Nguyen, H. K. D.; Bhadra, C. M.; Juodkazis, S.; Ivanova, E. P. Influence of Nanoscale Topology on Bactericidal Efficiency of Black Silicon Surfaces. *Nanotechnology* **2017**, 28 (24), 245301. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa700e>.
- (166) Li, X.; Chen, T. Enhancement and Suppression Effects of a Nanopatterned Surface on Bacterial Adhesion. *Phys. Rev. E* **2016**, 93 (5), 052419.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.93.052419>.
- (167) Zahir, T.; Pesek, J.; Franke, S.; Van Pee, J.; Rathore, A.; Smeets, B.; Ramon, H.; Xu, X.; Fauvart, M.; Michiels, J. Model-Driven Controlled Alteration of Nanopillar Cap Architecture Reveals Its Effects on Bactericidal Activity. *Microorganisms* **2020**, 8 (2), 186. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020186>.
- (168) Mo, S.; Mehrjou, B.; Tang, K.; Wang, H.; Huo, K.; Qasim, A. M.; Wang, G.; Chu, P. K. Dimensional-Dependent Antibacterial Behavior on Bioactive Micro/Nano Polyetheretherketone (PEEK) Arrays. *Chem. Eng. J.* **2020**, 392, 123736.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123736>.
- (169) Valiei, A.; Lin, N.; Bryche, J.-F.; McKay, G.; Canva, M.; Charette, P. G.; Nguyen, D.; Moraes, C.; Tufenkji, N. Hydrophilic Mechano-Bactericidal Nanopillars Require External Forces to Rapidly Kill Bacteria. *Nano Lett.* **2020**, 20 (8), 5720–5727.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01343>.
- (170) Michalska, M.; Divan, R.; Noirot, P.; Laible, P. D. Antimicrobial Properties of Nanostructured Surfaces – Demonstrating the Need for a Standard Testing Methodology. *Nanoscale* **2021**, 13 (41), 17603–17614.
<https://doi.org/10.1039/D1NR02953C>.

RÉFÉRENCES •

- (171) Krasowska, A.; Sigler, K. How Microorganisms Use Hydrophobicity and What Does This Mean for Human Needs? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2014**, *4*.
- (172) Bayouhdh, S.; Othmane, A.; Bettaieb, F.; Bakhrouf, A.; Ouada, H. B.; Ponsonnet, L. Quantification of the Adhesion Free Energy between Bacteria and Hydrophobic and Hydrophilic Substrata. *Mater. Sci. Eng. C* **2006**, *26* (2), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.10.045>.
- (173) Diu, T.; Faruqui, N.; Sjöström, T.; Lamarre, B.; Jenkinson, H. F.; Su, B.; Ryadnov, M. G. Cicada-Inspired Cell-Instructive Nanopatterned Arrays. *Sci. Rep.* **2015**, *4* (1), 7122. <https://doi.org/10.1038/srep07122>.
- (174) Suo, Z.; Avci, R.; Deliorman, M.; Yang, X.; Pascual, D. W. Bacteria Survive Multiple Puncturings of Their Cell Walls. *Langmuir* **2009**, *25* (8), 4588–4594. <https://doi.org/10.1021/la8033319>.
- (175) Knetsch, M. L. W.; Koole, L. H. New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers* **2011**, *3* (1), 340–366. <https://doi.org/10.3390/polym3010340>.
- (176) Kumar Agrawal, A.; Ninawe, A.; Dhawan, A. Nanostructured Plasmonic Chips Employing Nanopillar and Nanoring Hole Arrays for Enhanced Sensitivity of SPR-Based Biosensing. *RSC Adv.* **2022**, *12* (2), 929–938. <https://doi.org/10.1039/D1RA07937A>.
- (177) Wilkinson, C. D. W.; Rahman, M. Dry Etching and Sputtering. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Eng. Sci.* **2004**. <https://doi.org/10.1098/rsta.2003.1307>.
- (178) Green, T. A. Gold Etching for Microfabrication. *Gold Bull.* **2014**, *47* (3), 205–216. <https://doi.org/10.1007/s13404-014-0143-z>.
- (179) Huff, M. Recent Advances in Reactive Ion Etching and Applications of High-Aspect-Ratio Microfabrication. *Micromachines* **2021**, *12* (8), 991. <https://doi.org/10.3390/mi12080991>.
- (180) Kuznetsov, A. I.; Koch, J.; Chichkov, B. N. Nanostructuring of Thin Gold Films by Femtosecond Lasers. *Appl. Phys. A* **2009**, *94* (2), 221–230. <https://doi.org/10.1007/s00339-008-4859-6>.
- (181) Zhang, Y.; Chu, W.; Foroushani, A. D.; Wang, H.; Li, D.; Liu, J.; Barrow, C. J.; Wang, X.; Yang, W. New Gold Nanostructures for Sensor Applications: A Review. *Materials* **2014**, *7* (7), 5169–5201. <https://doi.org/10.3390/ma7075169>.
- (182) Trasobares, J.; Vaurette, F.; François, M.; Romijn, H.; Codron, J.-L.; Vuillaume, D.; Théron, D.; Clément, N. High Speed E-Beam Lithography for Gold Nanopillar Fabrication and Use in Nanotechnology. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, *5* (1), 1918–1925. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.202>.
- (183) Chattaway, C.; Magnin, D.; Ferain, E.; Demoustier-Champagne, S.; Glinel, K. Spatioselective Functionalization of Gold Nanopillar Arrays. *Nanoscale Adv.* **2019**, *1* (6), 2208–2215. <https://doi.org/10.1039/C9NA00149B>.

RÉFÉRENCES •

- (184) Plowman, B.; Ippolito, S. J.; Bansal, V.; Sabri, Y. M.; O'Mullane, A. P.; Bhargava, S. K. Gold Nanospikes Formed through a Simple Electrochemical Route with High Electrocatalytic and Surface Enhanced Raman Scattering Activity. *Chem. Commun.* **2009**, No. 33, 5039. <https://doi.org/10.1039/b910830k>.
- (185) Praig, V. G.; Piret, G.; Manesse, M.; Castel, X.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. Seed-Mediated Electrochemical Growth of Gold Nanostructures on Indium Tin Oxide Thin Films. *Electrochimica Acta* **2008**, 53 (27), 7838–7844. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.05.069>.
- (186) Lin, T.-H.; Lin, C.-W.; Liu, H.-H.; Sheu, J.-T.; Hung, W.-H. Potential-Controlled Electrodeposition of Gold Dendrites in the Presence of Cysteine. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (7), 2044–2046. <https://doi.org/10.1039/C0CC03273E>.
- (187) Sabri, Y. M.; Ippolito, S. J.; Tardio, J.; Bansal, V.; O'Mullane, A. P.; Bhargava, S. K. Gold Nanospikes Based Microsensor as a Highly Accurate Mercury Emission Monitoring System. *Sci. Rep.* **2015**, 4 (1), 6741. <https://doi.org/10.1038/srep06741>.
- (188) Mehla, S.; Kandjani, A.; Coyle, V.; Harrison, C. J.; Low, M. X.; Kaner, R. B.; Sabri, Y.; Bhargava, S. K. Gold Sunflower Microelectrode Arrays with Dendritic Nanostructures on the Lateral Surfaces for Antireflection and Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Appl. Nano Mater.* **2022**, 5 (2), 1873–1890. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c03501>.
- (189) Nagase, N.; Terao, K.; Miyanishi, N.; Tamai, K.; Uchiyama, N.; Suzuki, T.; Takao, H.; Shimokawa, F.; Oohira, F. Signal Enhancement of Protein Binding by Electrodeposited Gold Nanostructures for Applications in Kretschmann-Type SPR Sensors. *Analyst* **2012**, 137 (21), 5034–5040. <https://doi.org/10.1039/C2AN35574D>.
- (190) Elbourne, A.; E. Coyle, V.; Khanh Truong, V.; M. Sabri, Y.; E. Kandjani, A.; K. Bhargava, S.; P. Ivanova, E.; J. Crawford, R. Multi-Directional Electrodeposited Gold Nanospikes for Antibacterial Surface Applications. *Nanoscale Adv.* **2019**, 1 (1), 203–212. <https://doi.org/10.1039/C8NA00124C>.
- (191) Allemand, M. Synthèse et caractérisation de films minces électrodéposés de cuivre - palladium. Grade de Master, Université du Québec INRS-Energie, Matériaux et Télécommunications, Québec, 2011.
- (192) Avelino Pasa, A.; Luis Munford, M. Electrodeposition. *Encycl. Chem. Process.* **2005**, Pages3640. <https://doi.org/10.1201/NOE0824755638>.
- (193) Glicksman, M. E.; Lupulescu, A. O. Dendritic Crystal Growth in Pure Materials. *J. Cryst. Growth* **2004**, 264 (4), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2003.12.034>.
- (194) Kelly, J. J.; Tian, C.; West, A. C. Leveling and Microstructural Effects of Additives for Copper Electrodeposition. *J. Electrochem. Soc.* **1999**, 146 (7), 2540–2545. <https://doi.org/10.1149/1.1391968>.

RÉFÉRENCES •

- (195) Coyle, V. E.; Kandjani, A. E.; Sabri, Y. M.; Bhargava, S. K. Au Nanospikes as a Non-Enzymatic Glucose Sensor: Exploring Morphological Changes with the Elaborated Chronoamperometric Method. *Electroanalysis* **2017**, *29* (1), 294–304. <https://doi.org/10.1002/elan.201600138>.
- (196) Sjollema, J.; Zaat, S. A. J.; Fontaine, V.; Ramstedt, M.; Luginbuehl, R.; Thevissen, K.; Li, J.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J. In Vitro Methods for the Evaluation of Antimicrobial Surface Designs. *Acta Biomater.* **2018**, *70*, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.001>.
- (197) O'Toole, G. A. Classic Spotlight: Plate Counting You Can Count On. *J. Bacteriol.* **2016**, *198* (23), 3127. <https://doi.org/10.1128/JB.00711-16>.
- (198) Tomasiewicz, D. M.; Hotchkiss, D. K.; Reinbold, G. W.; Read, R. B.; Hartman, P. A. The Most Suitable Number of Colonies on Plates for Counting. *J. Food Prot.* **1980**, *43* (4), 282–286. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-43.4.282>.
- (199) Zhang, J.; Zhou, M.; Li, X.; Fan, Y.; Li, J.; Lu, K.; Wen, H.; Ren, J. Recent Advances of Fluorescent Sensors for Bacteria Detection-A Review. *Talanta* **2023**, *254*, 124133. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124133>.
- (200) Stiefel, P.; Schmidt-Emrich, S.; Maniura-Weber, K.; Ren, Q. Critical Aspects of Using Bacterial Cell Viability Assays with the Fluorophores SYTO9 and Propidium Iodide. *BMC Microbiol.* **2015**, *15* (1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>.
- (201) Tawakoli, P. N.; Al-Ahmad, A.; Hoth-Hannig, W.; Hannig, M.; Hannig, C. Comparison of Different Live/Dead Stainings for Detection and Quantification of Adherent Microorganisms in the Initial Oral Biofilm. *Clin. Oral Investig.* **2013**, *17* (3), 841–850. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0792-3>.
- (202) LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits.
- (203) Marquetoux, N.; Ridler, A.; Heuer, C.; Wilson, P. What Counts? A Review of in Vitro Methods for the Enumeration of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* **2019**, *230*, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.011>.
- (204) Clais, S.; Boulet, G.; Van Kerckhoven, M.; Lanckacker, E.; Delpitte, P.; Maes, L.; Cos, P. Comparison of Viable Plate Count, Turbidity Measurement and Real-Time PCR for Quantification of Porphyromonas Gingivalis. *Lett. Appl. Microbiol.* **2015**, *60* (1), 79–84. <https://doi.org/10.1111/lam.12341>.
- (205) Sjollema, J.; Zaat, S. A. J.; Fontaine, V.; Ramstedt, M.; Luginbuehl, R.; Thevissen, K.; Li, J.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J. In Vitro Methods for the Evaluation of Antimicrobial Surface Designs. *Acta Biomater.* **2018**, *70*, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.001>.
- (206) Tripathy, A.; Sen, P.; Su, B.; Briscoe, W. H. Natural and Bioinspired Nanostructured Bactericidal Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *248*, 85–104. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.030>.

RÉFÉRENCES •

- (207) Ivanova, E. P.; Hasan, J.; Webb, H. K.; Truong, V. K.; Watson, G. S.; Watson, J. A.; Baulin, V. A.; Pogodin, S.; Wang, J. Y.; Tobin, M. J.; Löbbe, C.; Crawford, R. J. Natural Bactericidal Surfaces: Mechanical Rupture of *Pseudomonas Aeruginosa* Cells by Cicada Wings. *Small* **2012**, 8 (16), 2489–2494. <https://doi.org/10.1002/sml.201200528>.
- (208) Doron, S.; Gorbach, S. L. Bacterial Infections: Overview. **2008**, 11.
- (209) Swiecicki, J.-M.; Sliusarenko, O.; Weibel, D. B. From Swimming to Swarming: *Escherichia Coli* Cell Motility in Two-Dimensions. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* **2013**, 5 (12), 1490–1494. <https://doi.org/10.1039/c3ib40130h>.
- (210) Evangelista, S. D. S.; Santos, S. G. D.; Oliveira, A. C. D. Impact of the Contamination Time by *Escherichia Coli* on Biofilm Formation in Surgical Instruments. *Rev. Bras. Enferm.* **2021**, 74 (3), e20200759. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2020-0759>.
- (211) Beloin, C.; Roux, A.; Ghigo, J.-M. *Escherichia Coli* Biofilms. In *Bacterial Biofilms*; Romeo, T., Ed.; Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer: Berlin, Heidelberg, 2008; pp 249–289. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_12.
- (212) O’Gara, J. P.; Humphreys, H. *Staphylococcus Epidermidis* Biofilms: Importance and Implications.
- (213) *Bacteria - Reproduction, Nutrition, Environment | Britannica*. <https://www.britannica.com/science/bacteria/Growth-of-bacterial-populations> (accessed 2024-01-16).
- (214) Bataillon, C.; Bleux, C.; Brion, P.; Cadet, A.; Jacquier, M.; Monfort, P.; Munch, S.; Nicolas, S.; Olivier, P.; René, A.; Volto, N.; Wybier, J. *Risques biologiques*, 2017.
- (215) Parreira, P.; Monteiro, C.; Graça, V.; Gomes, J.; Maia, S.; Gomes, P.; Gonçalves, I. C.; Martins, M. C. L. Surface Grafted MSI-78A Antimicrobial Peptide Has High Potential for Gastric Infection Management. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 18212. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53918-4>.
- (216) Cao, P.; Yuan, C.; Xiao, J.; He, X.; Bai, X. A Biofilm Resistance Surface Yielded by Grafting of Antimicrobial Peptides on Stainless Steel Surface. *Surf. Interface Anal.* **2018**, 50 (4), 516–521. <https://doi.org/10.1002/sia.6406>.
- (217) Costa, F. M. T. A.; Maia, S. R.; Gomes, P. A. C.; Martins, M. C. L. Dthvar5 Antimicrobial Peptide (AMP) Chemoselective Covalent Immobilization Results on Higher Antiadherence Effect than Simple Physical Adsorption. *Biomaterials* **2015**, 52, 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.049>.
- (218) Chen, R.; Cole, N.; Willcox, M. D. P.; Park, J.; Rasul, R.; Carter, E.; Kumar, N. Synthesis, Characterization and in Vitro Activity of a Surface-Attached Antimicrobial Cationic Peptide. *Biofouling* **2009**, 25 (6), 517–524. <https://doi.org/10.1080/08927010902954207>.
- (219) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, 105 (4), 1103–1170. <https://doi.org/10.1021/cr0300789>.

RÉFÉRENCES •

- (220) Kim, D. J.; Pitchimani, R.; Snow, D. E.; Hope-Weeks, L. J. A Simple Method for the Removal of Thiols on Gold Surfaces Using an NH₄OH–H₂O₂–H₂O Solution. *Scanning* **2008**, 30 (2), 118–122. <https://doi.org/10.1002/sca.20089>.
- (221) Le, H. T. N.; Phan, L. M. T.; Cho, S. Removal of Thiol-SAM on a Gold Surface for Re-Use of an Interdigitated Chain-Shaped Electrode. *Materials* **2022**, 15 (6), 2218. <https://doi.org/10.3390/ma15062218>.
- (222) Widdascheck, F.; Kothe, M.; Hauke, A. A.; Witte, G. The Effect of Oxygen Plasma Treatment of Gold Electrodes on the Molecular Orientation of CuPc Films. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, 507, 145039. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.145039>.
- (223) Koslowski, B.; Wahrenberg, R.; Oelhafen, P. Oxidation of Preferentially (1 1 1)-Oriented Au [®]lms in an Oxygen Plasma Investigated by Scanning Tunneling Microscopy and Photoelectron Spectroscopy. *Surf. Sci.* **2001**.
- (224) Tsai, H.; Hu, E.; Perng, K.; Chen, M.; Wu, J.-C.; Chang, Y.-S. Instability of Gold Oxide Au₂O₃. *Surf. Sci.* **2003**, 537 (1–3), L447–L450. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(03\)00640-X](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(03)00640-X).
- (225) Ron, H.; Matlis, S.; Rubinstein, I. Self-Assembled Monolayers on Oxidized Metals. 2. Gold Surface Oxidative Pretreatment, Monolayer Properties, and Depression Formation. *Langmuir* **1998**, 14 (5), 1116–1121. <https://doi.org/10.1021/la970785v>.
- (226) Lee, S.; Yoon, H.; Lee, S.; Chung, S.; Kim, H. Investigation of the Hydrophilic Nature and Surface Energy Changes of HfO₂ Thin Films Prepared by Atomic Layer Deposition. *Vacuum* **2024**, 219, 112756. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2023.112756>.
- (227) Gaudy, A. F.; Abu-Niaaj, F.; Gaudy, E. T. Statistical Study of the Spot-Plate Technique for Viable-Cell Counts. *Appl. Microbiol.* **1963**, 11 (4), 305–309.
- (228) Beck, N. k.; Callahan, K.; Nappier, S. p.; Kim, H.; Sobsey, M. d.; Meschke, J. s. Development of a Spot-Titer Culture Assay for Quantifying Bacteria and Viral Indicators. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* **2009**, 17 (4), 455–464. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2009.00182.x>.
- (229) Thomas, P.; Sekhar, A. C.; Upreti, R.; Mujawar, M. M.; Pasha, S. S. Optimization of Single Plate-Serial Dilution Spotting (SP-SDS) with Sample Anchoring as an Assured Method for Bacterial and Yeast Cfu Enumeration and Single Colony Isolation from Diverse Samples. *Biotechnol. Rep.* **2015**, 8, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003>.
- (230) Wang, J.; Woo, M.; Yan, C. Spot Plating Assay for the Determination of Survival and Plating Efficiency of Escherichia Coli in Sub-MIC Levels of Antibiotics. *Undergrad. J. Exp. Microbiol. Immunol.* **2017**, 1, 26–29.
- (231) Netuschil, L.; Ausschill, T. M.; Sculean, A.; Arweiler, N. B. Confusion over Live/Dead Stainings for the Detection of Vital Microorganisms in Oral Biofilms - Which Stain

RÉFÉRENCES •

- Is Suitable? *BMC Oral Health* **2014**, 14 (1), 2. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-2>.
- (232) Oger, P.-C.; Piesse, C.; Ladram, A.; Humblot, V. Engineering of Antimicrobial Surfaces by Using Temporin Analogs to Tune the Biocidal/Antiadhesive Effect. **2019**, 19.
- (233) Pitt, W. G.; Ross, S. A. Ultrasound Increases the Rate of Bacterial Cell Growth. *Biotechnol. Prog.* **2003**, 19 (3), 1038–1044. <https://doi.org/10.1021/bp0340685>.
- (234) Li, Y.; Li, X.; Hao, Y.; Liu, Y.; Dong, Z.; Li, K. Biological and Physicochemical Methods of Biofilm Adhesion Resistance Control of Medical-Context Surface. *Int. J. Biol. Sci.* **2021**, 17 (7), 1769–1781. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59025>.
- (235) *tkinter* — Python interface to Tcl/Tk. Python documentation. <https://docs.python.org/3/library/tkinter.html> (accessed 2024-01-29).
- (236) Chen, R.; Cole, N.; Willcox, M. D. P.; Park, J.; Rasul, R.; Carter, E.; Kumar, N. Synthesis, Characterization and in Vitro Activity of a Surface-Attached Antimicrobial Cationic Peptide. *Biofouling* **2009**, 25 (6), 517–524. <https://doi.org/10.1080/08927010902954207>.
- (237) Boulade, M.; Morlay, A.; Piat, F.; Roupioz, Y.; Livache, T.; Charette, P. G.; Canva, M.; Leroy, L. Early Detection of Bacteria Using SPR Imaging and Event Counting: Experiments with *Listeria Monocytogenes* and *Listeria Innocua*. *RSC Adv.* **2019**, 9 (27), 15554–15560. <https://doi.org/10.1039/C9RA01466G>.
- (238) Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; McCarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **2018**, 95 (2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>.
- (239) Trasatti, S.; Petrii, O. A. Real Surface Area Measurements in Electrochemistry. *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63 (5), 711–734. <https://doi.org/10.1351/pac199163050711>.
- (240) Jeyabharathi, C.; Ahrens, P.; Hasse, U.; Scholz, F. Identification of Low-Index Crystal Planes of Polycrystalline Gold on the Basis of Electrochemical Oxide Layer Formation. *J. Solid State Electrochem.* **2016**, 20 (11), 3025–3031. <https://doi.org/10.1007/s10008-016-3228-1>.
- (241) Hamelin, A. Cyclic Voltammetry at Gold Single-Crystal Surfaces. Part 1. Behaviour at Low-Index Faces. *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 407 (1–2), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(95\)04499-X](https://doi.org/10.1016/0022-0728(95)04499-X).