

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET CHIMIE-PHYSIQUE

UMR 1121 Biomatériaux et Bioingénierie

THÈSE présentée par :

Angela MUTSCHLER

Soutenue le : **22 septembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Chimie – Physique

**Nouveaux concepts de revêtements
antimicrobiens à base de peptides naturels
et de polypeptides appliqués aux dispositifs
médicaux**

THÈSE dirigée par :

M. SCHAAF Pierre

Professeur des universités, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. FRANCIUS Grégory

Mme GANGLOFF Sophie

Chargé de recherche, Centre National de la Recherche Scientifique
Professeur des universités, Université de Reims
Champagne-Ardenne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. BECHINGER Burkhard

Professeur des universités, Université de Strasbourg

M. LAVALLE Philippe

Directeur de Recherche, INSERM Unité 1121 (*Membre Invité*)

**« Tout savoir scientifique doit être à tout moment
reconstruit »**

Gaston Bachelard, la Formation de l'esprit scientifique

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Pierre Schaaf de m'avoir accordé la chance d'effectuer mes travaux de thèse au sein de son laboratoire et sous sa direction. Merci d'avoir été disponible et présent tout au long de ma thèse et pour vos précieux conseils qui m'ont toujours permis de m'orienter sur la bonne voie.

Je tiens ensuite à exprimer mes remerciements à Philippe Lavalley pour son encadrement et ses conseils forts utiles, tant du point de vue théorique que technique. Merci aussi pour ta confiance et le soutien permanent que tu as su m'accorder et qui m'ont permis de travailler avec motivation et entrain.

Ensuite, je tiens à remercier Sophie Gangloff, Grégory Francius et Burkhard Bechinger pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu apporter à ce travail en acceptant d'être membre du jury.

Merci aussi à Nihal Engin Vrana d'avoir participé à l'encadrement de certaines parties de ces travaux. Merci aussi ton partage sur la connaissance du monde scientifique, tant du point de vue académique qu'industriel. Et enfin, je te remercie pour tous les conseils que tu m'as su me donner.

Je souhaite ensuite remercier Marie-Hélène Metz-Boutigue pour ses conseils, sa disponibilité et pour le partage de sa grande connaissance sur les peptides.

Merci à Bernard Senger pour son aide dans l'exploitation de certains résultats, pour son expertise dans le domaine des statistiques et enfin, merci d'avoir accordé du temps à la relecture de cette thèse. Ce manuscrit ne serait pas ce qu'il est maintenant sans ta précieuse aide. Merci aussi pour ta sympathie et ta disponibilité.

Merci aussi à Vincent Ball d'avoir partagé avec moi ses connaissances dans le domaine des matériaux, bien que ce partage eût été très infime par rapport à l'ensemble de son savoir.

J'exprime ma gratitude aux membres de l'Institut Charles Sadron, Fouzia Boulmedais, André Schröder et Loïc Jierry, mais aussi à Benoit Frisch, de l'UMR 7199, pour leurs conseils qui ont souvent permis de débloquent certains verrous présents lors de mes travaux de thèse.

Merci aussi à Lorène Tallet et à Cosette Betscha pour leur aide dans certaines expériences indispensables à ces travaux de thèse. Je souhaite aussi mes plus vifs encouragements à Cynthia Calligaro dans la poursuite de certains de ces travaux.

Merci à Christiane Bouthier pour son aide dans la partie administrative. Je remercie aussi la faculté de chirurgie dentaire et plus particulièrement madame le Doyen, Corinne Taddei-Gross, pour son support financier.

Un petit mot pour Sarah Zahouani, ma colocataire de bureau pendant ces 3 années, avec qui j'ai pu partager de très bons moments mais que je remercie aussi pour notre solidarité dans notre quotidien de thésardes. Une pensée aussi à nos colocataires de bureau aquatiques que nous avons eu tant plaisir à élever, mais pas forcément de manière efficace (RIP Dory, Corail I et Corail II).

Merci à Julien Barthès, pour notre petite collaboration scientifique et nos discussions sur la vision du monde de la recherche.

Merci aussi à la team « Coat4Life » pour cette expérience de création de startup qui m'a permis de découvrir une nouvelle facette de la recherche. Si cette startup avait été créée, je suis certaine qu'on aurait formé une super équipe.

Merci aussi à mes autres collègues Annie Tu, Camille Dollinger, Céline Muller, Cifti Saït, Claire Ehlinger, Géraldine Koenig, Florian Ponzio, Helena Knopf-Marques, Manon Allais, Mathilde Ménard et Morgane

Rabineau, pour votre bonne humeur, votre soutien et nos petits moments de délires.

Merci aussi à Christine Affolter-Zbaraszczuk, Dominique Vautier, Fabienne Perrin-Schmitt, Florent Meyer, François Reitzer et Karim Benmlih, pour leur gentillesse, leur aide et leurs conseils.

J'adresse aussi mes plus vifs remerciements à tous les collègues situés à la faculté de chirurgie dentaire pour leur soutien, tant amical que professionnel: Adburraouf Zaet, Camille Bergthold, Céline Marban, Francesco Scavello, Sébastien Baixe et Sophie Helle.

Merci aussi à tous mes amis qui m'ont permis de décompresser hors laboratoire et grâce à qui j'ai poursuivi ces travaux de thèse avec bonne humeur.

Merci aussi à ma famille à qui je dédie ces travaux pour leur soutien moral durant toutes ces années et sans qui je ne serais jamais arrivé aussi loin dans mes études.

Merci à tous.

Tables des matières

Liste des abréviations	10
Liste des publications et brevet.....	12
Introduction générale	13
Chapitre 1 : Les revêtements antimicrobiens à base de peptides.....	18
Introduction	20
1.1. La problématique des biofilms	22
1.2. Mécanismes d'action des molécules antimicrobiennes	27
1.3. Stratégies de greffage des composés antimicrobiens	35
1.4. Stratégies antimicrobiennes de surface	43
Conclusion et perspectives	50
Références bibliographiques	51
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	60
2.1. Greffage des peptides à la surface.....	62
2.2. Construction des films multicouches de polyélectrolytes	63
2.3. Microbalance à cristal de quartz.....	67
2.4. Spectroscopies	70
2.5. Microscopies	75
2.6. Titration calorimétrique isotherme	80
2.7. Caractérisation des peptides et polypeptides	83

2.8. Mesure de l'activité antibactérienne	85
Références bibliographiques	90
Chapitre 3 : Revêtements à base de peptides naturels	92
Introduction	93
3.1. Accroche du peptide: mise au point et caractérisation	96
3.2. Caractérisation du clivage peptidique.....	104
3.3. Modification chimique du peptide tribloc.....	110
3.4. Activité antimicrobienne.....	117
Conclusion et perspectives	120
Références bibliographiques	123
Chapitre 4 : Revêtements à base de polypeptides.....	126
Introduction	127
4.1. Les revêtements (PAR/HA).....	129
4.2. Effet du polyanion sur les films antibactériens à base de PAR	160
4.3. Etablissement d'un modèle général de films antibactériens (polypeptide/HA) ₂₄	179
Conclusion et perspectives	187
Références bibliographiques	189
Conclusion générale	193
Annexe.....	197

Liste des abréviations

AFM : Microscope à force atomique

ALG : Alginate

CFU : Unité Formant Colonie

CTL : Cateslytine

CPP : *cell-penetrating peptides* ; peptides pénétrant dans les cellules

CSA : Chondroïtine sulfate A

CMB : concentration minimale bactéricide

CMF : concentration minimale fongicide

CMI : concentration minimale inhibitrice

CTC : 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride

DABCYL : acide 4-((4-(diméthylamino)phényl)azo)benzoïque

D-T-CTL : (DOPA)-K-(DOPA)-K-(DOPA)-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR

DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine

DMSO : diméthylsulfoxyde

EDANS : acide 5-((2-Aminoéthyl)amino)naphthalène-1-sulfonique

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

FRAP : Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment

FRET : *Förster resonance energy transfer* - Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

HA : Acide hyaluronique

HEP : Héparine

HPLC : Chromatographie à phase liquide à haute performance

ITC : Titration calorimétrique isotherme

LbL : *Layer-by-Layer*, couche-par-couche

MALDI-TOF : désorption-ionisation laser assistée par matrice – analyseur à temps de vol

Mefp : *Mussel foot protein* – Protéine issue du pied de la moule

MHB : Milieu de culture Mueller - Hinton Broth

NHS : N-Hydroxysuccinimide

OPSS : disulfide de pyridine

PAM : Peptide antimicrobien

PAR : Poly(L-arginine)

PEG : poly(éthylène glycol)

PBS : tampon phosphate salin

PLL : Poly(L-lysine)

POR : Poly(L-ornithine)

PGA : Poly(acide L-glutamique)

PSS : Poly(styrene sulfonate)

QCM : Microbalance à cristal de quartz

SPE : substance polymérique extracellulaire

SPPS : synthèse peptidique sur support solide

TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine

T-CTL : TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR

T-CTL-FRET : DABCYL-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR-E(EDANS)

TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane

Rho : Rhodamine

Liste des publications et brevet

Mutschler, A.; Tallet, L.; Rabineau, M.; Dollinger, C.; Metz-Boutigue, M.-H.; Schneider, F.; Senger, B.; Vrana, N. E.; Schaaf, P.; Lavalle, P., Unexpected bactericidal activity of poly(arginine)/hyaluronan nanolayered coatings. *Chemistry of Materials* **2016**, *28*, 8700-8709.

Mutschler, A.; Betscha, C.; Ball, V.; Senger, B.; Vrana, N. E.; Boulmedais, F.; Schroder, A.; Schaaf, P.; Lavalle, P., Nature of the Polyanion Governs the Antimicrobial Properties of Poly(arginine)/Polyanion Multilayer Films. *Chemistry of Materials* **2017**, *29*, 3195-3201.

Barthes, J.; **Mutschler, A.**; Dollinger, D.; Gaudinat, G.; , Lavalle, P.; , Le Houerou, V.; , McGuinness, G.B.; Vrana, N. E., Establishing Contact with Cell-laden Hydrogels with Metallic Implants with a Biomimetic Adhesive for Cell Therapy Supported Implants. *En cours de soumission*

Lavalle, P.; Schaaf, P.; Vrana, N. E.; **Mutschler, A.**; Polypeptides and acid hyaluronic coatings, Brevet n°16305509.8, 2016.

Introduction générale

Les infections nosocomiales, ou infections associées aux soins, sont des infections contractées en milieu hospitalier, absentes lors de l'admission à l'hôpital et se déclarant au minimum 48h après l'admission. A l'heure actuelle, en France, 1 patient sur 20 contracte une infection nosocomiale ce qui correspond à environ 750 000 infections déclarées par an. Ces infections sont responsables de 9 000 décès chaque année, dont 4 000 décès de personnes pour lesquelles le pronostic vital n'était pas engagé lors de la prise en charge en milieu hospitalier, soit plus que les décès liés aux accidents de la route¹. En outre, ces infections sont responsables de plus de 37 000 décès en Europe et 99 000 décès pour les Etats-Unis².

Les micro-organismes les plus fréquemment responsables de ces infections sont des bactéries telles qu'*Escherichia coli* (26%) se trouvant dans les intestins, *Staphylococcus aureus* (19 %) se trouvant au niveau de la peau et des muqueuses et *Pseudomonas aeruginosa* (8%) se développant sur les surfaces et dans les milieux humides³.

Ces infections entraînent un surcoût financier important. En effet, leur coût global est estimé à environ 7 milliard d'euros pour les pays européens. Il est principalement dû aux traitements d'antibiothérapies, aux rallongements des durées d'hospitalisation, au diagnostic et suivi de l'infection mais aussi aux remplacements des dispositifs médicaux.

On estime qu'environ 50% des infections contractées sont liées à la pose de dispositifs médicaux⁴. En effet, la pose de cathéters ou d'implants de longue durée (prothèses orthopédiques, dentaires, valves cardiaques...) peuvent être des portes d'entrées de l'organisme mais aussi d'excellents supports de croissance pour les pathogènes, ce qui, à terme, provoque l'apparition de biofilms. Ces biofilms engendrent ensuite des complications majeures puisque les traitements d'antibiothérapie deviennent inefficaces en raison de la difficulté pour l'antibiotique d'atteindre le cœur du biofilm⁵. Dans le milieu hospitalier, il existe notamment une pression de sélection forte des micro-organismes entraînant l'apparition de nombreuses souches bactériennes multi-résistantes pour lesquelles l'antibiothérapie devient inefficace. En outre, les infections liées à la pose de dispositifs médicaux de longue durée peuvent apparaître plus d'un an après l'opération chirurgicale.

Afin de lutter contre une recrudescence de ces infections, les revêtements antibactériens représentent une arme efficace. A l'heure actuelle, de nombreux revêtements antibactériens ont déjà été développés comme les revêtements à base de nanoparticules métalliques. En effet les nanoparticules d'argent sont très largement répandus pour leur pouvoir bactéricide⁶. De nombreux

dispositifs médicaux à base d'argent sont aujourd'hui commercialisés tels que les pansements ActiCoat™ ou encore les cathéters Silverline™. Bien que très répandus, de nombreuses études soulignent le possible effet néfaste de ces nanoparticules sur le corps humain, dû à la toxicité de l'argent envers les cellules eucaryotes^{7,8}, ou encore le risque d'accumulation de ces nanoparticules dans les organes⁹. D'autres revêtements à base de composés non-métalliques, tel que les polymères, sont utilisés. En exemple, la société Microban a développé un revêtement antimicrobien à base de Parylène, polymère pouvant se déposer sous vide après évaporation et ainsi former un film homogène à la surface des dispositifs médicaux. D'autres exemples de revêtements antimicrobiens sont les membranes TRYX™, utilisées dans le domaine médical pour protéger les implants de longues durées tels que les stimulateurs cardiaques. Ces membranes sont imprégnées d'antibiotiques. Leur composition à base de polymères biodégradables permet ainsi une délivrance locale d'antibiotiques autour de l'infection. Toutefois cette délivrance n'étant pas contrôlée, des effets secondaires peuvent apparaître.

Cette thèse consiste à développer un nouveau concept de revêtements antimicrobiens biocompatibles, efficaces à long terme et adaptables sur tout type d'implants. Pour ce faire, deux types de revêtements ont été développés.

Le premier type de revêtement s'appuie sur le greffage en une étape d'un peptide ayant plusieurs fonctionnalités. Cette surface est alors capable de libérer la partie antimicrobienne non immunogène car issue de la défense innée de l'organisme. Ces revêtements peuvent être considérés comme "intelligents" car ils seront auto-défensifs : ils ne seront effectifs qu'en présence du pathogène, ce qui permettra de prolonger fortement l'efficacité du traitement dans le temps.

Le deuxième type de revêtement s'appuie sur la conception d'un film obtenu par la technique dite « couche-par-couche » et avec l'utilisation de poly(L-arginine) et d'acide hyaluronique. Ce revêtement antimicrobien sera ainsi simple de mise en œuvre et biocompatible. De plus, pour être actif, il ne nécessite pas l'ajout d'agents antimicrobiens supplémentaire.

Le présent mémoire se divise en quatre chapitres. Dans le premier chapitre, un état de l'art sur les peptides antimicrobiens, leurs mécanismes d'actions ainsi que celui des différents revêtements antibactériens existants à ce jour sera présenté. Dans le second chapitre, je décrirais l'ensemble des techniques et méthodes utilisées pour la conception, la caractérisation et l'application des revêtements antibactériens. Le troisième chapitre sera consacré à la présentation du revêtement à base de peptides issus de la défense innée. Dans le quatrième chapitre, je décrirai le revêtement utilisant la technique des films de polyélectrolytes multicouche. Enfin je conclurai ma thèse par les perspectives qu'ouvre mon travail.

Références bibliographiques

1. (Raisin), Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé. *Institut de veille sanitaire* **2012**.
2. Allegranzi, B.; Nejad, S. B.; Combescure, C.; Graafmans, W.; Attar, H.; Donaldson, L.; Pittet, D., Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *The Lancet* **2011**, *377*, 228-241.
3. Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R., The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2331-2339.
4. Guggenbichler, J. P.; Assadian, O.; Boeswald, M.; Kramer, A., Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials - catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* **2011**, *6*.
5. Gbejuade, H. O.; Lovering, A. M.; Webb, J. C., The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthopaedica* **2015**, *86*, 147-158.
6. Chaloupka, K.; Malam, Y.; Seifalian, A. M., Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology* **2010**, *28*, 580-588.
7. AshaRani, P. V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S., Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009**, *3*, 279-290.
8. Braydich-Stolle, L.; Hussain, S.; Schlager, J. J.; Hofmann, M.-C., In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. *Toxicological Sciences* **2005**, *88*, 412-419.
9. Chen, X.; Schluesener, H. J., Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters* **2008**, *176*, 1-12.

Chapitre 1 :
Les revêtements
antimicrobiens
à base de peptides

Chapitre 1 : Les revêtements antimicrobiens à base de peptides

Introduction	20
1.1. La problématique des biofilms	22
1.1.1. Définition d'un biofilm.....	22
1.1.2. Mécanisme de formation d'un biofilm.....	23
1.1.3. Les infections liées aux biofilms	25
1.2. Mécanismes d'action des molécules antimicrobiennes	27
1.2.1. Les peptides antimicrobiens.....	27
1.2.1.1. Généralités.....	27
1.2.1.2. Les peptides perméabilisant les membranes.....	28
1.2.1.3. Les peptides pénétrant dans les cellules.....	31
1.2.2. Autres mécanismes antimicrobiens	32
1.3. Stratégies de greffage des composés antimicrobiens	35
1.3.1. Adsorption des molécules par voie physique.....	35
1.3.1.1. Principe des films multicouches de polyélectrolytes.....	35
1.3.1.2. Applications des films multicouches de polyélectrolytes.....	38
1.3.2. Adsorption des molécules par voie chimique	39
1.3.2.1. Synthèse peptidique sur support solide.....	39
1.3.2.2. Modifications chimiques de surface	41
1.4. Stratégies antimicrobiennes de surface	43
1.4.1. Les revêtements antiadhésifs.....	43

1.4.2. Les revêtements « release-killing »	44
1.4.3. Les revêtements « contact-killing ».....	46
1.4.4. Vers des nouvelles stratégies antimicrobiennes de surface	47
Conclusion et perspectives	50
Références bibliographiques	51

Introduction

Les bactéries constituent la grande majorité des cellules procaryotes existantes et représentent la première forme de vie apparue sur Terre, il y a environ 4 milliards d'années. De tailles comprises entre 0.5 et 3 μm , leur structure est représentée en figure 1.1. Les bactéries interagissent très souvent avec d'autres organismes selon différents modes : le mutualisme où la bactérie et l'organisme tirent tous deux profit de cette relation comme dans le cas des bactéries composant la flore digestive, le commensalisme où les bactéries profitent de l'environnement de l'hôte sans gêner celui-ci, comme le cas de la flore commensale (les bactéries se situant sur la peau, par exemple), et enfin le parasitisme, où les bactéries évoluent dans l'hôte en perturbant celui-ci.

Les maladies infectieuses sont le résultat de la contamination par les micro-organismes parasites. Elles ont été responsables dans le monde de plus d'un tiers des décès liés aux maladies de 1990 à 2010¹. Le combat de ces infections se fait selon modes trois actions : par le système immunitaire de l'hôte, en appliquant des procédures hygiéniques plus strictes et par l'administration de molécules ayant une action antibactérienne.

Les antibiotiques, composés détruisant ou bloquant la croissance bactérienne, ont été très largement administrés durant le XX^e siècle et ont permis de lutter contre de nombreuses maladies infectieuses. Malheureusement, à l'heure actuelle, l'utilisation préventive de ces composés et leur suradministration en cas d'infection ont favorisé l'apparition de nombreuses souches bactériennes multi-résistantes pour lesquelles l'antibiothérapie devient inefficace. Ce phénomène est notamment très présent dans le milieu hospitalier².

Les infections nosocomiales, ou infections associées aux soins, sont des infections contractées en milieu hospitalier, absentes lors de l'admission à l'hôpital et se déclarant au minimum 48 h après l'admission. On estime qu'environ 50 % des infections contractées sont liés à la pose de dispositifs médicaux³. En effet, la pose de cathéters ou d'implants de longue durée (prothèses orthopédiques, dentaires, valves cardiaques...) peuvent être des portes d'entrée de l'organisme mais aussi d'excellents supports de croissance pour les pathogènes, ce qui, à terme, provoque l'apparition de biofilms.

Dans un premier temps (cf. § 1.1.), nous aborderons la problématique des biofilms en en donnant une définition générale et en expliquant le principe de leur formation. Nous parlerons ensuite de la relation existante entre biofilm et infection nosocomiale.

Présents dans la réponse immunitaire de nombreux végétaux et animaux, les peptides antimicrobiens semblent être une solution efficace dans la lutte et le traitement de ces infections.

Dans la deuxième partie de ce chapitre (cf § 1.2.), nous présenterons ces peptides ainsi que leur mécanisme d'action. Nous présenterons aussi le mécanisme d'action antibactérien d'autres composés pouvant être utilisés dans le milieu médical.

Les composés antimicrobiens, notamment les peptides, ne possèdent généralement pas la propriété de pouvoir adhérer sur des surfaces. Dans une troisième partie, nous établirons un état de l'art des différentes techniques d'adsorption existantes pour les molécules antimicrobiennes, et plus précisément pour les peptides, pouvant être appliquées sur des dispositifs médicaux (cf § 1.3.).

Afin de combattre les infections liées à la pose de dispositifs médicaux, empêcher l'adhésion des bactéries à la surface des dispositifs est l'une des approches disponibles mais il existe d'autres stratégies visant à mener une action bactéricide. Dans la dernière partie (cf § 1.4.), nous évoquerons les différentes stratégies antimicrobiennes de surface.

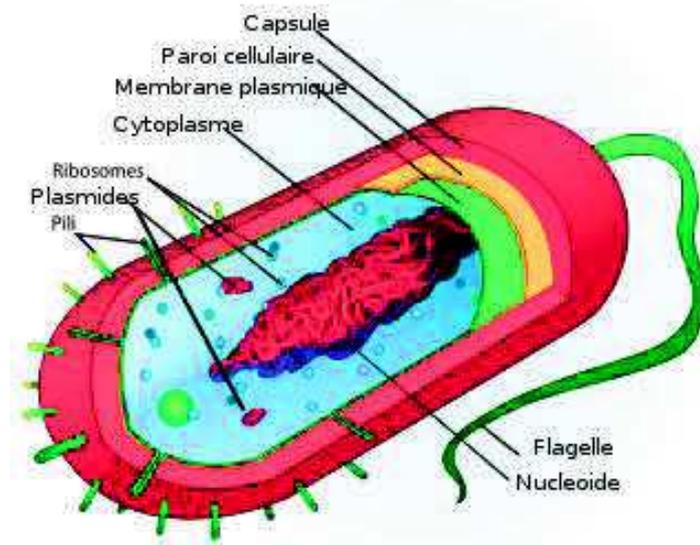


Figure 1.1 : Structure d'une bactérie. Cette figure a été reprise de la source <http://www.jpboeret.eu/biologie/index.php/microbiologie/77-anatomie-structure-bacterienne>

1.1. La problématique des biofilms

1.1.1. Définition d'un biofilm

Les bactéries, dans un milieu liquide, sont présentes dans l'un ou l'autre de deux états : l'état planctonique où la bactérie isolée se déplace librement, et l'état sessile où les bactéries se regroupent en communauté sur une surface sous forme de « biofilm ». La définition d'un biofilm est l'agrégation de micro-organismes protégés par une matrice extracellulaire et s'accumulant à une interface solide-liquide. Un biofilm peut être composé de plusieurs espèces différentes de micro-organismes formant alors un micro-consortium stable avec des paramètres physico-chimiques et biologiques contrôlés⁴. Dans un milieu liquide, les bactéries sont présentes en majorité sous forme de biofilm (Figure 1.2).

Les micro-organismes vivants dans les biofilms survivent grâce à la production d'une matrice composée en majorité d'eau et de substances polymériques extracellulaires (SPE), formant une architecture à trois dimensions. Les SPE regroupent principalement des polysaccharides (40 à 95 %), des protéines (1 à 60 %), des acides nucléiques (1 à 10 %) et des lipides (1 à 40 %)⁵. Cette matrice est aussi une source nutritive pour les organismes par la présence de composés carbonés, nitrogènes et phosphorés.

Les micro-organismes au sein du biofilm sont capables de communiquer entre eux grâce à un mécanisme appelé « quorum sensing »⁶. Ces voies de communication permettent d'échanger des informations sur le milieu environnant, notamment sur l'apparition d'un stress pour l'une des espèces présentes. Ce type de communication permet ainsi une meilleure défense des micro-organismes face à une agression externe. L'organisation d'un réseau de canaux aqueux au sein du biofilm, ayant pour fonction l'acheminement d'oxygène, d'eau et de nutriments ainsi que l'évacuation de déchets, est aussi l'un des résultats de cette communication inter et intra espèces.

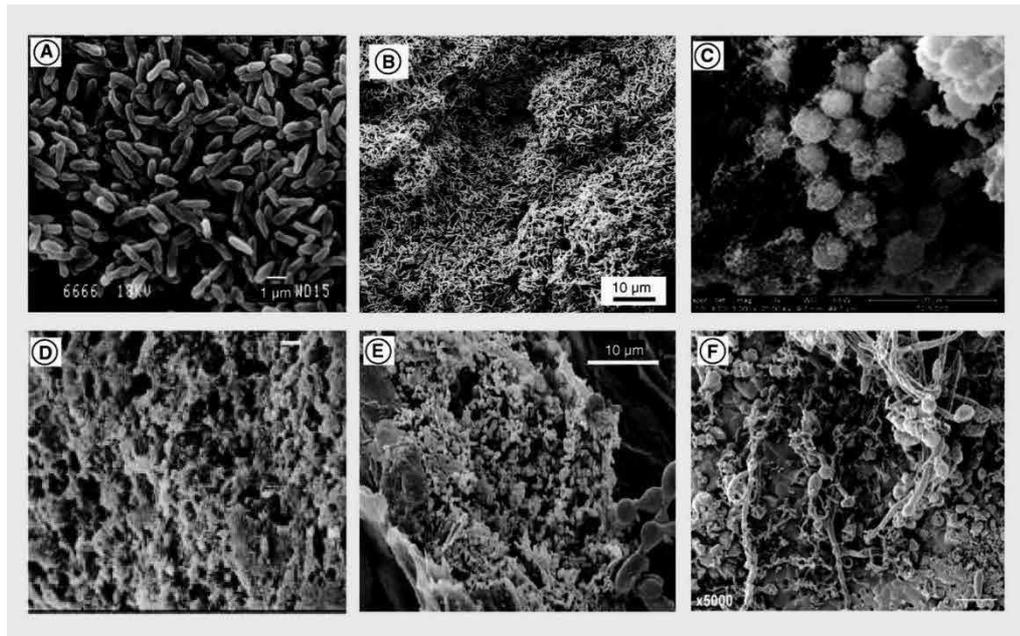


Figure 1.2 : Images obtenues par microscope électronique à balayage de (A) *Pseudomonas aeruginosa* isolées et attachées sur un substrat en verre; (B) biofilm de *Escherichia coli* formé sur une surface en oxyde de titane; (C) biofilm de *Staphylococcus aureus* formé sur un cathéter; (D) biofilm de *Staphylococcus epidermidis* formé sur un cathéter en Téflon; (E) biofilm de *Salmonella enterica* serovar Poona formé sur un melon; (F) biofilm de *Streptococcus mutans* et de *Candida albicans* formé sur un disque en hydroxyapatite. Cette figure a été reprise de l'article de Rabin et al.⁷

1.1.2. Mécanisme de formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm se déroule en trois étapes successives : l'attachement, la maturation et la dispersion (Figure 1.3)⁸.

L'étape d'adhésion peut être séparée en deux phases : une phase d'adhésion initiale réversible et une phase d'adhésion irréversible. Durant la phase d'adhésion initiale, lorsque la bactérie est à environ une dizaine de nanomètres de distance d'une surface, des forces d'adhésion et de répulsion bactérie-surface entrent en jeu. Les surfaces étant généralement chargées négativement dans les conditions physiologiques, les bactéries, elles aussi chargées négativement au niveau de leur membrane, sont repoussées. Cette répulsion est toutefois compensée par les forces attractives telles que les forces de Van der Waals. En outre, des agents locomoteurs bactériens, tels que les flagelles et les pillis, apportent une attache mécanique de la bactérie à la surface⁷. La phase d'adhésion irréversible est marquée par la production de matrice extracellulaire permettant alors la résistance du biofilm à des conditions environnementales extrêmes.

Après adhésion, les micro-organismes se multiplient, ce qui entraîne la formation de micro-colonies. Le mécanisme de « quorum sensing » entre micro-organismes se met en place et permet la

formation de canaux de circulation et la structuration du biofilm sous la forme de colonnes ou de champignons⁹. Dans les biofilms les plus épais, atteignant une épaisseur pouvant aller jusqu'à 100 μm , les micro-organismes s'organisent selon leur métabolisme. A titre d'exemple, les bactéries anaérobies se dirigent préférentiellement vers les couches les plus profondes où l'oxygène se fait plus rare⁷.

Après maturation du biofilm, la phase de dispersion apparaît. Une partie des micro-organismes se détachent du biofilm. Ce détachement peut être programmé par le micro-organisme lui-même⁹, et alors faire partie d'un processus naturel, ou bien il peut être provoqué par un stress apparu au sein du biofilm, comme le manque de nutriments ou une surpopulation bactérienne par exemple. Les micro-organismes, de retour à l'état planctonique, viennent ensuite se déposer et coloniser une autre surface.

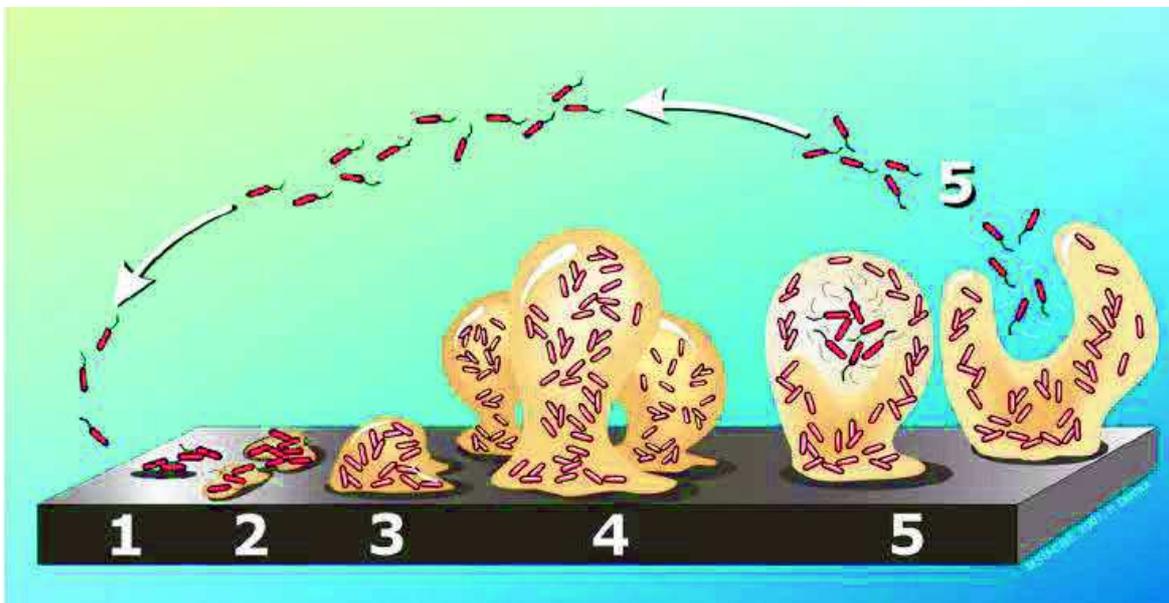


Figure 1.3 : Mécanisme de formation d'un biofilm. **1 :** Attache réversible du micro-organisme ; **2 :** Attache irréversible et production de matrice extracellulaire ; **3 :** Structuration du biofilm ; **4 :** Maturation du biofilm ; **5 :** Détachement d'une partie des micro-organismes et retour à l'état planctonique. Cette figure a été prise de *Annual Reviews of Microbiology*, volume 56 (2002).

1.1.3. Les infections liées aux biofilms

Les biofilms sont liés à de nombreux cas d'infections humaines. Plus précisément, selon un rapport public du US National Institute of Health, plus de 80 % des infections microbiennes sont liées à la formation de biofilms¹⁰. De plus, 50 % des infections contractées dans le milieu hospitalier sont liées à la pose de dispositifs médicaux. En effet, les dispositifs médicaux sont d'excellents supports pour l'adhésion de bactéries et le développement de biofilms¹¹. A titre d'exemple, les dispositifs médicaux conçus à base de polymères sont très facilement colonisés par les bactéries et les champignons, avec la formation d'un biofilm épais (de l'ordre du micromètre) en l'espace de seulement 24 h, pour une croissance pouvant aller jusqu'à 0.5 cm par heure.³

Les infections provoquées par la formation de biofilms peuvent se présenter dans l'ensemble du corps humain :

- Les patients souffrant d'infections respiratoires chroniques sont en grande partie touchés par un biofilm formé sur l'épithélium respiratoire à partir de *Pseudomonas aeruginosa*^{7,3}.
- Dans le milieu bucco-dentaire, il existe une multitude de biofilms composant la plaque dentaire et ceux-ci peuvent être responsables de l'apparition de caries dentaires. Lorsque le pH du milieu bucco-dentaire diminue, il y a un changement dans la nature des souches bactériennes constituant le biofilm et les bactéries résistant à des pH acides apparaîtront en majorité, telles que *Streptococcus sobrinus* et *Streptococcus mutans*, responsables des caries dentaires.⁷.
- Les infections urinaires peuvent être liées à la pose de cathéters, sur lesquels la formation d'un biofilm est un problème fréquent³.
- Concernant les infections dans le domaine des prothèses, on estime qu'entre 5 et 10 % des prothèses implantées seront responsables d'une infection dans les dix années suivantes l'implantation^{12,13}. Le nombre d'infections liées aux prothèses ne cesse de croître au fil des années, notamment par le fait du vieillissement de la population et de l'augmentation du taux d'obésité, l'obésité provoquant une altération de la réponse immunitaire^{14,15}.
- Enfin, le domaine cardio-vasculaire est très touché par les infections¹⁶, de par la pose de prothèses à long terme, tels que les pacemakers ou les valves cardiaques artificielles, pouvant conduire à un risque d'endocardite. Les biofilms présents dans le domaine cardio-vasculaire sont en majorité composés de souches bactériennes telles que *Staphylococcus epidermidis* ou encore *Staphylococcus aureus*. Ces biofilms peuvent à terme créer un dysfonctionnement du dispositif implanté. En outre, lors du détachement des micro-organismes contenus dans le

biofilm, la présence du flux sanguin permet à ces micro-organismes de coloniser d'autres organes du corps humain, pouvant amener à une infection généralisée¹⁷.

Les biofilms sont également une source majeure de problèmes dans le traitement des infections par les antibiotiques¹⁸. En effet, l'avantage principal du biofilm pour les micro-organismes est la création d'une barrière protectrice. Cette barrière les préserve de la dessiccation, de l'oxydation, des radiations ultraviolettes et de l'action de molécules bactéricides, telles que les antibiotiques, mais aussi d'agents issus de la défense immunitaire^{4,18,19}.

Concernant la résistance des biofilms aux antibiotiques, trois hypothèses sont avancées²⁰. La première repose sur le fait que les composés de la matrice extracellulaire peuvent se lier aux antibiotiques, empêchant ainsi leur diffusion et leur action en profondeur. La seconde hypothèse est liée à l'environnement spécifique du biofilm dont les zones les plus profondes, riches en résidus acides et pauvres en oxygène et en nutriments, pourraient gêner l'action de l'antibiotique. Enfin, la dernière hypothèse s'appuie sur les modifications phénotypiques observées dans certains biofilms et dont les micro-organismes constituants pourraient présenter des formes plus résistantes.

Une autre source de difficultés dues aux biofilms dans le traitement des infections est la possibilité de coloniser de plus en plus de supports au cours de la phase de dispersion. En outre, les micro-organismes détachés du biofilm peuvent posséder des caractéristiques acquises lors de leur présence au sein du biofilm comme la résistance aux antibiotiques²¹.

1.2. Mécanismes d'action des molécules antimicrobiennes

1.2.1. Les peptides antimicrobiens

1.2.1.1. Généralités

Les peptides antimicrobiens, ou PAM, participent à la défense immunitaire naturelle d'une grande variété de plantes, insectes, amphibiens et mammifères^{22,23}. Pour exemple, le peptide antimicrobien magainine, qui est l'un des plus étudiés à l'heure actuelle, est sécrété sur la peau de la grenouille *Xenopus laevis*²⁴. On dénombre aujourd'hui des milliers de peptides antimicrobiens. Ceux-ci ont d'abord été extraits de composés naturels. Par la suite, les PAM ont été de plus en plus produits par voie de synthèse²⁴. Ils possèdent la particularité d'être actifs envers une large gamme de bactéries à Gram positif et négatif, mais aussi envers les virus, protozoaires et champignons.

La structure générale des PAM consiste en une séquence d'acides aminés, généralement sous la forme lévogyre, et ayant une taille inférieure à 50 résidus. Leur charge nette totale est positive et généralement comprise entre + 2 et + 6, principalement due à la présence de groupements latéraux chargés positivement d'acides aminés tels que la lysine ou l'arginine. Ces peptides sont aussi composés d'acides aminés hydrophobes dans une proportion supérieure ou égale à 30 %²⁵. Cette variation de séquence d'acides aminés polaires et apolaires confère aux PAM une structure amphiphile (Figure 1.4).

Les PAM sont classés en 4 catégories selon leur structure : peptide ayant une conformation tridimensionnelle en hélice α (en exemple, le peptide LL-37), en feuillet β stabilisé par deux ou quatre ponts disulfures (en exemple, les défensines ou la protégrine), en conformation allongée pour des structures riches en glycine, proline, tryptophane, histidine et/ou arginine (en exemple, l'indolicidine) et les peptides cycliques stabilisés par un pont disulfure (en exemple, la bacténécine). Certains peptides adoptent une autre structure une fois en contact avec la membrane bactérienne, comme pour la magainine présente en conformation allongée à l'état naturel et adoptant une structure en hélice α après contact avec une membrane bactérienne²⁶.

Concernant le mécanisme bactéricide des PAM, deux voies d'action principales sont considérées : la lyse provoquée par la perturbation membranaire et la lyse provoquée par la perturbation du contenu cellulaire interne.

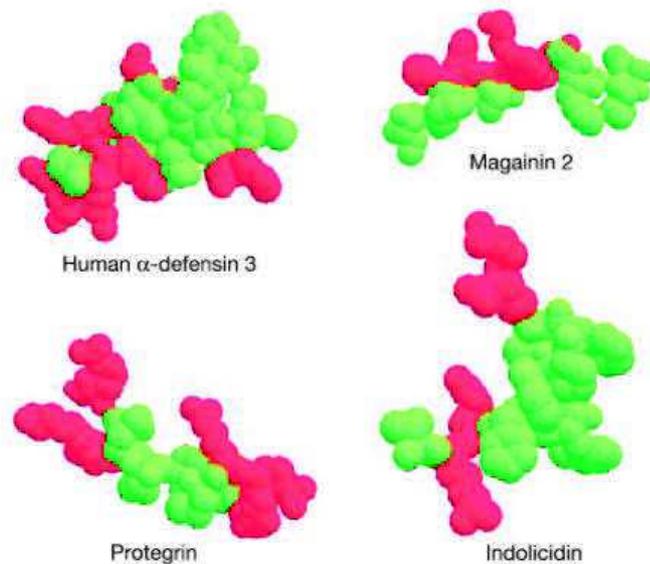


Figure 1.4 : Structure tridimensionnelle des peptides antimicrobiens défensine, magainine, protégrine et indolicidine. La séquence peptidique est représentée selon le domaine des acides aminés ; rouge : acides aminés chargés positivement ; vert : acides aminés hydrophobes. Cette figure a été reprise de l'article de Michael Zasloff²⁶.

1.2.1.2. Les peptides perméabilisant les membranes

Les bactéries peuvent être classées en deux catégories selon la paroi qui les compose et elles sont identifiables selon la méthode colorimétrique de Gram : il existe les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif (Figure 1.5).

La paroi des bactéries à Gram positif est constituée de nombreuses couches de peptidoglycanes, d'un espace périplasmique ainsi que d'une membrane cytoplasmique.

La paroi des bactéries à Gram négatif s'organise en trois grandes parties. La membrane externe est la couche en contact avec le milieu extérieur et est composée de phospholipides ainsi que de protéines de transport appelées porines. Après la membrane externe, les bactéries à Gram négatif sont composées d'une à deux couches de peptidoglycanes ainsi que d'une membrane cytoplasmique. Des lipoprotéines sont présentes entre la membrane externe et la couche de peptidoglycanes afin de maintenir le lien entre ces deux couches.

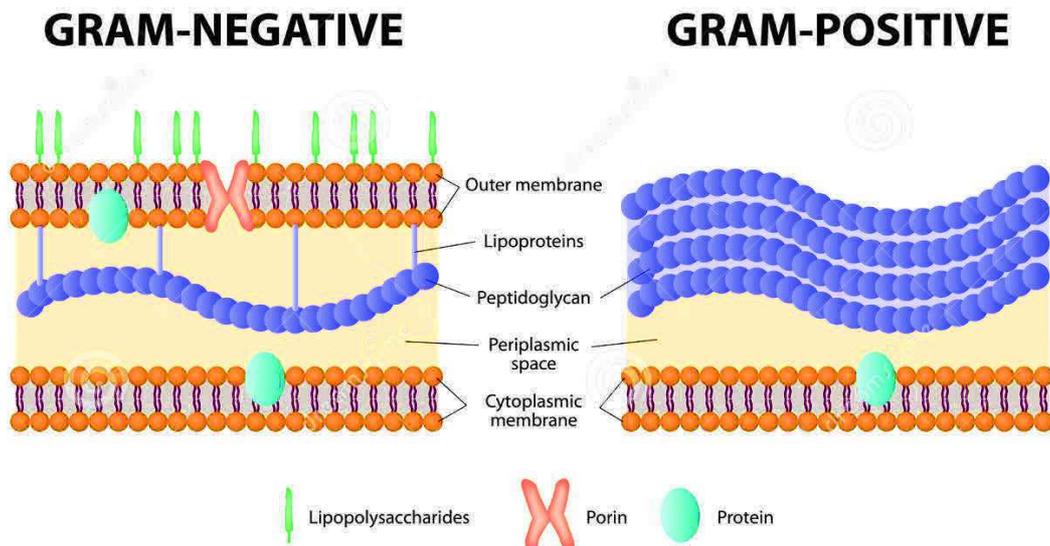


Figure 1.5 : Schéma représentant les différentes entités composant la paroi de bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Crédit : Shutterstock.

La double couche lipidique constituant la membrane plasmique des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, est composée de phospholipides présentant un caractère amphiphile, avec un pôle hydrophile orienté vers l'extérieur et un domaine hydrophobe, orienté vers l'intérieur. Chez les cellules procaryotes, ce domaine hydrophile confère à la membrane plasmique une charge de surface négative.

Le modèle de Shai-Matsuzaki-Hang a permis de décomposer l'activité des peptides antimicrobiens en plusieurs étapes : interaction du peptide avec la membrane, déplacement des lipides constituant la membrane, altération de la structure membranaire et, dans certains cas, entrée du peptide à l'intérieur de la cellule²³. L'interaction du peptide généralement chargé positivement s'effectue avec la membrane cytoplasmique chargée négativement des bactéries, ces peptides ayant la capacité de traverser la membrane externe des bactéries à Gram négatif et la couche de peptidoglycane des bactéries à Gram négatif et positif^{25,27}. Cette interaction provoque une perturbation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique²⁸.

Après attache avec la membrane plasmique, le peptide, grâce à sa structure amphiphile, adopte une structure secondaire spécifique²⁹. Dans la plupart des cas, le peptide adopte une conformation en hélice α ²⁵ mais certains peptides adoptent la conformation en feuillet β , comme par exemple le peptide GL13K³⁰ ou la cateslytine³¹.

Concernant l'altération de la membrane, trois modèles mécanistiques ont été proposés : le modèle du tapis, le modèle des douves de tonneaux et le modèle des pores toroïdaux^{29,27,32} (Figure 1.6):

- le modèle du tapis ou « carpet model » consiste en une accumulation des peptides sur la membrane, générant des interactions électrostatiques à la surface. Lorsque la concentration surfacique de ces peptides atteint un point de saturation, la structure membranaire se déstabilise et les couches lipidiques composant celle-ci se dissolvent, provoquant la lyse de la cellule.
- le modèle des douves de tonneaux ou « barrel-stave model » consiste en la formation de pores à l'intérieur de la membrane cytoplasmique. Les peptides adoptant une conformation en hélice α vont tout d'abord se fixer à la surface grâce aux interactions électrostatiques mais leurs résidus hydrophobes vont ensuite se lier aux groupements hydrophobes présents à l'intérieur de la membrane. L'agrandissement des pores se fera ensuite par l'accumulation des peptides à l'intérieur de la membrane cytoplasmique. Ces canaux vont ensuite être responsables de la fuite du contenu intracellulaire provoquant la lyse de la bactérie.
- le modèle des pores toroïdaux ou « toroidal pore model » consiste aussi en la formation de pores mais le mécanisme de formation est lié à un déplacement des lipides composant la membrane. En effet, après attache avec la surface membranaire, le peptide induit une déformation de la membrane en la courbant au niveau du site d'interaction. Cette courbure provoque un changement de la composition lipidique et facilite l'insertion du peptide. Une étude a d'ailleurs démontré que cette déformation semble être favorisée en présence de résidus arginine³³.

Le nombre de charges positives, la longueur de la chaîne peptidique, la structure secondaire et la présence d'une séquence hydrophobe sur la séquence peptidique semblent être des paramètres-clés pour obtenir une action antimicrobienne par perturbation membranaire ³².

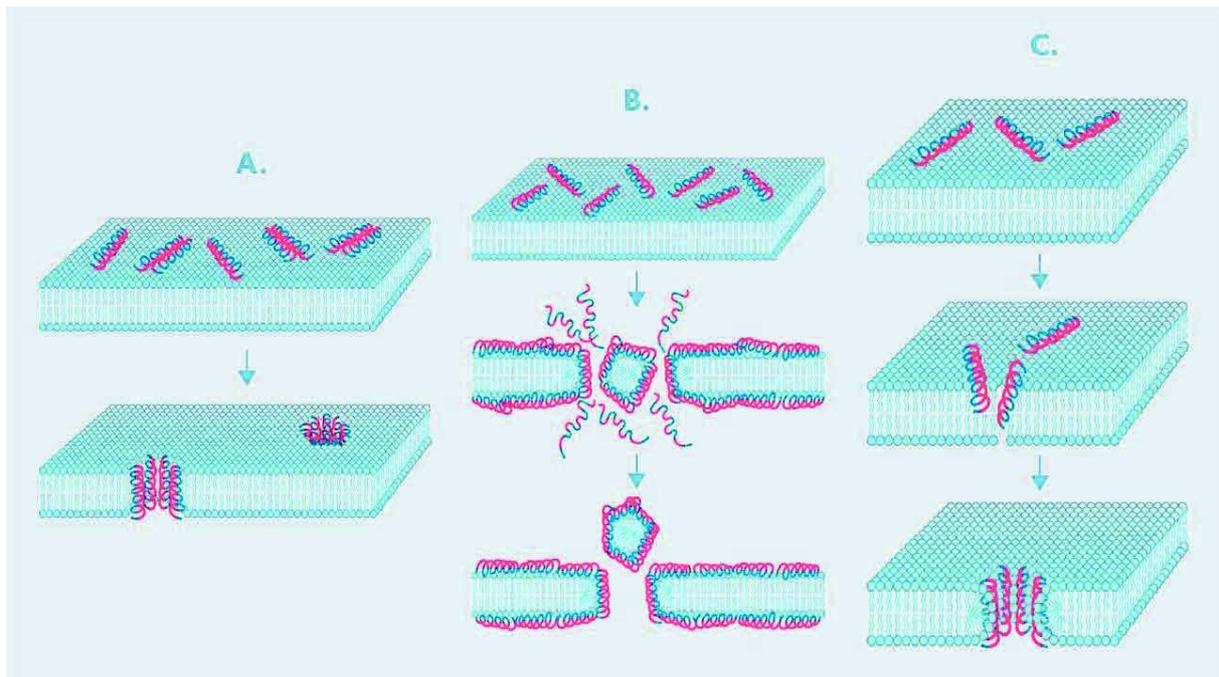


Figure 1.6 : Modèles proposés pour l'action des peptides antimicrobiens sur la membrane cellulaire. **(A)** modèle des douves de tonneaux **(B)** : modèle du tapis **(C)** : modèle des pores toroïdaux.

1.2.1.3. Les peptides pénétrant dans les cellules

Bien que la perturbation membranaire semble être un mécanisme fréquemment attribué aux peptides antimicrobiens, certains peptides pénètrent à l'intérieur des cellules procaryotes sans endommager la membrane et mène une action sur des cibles intracellulaires. Ces peptides peuvent par exemple endommager l'ADN ou l'ARN, comme le peptide indolicidine ou le peptide LL-37³⁴ ou encore inhiber l'activité de certaines enzymes, inhiber la synthèse de protéines ou empêcher la division cellulaire^{24,35}.

Certaines études émettent l'hypothèse que l'intégration de ces peptides au sein de la cellule est similaire à celle des "cell-penetrating peptides", ou CPP, fréquemment utilisés comme agent de transport intracellulaire dans les cellules eucaryotes et procaryotes^{35,27}. Les CPP sont des peptides chargés positivement, composés en grandes parties d'arginines ou de lysines et peuvent dans certains cas posséder une structure amphiphile. Bien que le mécanisme de pénétration des CPP ne soit pas encore parfaitement élucidé, certains auteurs suggèrent des processus d'internalisation ayant une dépendance énergétique via un mécanisme similaire à l'endocytose³⁵. Il semblerait que les groupements guanidiniums des arginines aient un rôle crucial dans la pénétration cellulaire^{36,37}.

Un exemple de peptide antimicrobien pénétrant dans les cellules est la catestatine, peptide issu de la chromogranine A. La chromogranine A est une protéine sécrétée par les cellules eucaryotes chromaffines. Par clivage de cette protéine, de nombreux peptides antimicrobiens, tels que la vasostatine, la chromofungine, la catestatine ou encore la cateslytine, ont été découverts^{31,38,39,40}. Concernant la catestatine, il a été démontré que son mécanisme de pénétration était similaire à celui des CPP et que, une fois à l'intérieur de la cellule, elle interagit avec la calmoduline, qui est une protéine capable de s'associer aux ions calcium. La catestatine perturbe alors le métabolisme énergétique de la cellule³⁸.

1.2.2. Autres mécanismes antimicrobiens

Les molécules antimicrobiennes les plus utilisées dans le domaine médical sont les composés communément appelés « antibiotiques ». Très largement répandus depuis le XX^e siècle, leur stratégie d'action repose principalement sur l'inhibition de la croissance bactérienne. Pour ce faire, quatre mécanismes d'action sont connus : le premier consiste à inhiber la réplication de l'ADN et concerne la famille des quinolones. Le second mode d'action est utilisé par la famille des aminosides et consiste à inhiber la synthèse des ARN. Le troisième mécanisme d'action consiste à empêcher la synthèse du peptidoglycane, composant de la membrane cellulaire, et concerne la famille des bêta-lactamines et des glycopeptides. Enfin, le dernier mécanisme consiste à empêcher la synthèse des protéines par inhibition des ribosomes et concerne la famille des macrolides, des streptogramines et des cyclines (Figure 1.7)⁴¹.

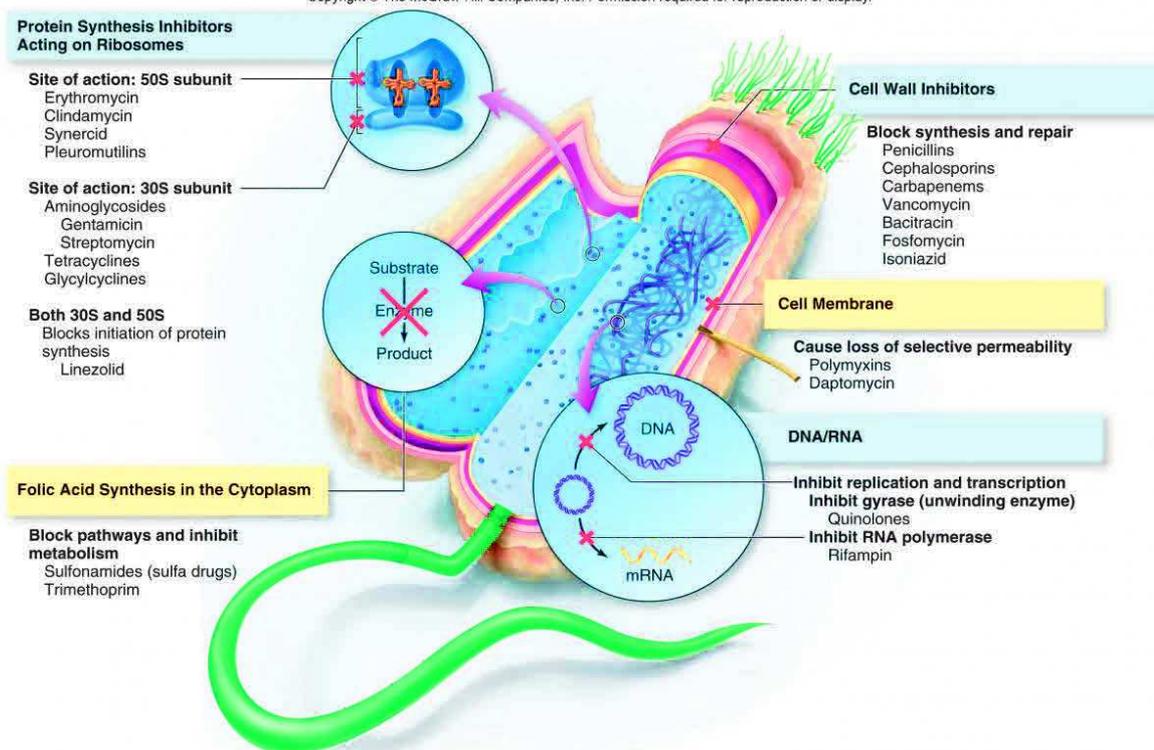


Figure 1.7 : Mécanisme d'action des différentes classes d'antibiotiques.

Cette figure a été reprise de la source online.science.psu.edu/micrb106_wd/node/6053

Les huiles essentielles, telles que le thymol ou l'eugénol, possèdent aussi des propriétés antimicrobiennes. De par leur composition complexe, leur mécanisme d'action n'a pas été clairement élucidé mais il semblerait que leur hydrophobicité faciliterait leur pénétration à travers la membrane lipidique des bactéries. La présence de nombreux composés au sein des huiles essentielles indiquerait que leur action est liée à une combinaison de plusieurs mécanismes induisant un effet synergique²⁸.

Les nanoparticules métalliques, dont la taille est généralement inférieure à 100 nm, possèdent aussi un pouvoir antimicrobien. Les nanoparticules d'argent sont très fréquemment utilisées dans le domaine biomédical^{42,43}. En effet, sous forme ionique (Ag^+), l'argent possède une forte toxicité pour de nombreux micro-organismes. La membrane bactérienne étant perméable à ces particules, celles-ci pénètrent dans le micro-organisme et viennent perturber l'activité respiratoire de la bactérie. En outre, l'argent peut aussi causer des dommages intracellulaires en se liant aux enzymes et à l'ADN^{44,45}. Bien qu'étant l'un des composés antimicrobiens les plus référencés dans le domaine biomédical, de nombreuses études soulignent le possible effet néfaste de ces nanoparticules sur le corps humain, dû à la toxicité de l'argent pour les cellules eucaryotes^{46,47}, ou encore au risque d'accumulation de ces nanoparticules dans les organes⁴⁵.

D'autres agents biologiques peuvent aussi être utilisés dans le combat contre les infections nosocomiales, comme les bactériophages. Le mécanisme d'action des bactériophages repose sur

l'utilisation d'une de ses protéines membranaires qui provoque la formation de « trous » sur la membrane bactérienne entraînant alors sa lyse⁴⁸. Certaines enzymes, comme l'alginate⁴⁹ ou la dispersine B⁵⁰, sont aussi utilisées dans la lutte contre les maladies infectieuses. Bien que n'agissant pas directement contre les bactéries, leur propriété antibactérienne provient du fait qu'elles empêchent la formation de biofilms.

Certains polyélectrolytes chargés positivement possèdent aussi des propriétés antimicrobiennes. Le chitosan est l'un des exemples les plus connus (Figure 1.8). Concernant son mécanisme antimicrobien, plusieurs hypothèses existent mais la plus connue propose une interaction entre les charges positives du chitosan et les charges négatives de la membrane microbienne. Le poids moléculaire et le degré d'acétylation du chitosan semblent être des paramètres importants dans le contrôle du pouvoir antimicrobien⁵¹. Les interactions électrostatiques résultantes provoquent la fuite du contenu intracellulaire de la bactérie dont les ions potassium et autres constituants à faible poids moléculaire.⁵²

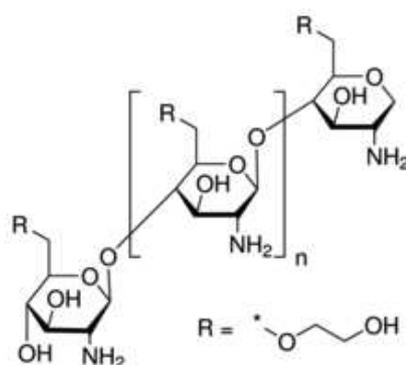


Figure 1.8 : Structure chimique du chitosan

Enfin, les homopolypeptides positivement chargés, comme la poly(L-arginine) ou la poly(L-lysine), peuvent aussi être utilisés en tant qu'agents antimicrobiens⁵³. Le mécanisme bactéricide semble être similaire à celui proposé pour les peptides antimicrobiens pénétrant dans les cellules puisque les poly(L-arginine) sont fréquemment utilisées en tant que CPP pour les cellules eucaryotes³⁷. Une étude a notamment démontré que la poly(L-arginine) pénétrait à l'intérieur des cellules eucaryotes plus efficacement que les autres homopolypeptides et que le nombre de résidus avait une influence sur l'action de perméabilité membranaire des poly(L-arginine), celles ayant un nombre de résidus supérieurs à 15 arginines pénétrant de manière plus efficace⁵⁴.

1.3. Stratégies de greffage des composés antimicrobiens

Les composés antimicrobiens, notamment les peptides, ne possèdent généralement pas la propriété de pouvoir adhérer sur des surfaces. Pour le développement de surfaces antimicrobiennes appliquées aux dispositifs médicaux, différentes techniques d'adsorption de ces molécules ont vu le jour. Il existe l'adsorption par voie physique, telle que la conception de films multicouches de polyélectrolytes, ou encore l'adsorption par voie chimique, telle que le greffage chimique de ces composés par modification de la surface et/ou de l'entité antimicrobienne.

1.3.1. Adsorption des molécules par voie physique

L'adsorption par voie physique fait intervenir des interactions dites faibles, comme les interactions de Van der Waals ou l'apparition de liaisons hydrogènes. Dans cette partie, nous nous intéressons à une méthode de fabrication de film par voie physique : la conception de films multicouches de polyélectrolytes.

1.3.1.1. Principe des films multicouches de polyélectrolytes

La construction de films multicouches à base de polyélectrolytes est l'une des techniques les plus couramment utilisées⁵⁵. Développée par Decher *et al.* au début des années 1990, la construction de ces films est basée sur l'interaction électrostatique entre des polymères de charges opposés⁵⁶. Une surface étant généralement chargée négativement dans les conditions physiologiques, cette surface est mise en contact avec un polymère chargé positivement, le polycation. Cette surface est ensuite mise en contact avec une solution de polyanion, et, grâce à des interactions électrostatiques, les polyanions viennent se déposer sur la première couche de polycation. Après plusieurs répétitions des étapes de dépôt de polycations, suivi de polyanions, un film nanostructuré se forme à la surface du matériau (Figure 1.9). Cette méthode de construction d'un film est aussi appelée construction « couche-par-couche », ou LbL (« Layer-by-Layer »). L'épaisseur du film peut ainsi être contrôlée par le nombre de couches polycations/polyanions déposées.

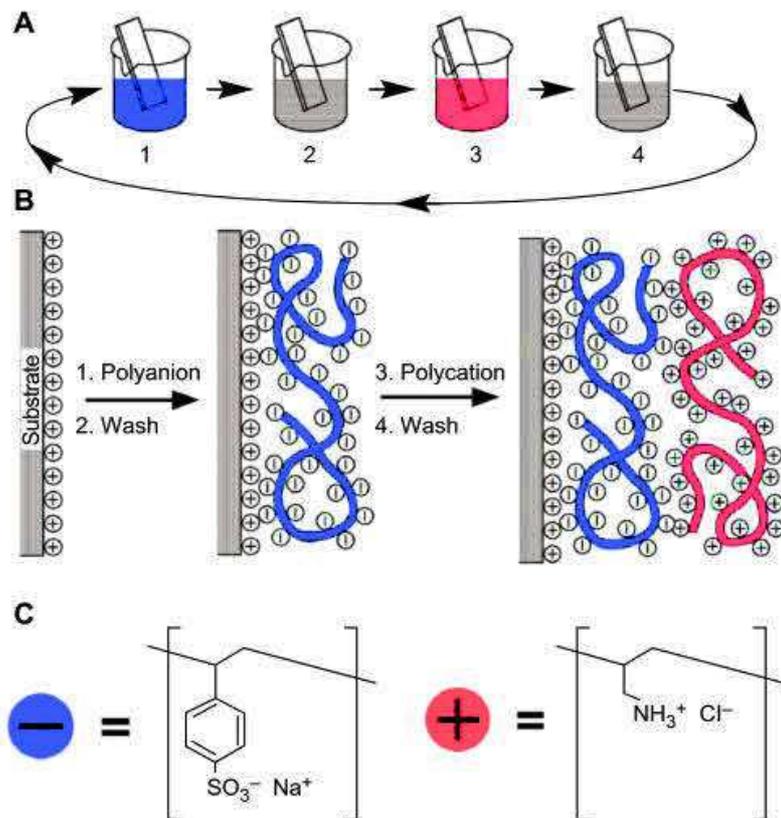


Figure 1.9 : Construction des films multicouches de polyélectrolytes. **A :** Procédé d'assemblage des films multicouches par immersion du substrat. **B :** Schéma de principe du dépôt du polyanion sur un substrat chargé positivement suivi du dépôt du polyanion. **C :** Exemples d'un polyanion et d'un polycation utilisés. Cette figure a été reprise de l'article de Decher⁵⁶.

L'assemblage « couche-par-couche » de ces films peut se faire selon trois méthodes. La première méthode dite « dipping » consiste à immerger la surface à traiter dans des solutions de polyélectrolytes, avec une étape de rinçage entre deux immersions. La seconde méthode, dite « spincoating », consiste à déposer un faible volume de polyélectrolyte dissout dans un solvant volatil à la surface d'un substrat en rotation. Le solvant se volatilise et les polyélectrolytes sont étalés sur le substrat par la force centrifuge. Enfin la dernière méthode, dite « spraying », consiste à déposer successivement ou simultanément des couches de polyélectrolytes par un procédé de nébulisation. La première méthode est la plus conventionnelle pour la construction des films multicouches, bien que les deux autres méthodes, nécessitant un temps de dépôt plus court et une consommation en polyélectrolytes réduite, puissent avoir un intérêt dans le domaine industriel. D'autres méthodes non conventionnelles, telles que l'utilisation de polymères non chargés ou encore la construction de multicouches hydrides, par l'utilisation de cellules ou de tissus, ont récemment été développées⁵⁷.

Lors de la construction des films LbL, deux modes de croissance des films ont été observés. Le premier mode est une croissance dite linéaire, où l'épaisseur et la masse du film formé sont proportionnelles au nombre de couches déposées. Dans ce type de films, les polyélectrolytes de la

solution n'interagissent qu'avec les polyélectrolytes de charge opposée constituant la surface externe du film⁵⁶ et ne peuvent pas diffuser vers l'intérieur du film. Laugel *et al.* ont démontré qu'un film était à croissance linéaire lorsque le couple polyanion/polycation possédait une enthalpie de réaction négative, liée à une réaction exothermique⁵⁸.

Le deuxième type de films multicouches est celui dont la croissance est dite exponentielle. Le mécanisme de formation de ces films multicouches a été décrit par Lavalley *et al.* pour les films à base de poly(L-Lysine) et d'acide hyaluronique (HA)⁵⁹. La croissance de ces films est basée sur la diffusion d'au moins un des deux polyélectrolytes dans et hors du film lors de chaque étape de construction. Ainsi, lorsqu'un film PLL/HA, terminé par une couche de polyanions HA, est mis au contact de la solution de polycations PLL, ces derniers vont à la fois se complexer avec l'excès de charges négatives en surface, conduisant à la formation d'une nouvelle couche chargée positivement, mais aussi diffuser à l'intérieur du film qui joue le rôle de réservoir de polycations libres. Le potentiel chimique de ces chaînes augmente alors jusqu'à être égal à celui des chaînes en solution. A ce moment, le processus de diffusion vers l'intérieur du film s'arrête. Lors de la phase de rinçage, la solution de polycations est remplacée par le milieu tampon et seule une partie des polycations libres du film diffuse hors de la multicouche. Lorsque le film est ensuite mis au contact de la solution de polyanions, ceux-ci se complexent avec l'excès de charges positives présentes en surface mais aussi à l'intérieur du film. De plus les polycations libres restants dans le film diffusent hors du film. Au moment d'arriver à l'interface film/solution, ils sont complexés par les chaînes de HA en solution. Ces complexes HA/PLL restent accrochés à la surface et contribuent à augmenter la masse et l'épaisseur de la multicouche. Le processus s'arrête une fois que toutes les chaînes libres de polycations se sont complexées avec le polyanion. La quantité de polyanions de la nouvelle couche formée est donc proportionnelle à la quantité de polycations libres dans le film. Après chaque dépôt de polycations, la quantité de polycations libres présente dans le film augmente avec l'épaisseur du film déjà déposé, conduisant à une augmentation exponentielle de la masse du film avec le nombre de dépôts.⁶⁰ Laugel *et al.* ont par ailleurs démontré qu'un film multicouche était à croissance exponentielle lorsque la complexation polyanion/polycation est un processus endothermique⁵⁸.

Au sein des films multicouches, les chaînes de polyélectrolytes présentent un certain degré de mobilité dépendant de la nature de l'assemblage. Jourdainne *et al.* ont par ailleurs démontré qu'au sein d'un film PLL/HA, trois populations de polycations coexistent⁶¹. Lorsqu'une couche de polycation est déposée en surface, deux populations mobiles et une population immobile apparaissent. La population immobile semble correspondre à des polycations fortement liés à des polyanions et participent à la structuration du film. Les populations mobiles, une lente et une rapide, semblent correspondre aux polycations diffusant librement dans le film. La fraction de population mobile de ces

polycations peut d'ailleurs être diminuée, en réalisant une réticulation chimique liant de manière covalente les polycations aux polyanions⁶².

1.3.1.2. Applications des films multicouches de polyélectrolytes

Les applications des films multicouches dans le domaine biomédical sont très variées. En effet, la facilité de construction de ces films et le contrôle de leurs propriétés physico-chimiques en font des éléments de choix pour l'ingénierie tissulaire et le domaine des biomatériaux.

Les multicouches à croissance exponentielle peuvent être des réservoirs pour les agents thérapeutiques grâce à la diffusion de ceux-ci au sein du film, ce qui permet ensuite une libération locale⁵⁵. Par exemple, She *et al.* ont incorporé des facteurs de croissance pour les fibroblastes au sein d'un film poly(L-arginine)/sulfate de dextrane⁶³. Dans le but de combattre le développement de cellules cancéreuses, Deng *et al.* ont quant à eux déposé des films multicouches sur un médicament anticancéreux, la doxorubicine, afin de délivrer localement un ARN interférant inhibant l'expression génétique des cellules cancéreuses⁶⁴. Une double action anticancéreuse a ainsi pu être développée. Craig *et al.* ont développé des microsphères contenant des agents biocides. Ces microsphères possèdent une membrane à base de poly(L-acide glutamique) et de poly(L-lysine)⁶⁵. Cette membrane est dégradée uniquement en présence du pathogène *Staphylococcus aureus*, produisant l'enzyme endoprotéinase Glu-C et ayant la capacité de cliver la liaison C-terminale de l'acide glutamique. Grâce à l'utilisation du poly(L-acide glutamique), ces microsphères possèdent la capacité de délivrer l'agent biocide uniquement en présence du pathogène.

L'utilisation des films multicouches a aussi largement été développée pour moduler l'adhésion cellulaire. Pour exemple, Richert *et al.*⁶² ont étudié l'effet de la réticulation des films PLL/HA sur l'adhésion cellulaire. Ils ont démontré que cette adhésion était favorisée par des surfaces de rigidité importante. Mais la rigidité des multicouches peut aussi jouer un rôle dans la différenciation cellulaire, comme décrit dans le travail de Rabineau *et al.*⁶⁶.

Il est aussi possible de modifier chimiquement l'un des polyélectrolytes utilisés dans la construction de ces films en lui greffant une molécule bioactive. Ainsi, Chluba *et al.* ont réussi à lier un peptide à la PLL au sein du film poly(L-lysine)/poly(L-acide glutamique) et à maintenir l'activité biologique de ce peptide similaire à celle qu'il possède dans son état libre⁶⁷.

Enfin, il est également possible d'utiliser les films multicouches dans le but de créer des membranes biomimétiques, par incorporation de couches lipidiques par exemple⁶⁸ ou encore dans le but de créer des biosenseurs⁶⁹.

1.3.2. Adsorption des molécules par voie chimique

Dans cette partie, nous nous intéresserons à différentes méthodes de greffage des molécules antimicrobiennes sur des surfaces, et plus particulièrement aux techniques utilisées pour les peptides antimicrobiens.

1.3.2.1. Synthèse peptidique sur support solide

La première technique consiste à synthétiser directement le peptide sur la surface d'attache en utilisant le principe de la synthèse peptidique sur support solide (SPPS). Cette technique consiste à synthétiser le peptide en liant chaque acide aminé bout à bout par couplage du groupement carboxyle d'un acide aminé avec le groupement amine d'un autre acide aminé.

La SPPS consiste à répéter des cycles de déprotection, de lavage, de couplage et de lavage. Pour ce faire, un premier acide aminé est ancré sur une matrice de polymère insoluble, telle qu'une matrice à base de poly(styrène), de poly(éthylène glycol) ou encore de polyamide ayant un linker pouvant réagir avec le premier acide aminé. Cette matrice contenant le premier acide aminé sera ensuite mise en contact avec une solution contenant un deuxième acide aminé possédant un groupement carboxyle activé, un groupement N-terminal et des groupements latéraux protégés. Ce deuxième acide aminé viendra réagir sur le premier acide aminé déjà ancré sur la matrice. Un cycle de lavage interviendra ensuite afin d'éliminer tous les acides aminés n'ayant pas réagi sur la matrice. Le groupement protecteur de l'amine situé sur la chaîne principale du 2^e acide aminé sera ensuite enlevé pour permettre la réaction avec un troisième acide aminé ayant un C-terminal activé. Ce cycle est répété jusqu'à obtenir la séquence peptidique désirée. A la fin, un dernier lavage permettra d'ôter les groupements protecteurs situés sur les chaînes latérales (Figure 1.10).

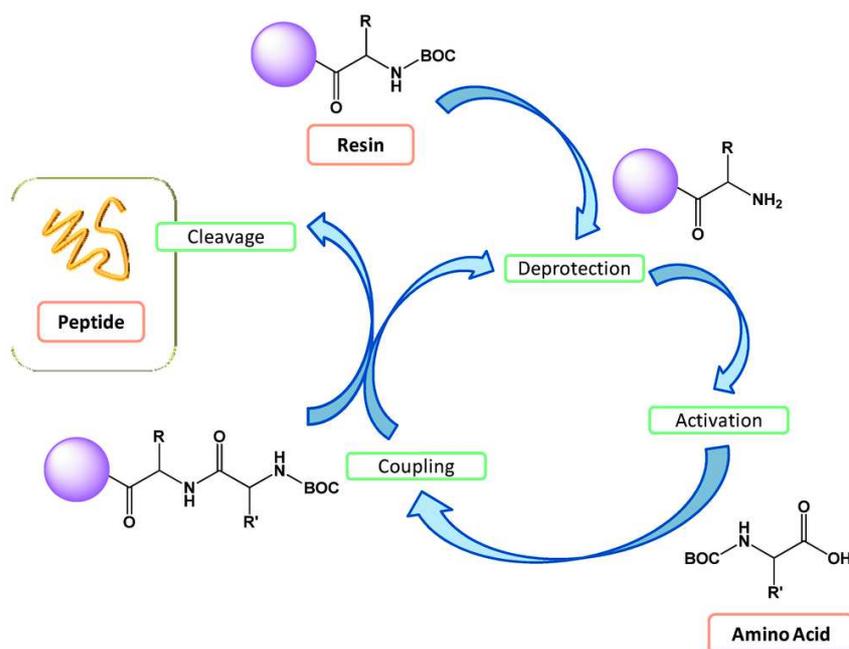


Figure 1.10 : Principe de la synthèse peptidique sur support solide (SPPS). Cette figure a été reprise de la source <http://www.mdpi.com/2073-4360/6/2/515/html>

Concernant la protection de l'amine située sur la chaîne principale, les groupements tert-butoxycarbonyle (t-Boc) et fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) sont les plus utilisés. Le groupement t-Boc est éliminé en utilisant de l'acide trifluoroacétique tandis que le groupement Fmoc est éliminé en utilisant de la pipéridine. Lors de la réaction de couplage, le composé carboxyle est activé afin de créer un composé plus réactif vis-à-vis des amines primaires. Pour ce faire, le diisopropylcarbodiimide est souvent utilisé en tant qu'agent activateur.

L'avantage principal de cette technique est un contrôle optimal de l'immobilisation du peptide à la surface. En effet, contrôler l'immobilisation à la surface permet ainsi de garantir que la structure peptidique présente à la surface est similaire à celle connue en solution pour son activité antimicrobienne. Par exemple, Cho *et al.* ont démontré qu'un peptide déposé sur une résine présentait une activité antimicrobienne grâce au maintien de sa conformation en feuillet β par la technique SPPS et ne présentait aucune activité cytotoxique.⁷⁰ Malgré la démonstration du maintien de l'activité antimicrobienne des peptides selon cette technique de greffage, des surfaces spécifiques doivent être utilisées, empêchant l'utilisation de cette technique sur tous types de supports.

1.3.2.2. Modifications chimiques de surface

Les matériaux utilisés dans le domaine biomédical sont généralement à base de titane ou d'aluminium pour les matériaux inorganiques et de polymères tels que le silicone, le polyester, le polyéthylène ou le polypropylène pour les matériaux organiques. Ces matériaux possèdent une surface peu réactive. Une des stratégies envisagées pour le greffage et l'immobilisation de molécules antimicrobienne sur les dispositifs médicaux est la modification de surfaces afin de rendre celle-ci plus réactives vis-à-vis des molécules antimicrobiennes.

Concernant les peptides antimicrobiens, deux stratégies de greffage principales ont été développées :

- 1) **Seule la surface est modifiée.** Cette stratégie consiste à greffer sur la surface des groupements qui peuvent réagir avec les amines primaires contenues dans la séquence peptidique. Pour ce faire, diverses techniques ont été employées. Holmberg *et al.* ont, par exemple, développé un processus de silanisation sur un substrat en titane afin de pouvoir greffer le peptide antimicrobien GL13K⁷¹. Rapsch *et al.* ont quant à eux greffé sur des surfaces des fonctions époxydes, aldéhyde, n-hydrosuccinimide ou encore diisothiocyanate de *p*-phénylène afin de favoriser la réaction avec les amines primaires des molécules antimicrobiennes⁷². Concernant les matériaux organiques, Steven *et al.* ont ajouté, sur une surface de polyéthylène, un poly(éthylène glycol) possédant des groupements carbonyles activés en bout de chaîne. Il a ensuite été démontré que ces groupements carbonyles peuvent réagir avec un peptide antimicrobien dérivé de la magainine⁷³. Enfin, Sun *et al.* ont activé une surface de polyester par hydrolyse de celle-ci⁷⁴.
- 2) **La surface et le peptide sont modifiés.** La stratégie consistant à modifier uniquement la surface possède le principal désavantage de ne permettre aucun contrôle sur l'orientation du peptide immobilisé à la surface, ce qui peut influencer les propriétés antimicrobiennes de celui-ci²⁹. En effet, les peptides antimicrobiens possèdent de nombreux acides aminés comme les arginines et les lysines ayant des amines primaires situées sur leurs chaînes latérales. Celles-ci peuvent aussi réagir avec la surface activée selon la première technique. Une modification du peptide afin de réagir spécifiquement sur le site de greffage est couramment employée. Pour ce faire, une des techniques les plus répandues est l'ajout d'une cystéine en bout de chaîne du peptide et le greffage de fonctions thiols, maléimides ou époxydes à la surface. En effet, les thiols présents sur les cystéines pourront réagir spécifiquement avec les fonctions présentes sur les surfaces (à l'exception des époxydes, qui peuvent aussi réagir avec les amines primaires)²⁹. Glinel *et al.* ont par exemple développé un revêtement antiadhésif et antimicrobien par greffage d'un copolymère antiadhérent, où le groupement présent à

l'extrémité de la chaîne a ensuite été activé afin de réagir avec une magainine modifiée avec une cystéine⁴⁹. Une autre technique spécifique pouvant être envisagée est l'utilisation du procédé de chimie click, par greffage de fonctions azotures ou alcynes sur la surface et le peptide²⁹ (Figure 1.11).

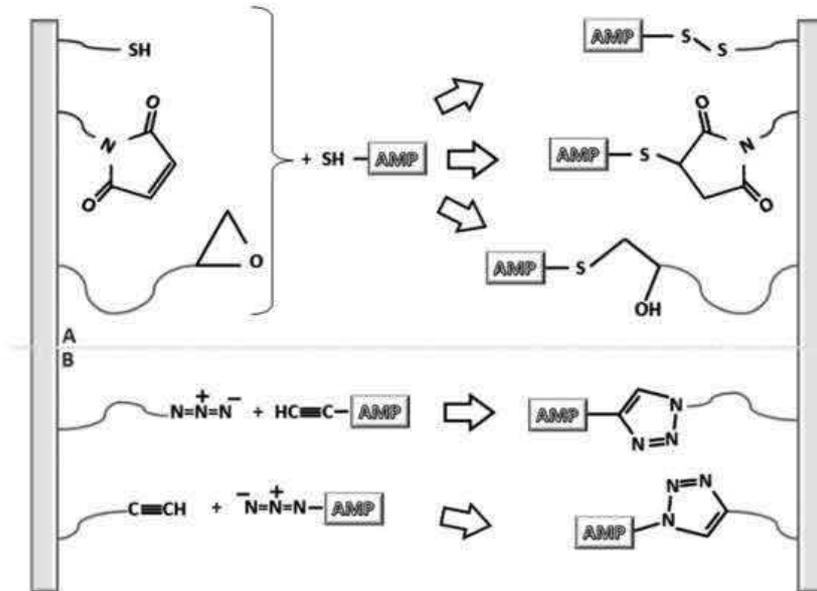


Figure 1.11 : Schéma de greffage entre une surface et un peptide modifié chimiquement. **A** : réaction entre une fonction thiol, maléimide ou époxyde greffée sur une surface et un peptide contenant un thiol par ajout d'une cystéine. **B** : réaction entre une surface possédant une fonction alcyne ou azoture avec un peptide contenant une fonction azoture ou alcyne par chimie click. Cette figure a été reprise depuis l'article de Costa et al.²⁹

Ces deux techniques de greffage, bien que très documentées dans la littérature, nécessitent des réactions en plusieurs étapes. Développer un peptide pouvant adhérer en une seule étape devient alors un enjeu intéressant. Un peptide contenant une cystéine peut réagir avec une surface recouverte d'or en une seule étape et sans modification de celle-ci. Ivanov *et al.* ont par exemple utilisé ce procédé pour greffer le peptide antimicrobien chrosophysin-1 sur une surface d'or⁷⁵. Mais cette réaction étant limitée à l'or, il serait intéressant de développer un peptide contenant une séquence d'accroche pouvant adhérer sur tous types de supports. A l'heure actuelle, seuls les peptides modifiés avec la L-3,4-dihydroxyphénylalanine, ou L-DOPA, possèdent cette capacité. Par exemple, Statz *et al.* ont développé des surfaces anti-adhérentes par combinaison de peptides avec la L-DOPA⁷⁶. Peyre *et al.* ont aussi utilisé cette molécule afin de lier la magainine modifiée à des surfaces recouvertes d'oxyde de titane. Après greffage, il a été prouvé que la surface possédait bien un effet antimicrobien⁷⁷.

1.4. Stratégies antimicrobiennes de surface

Concernant la lutte contre la formation des biofilms sur les dispositifs médicaux, une des stratégies employées est d'empêcher les micro-organismes présents à l'état planctonique de venir adhérer sur la surface des dispositifs médicaux, mais il existe d'autres stratégies visant une action bactéricide et ayant ainsi un effet sur la prolifération bactérienne. Il existe trois types de revêtements antimicrobiens : les revêtements dits « antiadhésifs », empêchant l'adhésion microbienne, les revêtements dits « release-killing », libérant un agent antimicrobien et les revêtements dits « contact-killing » où il est nécessaire que la bactérie entre en contact avec la surface pour être lysée (Figure 1.12).

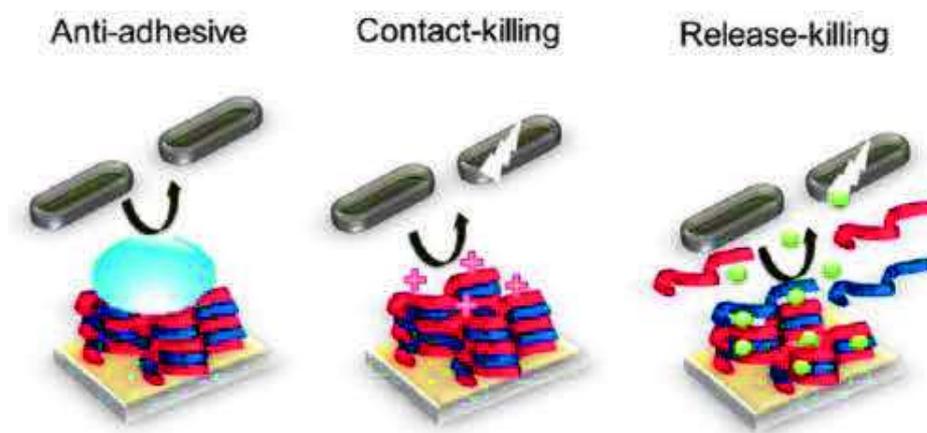


Figure 1.12 : Stratégies antimicrobiennes de surfaces fonctionnalisées. Cette figure a été reprise de l'article de Seon et al.⁷⁸

1.4.1. Les revêtements antiadhésifs

Les propriétés physiques d'une surface peuvent jouer un rôle dans la limitation de l'adhésion bactérienne⁷⁹. En effet, la rugosité et l'hydrophilie d'une surface ont un impact important sur l'adhésion cellulaire. Concernant la rugosité, de nombreuses études ont démontré que l'augmentation de celle-ci entraîne une augmentation de l'adhésion bactérienne^{80,81,82}. Concernant l'hydrophilie, une étude a récemment démontré que les flagelles bactériens, responsables de l'adhésion irréversible, ont une meilleure adhésion sur les surfaces hydrophobes⁸³. Ainsi, rendre une surface plus hydrophile peut être une voie qui tend à limiter l'adhésion bactérienne⁸⁴. Les revêtements antiadhésifs sont principalement composés de polymères hydrophiles, tels que le poly(éthylène glycol). Les bactéries approchant du film provoquent alors une compression de ces chaînes de polymères engendrant une

force de répulsion élastique. En outre, l'approche des bactéries provoque le retrait de molécules d'eau des chaînes de polymères hydratées durant la compression ce qui a pour effet de créer une pression osmotique instable. Ces pressions génèrent alors une force répulsive dépendant de la densité de surface et de la longueur du polymère ⁸⁵.

En outre, les propriétés mécaniques d'un substrat, telles que le module de Young, peuvent jouer un rôle dans la limitation de l'adhésion bactérienne. Lichter *et al.* ont démontré que, lors de la construction d'un film multicouche à base de poly(hydrochlorure d'allylamine) et de poly(acide acrylique), la modification du pH pendant l'assemblage modifie le module de Young final du film. Ils ont ainsi déterminé une corrélation entre l'adhésion bactérienne et les propriétés mécaniques du film⁸⁶. Par exemple, une adhésion bactérienne est observée pour *Escherichia coli* sur un film ayant un module de Young de 100 MPa tandis qu'aucune adhésion n'est visible pour un film de même composition mais ayant un module de 1 MPa. Une autre étude a toutefois observé qu'en réticulant chimiquement un film multicouche et donc en augmentant son module de Young de 30 à 150 kPa, l'adhésion bactérienne était diminuée, contredisant la conclusion de Lichter *et al.*⁷⁸ Enfin, dans les films multicouches, certains polyélectrolytes possèdent eux-mêmes des propriétés antiadhésives, comme l'héparine ^{87,88}.

Bien qu'empêchant l'adhésion à la surface, et donc la formation d'un biofilm, le principal désavantage de cette stratégie réside dans le fait qu'elle ne provoque pas la lyse des bactéries. Celles-ci peuvent alors proliférer sur d'autres surfaces non protégées et un biofilm peut alors y apparaître.

1.4.2. Les revêtements « release-killing »

Limiter l'adhésion des bactéries en contrôlant les paramètres physiques de la surface est une stratégie envisageable. Toutefois, il a été démontré que les stratégies impliquant une action bactéricide sont plus efficaces⁸⁹. Les revêtements contenant des molécules bactéricides empêchent notamment la prolifération bactérienne sur d'autres supports. Les composés antibactériens sont libérés du film pour une action au voisinage du support : c'est la stratégie dite « release-killing ».

Les molécules bactéricides peuvent être contenues dans des multicouches de polyélectrolytes, des hydrogels⁹⁰ ou encore dans des matrices à base de polymères⁴³. Les molécules antimicrobiennes utilisées sont généralement des nanoparticules d'argent⁹¹, des antibiotiques^{92,93}, ou encore des peptides antimicrobiens^{94,95,96}. Ces revêtements présentent l'avantage d'avoir une action localisée forte au voisinage de la surface libre du film où les molécules sont libérées avec une action d'intensité décroissante à mesure que l'on s'éloigne de la surface.

A titre d'exemple, Min *et al.* ont développé un système de bithérapie en incorporant dans des films multicouches un antibiotique, la gentamicine, et un facteur de croissance favorisant la réparation des tissus osseux⁹⁷. L'antibiotique contenu dans les couches supérieures du film est libéré en premier et évite ainsi le développement d'infections dans les jours suivant l'implantation tandis que le facteur de croissance, présent dans les couches inférieures, est libéré plus tard. Cheng *et al.* ont aussi développé un système de bithérapie sur des supports en titane mais en utilisant une matrice à base de gélatine contenant des fonctions catéchols pour l'adhésion et des fonctions méthacryols pour la réticulation et le maintien de la matrice dans des conditions physiologiques⁹⁸. Des peptides antimicrobiens et des nanoparticules de silice, pour leur action sur la régénération osseuse, ont été ajoutés à la matrice de gélatine après dépôt et avant réticulation. La libération de ces composés a ensuite été vérifiée.

Le contrôle de la libération de l'agent thérapeutique peut se faire en concevant une barrière à l'intérieur du film, libérant plus tardivement l'agent situé dans les premières couches déposées sur le substrat. Min *et al.* ont par exemple utilisé une barrière à base d'argile afin de ralentir la diffusion d'un agent thérapeutique⁹² (Figure 1.13).

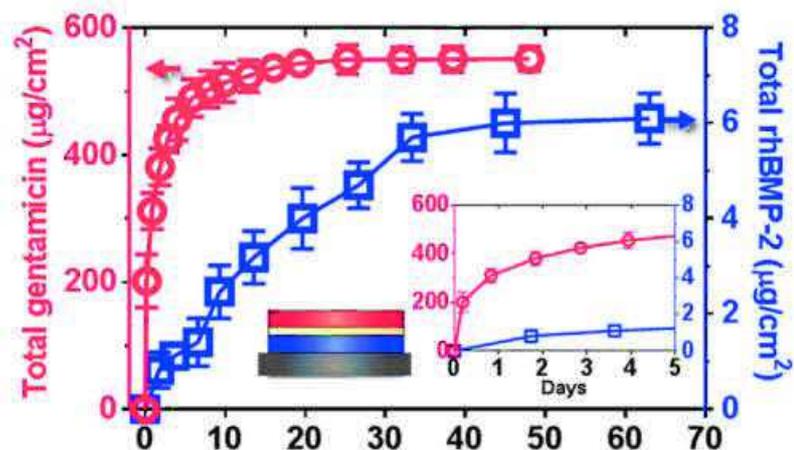


Figure 1.13 : Cinétique de libération d'un agent thérapeutique au sein d'un film multicouche contenant une barrière d'argile. **En rouge :** agent thérapeutique présent dans les couches supérieures du film. **En bleu :** agent thérapeutique présent dans les couches inférieures. Entre les couches supérieures et inférieures, une barrière composée d'argile est mise en place (**en jaune**) provoquant ainsi un retard dans la libération de l'agent thérapeutique présent dans les couches inférieures. Cette figure a été reprise de l'article de Min *et al.*⁹²

Malgré cela, la quantité de molécules libérées reste difficilement contrôlable ce qui peut provoquer des effets secondaires indésirables (toxicité vis-à-vis des cellules eucaryotes, réactions inflammatoires...). Par exemple, Agarwal *et al.* ont développé un film multicouche contenant de la chlorhexidine, un antiseptique local, et ont démontré que la quantité de chlorhexidine libérée était très proche de la limite cytotoxique⁹⁹. En outre, ces revêtements possèdent une action

antimicrobienne à court terme uniquement et la libération des agents bactéricides peut se faire aussi bien en présence de souches pathogènes qu'en leur absence, limitant ainsi l'efficacité de ces revêtements.

1.4.3. Les revêtements « contact-killing »

Pour contourner les désavantages des autres stratégies antimicrobiennes déjà évoquées, les revêtements « contact-killing », dont l'objectif est de lyser les bactéries arrivant au contact avec la surface, ont été développées. Le greffage chimique des composés antimicrobiens à la surface ou l'attache covalente dans les hydrogels sont utilisés. Une étude a par exemple démontré qu'il était possible de greffer des antibiotiques à une surface et de maintenir leur propriété antimicrobienne intacte¹⁰⁰.

Les revêtements à base de peptides antimicrobiens (PAM) liés de manière covalente à la surface présentent de nombreux avantages : ils sont efficaces sur un large spectre de bactéries à faible concentration peptidique, présentent un faible risque de favoriser la résistance bactérienne et une faible cytotoxicité²⁹. Chen *et al.* ont par exemple utilisé un processus de silanisation afin de greffer le peptide antimicrobien GL13K sur une surface en titane¹⁰¹. Toutefois, de nombreux paramètres sont à prendre en compte. Il a été démontré que pour certains peptides antimicrobiens, la conformation dans laquelle ils se trouvent à la surface est déterminante pour leur activité biologique. En effet, Haynie *et al.*¹⁰² ont démontré qu'une fois attachés à la surface, seuls les peptides qui maintenaient une conformation tridimensionnelle en hélice α possédaient une activité antimicrobienne. En outre, de nombreux composés antimicrobiens ne sont actifs à la surface qu'en présence d'un espaceur. Le poly(éthylène glycol) (PEG), ayant un poids moléculaire généralement compris entre 3000 et 500 g.mol⁻¹, est l'un des espaceurs les plus répandus dans la littérature²⁹. Par exemple, Gabriel *et al.*¹⁰³ ont démontré que le peptide antimicrobien LL-37 n'est actif sur une surface en titane qu'en présence d'un espaceur PEG. En outre, Lodzeau *et al.*¹⁰⁴ ont mesuré l'activité bactéricide d'une surface traitée avec le peptide antimicrobien chrysopsin-1 couplé à des PEG de différentes tailles.

Enfin, les films multicouches de polyélectrolytes peuvent aussi être utilisés comme revêtements « contact-killing ». Pour ce faire, un agent thérapeutique peut être lié de manière covalente à l'un des polyélectrolytes utilisés lors de la construction. Cassin *et al.* ont d'ailleurs démontré que, pour un film multicouche composé de collagène et d'acide hyaluronique, avec dans un cas le peptide antimicrobien LL-37 absorbé et dans l'autre cas immobilisé chimiquement, l'action antimicrobienne était similaire⁹⁶. En outre, les films multicouches peuvent aussi être antimicrobiens sans ajout de molécules biocides supplémentaires. En effet, les polycations, de par la présence de

charges positives, peuvent aussi jouer le rôle d'agent antimicrobien. Les chitosans sont notamment très répandus dans la conception de films multicouches antimicrobiens ^{105,95,106,88}. En outre, Lichter *et al.* ont notamment démontré que la mobilité des polycations au sein des films multicouches était un paramètre important pour l'obtention d'un film antimicrobien. Cette mobilité peut être modifiée par le pH de la solution contenant les polycations lors de la construction ¹⁰⁷.

1.4.4. Vers des nouvelles stratégies antimicrobiennes de surface

La modification de surface des dispositifs médicaux visant à limiter l'adhésion et la prolifération bactérienne paraît donc une solution envisageable dans la lutte contre les infections nosocomiales. Mais le risque de ces modifications est d'entraîner des effets secondaires. A titre d'exemple, les stratégies « release-killing » ont pour désavantage le risque de fournir un surdosage de molécules bactéricides, pouvant ainsi créer une toxicité locale envers les cellules eucaryotes. L'apparition de réactions inflammatoires peut aussi exister après modification de surface d'un dispositif médical, et ce, même pour les stratégies dites « contact-killing ». En outre, l'efficacité à long terme est aussi un paramètre important à contrôler, notamment pour les dispositifs médicaux implantés dans le corps humain pendant plusieurs années.

Afin d'augmenter l'efficacité à long terme de ces revêtements, de nouveaux films antimicrobiens ont été conçus de telle sorte que l'agent thérapeutique devient actif uniquement en présence de pathogènes. Une des stratégies utilisées est de concevoir des films multicouches libérant l'agent antimicrobien en fonction du pH. En effet, la croissance bactérienne s'accompagne généralement d'une diminution du pH. La liaison entre l'agent antimicrobien et la matrice est alors conçue pour être rompue pour un pH plus faible que le pH physiologique permettant ainsi la libération uniquement en présence du pathogène. Ce type de revêtement a notamment été développé par Pavlukhina *et al.* à l'aide d'hydrogels¹⁰⁸ et par Zhuk *et al.* à partir de films multicouches⁹³. Une autre stratégie, développée par Cado *et al.*, est de concevoir un revêtement à base de chitosan et d'acide hyaluronique où le peptide antimicrobien (la cateslytine) est lié à l'acide hyaluronique. Comme les souches pathogènes produisent l'enzyme hyaluronidase, le film est dégradé et la cateslytine libérée en solution uniquement en présence de ces souches ¹⁰⁵.

Une autre stratégie utilisée afin d'augmenter le pouvoir antimicrobien est de créer des revêtements combinant propriétés anti-adhésives et bactéricides. Wang *et al.* ont ainsi créé un film multicouche (héparine/ chitosan) pour les couches inférieures et (poly(acide acrylique)/ poly(vinylpyrrolidone) pour les couches supérieures. Les couches supérieures, étant anti-adhésives, vont être dégradées au cours du temps révélant ensuite les couches inférieures aux propriétés

bactéricides¹⁰⁶. Laloyaux *et al.* ont quant à eux développé un revêtement soit antibactérien soit antiadhésif, en fonction de la température. En effet, ce revêtement est à base de magainine et de copolymères ayant une conformation dépendant de la température¹⁰⁹. Ainsi pour une température supérieure à 22°C, le polymère révèle à la surface la magainine, tandis que pour une température inférieure à 22°C, le polymère adopte une conformation telle que les fonctions bactéricides ne sont plus visibles et la nature même du polymère apporte alors la fonction antiadhésive (Figure 1.14).

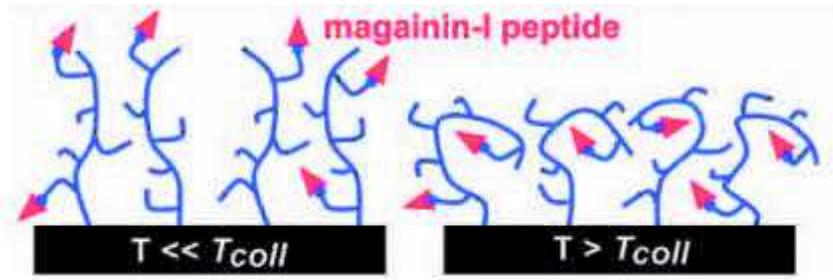


Figure 1.14 : Schéma représentant la conformation du copolymère-magainine en fonction de la température sachant que $T_{coll} = 22^{\circ}\text{C}$ est la température à laquelle le copolymère change de conformation. Cette figure a été reprise de l'article de Laloyaux *et al.*¹⁰⁹

Il existe aussi d'autres stratégies ciblant leur action sur les étapes suivant la phase d'adhésion lors de la formation du biofilm, telles que les revêtements intégrant des molécules inhibant le « quorum sensing » (par exemple, le furanone) ou intégrant des enzymes limitant la production d'une matrice extracellulaire (par exemple, l'alginase)⁴⁹. Pour exemple, Pavlukhina *et al.* ont développé un revêtement antibiofilm contenant l'enzyme dispersine B qui a la capacité de dégrader la matrice extracellulaire⁵⁰. D'autres revêtements influençant la réponse immunitaire de l'hôte ont été explorés, avec par exemple, l'incorporation de cytokines spécifiques¹¹⁰. Enfin, une dernière voie d'action explorée est le recouvrement des surfaces par des souches bactériennes non pathogènes afin de limiter l'adhésion des souches pathogènes.¹¹⁰ La figure 1.15 représente l'ensemble des stratégies antimicrobiennes existantes à ce jour.

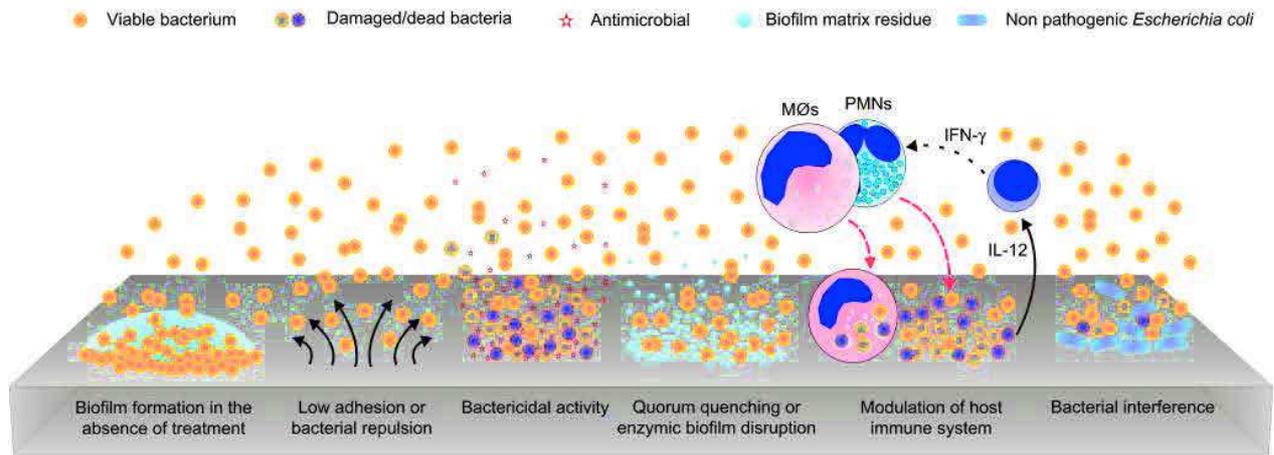


Figure 1.15 : Représentation des différentes voies d'action pour les revêtements antimicrobiens appliqués aux dispositifs médicaux. Cette figure a été reprise de l'article de Campoccia et al. ¹¹⁰.

Conclusion et perspectives

La formation de biofilms est donc une problématique majeure dans le traitement des infections liées aux dispositifs médicaux puisque les biofilms sont une source nutritive pour le développement des micro-organismes mais aussi une barrière contre les agents antimicrobiens. Avec une population vieillissante, un taux d'obésité de plus en plus élevé, l'apparition de souches multi-résistantes aux antibiotiques et l'utilisation de plus en plus fréquente des dispositifs médicaux, il devient alors urgent de développer des stratégies antimicrobiennes applicables à ces dispositifs.

Les peptides antimicrobiens semblent être des agents idéaux dans la lutte contre les infections. Leur mécanisme d'action est basé sur la perturbation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique des bactéries et/ou sur l'inhibition de composés contenus à l'intérieur des cellules provoquant alors une lyse cellulaire. En outre, il a été démontré que les peptides antimicrobiens peuvent aussi posséder des propriétés immuno-modulatrices^{11,24}. Malgré cela, le principal défaut des PAM est une faible tenue à la dégradation enzymatique et ainsi une perte de leur activité antimicrobienne en présence de protéases. Ces peptides possèdent tout de même un grand intérêt dans le domaine biomédical, notamment dû au fait que la résistance des souches bactérienne aux PAM est beaucoup plus faible qu'aux antibiotiques.²⁶

La stratégie d'attache des peptides sur des surfaces peut se faire par insertion de ceux-ci dans des multicouches de polyélectrolytes ou par greffage chimique, en créant des sites réactifs sur la surface pouvant réagir avec le peptide. Ces revêtements peuvent donc empêcher uniquement l'adhésion des bactéries à la surface, par greffage de molécules hydrophiles par exemple (revêtement « antiadhésif »), mais aussi empêcher la prolifération bactérienne, par contact de la bactérie avec l'agent antimicrobien contenu dans le revêtement (revêtement « contact-killing ») ou par libération des agents antimicrobiens du revêtement vers le milieu environnant (revêtement « release-killing »). Ces revêtements possèdent le principal désavantage d'être actifs même en l'absence de souche bactérienne ce qui réduit considérablement leur durée de vie. Des nouvelles stratégies basées sur la libération de l'agent antimicrobien uniquement en présence de bactéries ont donc été développées, mais les bactéries n'étant pas toutes des espèces pathogènes, il serait intéressant de développer un revêtement actif spécifique à un pathogène choisi.

Références bibliographiques

1. Dye, C., After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2014**, *369*, 20130426.
2. Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R., The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2331-2339.
3. Guggenbichler, J. P.; Assadian, O.; Boeswald, M.; Kramer, A., Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials - catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* **2011**, *6*.
4. Flemming, H. C.; Wingender, J., The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **2010**, *8*, 623-633.
5. Flemming, H. C.; Wingender, J., Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* **2001**, *43*, 1-8.
6. Dickschat, J. S., Quorum sensing and bacterial biofilms. *Natural Product Reports* **2010**, *27*, 343-369.
7. Rabin, N.; Zheng, Y.; Opoku-Temeng, C.; Du, Y.; Bonsu, E.; Sintim, H. O., Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry* **2015**, *7*, 493-512.
8. Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P., Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2004**, *2*, 95-108.
9. Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284*, 1318-1322.
10. Davies, D., Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 114-122.
11. Schierholz, J. M.; Beuth, J., Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *Journal of Hospital Infection* **2001**, *49*, 87-93.
12. Gbejuade, H. O.; Lovering, A. M.; Webb, J. C., The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthopaedica* **2015**, *86*, 147-158.
13. Sampedro, M. F.; Patel, R., Infections associated with long-term prosthetic devices. *Infectious disease clinics of North America* **2007**, *21*, 785-819.
14. Meckenstock, R.; Therby, A., Modifications de l'immunité dans l'obésité : impact sur le risque infectieux. *La Revue de Médecine Interne* **2015**, *36*, 760-768.
15. Kapadia, B. H.; Berg, R. A.; Daley, J. A.; Fritz, J.; Bhave, A.; Mont, M. A., Periprosthetic joint infection. *The Lancet* **2016**, *387*, 386-394.
16. Tarakji, K. G.; Ellis, C. R.; Defaye, P.; Kennergren, C., Cardiac implantable electronic device infection in patients risk. *Arrhythmia & Electrophysiology Review* **2016**, *5*, 65-71.
17. Steinberg, J. P.; Clark, C. C.; Hackman, B. O., Nosocomial and community-acquired Staphylococcus aureus bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clinical Infectious Diseases* **1996**, *23*, 255-259.
18. Donlan, R. M.; Costerton, J. W., Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **2002**, *15*, 167-193.
19. Amorena, B.; Gracia, E.; Monzón, M.; Leiva, J.; Oteiza, C.; Pérez, M.; Alabart, J.-L.; Hernández-Yago, J., Antibiotic susceptibility assay for Staphylococcus aureus in biofilms developed in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1999**, *44*, 43-55.

20. Foley, I.; Gilbert, P., Antibiotic resistance of biofilms. *Biofouling* **1996**, *10*, 331-346.
21. French, G. L., Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections--the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2006**, *58*, 1107-1117.
22. Lemaitre, B.; Hoffmann, J., The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* **2007**, *25*, 697-743.
23. Zasloff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, *415*, 389-395.
24. Haney, E. F.; Hancock, R. E., Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Biopolymers* **2013**, *100*, 572-583.
25. Hancock, R. E.; Sahl, H. G., Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* **2006**, *24*, 1551-1557.
26. Zasloff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, *415*, 389-395.
27. Wimley, W. C., Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chemical Biology* **2010**, *5*, 905-17.
28. Glinel, K.; Thebault, P.; Humblot, V.; Pradier, C. M.; Jouenne, T., Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomaterialia* **2012**, *8*, 1670-1684.
29. Costa, F.; Carvalho, I. F.; Montelaro, R. C.; Gomes, P.; Martins, M. C. L., Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomaterialia* **2011**, *7*, 1431-1440.
30. Balhara, V.; Schmidt, R.; Gorr, S. U.; Dewolf, C., Membrane selectivity and biophysical studies of the antimicrobial peptide GL13K. *Biochimica et Biophysica Acta* **2013**, *1828*, 2193-2203.
31. Frantz, J. F.; Castano, S.; Desbat, B.; Odaert, B.; Roux, M.; Metz-Boutigue, M. H.; Dufourc, E. J., Aggregation of cateslytin beta-sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new mode of action for antimicrobial peptides? *Biochemistry* **2008**, *47*, 6394-6402.
32. Malmsten, M., Antimicrobial peptides. *Upsala Journal of Medical Sciences* **2014**, *119*, 199-204.
33. Schmidt, N. W.; Wong, G. C., Antimicrobial peptides and induced membrane curvature: geometry, coordination chemistry, and molecular engineering. *Current Opinion in Solid State and Materials Sciences* **2013**, *17*, 151-163.
34. Wang, G.; Mishra, B.; Lau, K.; Lushnikova, T.; Golla, R.; Wang, X., Antimicrobial peptides in 2014. *Pharmaceuticals* **2015**, *8*, 123-150.
35. Splith, K.; Neundorff, I., Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *European Biophysics Journal* **2011**, *40*, 387-397.
36. Traboulsi, H.; Larkin, H.; Bonin, M. A.; Volkov, L.; Lavoie, C. L.; Marsault, E., Macrocyclic cell penetrating peptides: a study of structure-penetration properties. *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26*, 405-411.
37. Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y., Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 5836-5840.
38. Sugawara, M.; Resende, J. M.; Moraes, C. M.; Marquette, A.; Chich, J. F.; Metz-Boutigue, M. H.; Bechinger, B., Membrane structure and interactions of human cateslytin by multidimensional solution and solid-state NMR spectroscopy. *FASEB Journal* **2010**, *24*, 1737-1746.
39. Lugardon, K.; Chasserot-Golaz, S.; Kieffer, A. E.; Maget-Dana, R.; Nullans, G.; Kieffer, B.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M. H., Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 35875-35882.
40. Aslam, R.; Marban, C.; Corazzol, C.; Jehl, F.; Delalande, F.; Van Dorsselaer, A.; Prevost, G.; Haikel, Y.; Taddei, C.; Schneider, F.; Metz-Boutigue, M. H., Cateslytin, a chromogranin A derived

peptide is active against *Staphylococcus aureus* and resistant to degradation by its proteases. *PLoS one* **2013**, *8*, e68993.

41. Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Collins, J. J., How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* **2010**, *8*, 423-435.
42. Ploux, L.; Mateescu, M.; Anselme, K.; Vasilev, K., Antibacterial Properties of Silver-Loaded Plasma Polymer Coatings. *Journal of Nanomaterials* **2012**, *2012*, 1-9.
43. Sambhy, V.; MacBride, M. M.; Peterson, B. R.; Sen, A., Silver bromide nanoparticle/polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 9798-9808.
44. Chaloupka, K.; Malam, Y.; Seifalian, A. M., Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology* **2010**, *28*, 580-588.
45. Chen, X.; Schluesener, H. J., Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters* **2008**, *176*, 1-12.
46. AshaRani, P. V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S., Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009**, *3*, 279-290.
47. Braydich-Stolle, L.; Hussain, S.; Schlager, J. J.; Hofmann, M.-C., In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. *Toxicological Sciences* **2005**, *88*, 412-419.
48. Young, R., Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiological Reviews* **1992**, *56*, 430-481.
49. Glinel, K.; Jonas, A. M.; Jouenne, T.; Leprince, J.; Galas, L.; Huck, W. T., Antibacterial and antifouling polymer brushes incorporating antimicrobial peptide. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 71-77.
50. Pavlukhina, S. V.; Kaplan, J. B.; Xu, L.; Chang, W.; Yu, X.; Madhyastha, S.; Yakandawala, N.; Mentbayeva, A.; Khan, B.; Sukhishvili, S. A., Noneluting enzymatic antibiofilm coatings. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2012**, *4*, 4708-4716.
51. Goy, R. C.; Britto, D. d.; Assis, O. B. G., A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* **2009**, *19*, 241-247.
52. Rabea, E. I.; Badawy, M. E. T.; Stevens, C. V.; Smagghe, G.; Steurbaut, W., Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1457-1465.
53. Conte, M.; Aliberti, F.; Fucci, L.; Piscopo, M., Antimicrobial activity of various cationic molecules on foodborne pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2007**, *23*, 1679-1683.
54. Mitchell, D. J.; Kim, D. T.; Steinman, L.; Fathman, C. G.; Rothbard, J. B., Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *Journal of Peptide Research* **2000**, *56*, 318-325.
55. Hammond, P. T., Building biomedical materials layer-by-layer. *Materials Today* **2012**, *15*, 196-206.
56. Decher, G., Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232-1237.
57. Richardson, J. J.; Cui, J.; Bjornmalm, M.; Braunger, J. A.; Ejima, H.; Caruso, F., Innovation in layer-by-layer assembly. *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 14828-14867.
58. Laugel, N.; Betscha, C.; Winterhalter, M.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Ball, V., Relationship between the growth regime of polyelectrolyte multilayers and the polyanion/polycation complexation enthalpy. *Journal of Physical Chemistry. B* **2006**, *110*, 19443-19449.

59. Lavallo, P.; Picart, C.; Mutterer, J.; Gergely, C.; Reiss, H.; Voegel, J. C.; Senger, B.; Schaaf, P., Modeling the buildup of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 635-648.
60. Picart, C.; Mutterer, J.; Richert, L.; Luo, Y.; Prestwich, G. D.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Lavallo, P., Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 12531-12535.
61. Jourdainne, L.; Lecuyer, S.; Arntz, Y.; Picart, C.; Schaaf, P.; Senger, B.; Voegel, J. C.; Lavallo, P.; Charitat, T., Dynamics of poly(L-lysine) in hyaluronic acid/poly(L-lysine) multilayer films studied by fluorescence recovery after pattern photobleaching. *Langmuir* **2008**, *24*, 7842-7847.
62. Richert, L.; Boulmedais, F.; Lavallo, P.; Mutterer, J.; Ferreux, E.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Picart, C., Improvement of Stability and Cell Adhesion Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films by Chemical Cross-Linking. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 284-294.
63. She, Z.; Wang, C. X.; Li, J.; Sukhorukov, G. B.; Antipina, M. N., Encapsulation of Basic Fibroblast Growth Factor by Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules and Its Controlled Release for Enhancing Cell Proliferation. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2174-2180.
64. Deng, Z. J.; Morton, S. W.; Ben-Akiva, E.; Dreaden, E. C.; Shopsowitz, K. E.; Hammond, P. T., Layer-by-layer nanoparticles for systemic codelivery of an anticancer drug and siRNA for potential triple-negative breast cancer treatment. *ACS Nano* **2013**, *7*, 9571-9584.
65. Craig, M.; Amiri, M.; Holmberg, K., Bacterial protease triggered release of biocides from microspheres with an oily core. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *127*, 200-205.
66. Rabineau, M.; Flick, F.; Mathieu, E.; Tu, A.; Senger, B.; Voegel, J.-C.; Lavallo, P.; Schaaf, P.; Freund, J.-N.; Haikel, Y.; Vautier, D., Cell guidance into quiescent state through chromatin remodeling induced by elastic modulus of substrate. *Biomaterials* **2015**, *37*, 144-155.
67. Chluba, J.; Voegel, J.-C.; Decher, G.; Erbacher, P.; Schaaf, P.; Ogier, J., Peptide Hormone Covalently Bound to Polyelectrolytes and Embedded into Multilayer Architectures Conserving Full Biological Activity. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 800-805.
68. Boudou, T.; Crouzier, T.; Ren, K. F.; Blin, G.; Picart, C., Multiple Functionalities of Polyelectrolyte Multilayer Films: New Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2010**, *22*, 441-467.
69. Tang, Z. Y.; Wang, Y.; Podsiadlo, P.; Kotov, N. A., Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering. *Advanced Materials* **2006**, *18*, 3203-3224.
70. Cho, W.-M.; Joshi, B. P.; Cho, H.; Lee, K.-H., Design and synthesis of novel antibacterial peptide-resin conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 5772-5776.
71. Holmberg, K. V.; Abdolhosseini, M.; Li, Y.; Chen, X.; Gorr, S. U.; Aparicio, C., Bio-inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications. *Acta Biomaterialia* **2013**, *9*, 8224-8231.
72. Rapsch, K.; Bier, F. F.; Tadros, M.; von Nickisch-Rosenegk, M., Identification of antimicrobial peptides and immobilization strategy suitable for a covalent surface coating with biocompatible properties. *Bioconjugate Chemistry* **2014**, *25*, 308-319.
73. Steven, M. D.; Hotchkiss, J. H., Covalent immobilization of an antimicrobial peptide on poly(ethylene) film. *Journal of Applied Polymer Science* **2008**, *110*, 2665-2670.
74. Sun, H.; Öneby, S., Facile polyester surface functionalization via hydrolysis and cell-recognizing peptide attachment. *Polymer International* **2006**, *55*, 1336-1340.
75. Ivanov, I. E.; Morrison, A. E.; Cobb, J. E.; Fahey, C. A.; Camesano, T. A., Creating antibacterial surfaces with the peptide chrysopsin-1. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2012**, *4*, 5891-5897.

76. Statz, A. R.; Park, J. P.; Chongsiriwatana, N. P.; Barron, A. E.; Messersmith, P. B., Surface-immobilised antimicrobial peptoids. *Biofouling* **2008**, *24*, 439-448.
77. Peyre, J.; Humblot, V.; Methivier, C.; Berjeaud, J. M.; Pradier, C. M., Co-grafting of aminopoly(ethylene glycol) and Magainin I on a TiO₂ surface: tests of antifouling and antibacterial activities. *Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 13839-13847.
78. Seon, L.; Lavallo, P.; Schaaf, P.; Boulmedais, F., Polyelectrolyte Multilayers: A Versatile Tool for Preparing Antimicrobial Coatings. *Langmuir* **2015**, *31*, 12856-13872.
79. Satpathy, S.; Sen, S. K.; Pattanaik, S.; Raut, S., Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2016**, *7*, 56-66.
80. Olson, M. E.; Garvin, K. L.; Fey, P. D.; Rupp, M. E., Adherence of Staphylococcus epidermidis to biomaterials is augmented by PIA. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **2006**, *451*, 21-24.
81. Öztürk, O.; Sudagidan, M.; Türkan, U., Biofilm formation by Staphylococcus epidermidis on nitrogen ion implanted CoCrMo alloy material. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007**, *81*, 663-668.
82. Quirynen, M.; van der Mei, H. C.; Bollen, C. M.; Schotte, A.; Marechal, M.; Doornbusch, G. I.; Naert, I.; Busscher, H. J.; van Steenberghe, D., An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *Journal of Dental Research* **1993**, *72*, 1304-1309.
83. Bruzaud, J.; Tarrade, J.; Coudreuse, A.; Canette, A.; Herry, J. M.; de Givenchy, E. T.; Darmanin, T.; Guittard, F.; Guilbaud, M.; Bellon-Fontaine, M. N., Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of Pseudomonas aeruginosa PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. *Colloid and Surfaces B : Biointerfaces* **2015**, *131*, 59-66.
84. Faille, C.; Jullien, C.; Fontaine, F.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Slomianny, C.; Benezech, T., Adhesion of Bacillus spores and Escherichia coli cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* **2002**, *48*, 728-738.
85. Banerjee, I.; Pangule, R. C.; Kane, R. S., Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Advanced Materials* **2011**, *23*, 690-718.
86. Lichter, J. A.; Thompson, M. T.; Delgadillo, M.; Nishikawa, T.; Rubner, M. F.; Van Vliet, K. J., Substrata Mechanical Stiffness Can Regulate Adhesion of Viable Bacteria. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1571-1578.
87. Chang, Y.-Z.; Lin, J.-T.; Prasanna, A.; Chen, P.-C.; Ko, C.-Y.; Tsai, H.-C., Evaluation of the bacterial anti-adhesive properties of polyacrylic acid, chitosan and heparin-modified medical grade Silicone rubber substrate. *Journal of Polymer Research* **2015**, *22*.
88. Fu, J. H.; Ji, J.; Yuan, W. Y.; Shen, J. C., Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6684-6692.
89. Liu, C. X.; Zhang, D. R.; He, Y.; Zhao, X. S.; Bai, R., Modification of membrane surface for anti-biofouling performance: Effect of anti-adhesion and anti-bacteria approaches. *Journal of Membrane Science* **2010**, *346*, 121-130.
90. Fullenkamp, D. E.; Rivera, J. G.; Gong, Y. K.; Lau, K. H.; He, L.; Varshney, R.; Messersmith, P. B., Mussel-inspired silver-releasing antibacterial hydrogels. *Biomaterials* **2012**, *33*, 3783-3791.
91. Malcher, M.; Volodkin, D.; Heurtault, B.; Andre, P.; Schaaf, P.; Mohwald, H.; Voegel, J. C.; Sokolowski, A.; Ball, V.; Boulmedais, F.; Frisch, B., Embedded silver ions-containing liposomes in polyelectrolyte multilayers: cargos films for antibacterial agents. *Langmuir* **2008**, *24*, 10209-10215.

92. Min, J.; Braatz, R. D.; Hammond, P. T., Tunable staged release of therapeutics from layer-by-layer coatings with clay interlayer barrier. *Biomaterials* **2014**, *35*, 2507-2517.
93. Zhuk, I.; Jariwala, F.; Attygalle, A. B.; Wu, Y.; Libera, M. R.; Sukhishvili, S. A., Self-defensive layer-by-layer films with bacteria-triggered antibiotic release. *ACS Nano* **2014**, *8*, 7733-7745.
94. Shukla, A.; Fleming, K. E.; Chuang, H. F.; Chau, T. M.; Loose, C. R.; Stephanopoulos, G. N.; Hammond, P. T., Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2348-2357.
95. Raman, N.; Marchillo, K.; Lee, M. R.; Rodriguez Lopez, A. L.; Andes, D. R.; Palecek, S. P.; Lynn, D. M., Intraluminal Release of an Antifungal beta-Peptide Enhances the Antifungal and Anti-Biofilm Activities of Multilayer-Coated Catheters in a Rat Model of Venous Catheter Infection. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2016**, *2*, 112-121.
96. Cassin, M. E.; Ford, A. J.; Orbach, S. M.; Saverot, S. E.; Rajagopalan, P., The design of antimicrobial LL37-modified collagen-hyaluronic acid detachable multilayers. *Acta Biomaterialia* **2016**, *40*, 119-129.
97. Min, J.; Choi, K. Y.; Dreaden, E. C.; Padera, R. F.; Braatz, R. D.; Spector, M.; Hammond, P. T., Designer Dual Therapy Nanolayered Implant Coatings Eradicate Biofilms and Accelerate Bone Tissue Repair. *ACS Nano* **2016**, *10*, 4441-4450.
98. Cheng, H.; Yue, K.; Kazemzadeh-Narbat, M.; Liu, Y.; Khalilpour, A.; Li, B.; Zhang, Y. S.; Annabi, N.; Khademhosseini, A., Mussel-Inspired Multifunctional Hydrogel Coating for Prevention of Infections and Enhanced Osteogenesis. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9*, 11428-11439.
99. Agarwal, A.; Nelson, T. B.; Kierski, P. R.; Schurr, M. J.; Murphy, C. J.; Czuprynski, C. J.; McAnulty, J. F.; Abbott, N. L., Polymeric multilayers that localize the release of chlorhexidine from biologic wound dressings. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6783-6792.
100. Aumsuwan, N.; Heinhorst, S.; Urban, M. W., Antibacterial surfaces on expanded polytetrafluoroethylene; penicillin attachment. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 713-718.
101. Chen, X.; Hirt, H.; Li, Y.; Gorr, S. U.; Aparicio, C., Antimicrobial GL13K peptide coatings killed and ruptured the wall of *Streptococcus gordonii* and prevented formation and growth of biofilms. *PLoS one* **2014**, *9*, e111579.
102. Haynie, S. L.; Crum, G. A.; Doele, B. A., Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, *39*, 301-307.
103. Gabriel, M.; Nazmi, K.; Veerman, E. C.; Nieuw Amerongen, A. V.; Zentner, A., Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 548-550.
104. Lozeau, L. D.; Alexander, T. E.; Camesano, T. A., Proposed Mechanisms of Tethered Antimicrobial Peptide Chrysopsin-1 as a Function of Tether Length Using QCM-D. *Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*, 13142-13151.
105. Cado, G.; Aslam, R.; Seon, L.; Garnier, T.; Fabre, R.; Parat, A.; Chassepot, A.; Voegel, J. C.; Senger, B.; Schneider, F.; Frere, Y.; Jierry, L.; Schaaf, P.; Kerdjoudj, H.; Metz-Boutigue, M. H.; Boulmedais, F., Self-Defensive Biomaterial Coating Against Bacteria and Yeasts: Polysaccharide Multilayer Film with Embedded Antimicrobial Peptide. *Advanced Functional Materials* **2013**, *23*, 4801-4809.
106. Wang, B. L.; Ren, K. F.; Wang, H.; Ji, J., Construction of Degradable Multilayer Films for Enhanced Antibacterial Properties. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5*, 4136-4143.
107. Lichter, J. A.; Rubner, M. F., Polyelectrolyte multilayers with intrinsic antimicrobial functionality: the importance of mobile polycations. *Langmuir* **2009**, *25*, 7686-7694.

108. Pavlukhina, S.; Lu, Y.; Patimetha, A.; Libera, M.; Sukhishvili, S., Polymer multilayers with pH-triggered release of antibacterial agents. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3448-3456.
109. Laloyaux, X.; Fautre, E.; Blin, T.; Purohit, V.; Leprince, J.; Jouenne, T.; Jonas, A. M.; Glinel, K., Temperature-responsive polymer brushes switching from bactericidal to cell-repellent. *Advanced Materials* **2010**, *22*, 5024-5028.
110. Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R., A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* **2013**, *34*, 8533-8554.
111. Otvos, L., Jr., Immunomodulatory effects of anti-microbial peptides. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **2016**, *63*, 257-277.

Chapitre 2 :

Matériels et méthodes

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

2.1. Greffage des peptides à la surface.....	62
2.1.1. Liste des peptides.....	62
2.1.2. Protocole de greffage et de clivage	63
2.2. Construction des films multicouches de polyélectrolytes	63
2.2.1. Liste des polycations	63
2.2.2. Liste des polyanions	64
2.2.3. Protocole de construction.....	66
2.3. Microbalance à cristal de quartz.....	67
2.3.1. Principe	67
2.3.2. Dispositif expérimental	69
2.4. Spectroscopies	70
2.4.1. UV-Visible.....	70
2.4.2. Fluorescence	71
2.4.2.1. <i>Théorie</i>	71
2.4.2.2. <i>Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes</i>	73
2.5. Microscopies	75
2.5.1. Microscopie à force atomique	75
2.5.1.1. <i>Théorie</i>	75
2.5.1.2. <i>Procédure expérimentale</i>	76
2.5.2. Microscopie confocale	77

2.5.2.1. Théorie	77
2.5.2.2. Recouvrement de fluorescence par photoblanchiment	78
2.6. Titration calorimétrique isotherme	80
2.6.1. Principe	80
2.6.2. Protocole expérimental	83
2.7. Caractérisation des peptides et polypeptides	83
2.7.1. Chromatographie en phase liquide à haute performance.....	83
2.7.2. Spectrométrie de masse	84
2.8. Mesure de l'activité antibactérienne	85
2.8.1. Culture bactérienne	85
2.8.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i>	87
2.8.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne en surface.....	88
2.8.3.1. Estimation de l'effet bactéricide	88
2.8.3.2. Estimation de l'effet bactériostatique.....	88
Références bibliographiques	90

2.1. Greffage des peptides à la surface

2.1.1. Liste des peptides

Le tableau 2.1 résume la liste des peptides étudiés. Les peptides utilisés ont été synthétisés par la société Pepmic, basée en Chine avec une pureté de 80%. Ils sont soit dissouts dans un tampon phosphate salin (PBS, pH = 7.4) dont la composition est la suivante : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ et 1.76 mM KH₂PO₄; soit dans un tampon contenant de l'acide citrique à 10 mM (pH = 4). Lorsque le peptide a une faible solubilité dans ce tampon (notamment les peptides comprenant des groupements fluorescents), il est dissout dans un premier temps dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) puis le PBS a été ajouté pour arriver à un ratio volumique DMSO / PBS de 10 / 90. Les peptides sont dissouts pour conduire à une gamme de concentrations de 0.1 à 1 mg.mL⁻¹.

Tableau 2.1 : Liste des peptides utilisés

Acronyme	Séquence	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Remarque
D	(DOPA)-K-(DOPA)-K-(DOPA)	812	Séquence d'accroche, mimant Mefp-5
T-CTL	TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR	2473	Séquence clivable par protéase Glu-C + Cateslytine
T-CTL-FRET	Dabcyl-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR-E(Edans)	3102	Quencher Dabcyl + Séquence clivable + Cateslytine + Fluorophore Edans
D-T-CTL	(DOPA)-K-(DOPA)-K-(DOPA)-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR	3267	Séquence d'accroche + Séquence clivable + Cateslytine
D-G10-T-CTL	(DOPA)-K-(DOPA)-K-(DOPA)-GGGGGGGGGG-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR	3838	Séquence d'accroche + Espaceur Polyglycine + Séquence clivable + Cateslytine
DGS3-T-CTL	(DOPA)-K-(DOPA)-K-(DOPA)-GSGSGS-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR	3700	Séquence d'accroche + Espaceur Glycine-Serine + Séquence clivable + Cateslytine

A l'exception du peptide « D » représentant la séquence d'accroche, ces peptides présentent tous une séquence dite de clivage : TLRGGE. Pour étudier ce clivage, l'enzyme endoprotéinase Glu-C spécifique à *Staphylococcus aureus* issu de la souche V8, de poids moléculaire Mw = 29 849 g.mol⁻¹ et

commercialisé par Sigma est utilisée. En effet, cette enzyme a la capacité de cliver la liaison peptidique situé au niveau de l'extrémité C-terminal de l'acide glutamique.

2.1.2. Protocole de greffage et de clivage

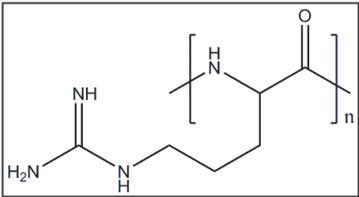
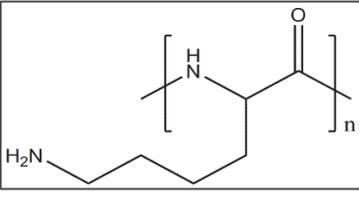
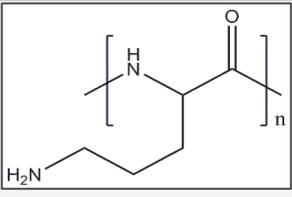
Le peptide est dissout à une concentration de 1 mg.mL^{-1} et est déposé de telle sorte que le résidu DOPA soit sous la forme catéchol (état non oxydé) ou quinone (état oxydé). Pour le dépôt du peptide à l'état oxydé, du périodate de sodium (NaIO_4) est ajouté de telle sorte que le ratio DOPA / NaIO_4 soit de 1 / 1. Le greffage à la surface a été étudié sur une surface recouverte d'oxyde de silice SiO_2 ou sur des surfaces de verre. L'enzyme endoprotéinase Glu-C a été ajouté avec une concentration de $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ lors des essais de clivage à la surface.

2.2. Construction des films multicouches de polyelectrolytes

2.2.1. Liste des polycations

Le tableau 2.2 résume la liste des polycations étudiés. Ceux-ci ont été synthétisés par la société Alamanda Polymers, basée aux Etats-Unis. Ils sont dissouts à 0.5 mg.mL^{-1} dans un tampon NaCl-TRIS ($\text{pH} = 7.4$), dont la composition est la suivante : 150 mM de chlorure de sodium et 10 mM de trishydroxyméthylaminométhane (TRIS). Ce tampon est filtré avec une membrane dont les pores ont un diamètre de $0.22 \text{ }\mu\text{m}$.

Tableau 2.2 : Liste des polycations utilisés

Nom	Acronyme	Formule	Nombre de résidus/ chaîne	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)
Poly(L-arginine)	PAR		10	2 100
			30	6 400
			100	20 600
			200	40 800
Poly(L-lysine)	PLL		10	1 600
			20	3 500
			30	5 400
			50	9 000
			100	17 300
			250	39 500
Poly(L-ornithine)	POR		30	5 900
			100	18 500
			250	44 700

Dans certains cas, le polycation a été fonctionnalisé avec un composé fluorescent, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Pour ce faire, le polycation a été dissout à 1 mg.mL⁻¹ dans le tampon NaHCO₃ (100 mM, pH = 8.3). Le composé FITC a été ajouté goutte à goutte avec un ratio molaire polycation / FITC égal à 1 / 2. La réaction de greffage s'est faite à température ambiante sous agitation pendant 3 h. La solution a ensuite été dialysée à 4 °C avec un bain de dialyse d'eau distillée, excepté le bain de la dialyse finale qui est le tampon NaCl-TRIS. La solution finale a été aliquotée avec une concentration de 0.5 mg.mL⁻¹.

2.2.2. Liste des polyanions

Le tableau 2.3 résume la liste des polyanions étudiés. L'acide hyaluronique a été synthétisé par la société Lifecore Biomedical tandis que les autres polyanions proviennent de la société Sigma. Les polyanions sont utilisés selon le même protocole que les polycations.

Tableau 2.3 : Liste des polyanions utilisés

Nom	Acronyme	Formule	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)	Poids moléculaire monomère (g.mol ⁻¹)
Acide alginique issu des algues brunes	ALG		240 000	176
Chondroïtine sulfate A issue de la trachée bovine	CSA			459
Acide Hyaluronique	HA		Entre 29 000 et 150 000	379
Héparine issue de la muqueuse porcine intestinale	HEP		18 000	597
Poly(acide L-glutamique)	PGA		Entre 50 000 et 100 000	129
Poly(4-styrène sulfonate)	PSS		70 000	206

2.2.3. Protocole de construction

Des lamelles de verre d'un diamètre de 12 mm et fabriquées par la société Knittel Glass ont été utilisées pour construire les films de polyelectrolytes. Ces lamelles sont nettoyées selon deux protocoles :

- « chimique » : les lamelles sont nettoyées avec une solution Hellmanex™ 2 % (v/v) pendant 30 minutes puis rincées avec de l'eau distillée et plongées dans une solution HCl 1 M pendant 5 minutes. Les lamelles sont rincées dans de l'eau distillée puis avec de l'éthanol et finalement séchées à l'air comprimé.
- « physique » : les lamelles sont nettoyées sous atmosphère présente à l'état plasma pendant 15 minutes (puissance du radiofréquenceur : 18 W). Le nettoyeur utilisé provient de la société Harrick Plasma.

Ces lamelles de verre sont ensuite trempées dans une solution de polycations, rincées avec le tampon NaCl-TRIS puis trempées dans une solution de polyanions. Le temps de dépôt est de 5 minutes et ce cycle est répété jusqu'à atteindre le nombre de bicouches polycation/polyanion désiré. Après construction, les films sont séchés et réhydratés dans le tampon NaCl-TRIS puis conservés immergés dans ce tampon à 4°C avant utilisation.

Pour la mesure de l'épaisseur et l'observation de l'homogénéité des films formés, ceux-ci ont été mis au contact d'une solution de 100 µL de polycation-FITC à 0.5 mg.mL⁻¹. Après mise en contact pendant quelques minutes, les films sont rincés avec le tampon NaCl-TRIS et observés par microscopie confocale.

Concernant les études de microbiologie, les lamelles de verre, après construction, ont été stérilisées par exposition aux rayons UV pendant 15 minutes.

2.3. Microbalance à cristal de quartz

2.3.1. Principe

La microbalance à cristal de quartz est une technique permettant de mesurer des quantités de matière déposées sur la surface d'un cristal de quartz. Cela permet de mesurer des masses très faibles (de quelques nanogrammes à quelques microgrammes par cm^2) par la variation de fréquence d'un cristal piézoélectrique, généralement en quartz. Le principe de la piézoélectricité repose sur le couplage entre un champ électrique et la déformation du matériau. Le cristal est composé de deux électrodes et d'une aire où l'échantillon à analyser est déposé. La différence de potentiel entre les électrodes provoque un champ électrique dans le quartz, d'où un déplacement mécanique transversal (mouvement de cisaillement) qui engendre la propagation d'une onde acoustique. Les modes de résonance de la fréquence fondamentale de l'onde parcourant le cristal obéissent à la relation suivante :

$$f_{2n+1} = \frac{(2n+1)c}{2h_0}$$

où h_0 est l'épaisseur du disque de quartz et c , la vitesse d'une onde dans le quartz ($c = 3340 \text{ m.s}^{-1}$).

Une légère variation de masse d'une des électrodes induit une légère baisse de fréquence de résonance du quartz. Cet effet a été modélisé par Sauerbrey¹ en 1959 pour aboutir à la relation entre la variation de masse Δm sur les électrodes et la variation Δf_ν de fréquence de résonance :

$$\Delta f_\nu = \frac{-2f^2}{A\rho_0 c} \Delta m = \frac{-\Delta m \nu}{C}$$

où $\rho_0 = 2650 \text{ kg.m}^{-3}$ est la masse volumique du quartz, ν l'ordre de l'harmonique, c la vitesse d'une onde acoustique dans le cristal quartz, A l'aire de recouvrement des électrodes et C la constante de Sauerbrey.

Cette relation montre que si le film déposé se comporte comme un film parfaitement rigide et solidaire du cristal, les rapports $\frac{\Delta f_\nu}{\nu}$ sont égaux entre eux.

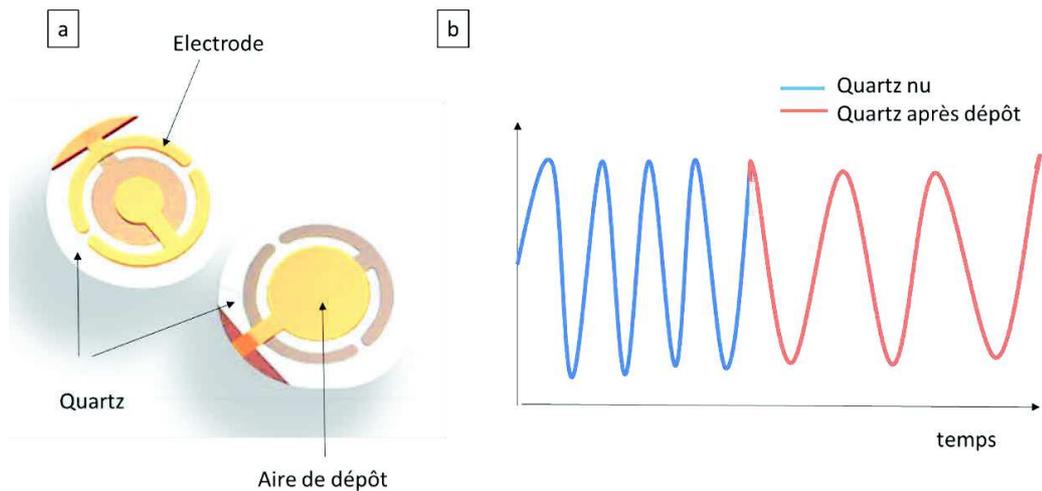


Figure 2.1 : **a)** Cristal de quartz piézoélectrique, **b)** représentation du changement de fréquence après dépôt sur le cristal de quartz.

Dans la relation proposée par Sauerbrey, la couche déposée est supposée avoir les mêmes propriétés mécaniques que le substrat. Mais à partir des années 1980, cette technique a été étendue à la mesure des propriétés viscoélastiques et de l'épaisseur d'un film dans un environnement liquide par la mesure de l'amortissement des vibrations dû à la dissipation de l'énergie dans le film déposé et le liquide environnant² : c'est la technique dite de "microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation". L'amortissement des vibrations est représenté par la mesure du facteur de dissipation D :

$$D = \frac{1}{\pi f \tau}$$

où f est la fréquence de résonance et τ le temps de relaxation caractérisant l'amortissement de la vibration.

Les films multicouches que nous étudions étant la plupart du temps hydratés, la relation de Sauerbrey ne peut plus s'appliquer pour l'estimation de la masse déposée à la surface du cristal. Les relations entre les caractéristiques physiques d'un film hydraté d'une part et les fréquences de résonance ainsi que les dissipations d'autre part, ont été déterminées par Voinova *et al.*³

Les propriétés viscoélastiques du film déposé sur le cristal sont modélisées par un élément de Kelvin-Voigt constitué par un ressort et un piston en parallèle. Les variations de fréquence de résonance et de dissipation sont données respectivement par les parties imaginaire et réelle de la fonction β , développée dans le travail de Voinova *et al.*³ et repris dans le travail de Höök *et al.*⁴ en considérant l'hypothèse que la couche déposée sur le cristal de quartz de masse volumique ρ_0 et d'épaisseur h_0 se comporte comme un film viscoélastique de module élastique de cisaillement μ_f , de

viscosité de cisaillement η_f , de masse volumique ρ_f et d'épaisseur d_f et est en contact avec un liquide de masse volumique ρ_l et de viscosité η_l :

$$\Delta f = \text{Im} \left(\frac{\beta}{2\pi\rho_0 h_0} \right)$$

$$\Delta D = -\text{Re} \left(\frac{\beta}{\pi f \rho_0 h_0} \right)$$

avec :

$$\beta = \xi_f \frac{2\pi f \eta_f - i\mu_f}{2\pi f} \frac{1 - \alpha e^{2\xi_f d_f}}{1 + \alpha e^{2\xi_f d_f}}$$

$$\alpha = \frac{\frac{\xi_f}{\xi_l} \frac{2\pi f \eta_f - i\mu_f}{2\pi f \eta_f} + 1}{\frac{\xi_f}{\xi_l} \frac{2\pi f \eta_f - i\mu_f}{2\pi f \eta_f} - 1}$$

$$\xi_f = \sqrt{-\frac{(2\pi f)^2 \rho_f}{\mu_f + i2\pi f \eta_f}}$$

$$\xi_l = \sqrt{i \frac{2\pi f \rho_l}{\eta_l}}$$

2.3.2. Dispositif expérimental

L'appareil que nous avons utilisé provient de la société Q-Sense, située en Suède. Il comporte une cellule contenant le cristal en quartz, une enceinte de mesure thermostatée, une pompe péristaltique et une unité électronique interfacée avec un ordinateur (Figure 2.2).

La fréquence fondamentale de résonance du cristal est de 5 MHz et les harmoniques $\nu = 3, 5, 7$ et 9 (15, 25, 35 et 45 MHz) ont été utilisées. La constante de Sauerbrey est de $17.7 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{Hz}^{-1}$ pour les cristaux utilisés⁵.

Une expérience de QCM consiste à introduire *in situ* un composé chimique dans un milieu liquide par injection avec un volume de $400 \mu\text{L}$ et un débit de $250 \mu\text{L.min}^{-1}$. Toutes les solutions sont dégazées avant injection afin d'éviter la formation de bulles d'air à l'intérieur de la cellule.

La QCM a ainsi permis de quantifier le dépôt de peptides à la surface du cristal de quartz et de suivre la construction des films multicouches.

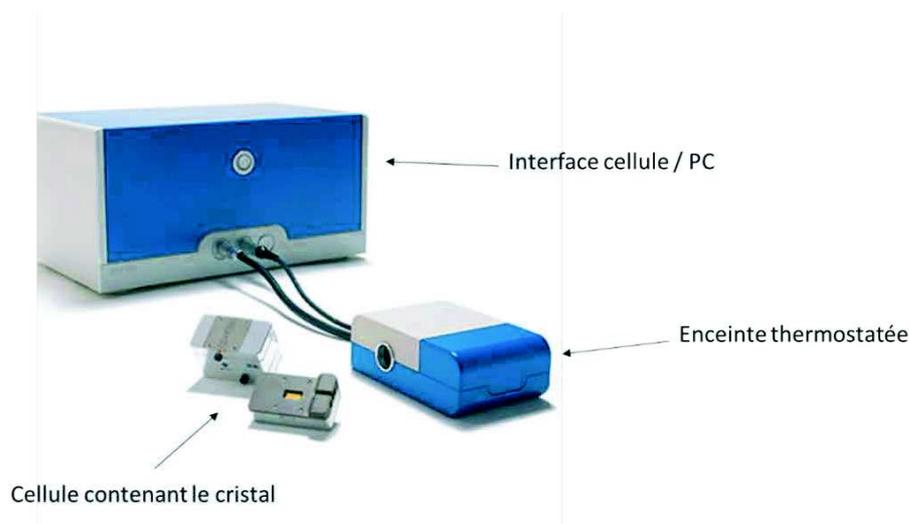


Figure 2.2 : Dispositif expérimental QCM

2.4. Spectroscopies

La spectroscopie est l'étude des rayonnements émis, diffusés ou absorbés par la matière. La longueur d'onde de ces rayonnements définit le type de spectroscopie : de la résonance magnétique nucléaire (longueur d'onde supérieure à 100 μm), aux rayonnements gamma (de l'ordre de 0.01 nm) en passant par la spectroscopie ultraviolet-visible et de fluorescence (de l'ordre de 10^2 nm).

2.4.1. UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible met en jeu des rayonnements dont la longueur d'onde est dans le domaine de l'ultraviolet (100 – 400 nm), du visible (400 – 750 nm) et du proche infrarouge (750 – 1400 nm). Soumis à ce rayonnement, les molécules sont susceptibles de subir une ou plusieurs transitions électroniques. Les composés organiques absorbent dans les régions visible et ultraviolette, notamment ceux ayant un haut pouvoir de conjugaison comme les cycles aromatiques.

Lors d'une mesure par spectrophotométrie, l'intensité lumineuse initiale (notée I_0) est mesurée ainsi que l'intensité lumineuse après passage dans la cuve contenant la molécule à étudier (notée I). Le rapport entre ces deux intensités est la transmittance T :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

La transmittance est reliée à l'absorbance A par la relation suivante :

$$A = -\log(T)$$

La spectroscopie UV-Visible est une technique d'analyse quantitative. En effet, l'absorbance mesurée peut être reliée à la concentration d'une entité chimique en solution grâce à la relation de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

où A représente l'absorbance mesurée, ε le coefficient d'extinction molaire (en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) dépendant de la nature chimique de l'entité et de la température, l la longueur du trajet optique dans la solution traversée (en cm) et C la concentration de l'entité (en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

2.4.2. Fluorescence

2.4.2.1. Théorie

La spectroscopie de fluorescence est basée sur le principe d'absorption et d'émission d'un rayonnement électromagnétique par un composé chimique (Figure 2.3). La première étape consiste à absorber un photon d'énergie $E_i = h\nu_{abs}$ où h représente la constante de Planck et ν_{abs} la fréquence du rayonnement absorbé. Les électrons du composé se trouvent alors dans un état électronique excité (noté S_1). La seconde étape correspond à la transition d'un état excité à un autre mais de plus faible énergie, liée à l'interaction entre le composé et son environnement et cette énergie est dissipée sous forme de chaleur par relaxation vibrationnelle. La dernière étape est le retour à l'état fondamental noté S_0 , par l'émission d'un photon d'énergie $E_f = h\nu_{em}$ où ν_{em} est la fréquence du rayonnement émis.

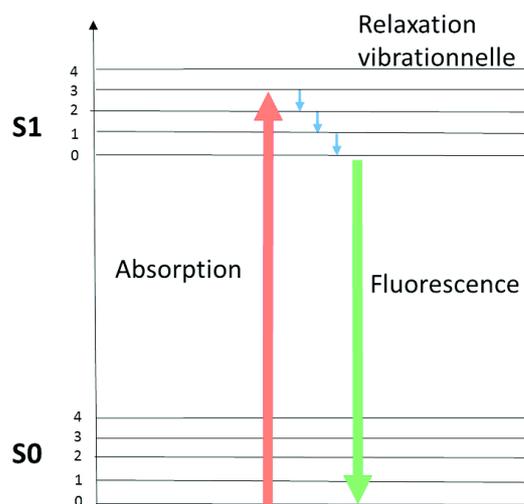


Figure 2.3 : Schéma du mécanisme de fluorescence

Le phénomène de relaxation vibrationnelle provoque un déplacement de l'énergie lumineuse émise par rapport à l'énergie absorbée. On parle alors de longueur d'onde « d'excitation » et « d'émission ». Les molécules fluorescentes contiennent souvent des cycles aromatiques et leur structure permet d'être liée de manière covalente à d'autres molécules sans perdre leur propriété de fluorescence. Elles jouent alors le rôle de sonde ou de marqueur et peuvent être utilisées pour l'étude de processus biochimiques (détection de bactéries sur une surface, par exemple) mais aussi chimiques (détection de molécules au sein d'un film multicouche, par exemple). Le composé isothiocyanate de fluorescéine, ou FITC, est une des molécules fluorescentes les plus utilisées avec un maximum d'excitation aux alentours de 490 nm et d'émission aux alentours de 520 nm. La structure moléculaire de FITC est représentée en figure 2.4.

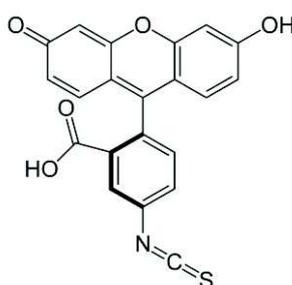


Figure 2.4 : Formule chimique de l'isothiocyanate de fluorescéine

2.4.2.2. Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

Le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) se produit entre un groupement donneur et un groupement accepteur situé à faible distance du groupement donneur. Le groupement « donneur » est un groupement aux propriétés fluorescentes ayant un spectre d'excitation et d'émission défini. Le groupement « accepteur » est un groupement n'émettant pas de fluorescence mais étant capable d'absorber des rayonnements électromagnétiques. Le spectre d'absorption de l'accepteur recouvrant au moins partiellement le spectre d'émission du donneur, un processus de transfert d'énergie sans émission de lumière a alors lieu entre les groupements donneur et accepteur. Une très faible émission de fluorescence, voire aucune, est alors émise par le groupement donneur.

La qualité de transfert dépend alors de deux paramètres :

- le recouvrement entre le spectre d'absorption de l'accepteur et le spectre d'émission du donneur. Ce recouvrement peut être quantifié par l'intégrale de recouvrement $J(\lambda)$:

$$J(\lambda) = \int f_D(\lambda)\epsilon_a(\lambda)\lambda^4 d\lambda$$

où f_D est l'intensité de fluorescence du donneur à une longueur d'onde donnée, ϵ_a le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur.

- la distance entre donneur et accepteur. La distance pour laquelle l'efficacité de transfert est de 50% est donnée par le rayon de Förster, noté R_0 :

$$R_0 = (10^{-3} k^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \times 9730$$

où $J(\lambda)$ est l'intégrale de recouvrement, n l'indice de réfraction du milieu, Q_D le rendement quantique du donneur en l'absence d'accepteur et k le facteur d'orientation qui est fonction de l'orientation relative du donneur et de l'accepteur.

La technique FRET est couramment employée pour étudier le clivage enzymatique d'un peptide. *Komarova et al.* ont par exemple observé par FRET le clivage d'un peptide par l'enzyme endoprotéinase Glu-C⁵ tandis que *Guo et al.* se sont intéressés au clivage d'une neurotoxine par utilisation du groupement accepteur DABCYL et du fluorophore EDANS sur celle-ci⁷.

Le groupement accepteur DABCYL, ou acide 4-((4-(diméthylamino)phényl)azo)benzoïque, a une longueur d'onde d'absorption de $\lambda_{\text{abs}} = 472\text{nm}$ tandis que le fluorophore EDANS ou acide 5-((2-

aminoéthyl)amino)naphthalène-1-sulfonique a une longueur d'onde d'excitation de $\lambda_{ex} = 340$ nm et d'émission de $\lambda_{em} = 490$ nm. Lorsque les deux groupements sont situés à une distance inférieure à 10 nm, l'énergie émise par EDANS est absorbée par DABCYL, ce qui a pour résultat une faible émission de fluorescence.

Ainsi, dans le cadre du travail décrit dans ce manuscrit, le clivage du peptide par l'enzyme endoprotéinase Glu-C a été suivi. La figure 2.5 représente le clivage du peptide T-CTL-FRET par l'enzyme endoprotéinase Glu-C. Dans les expériences en solution, le peptide T-CTL-FRET a été mis en contact avec l'enzyme selon un ratio $\frac{Peptide}{Enzyme}$ variant de 4 à 50 (w/w) et avec une concentration de peptide fixe en solution de 0.1 mg.mL^{-1} . Le suivi du clivage s'est effectué à 37°C par mesure de la fluorescence émise à 490 nm. Pour les expériences en surface, une première couche de peptide D a été déposée sur une surface en verre, avec ou sans présence de sodium periodate. Le peptide T-CTL-FRET a ensuite été déposé sur cette surface, et après rinçage, la surface traitée est mise en contact avec une solution contenant l'enzyme endoprotéinase Glu-C à $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. La fluorescence émise en solution à 490 nm est suivie au cours du temps, et ce, à 37°C .

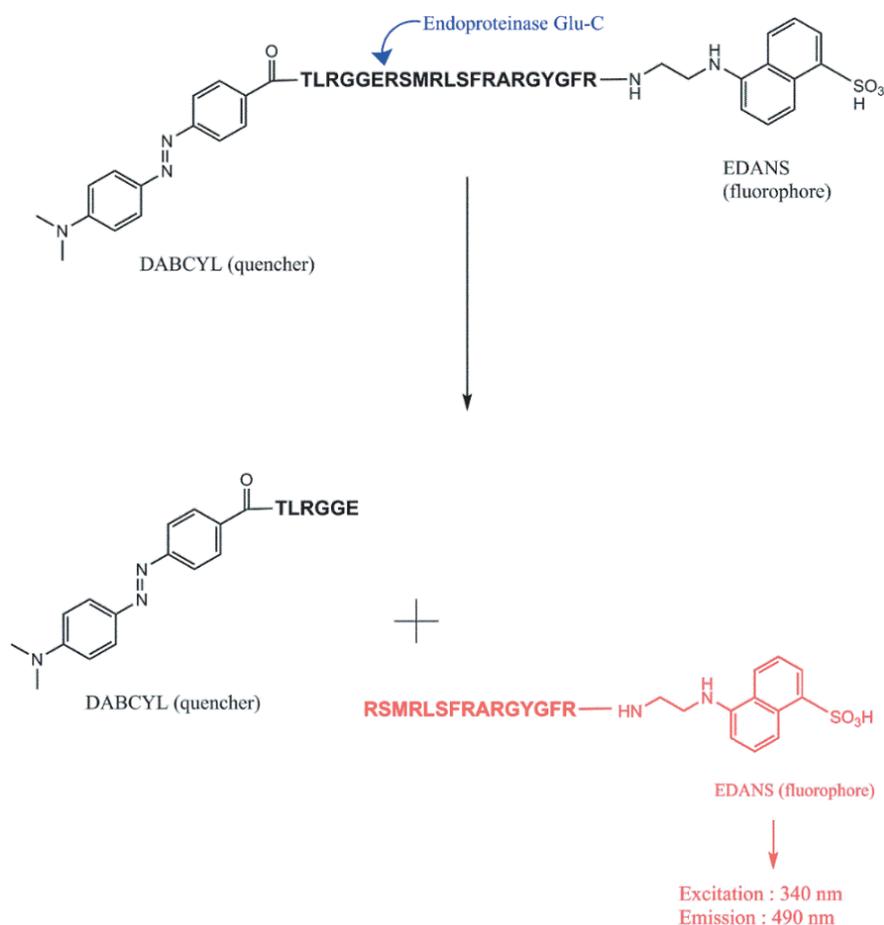


Figure 2.5 : Mécanisme de clivage entre le peptide T-CTL-FRET et l'enzyme endoprotéinase Glu-C.

2.5. Microscopies

2.5.1. Microscopie à force atomique

2.5.1.1. Théorie

La microscopie à force atomique (ou AFM) a été inventée en 1986 par Gerd Binnig, Calvin Quate et Christoph Gerber. Le principe repose sur la mesure de l'interaction de deux objets distants l'un de l'autre. En effet, deux objets à distance sont d'une part « attirés » l'un par l'autre, c'est l'interaction attractive liée aux interactions de Van der Waals, mais ils se repoussent également, c'est l'interaction répulsive, liée au principe d'exclusion de Pauli. Ces deux forces ont une intensité dépendante de la distance entre les deux objets.

Pour mesurer ces forces d'interaction, un microlevier sur lequel repose une pointe est utilisé. Ce microlevier possède une constante de raideur, lui permettant ainsi une certaine flexion. À l'approche d'une surface, les forces entre la pointe et l'échantillon entraînent une déviation du levier, provoquant ainsi une déflexion. Cette déflexion suit alors la loi de Hooke. La force mesurée a ainsi pour relation :

$$F = -k_c \Delta d$$

avec k_c la constante de raideur du levier et Δd , sa déflexion.

La mesure de la déflexion du cantilever se fait de manière optique. Un faisceau laser est dirigé vers l'extrémité du microlevier et réfléchi vers un système de photodiode circulaire divisée en quatre cadrants (Figure 2.6). La différence d'éclairement entre ces cadrans est proportionnelle à la déflexion angulaire du microlevier. Ce signal est ensuite traduit en signal électrique.

Grâce à l'utilisation de tubes piézoélectriques permettant le déplacement de l'échantillon dans les trois directions, l'AFM permet une mesure en trois dimensions. L'obtention d'images topographiques de la surface peut se faire en maintenant la force d'interaction pointe-échantillon constante au cours du balayage de la zone étudiée. Si la pointe balaie la surface à hauteur constante, elle risque d'être endommagée ou d'endommager l'échantillon : il existe donc un système de rétroaction qui permet d'ajuster la distance entre la pointe et l'échantillon. Le signal récupéré par la photodiode est comparé à un signal de consigne et un signal d'erreur est généré. Celui-ci est envoyé au tube piézoélectrique et a pour effet de provoquer des déplacements verticaux de l'échantillon. Ce

sont ces déplacements verticaux qui sont enregistrés et utilisés pour la création d'une image qui reflète le relief de la surface.

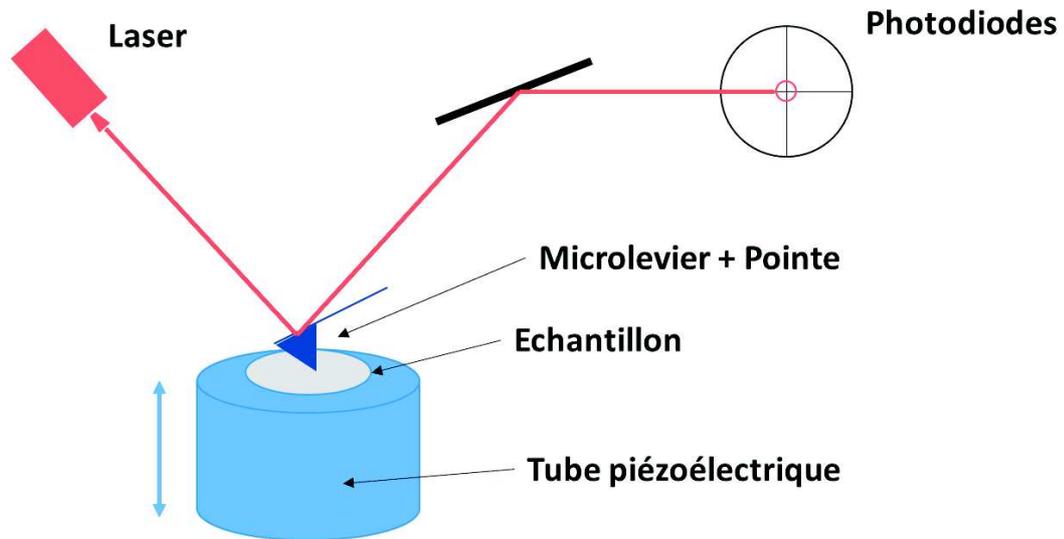


Figure 2.6 : Schéma de principe de la microscopie à force atomique (AFM)

L'avantage principe de l'AFM est la mesure à l'échelle nanométrique. En effet à cette échelle apparaissent des phénomènes de diffraction qui rendent l'observation de détails de moins de quelques centaines de nanomètres impossible par microscopie optique classique.

2.5.1.2. Procédure expérimentale

La microscopie à force atomique a été utilisée afin d'observer l'aspect des peptides déposés à la surface de cristaux en quartz, recouverts de SiO_2 . Pour ce faire, l'appareil Nanoscope III (Digital Instruments, USA) a été utilisé et équipé de cantilevers en silicone et non conducteur (modèle MLCT, Bruker, USA), avec une constante de raideur de 0.01 N.m^{-1} . Les expériences AFM ont été réalisées dans un milieu liquide, correspondant au tampon utilisé lors des expériences réalisées par QCM-D. Les images obtenues ont été scannées avec une fréquence de 0.5 Hz et une résolution de 512×512 pixels.

2.5.2. Microscopie confocale

2.5.2.1. Théorie

La microscopie confocale a été inventée et brevetée par Marvin Minsky en 1957. Le principe de cette technique repose sur l'utilisation d'un diaphragme confocal, situé avant le détecteur et ne laissant passer que la fluorescence émise au niveau du plan focal. Les images obtenues sont alors des « coupes » d'un échantillon et peuvent être obtenues à différents niveaux de l'échantillon. Le diaphragme confocal, ou encore « pinhole » (trou d'épingle) joue un rôle essentiel pour contrôler la résolution spatiale. En effet, le contrôle du diamètre d'ouverture du diaphragme permet d'ajuster la résolution en fluorescence mais aussi l'épaisseur du plan focal observé.

La lumière laser est utilisée dans la microscopie confocale comme source d'excitation des fluorophores. Le faisceau laser d'excitation est tout d'abord réfléchi par un miroir dichroïque puis envoyé sur des miroirs de balayage qui, en pivotant sur leur axe, vont ainsi balayer l'ensemble du plan focal désiré. La fluorescence émise suit alors le même chemin et parvient au détecteur (photomultiplicateur) via successivement le miroir dichroïque et le diaphragme confocal.

Le signal électrique émis par le photomultiplicateur est amplifié puis envoyé à l'ordinateur où il est numérisé. L'unité électronique interfacée avec le PC contrôle les miroirs de balayage, la platine galvanométrique, contrôlant le déplacement en z de la platine, et l'ouverture du diaphragme confocal.

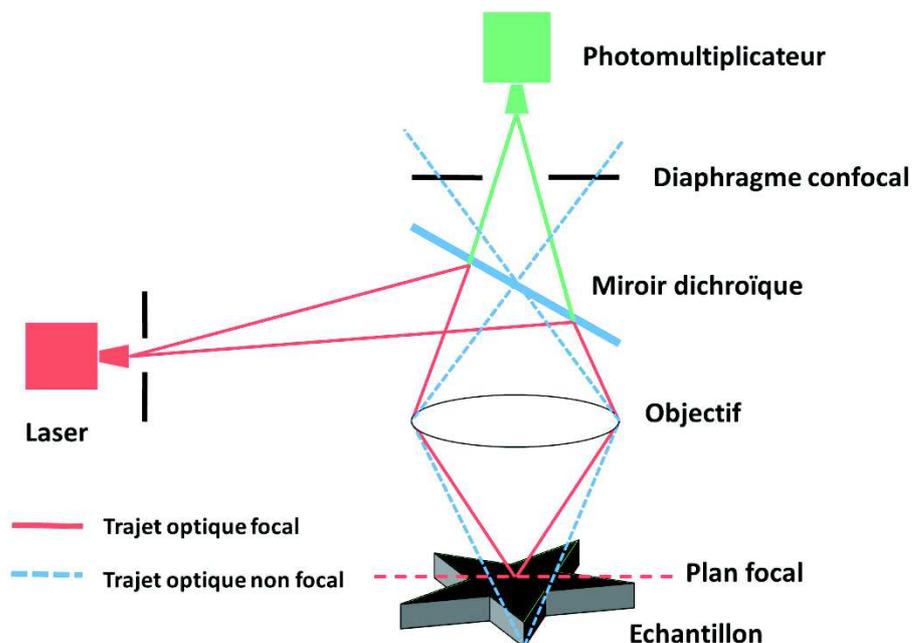


Figure 2.7 : Schéma de principe d'un microscope confocal

L'utilisation simultanée de plusieurs sondes fluorescentes requiert la détection du signal de chaque sonde séparément, ce qui demande une distinction entre les spectres d'excitation et d'émission. Des miroirs dichroïques aux caractéristiques dépendant du fluorophore sont placés sur les trajets optiques, permettant la séparation des différentes longueurs d'ondes.

La microscopie confocale a été très couramment utilisée pour observer la structure et la construction des films par utilisation de polycations et/ou de polyanions marqués par un groupement fluorophore^{8,9}.

Les principaux avantages du microscope confocal sont :

- une résolution en (x,y) améliorée d'environ 30 % par rapport à un microscope conventionnel;
- une mesure en z d'un minimum de 500 nm, qui permet ainsi d'analyser et de comparer des objets de différentes épaisseurs;
- une mesure en simultanée avec différentes sondes fluorescentes;
- le suivi d'un phénomène en fonction du temps.

Le principal désavantage de la microscopie confocale réside dans l'utilisation d'une source lumineuse laser, ce qui a pour effet d'augmenter l'effet de photoblanchiment. Mais ce phénomène a permis le développement d'une technique couramment utilisée en biologie et en science des matériaux : le recouvrement de fluorescence par photoblanchiment, ou FRAP.

2.5.2.2. Recouvrement de fluorescence par photoblanchiment

Une molécule fluorescente, en présence d'un rayonnement, peut émettre de la fluorescence mais aussi participer à une réaction photochimique. Cette réaction photochimique peut ainsi modifier la structure du composé et celui-ci perd alors sa propriété de fluorescence. La probabilité d'altérer le composé chimique sera d'autant plus importante que le cycle d'exposition à une source lumineuse est long.¹⁰ C'est le terme photoblanchiment qui est alors utilisé.

Dans les expériences de recouvrement de fluorescence par photoblanchiment (FRAP), les composés fluorescents sont photoblanchis sur une zone généralement micrométrique bien définie grâce à l'utilisation du laser réglé à très forte puissance. Les composés fluorescents présents dans la zone non photoblanchie et qui peuvent diffuser à l'intérieur de la zone exposée seront à l'origine du phénomène de recouvrement de fluorescence. L'ensemble du processus peut être suivi par acquisition d'images au cours du temps en utilisant le laser à une puissance conventionnelle, généralement beaucoup plus faible que celle nécessaire au photoblanchiment.

Le recouvrement de fluorescence est considéré comme étant dû à la diffusion brownienne des molécules mobiles si :

- le mouvement des molécules dans le fluide n'est soumis à aucune interaction, exceptée la rencontre avec d'autres molécules,
- toutes les molécules mobiles ont le même coefficient de diffusion,
- le profil d'intensité lumineuse initial présente une forme cylindrique parfaite (cas d'une zone photoblanchie circulaire).

Considérant cette hypothèse, l'intensité normalisée dans la zone exposée au cours du temps peut être reliée au coefficient de diffusion D et à la fraction de molécules mobiles p ^{11,12}. La figure ci-dessous représente l'intensité de fluorescence normalisée pour une zone photoblanchie avec une intensité de fluorescence initiale F_i . Après photoblanchiment, la fluorescence de cette zone évolue d'une intensité F_0 vers une intensité F_∞ en fonction du temps. La proportion de chaînes mobiles p peut alors être définie selon la relation suivante :

$$p = \frac{F_\infty - F_0}{1 - F_0}$$

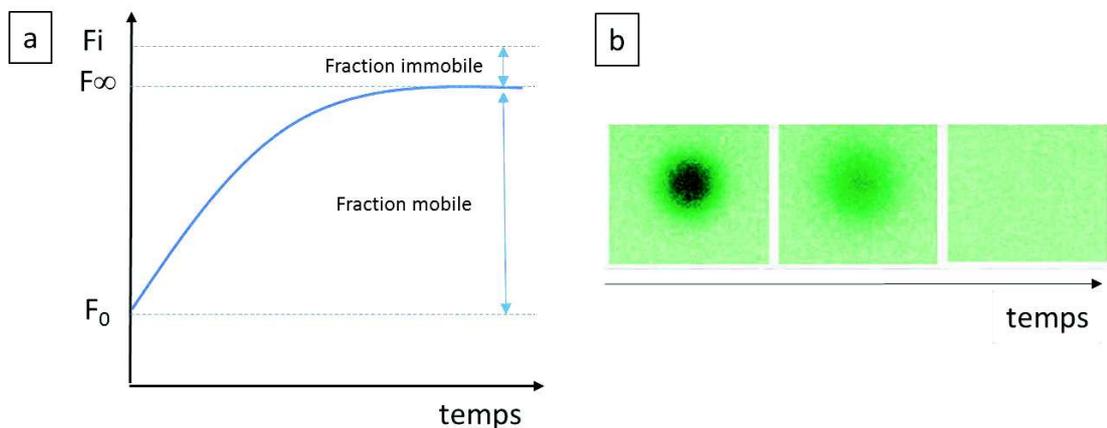


Figure 2.8 : **a)** Intensité de fluorescence normalisée pour une zone photoblanchie au cours du temps. **b)** Observation dynamique d'une zone photoblanchie.

La cinétique de recouvrement de fluorescence de la zone blanchie permet ainsi de déterminer le coefficient de diffusion D par mesure du rapport de l'intensité lumineuse de la zone blanchie à celle éloignée de la zone blanchie de même aire. Ce rapport correspond au rapport de concentrations de molécules fluorescentes dans les mêmes zones. Dans le cas idéal, le rapport s'exprime par :

$$\frac{c(\tau)}{c_0} = \alpha + p(1 - \alpha)e^{-\frac{2}{\tau}} \left[I_0\left(\frac{2}{\tau}\right) + I_1\left(\frac{2}{\tau}\right) \right]$$

$$\tau = \frac{4Dt}{a^2}$$

où a est le rayon de la zone blanchie, α le rapport d'intensité entre la zone à l'issue de l'étape de blanchiment et une zone non blanchie, D le coefficient de diffusion, p la proportion de chaînes mobiles et I_0, I_1 les fonctions de Bessel modifiées de première espèce et d'ordre 0 et 1¹³.

La technique FRAP a été utilisée dans ce manuscrit pour déterminer la mobilité des polycations au sein des films. La proportion de molécules mobiles p ainsi que le coefficient de diffusion D a été mesurée pour les films multicouches contenant la molécule Polycation-FITC. Une lamelle de verre recouverte du film est introduite dans un porte-échantillon conçu au laboratoire et immergée dans 200 μ L de tampon NaCl-TRIS. Une zone circulaire (4,4 μ m de diamètre pour une image de 35 x 35 μ m ou 10,6 μ m de diamètre pour une image de 85 x 85 μ m) est blanchie pendant 700 ms à l'aide du faisceau laser à haute puissance émettant à la longueur d'onde de 488 nm. Le recouvrement de fluorescence de la zone blanchie est suivi au cours du temps. Dans le même temps, la fluorescence de trois autres zones circulaires est suivie. L'intensité de ces trois zones est utilisée afin de normaliser l'intensité de la zone blanchie.

2.6. Titration calorimétrique isotherme

2.6.1. Principe

Toute réaction chimique ou changement physique s'accompagne obligatoirement d'un changement de chaleur ou d'enthalpie. La détermination de la chaleur prise de l'environnement (processus endothermique) ou la chaleur émise dans le milieu environnant (processus exothermique) est reliée à la quantité de matière présente, à la stœchiométrie de la réaction mais aussi au changement d'enthalpie ΔH engendré par la réaction. La titration calorimétrique isotherme (ITC) est une technique permettant de quantifier l'énergie d'interaction entre deux molécules par échange thermique. L'avantage de cette technique réside dans le fait qu'elle ne nécessite pas de modification chimique ou physique des deux molécules impliquées dans la liaison.

Le microcalorimètre est composé des éléments suivants (Figure 2.9) :

- **une cellule de référence** : cellule ne contenant que de l'eau
- **une cellule de mesure** : cellule contenant une des deux molécules à étudier

- **une seringue d'injection**: la seringue contient le ligand et est reliée à un dispositif permettant d'injecter automatiquement le volume désiré dans la cellule de mesure. Cette seringue dispose d'un bras rotatif permettant simultanément l'injection et l'agitation.
- **une enceinte thermostatée** contenant les deux cellules : Un dispositif détecte la différence de température entre les cellules lors de la formation de la liaison et envoie un signal aux dispositifs de chauffage qui compensent cette différence pour ramener les cellules à la même température.

Lors de la mesure, les molécules dans la cellule interagissent avec les ligands ajoutés. Ces ligands sont injectés fraction par fraction et à chaque ajout de ligand correspond un échange thermique dépendant de l'interaction molécule-ligand. Chaque variation de température mesurée va être alors compensée par le thermostat afin de maintenir la température constante dans la cellule de mesure. Le signal brut obtenu est ainsi la puissance (en cal/s ou J/s) nécessaire au thermostat pour maintenir la température de la cellule de mesure constante. La chaleur produite ou absorbée par la réaction est calculée par intégration de la puissance en fonction du temps de chaque injection.

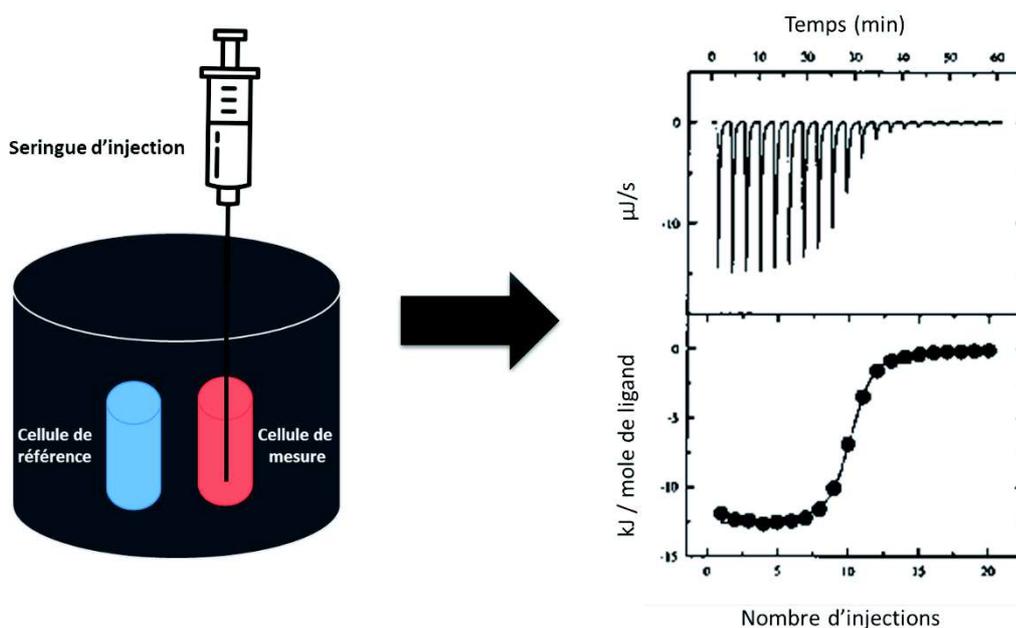


Figure 2.9 : Schéma de principe d'un microcalorimètre et résultats obtenus

Lors de l'ajout du ligand, la chaleur dégagée par injection Q_{inj} peut être déterminée selon la relation suivante ¹⁴ :

$$Q_{inj} = \Delta H \times [L]_{inj} \times V_{inj}$$

avec ΔH , l'enthalpie de la réaction, $[L]_{inj}$ la concentration en ligand injecté et V_{inj} le volume injecté. Cette relation n'est cependant valable que si ligands et molécules sont dissouts dans le même

solvant. En outre, la dissolution du ligand provoque une variation de chaleur. La quantité de chaleur Q_{int} liée à l'interaction molécule-ligand est corrigée par la relation suivante :

$$Q_{int} = Q_{inj} - Q_{blanc}$$

où Q_{blanc} représente la variation de chaleur lors de l'ajout du ligand dans le milieu seul. Cette quantité de chaleur est calculée par la mesure de la différence de température lors de l'ajout du ligand dans le solvant uniquement.

La représentation de la quantité de chaleur générée ou absorbée est une somme de toutes les chaleurs produites lorsqu'une fraction de ligand est ajoutée. Au début de la réaction, tous les ligands ajoutés réagissent avec les molécules présentes en large excès. A l'approche du point d'équivalence, la quantité de molécules disponibles pour chaque ligand ajouté diminue considérablement. Après passage au point d'équivalence, la quantité de titrant ajouté est alors en excès et la quantité de chaleur générée est liée uniquement à la dissolution du ligand dans le milieu. La stœchiométrie n de la réaction est alors déterminée par la position du point d'équivalence (Figure 2.10).

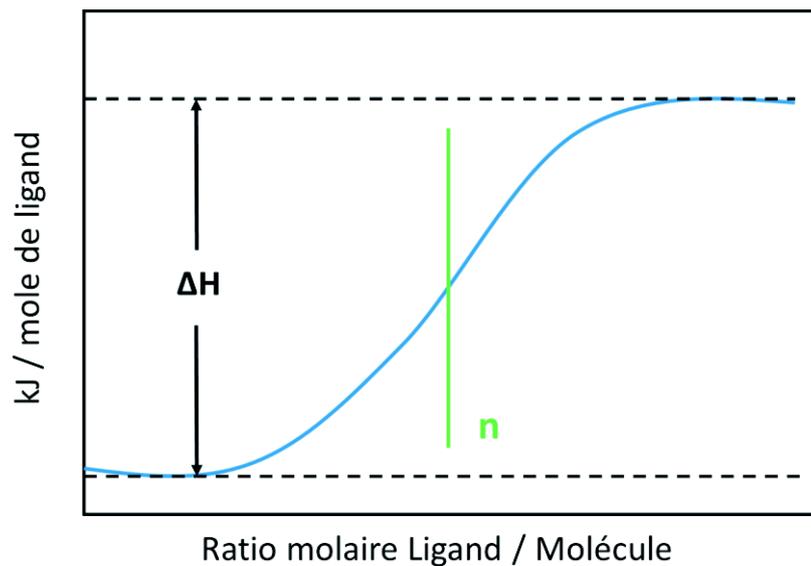


Figure 2.10 : Détermination des paramètres thermodynamiques d'une interaction molécule-ligand

2.6.2. Protocole expérimental

Dans notre travail, la titration calorimétrique isotherme a permis d'étudier l'interaction entre la PAR30 et les différents polyanions. Les expériences ont été réalisées à 25°C. La PAR30 et les polyanions ont été dissouts séparément dans le tampon NaCl-TRIS. 250 μL de solution de PAR30 à 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ est placé dans la seringue. La cellule de référence contient 1 mL d'eau Mill-Q tandis que la cellule de mesure contient 1 mL de la solution de polyanions. La concentration en polyanions est déterminée de telle sorte qu'après injection totale de la solution de PAR30 dans la cellule, le ratio arginine / résidus anioniques a pour valeur 2,5. Chaque titration consiste en une série de 25 injections de 10 μL dans la cellule de mesure, avec un temps d'attente de 600 s entre deux injections successives. La variation de température associée à la dissolution de la PAR30 dans le tampon NaCl-TRIS a été mesurée dans les mêmes conditions, conduisant à une variation de chaleur moyenne de -20 μJ par injection. Cette contribution a été soustraite des aires des pics dans le thermogramme avant calcul.

2.7. Caractérisation des peptides et polypeptides

2.7.1. Chromatographie en phase liquide à haute performance

La chromatographie en phase liquide à haute performance, ou HPLC, est une technique analytique permettant de séparer différents composés chimiques présents dans un liquide. Son principe repose sur l'affinité des composés envers une phase mobile et une phase stationnaire. L'échantillon à analyser est injecté dans une colonne remplie d'une phase stationnaire. Un éluant, composé de deux solvants miscibles, est ensuite injecté dans la colonne en continu avec un gradient de composition.

La recherche d'une bonne séparation des composés chimiques a mené à la création de phases stationnaires de natures et de structures très variées parmi lesquelles le gel de silice. Pour diminuer la polarité du gel de silice, des groupements hydrophobes sont greffés sur les fonctions silanols libres. Des phases mobiles polaires sont donc utilisées pour l'élution et la séparation des composés.

Comme les gels de silice greffés présentent une mauvaise mouillabilité, l'eau ne doit pas être utilisée seule au risque de provoquer un dégreffage des chaînes. La phase mobile est par conséquent une phase polaire hydro-organique contenant de l'eau et un modificateur organique moins polaire qui ne doit pas, ou très peu, absorber dans l'intervalle de longueurs d'ondes choisit pour l'analyse. Le méthanol et l'acétonitrile sont les modificateurs les plus utilisés, d'une part pour leur force d'élution

supérieure à celle de l'eau en phase inverse mais aussi parce qu'ils forment avec l'eau un mélange de viscosité moyenne, ce qui évite l'augmentation de la pression en tête de colonne.

La polarité de la phase mobile conditionne aussi l'ordre et le temps d'élution. Avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions, les composés polaires sont assez difficiles à séparer entre eux tandis que les composés apolaires, fortement retenus, tardent à migrer. Dans le cas où plusieurs composés de polarités différentes sont présents, un gradient d'élution est réalisé par modification de la polarité du solvant en cours d'analyse pour obtenir la meilleure séparation possible. En phase inverse, on diminue progressivement la concentration en eau (polaire) au profit du modifiant choisi (moins polaire).

L'appareil HPLC est composé d'un réservoir de solvants, d'une pompe d'élution, d'un système d'injection, d'une colonne thermostatée et d'un détecteur pour repérer les produits à la sortie de la colonne. Le détecteur utilisé durant cette étude est de type UV-visible, mesurant l'absorbance à 210 nm, correspondant à la longueur d'onde des liaisons peptidiques. Le spectre obtenu représente la quantité détectée par UV-Visible en fonction du temps.

La chromatographie en phase liquide à haute performance a été utilisée dans ce manuscrit afin de séparer les différents composés obtenus lors des études de clivage du peptide par l'enzyme. Elle a été utilisée en phase inverse. Pour ce faire, un gradient d'élution a été utilisé en partant d'un solvant H₂O avec de l'acide trifluoroacétique à 0,1 % vers un solvant acétonitrile avec de l'acide trifluoroacétique à 0,1%.

2.7.2. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique permettant d'identifier des composés chimiques en fonction de leur masse. C'est une méthode destructive, basée sur le principe de l'ionisation d'un composé en phase gazeuse. Les composés ionisés sont alors séparés en fonction de leur rapport masse / charge (m/z). Un spectromètre de masse comporte une source d'ionisation, un analyseur séparant les composés selon leur rapport m/z , un détecteur amplifiant le signal et une interface détecteur / PC traitant le signal obtenu.

L'instrument utilisé est un spectromètre de masse de type MALDI-TOF, c'est-à-dire couplé à une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) et d'un analyseur de temps de vol (TOF). La technique MALDI consiste à mélanger l'échantillon à analyser avec une matrice composée de molécules et de solvant. Ce mélange est ensuite déposé sur une surface. Le solvant s'évapore, laissant une matrice cristallisée avec les analytes uniformément répartis. La matrice permet d'absorber

l'énergie du laser et de la transmettre ensuite aux analytes, empêchant ainsi la dégradation de l'échantillon par la puissance du laser. L'analyseur TOF consiste à appliquer un champ électrique permettant d'accélérer les ions obtenus et de les séparer selon leur rapport m/z . C'est le temps mis par une particule pour atteindre le détecteur qui est mesuré.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF a été utilisée dans notre travail afin d'identifier les différents composés obtenus lors des études de clivage du peptide par l'enzyme et ensuite séparés par HPLC.

2.8. Mesure de l'activité antibactérienne

2.8.1. Culture bactérienne

Les bactéries sont étudiées dans des milieux de culture composés d'un mélange de substrats nutritifs (acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres...), d'un tampon pour éviter les variations importantes du pH, de sels minéraux et de vitamines. Il est possible d'ajouter d'autres facteurs de croissance (sang, protéines, hémoglobine, vitamines). Les milieux de culture sont de nature solide, semi-solide ou liquide.

Nous avons principalement utilisé les souches *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA, ATCC BAA-44), *Micrococcus luteus* (*M. luteus*, ATCC 9341), *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, ATCC 27853), provenant de la société ATCC, basée aux Etats-Unis. La culture de ces souches est réalisée dans le milieu Mueller – Hinton – Broth (MHB) dont la composition est indiquée dans le tableau 2.4. Dans notre cas, aucun facteur de croissance n'a été ajouté. Cette souche est d'abordensemencée sur des milieux solides avec MHB contenant de l'agar afin de former des colonies (Figure 2.11).

Tableau 2.4 : Composition du milieu Mueller – Hinton – Broth

Ingrédients	Concentration (g.L ⁻¹)
Infusion solide de bœuf	2
Amidon	1.5
Caséine	17.5

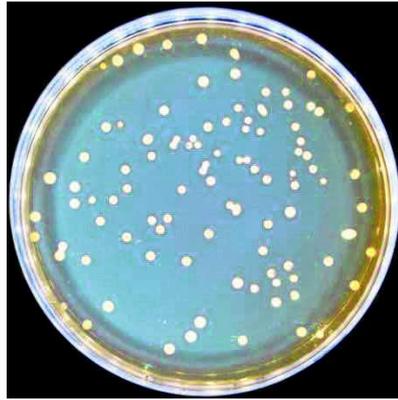


Figure 2.11 : Colonies de bactéries formées sur une boîte de pétri contenant le milieu de culture solide.

Le milieu MHB est couramment utilisé pour déterminer la concentration minimale inhibitrice et bactéricide (CMI et CMB) des composés chimiques. En effet, ce milieu possède une faible quantité de thymine, de thymidine, d'acide p-aminobenzoïque et ses analogues, qui sont susceptibles d'interagir avec certaines molécules antimicrobiennes. De plus, l'amidon qu'il contient permet d'absorber les métabolites toxiques produits par les bactéries.

La croissance bactérienne s'effectue en milieu liquide. Il existe quatre phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance (Figure 2.12) :

- **phase de latence** : il n'y a aucune division cellulaire. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat;
- **phase de croissance exponentielle** : le taux de croissance est au maximum et le temps de division est le plus court;
- **phase maximale stationnaire** : le taux de croissance devient nul. La population de bactérie mourante est compensée par celles qui se multiplient. Il y a épuisement du milieu de culture et accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries;
- **phase de décroissance** : toutes les ressources nutritives sont épuisées et la quantité de métabolites toxiques augmente. La population de bactérie mourante augmente sans être compensée.

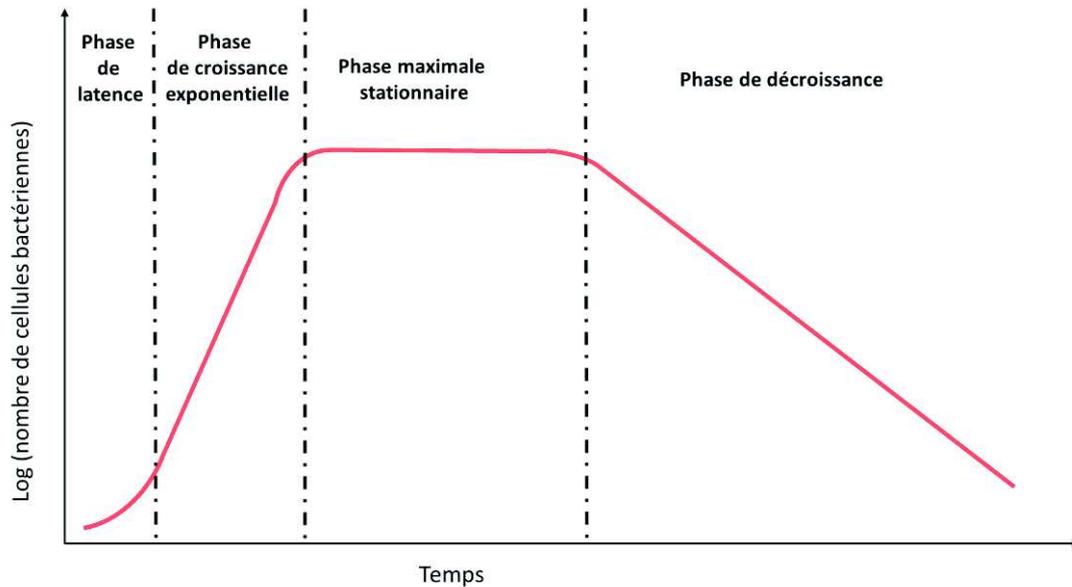


Figure 2.12 : Phases de croissance bactérienne

La pré-culture bactérienne consiste à mettre les souches en culture afin d'atteindre la phase stationnaire lors de la croissance bactérienne. Elle est réalisée par inoculation d'une colonie dans du milieu de culture liquide. Un tube témoin contenant du milieu sans colonie est également réalisé, afin de s'assurer de la stérilité du milieu utilisé. L'ensemble est placé en incubateur à 37 °C sous agitation. La concentration bactérienne est ensuite ajustée à 8.10^5 CFU.mL⁻¹ avant utilisation. Celle-ci est déterminée par mesure de l'absorbance à 620 nm (turbidité), sachant que $A_{620} = 1$ correspond à une concentration bactérienne de 8.10^8 CFU.mL⁻¹.

2.8.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro*

La concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une entité désigne la plus petite concentration qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37°C tandis que la concentration minimale bactéricide (CMB) désigne la plus petite concentration ne laissant subsister que 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. On parle de molécules bactéricides quand la CMB est au maximum 4 fois plus importante que la CMI ¹⁵.

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de nos peptides et polypeptides, ceux-ci ont été mis en contact à différentes concentrations avec une suspension bactérienne dans le milieu de culture à 37°C. Au bout de 24h, l'absorbance à 620 nm a été mesurée. Ainsi, le pourcentage de croissance bactérienne est mesuré pour chaque concentration d'entité selon la relation suivante :

$$\% \text{ croissance bactérienne} = \left(\frac{A_{620} \text{échantillon} - A_{620} \text{contrôle positif}}{A_{620} \text{contrôle négatif} - A_{620} \text{contrôle positif}} \right) \times 100$$

Le contrôle négatif correspond à la suspension bactérienne seule, qui est fixé à 100% de croissance bactérienne. Le contrôle positif est composé de 90% de suspension bactérienne additionnée de 10% d'un mélange antibiotique de tétracycline à 10 µg.mL⁻¹ et de céfotaxime à 0,1 µg.mL⁻¹, et correspond à 0% de croissance bactérienne.

2.8.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne en surface

2.8.3.1. Estimation de l'effet bactéricide

Une surface traitée avec un composé bactéricide empêche la croissance des bactéries et ne se limite pas à éviter leur adhésion à cette surface. Pour mesurer cet effet bactéricide, une suspension bactérienne est mise en contact avec les surfaces traitées à 37°C pendant 24h. La suspension est ensuite prélevée et l'absorbance à 620 nm est mesurée. Le pourcentage de croissance bactérienne dans la suspension est déterminé de la même manière que lors de l'évaluation de la concentration minimale inhibitrice, sachant que le contrôle négatif correspond à la suspension bactérienne mise en contact avec une lamelle de verre non traitée et le contrôle positif est composé de 90% de suspension bactérienne additionnée de 10% d'un mélange antibiotique de tétracycline et de céfotaxime en contact avec une lamelle de verre. Ainsi une surface traitée efficacement avec un composé bactéricide présente un pourcentage de croissance bactérienne proche de zéro.

2.8.3.2. Estimation de l'effet bactériostatique

Pour évaluer la viabilité des bactéries présentes à la surface des lamelles de verre, le kit BacLight™ RedoxSensor CTC Vitality Kit™ (Thermo Fischer Scientific, France) a été utilisé. Ce kit contient deux réactifs :

- le SYTO 24™, où la membrane bactérienne est perméable à cette molécule qui se fixe sur les acides nucléiques de l'ADN des bactéries. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont de 490 et 515 nm (émission dans le vert).
- le 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC), qui sert à évaluer l'activité respiratoire des bactéries. En effet, les bactéries vivantes réduisent le CTC en un précipité fluorescent,

le CTC-formazan (Figure 2.13). Les bactéries mortes ou avec une faible activité respiratoire ne réduisent pas le CTC, et par conséquent ne produiront pas le précipité rouge. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont de 450 et 630 nm (émission dans le rouge).

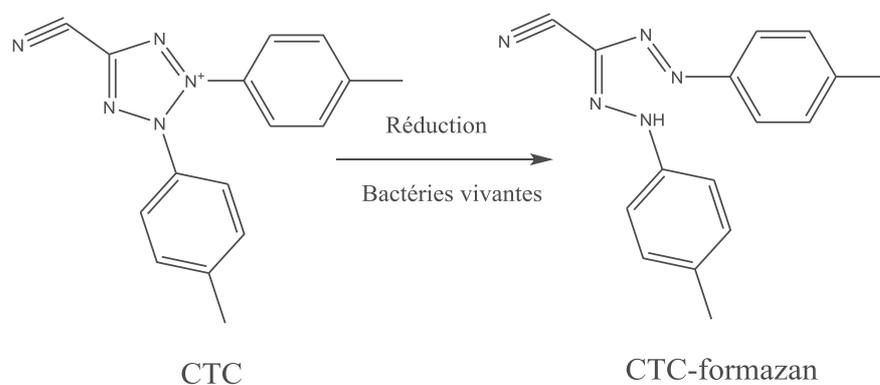


Figure 2.13 : Mécanisme de réduction du CTC par le pouvoir respiratoire bactérien

Les surfaces traitées avec l'agent antimicrobien sont donc observées par microscopie confocale après incubation avec une suspension bactérienne et marquage des bactéries présentes à la surface par les composés SYTO 24™ et CTC. Si les bactéries présentent une bonne viabilité, celles-ci émettront dans le vert (correspondant à la longueur d'onde d'émission du SYTO 24™) mais aussi dans le rouge (longueur d'onde d'émission du CTC-formazan formé). Lorsque les bactéries sont en difficulté respiratoire, et en fin de vie voire mortes, celles-ci ne peuvent réduire le composé CTC et émettront uniquement dans le vert. Ainsi, si la surface présente un effet bactériostatique, une très faible quantité de bactéries émettant dans les deux longueurs d'onde est alors présent à la surface. Si la surface présente un effet bactéricide, une très faible quantité de bactéries n'émettant que dans le vert est alors visible.

Pour mesurer ceci, une solution de 50 mM de CTC et de 1 µM de SYTO 24™ a été préparé dans de l'eau distillée. Les surfaces traitées sont ensuite mises en contact avec cette solution et du tampon PBS avec un ratio volumique de 10/90 et incubées pendant 30 min. Les surfaces sont ensuite rincées avec du tampon PBS et les bactéries présentes sur cette surface sont ensuite observées par microscopie confocale à une longueur d'onde d'excitation / émission de 450 nm / 630 nm pour le CTC et 490 / 515 nm pour le SYTO 24.

Références bibliographiques

1. Sauerbrey, G., Verwendung von Schwingquartzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **1959**, *155*, 206-222.
2. Nomura, T.; Okuhara, M., Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids. *Analytica Chimica Acta* **1982**, *142*, 281-284.
3. Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B., Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces : continuum mechanics approach. *Physica Scripta* **1999**, *59*, 391-396.
4. Höök, F.; Kasemo, B.; Nylander, T.; Fant, C.; Sott, K.; Elwing, H., Variations in Coupled Water, Viscoelastic Properties, and Film Thickness of a Mefp-1 Protein Film during Adsorption and Cross-Linking: A Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, Ellipsometry, and Surface Plasmon Resonance Study. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5796-5804.
5. Hübsch, E.; Ball, V.; Senger, B.; Decher, G.; Voegel, J. C.; Schaaf, P., Controlling the growth regime of polyelectrolyte multilayer films: Changing from exponential to linear growth by adjusting the composition of polyelectrolyte mixtures. *Langmuir* **2004**, *20*, 1980-1985.
6. Komarova, E.; Bogomolova, A.; Aldissi, M., Conjugated fluorescent polymer sensor for proteolytic activity detection with designed specificity. *Polymer International* **2015**, *64*, 1451-1457.
7. Guo, J.; Xu, C.; Li, X.; Chen, S., A simple, rapid and sensitive FRET assay for botulinum neurotoxin serotype B detection. *PLoS One* **2014**, *9*, e114124.
8. Picart, C.; Mutterer, J.; Richert, L.; Luo, Y.; Prestwich, G. D.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Lavalle, P., Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 12531-12535.
9. Lavalle, P.; Picart, C.; Mutterer, J.; Gergely, C.; Reiss, H.; Voegel, J. C.; Senger, B.; Schaaf, P., Modeling the buildup of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 635-648.
10. Eggeling, C.; Widengren, J.; Rigler, R.; Seidel, C. A. M., Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 2651-2659.
11. Picart, C.; Mutterer, J.; Arntz, Y.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Senger, B., Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film. *Microscopy Research and Technique* **2005**, *66*, 43-57.
12. Soumpasis, D. M., Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal* **1983**, *41*, 95-97.
13. Abramowitz, M. S., Irene S., Handbook of Mathematical Functions. *U.S. Government Printing Office, Washington, D.C* **1964**.
14. Lewis, E. A.; Murphy, K. P., Isothermal titration calorimetry. *Methods in Molecular Biology* **2005**, *305*, 1-16.
15. French, G. L., Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections--the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2006**, *58*, 1107-17.

Chapitre 3 :

Revêtements à base de peptides naturels

Chapitre 3 : Revêtements à base de peptides naturels

Introduction	93
3.1. Accroche du peptide: mise au point et caractérisation	96
3.1.1. Accroche du peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)	96
3.1.2. Accroche du peptide tribloc	103
3.2. Caractérisation du clivage peptidique.....	104
3.2.1. Clivage du peptide T-CTL en solution	104
3.2.2. Clivage du peptide tribloc en surface	109
3.3. Modification chimique du peptide tribloc.....	110
3.3.1. Utilisation d'espacesurs à base d'acides aminés	111
3.3.2. Utilisation d'espacesurs à base de poly(éthylène glycol)	112
3.4. Activité antimicrobienne.....	117
3.4.1. Surfaces traitées avec le peptide tribloc	117
3.4.2. Surfaces traitées avec le peptide tribloc modifié.....	118
Conclusion et perspectives	120
Références bibliographiques	123

Introduction

A l'heure actuelle, l'enjeu dans le traitement des infections liées aux dispositifs médicaux est la conception d'un revêtement antibactérien limitant les effets secondaires, telles que l'absence de toxicité envers les cellules eucaryotes ou l'apparition de réaction inflammatoire, et présentant une action à long terme. Des nouvelles stratégies basées sur la libération de l'agent antimicrobien uniquement en présence de bactéries ont donc été développées, mais les bactéries n'étant pas toutes pathogènes, il devient intéressant de développer un revêtement actif uniquement en fonction du pathogène choisi. Les peptides antimicrobiens étant des peptides déjà présents dans le système immunitaire mais ne pouvant se fixer sur des surfaces inertes, nous avons conçu un peptide inédit: le peptide **(L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR**. Ce peptide est dit « tribloc » car il est constitué de trois séquences lui donnant chacune une spécificité:

- 1) La séquence **(L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)**, abrégée « D », est un mimétisme des protéines contenues dans les fibrilles des mollusques favorisant leur accroche sur des supports solides en milieu marin. En effet, ces protéines sont composées majoritairement de L-3,4-dihydroxyphénylalanine, ou L-DOPA. De nombreuses études^{1,2,3} ont déjà prouvé le rôle majeur de la L-DOPA dans l'accroche des mollusques sur un support. Dans notre cas, la propriété première de cette séquence est donc l'accroche du peptide sur tout type de surface (matériaux organiques et inorganiques).
- 2) La séquence antimicrobienne **RSMRLSFRARGYGFR**, ou cateslytine (« CTL »), est une séquence issue de la chromogranine A (CgA), une protéine sécrétée par les cellules eucaryotes chromaffines. La scission de la CgA a permis de découvrir un peptide antimicrobien, la catestatine. Ce peptide, ne résistant pas à la dégradation par des protéases, une partie des résidus peptidiques a été ôtée afin de produire un peptide plus court : la cateslytine (Figure 3.1). Cette séquence constitue un peptide antimicrobien et a été reconnue comme résistante aux protéases et bactériotique contre la plupart des bactéries, dont *Staphylococcus aureus* et également contre des champignons⁴. Afin d'interagir avec la membrane bactérienne et ensuite d'être active, cette séquence doit être libérée dans le milieu.

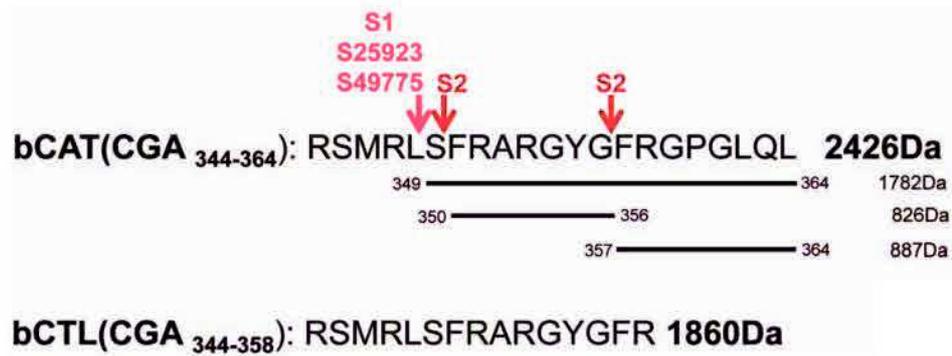


Figure 3.1 : Schéma représentant la catestatine et la cateslytine bovine (bCAT et bCTL) ainsi que les différents sites de clivage observés après mis en contact avec des protéases. Cette figure a été reprise depuis l'article d'Aslam et al.⁴

- 3) La séquence intermédiaire **TLRGGE**, abrégée « T », est un site de clivage qui a été conçu au laboratoire. En effet, seule la bactérie *Staphylococcus aureus* produit l'endoprotéinase Glu-C, permettant de cliver la liaison C-terminal de l'acide glutamique E présent dans la séquence⁵. Ainsi, en présence de *Staphylococcus aureus*, le peptide préalablement greffé en surface devrait être clivé et la cateslytine libérée en solution afin de permettre d'éliminer les pathogènes (Figure 3.2).

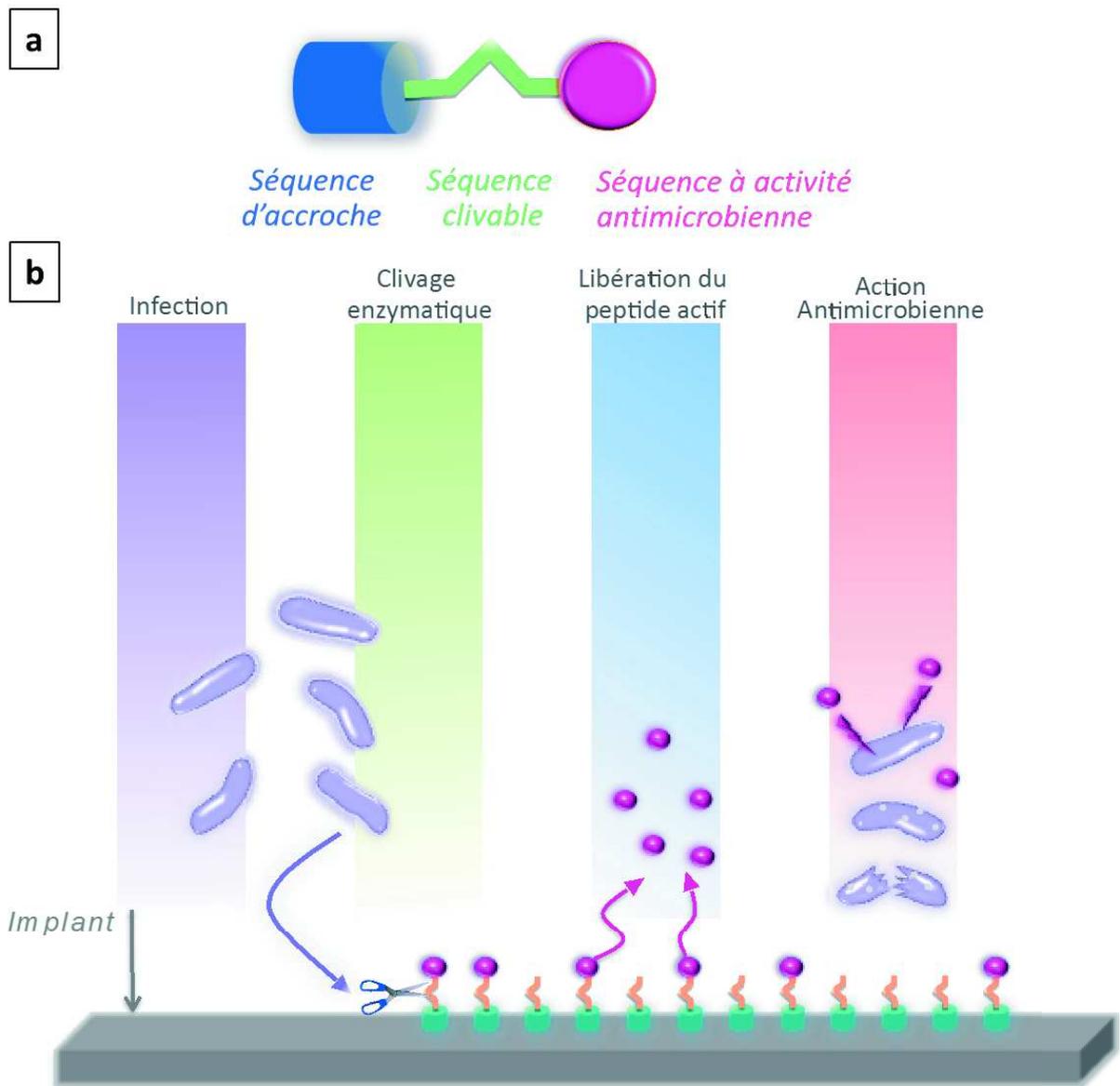


Figure 3.2 : **a)** Représentation du peptide tribloc; **b)** Schéma représentant les différentes actions du peptide tribloc en présence d'un pathogène (clivage, libération de la cateslytine et action antimicrobienne).

Dans un premier temps, l'accroche de ce peptide tribloc a été étudiée. Pour ce faire, la séquence d'accroche (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA), abrégée D, a été utilisée afin de déterminer les paramètres optimaux du dépôt peptidique. Dans un deuxième temps, le clivage du peptide tribloc a été étudié. La séquence TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR, abrégée T-CTL, a été utilisée afin de suivre le clivage de cette séquence par l'enzyme endoprotéinase Glu-C. Enfin, les propriétés antimicrobiennes d'une surface traitée avec le peptide tribloc ont été déterminées.

3.1. Accroche du peptide: mise au point et caractérisation

3.1.1. Accroche du peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)

Les moules peuvent adhérer sur n'importe quel type de support dans le milieu marin grâce aux protéines Mefp-3 et Mefp-5 contenues à l'extrémité de leur byssus¹. Ces protéines peuvent en effet adhérer fortement sur les surfaces organiques et inorganiques grâce à une haute concentration en L-DOPA (environ 30 % en mol)^{6,7}. Une étude récente a aussi démontré que l'abondance de L-DOPA et de L-lysine dans les protéines Mefp-5 joue un rôle synergique dans l'adhésion des moules offrant ainsi une forte accroche sur les métaux et les polymères, et ce, dans une large gamme de pH⁸. En effet, dans le milieu marin, la L-lysine semble chasser les cations hydratés de la surface minérale, permettant ainsi une meilleure adhésion de la L-DOPA sur celle-ci. La L-DOPA, combinée ou non à la lysine, peut être utilisée pour ses propriétés d'accroche dans la conception de revêtement. A titre d'exemple, la L-DOPA et la L-Lysine peuvent être couplées à d'autres molécules afin de former des polymères peptidomimétiques. Ces polymères ont alors d'une part, la propriété d'adhérer sur tout type de support et d'autre part d'empêcher l'adhésion de bactéries par association de molécules anti-adhérentes à la L-DOPA et la L-Lysine⁹. La L-DOPA peut aussi être greffée sur des surfaces puis couplée à des peptides antimicrobiens afin de former des surfaces bactériocides¹⁰.

La L-DOPA présente une adhésion forte sur les surfaces inorganiques dans des conditions réductrices, par exemple, en milieu acide. En effet, la L-DOPA présente sous la forme catéchol interagit avec les substrats inorganiques via une chimie de coordination (Figure 3.3)¹¹. A l'inverse, la L-DOPA oxydée, présente sous la forme quinone, interagit fortement avec les surfaces organiques via la formation de liaisons covalentes^{3,12}. Dans le milieu marin, cela permet à la moule d'adhérer à tout type de support car la L-DOPA est confrontée à un équilibre entre sa forme quinone et catéchol¹³.

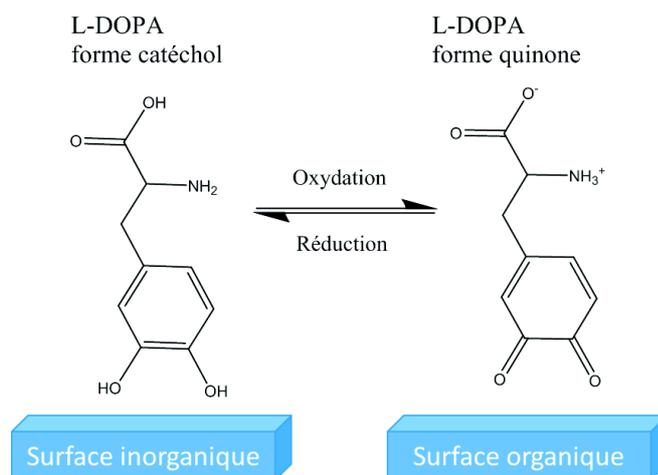


Figure 3.3 : Schéma d'interaction de la L-DOPA avec une surface inorganique et organique.

Dans le cadre de la conception d'un revêtement antibactérien appliqué aux dispositifs médicaux, la L-DOPA combinée à la L-lysine a donc été utilisée afin de permettre l'adhésion des molécules greffées. Dans un premier temps, l'étude de l'accroche du peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA), noté "D", a été réalisée sur une surface inorganique (SiO₂). Pour ce faire, la microbalance à cristal de quartz (QCM-D) a été utilisée. Cette technique est capable de mesurer des changements de masse déposée à la surface d'un cristal de quartz. La variation de la fréquence de résonance du cristal est liée à un dépôt de matériau à sa surface. Dans l'hypothèse que le dépôt n'engendre pas de dissipation d'énergie, le modèle de Sauerbrey permet de déterminer la masse adsorbée ainsi que l'épaisseur de la couche déposée.

Le principal objectif a été de déterminer si l'accroche de ce peptide est plus favorable lorsque la L-DOPA est présente sous sa forme oxydée ou réduite. Pour ce faire, le dépôt du peptide sur une surface de SiO₂ a été étudié à différents pH avec ou sans la présence d'un oxydant, le periodate de sodium (NaIO₄) avec un ratio molaire L-DOPA / NaIO₄ de 1 / 1. La présence de l'oxydant permet de déplacer l'équilibre redox vers la forme quinone. Les différences de fréquence obtenues pour le troisième harmonique sont représentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 3.1) :

Tableau 3.1 : Variation de la fréquence normalisée $-\frac{\Delta f_v}{v}$ (avec $v = 3$) lors du dépôt du peptide D sur une surface de SiO₂ d'un cristal de quartz dans différentes conditions d'oxydation et de pH. Les valeurs indiquées représentent la moyenne et l'écart-type de trois expériences, excepté pour la condition pH = 4 avec oxydant, où l'expérience n'a été produite qu'une seule fois.

pH	4	7.4
$-\frac{\Delta f_v}{v}$ (Hz) sans oxydant	1 ± 1	1 ± 1
$-\frac{\Delta f_v}{v}$ (Hz) avec oxydant	540	160 ± 82

En l'absence d'oxydant, il apparaît que la variation de la fréquence normalisée pour le troisième harmonique correspond à 1 ± 1 Hz, ce qui correspond au bruit de fond de l'appareil de mesure et qu'aucun dépôt significatif n'a été mesuré. La figure représentant l'épaisseur du dépôt calculée, et correspondant au bruit de fond, dans les conditions en l'absence d'oxydant, est représentée en annexe (Figure A.1).

Grâce au modèle de Voigt, exploité dans le travail de Voinova *et al.*¹⁴, nous avons pu déterminer l'épaisseur de la couche de peptide obtenue à la surface pour les conditions où le peptide est oxydé. La figure 3.4 représente l'évolution de l'épaisseur de la couche déposée en présence de l'oxydant NaIO_4 . Il apparaît qu'une couche de peptide L-DOPA s'est déposée avec une épaisseur moyenne de 20 nm à pH = 7.4, et jusqu'à 120 nm à pH = 4. Selon ces résultats, il est nécessaire que la L-DOPA soit présente sous sa forme oxydée afin d'obtenir un dépôt épais du peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA) sur une surface recouverte d'oxyde de silice.

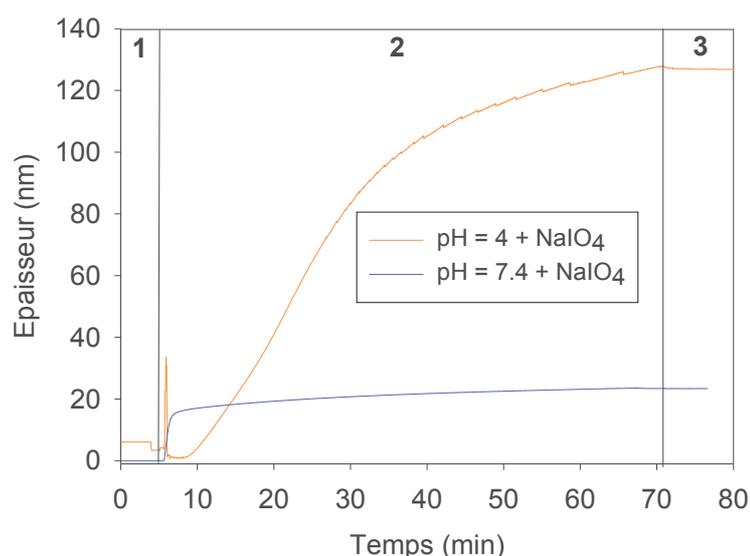


Figure 3.4 : Suivi par QCM-D de l'épaisseur du peptide déposé sur le cristal de quartz recouvert de SiO_2 lors du passage d'une solution de peptide D à pH = 4 (courbe orange) et à pH = 7.4 (courbe bleue) et en présence de l'oxydant NaIO_4 . **1** : Cristal dans le tampon, **2** : cristal en contact avec une solution de peptide D, **3** : rinçage avec le tampon.

La mesure de l'absorbance du peptide D en solution dans ces quatre conditions (pH = 4 ou 7.4, avec ou sans oxydant) a permis de déterminer qu'en l'absence d'oxydant, une seule bande d'absorbance est observée avec un maximum à 280-285 nm, correspondant à la L-DOPA sous sa forme réduite (catéchol). En présence d'oxydant, la bande d'absorbance est beaucoup plus large et le maximum est décalé vers des plus grandes longueurs d'onde (vers 350 nm), signe de la réaction de couplage et de la formation d'agrégats¹⁵ (Figure 3.5).

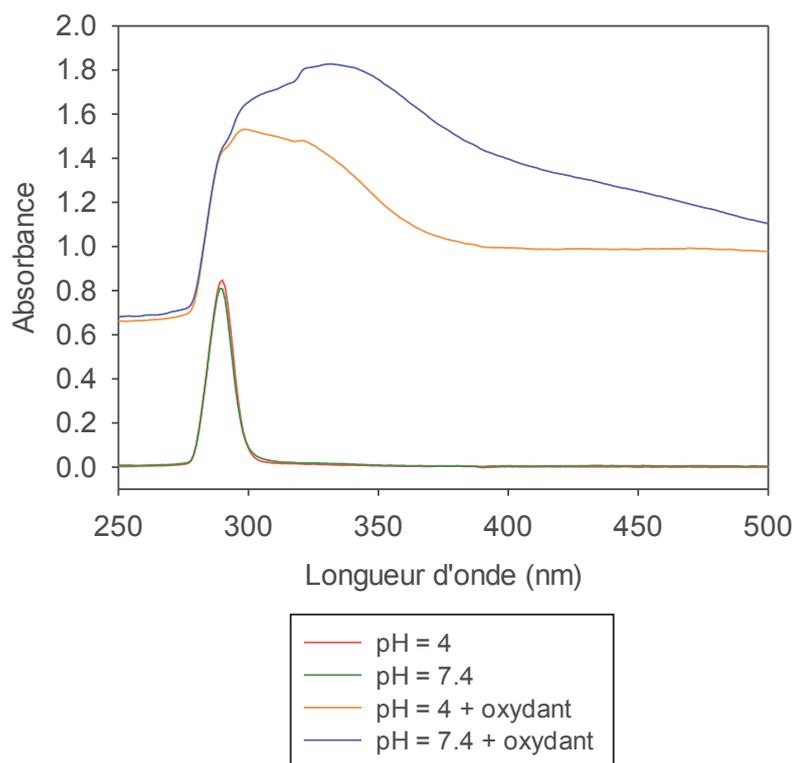


Figure 3.5 : Spectre d'absorbance des peptides D en solution en fonction de la longueur d'onde et des conditions suivantes: pH = 4 (courbe rouge), pH = 7.4 (courbe verte), pH = 4 avec NaIO_4 (courbe orange) et pH = 7.4 avec NaIO_4 (courbe bleue).

Cette formation d'agrégats en solution a été confirmée par mesure de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour ces quatre conditions (Tableau 3.2). Il apparaît que la taille des particules formées est plus grande en présence d'oxydant pour un même pH. De plus, à pH = 4 et en présence d'oxydant, une distribution de taille de particules bimodale est observée.

Tableau 3.2 : Diamètre des particules (nm) du peptide D formées en solution et mesurées par diffusion dynamique de la lumière en fonction du pH et de la présence ou non de l'oxydant.

Condition	pH = 4	pH = 7.4	pH = 4 + oxydant	pH = 7.4 + oxydant
Diamètre (nm)	164 ± 17	276 ± 35	424 ± 174 et 5330 ± 696	5265 ± 713

Concernant l'effet en surface, plus le ratio L-DOPA / oxydant est élevé, plus la quantité de peptide déposée à la surface est petite. La cinétique de dépôt est aussi dépendante du ratio L-DOPA / oxydant (Figure 3.6) puisque pour un ratio L-DOPA / NaIO_4 1/1, une cinétique de dépôt linéaire est observée, signe d'une réaction continue entre la L-DOPA et les résidus lysines, cette réaction se terminant quand l'un des deux composés vient à manquer.

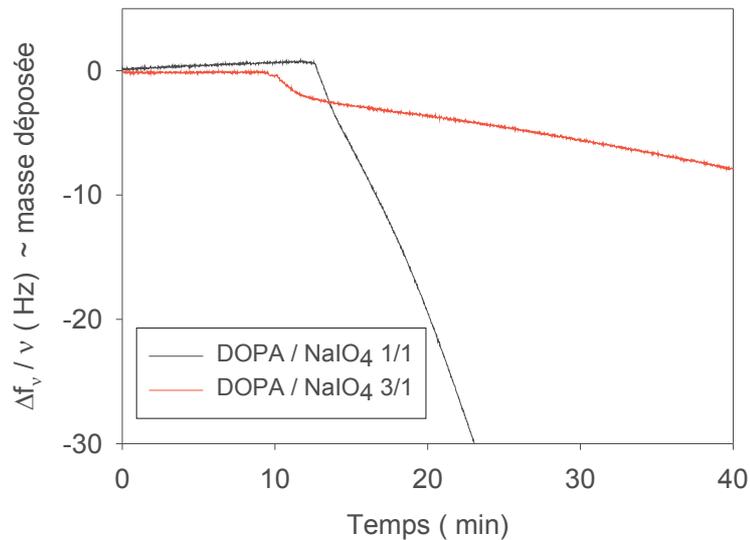


Figure 3.6 : Suivi par QCM-D du dépôt du peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA) sur un cristal de quartz recouvert de SiO₂. Représentation de la variation de la fréquence normalisée $\frac{\Delta f_v}{\nu}$ (avec $\nu = 3$) en fonction du ratio L-DOPA / NaIO₄ en solution : 1 / 1 (courbe noire) et 3 / 1 (courbe rouge).

Les surfaces des cristaux de quartz de SiO₂ utilisées selon les différentes conditions en présence d'oxydant ont été observées par microscopie à force atomique (AFM) (Figure 3.7). Deux conditions de dépôt ont été analysées : dépôt à pH = 4 et pH = 7.4. Un cristal de quartz sans traitement a été utilisé comme contrôle (Figure 3.7.a). En présence d'oxydant (Figure 3.7.b et 3.7.c), un revêtement d'aspect granulaire est observé. Dans le cas où l'oxydant a été ajouté à pH = 4 (Figure 3.7.b), le revêtement obtenu, correspondant à une épaisseur moyenne de 120 nm, est d'aspect très rugueux (Tableau 3.3) et il n'y a pas de recouvrement total de la surface tandis qu'en condition oxydante à pH = 7.4 (Figure 3.7c), le revêtement ayant une épaisseur moyenne de 20 nm, s'est déposé de manière plus homogène et présente une rugosité moindre (Tableau 3.3).

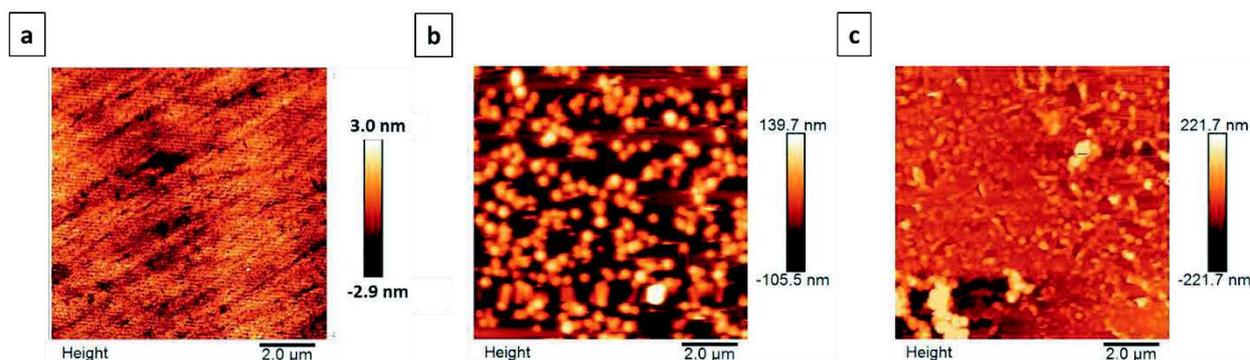


Figure 3.7 : Images obtenues par AFM représentant : **a)** cristal de quartz après nettoyage **b)** après mise en contact d'une solution de peptide D à pH 4 en présence d'oxydant **c)** après mis en contact d'une solution de peptide D à pH 7.4 en présence d'oxydant.

Tableau 3.3 : Rugosité moyenne arithmétique (R_a) des images obtenues par AFM des revêtements sous différentes conditions. Chaque valeur est une moyenne de 6 profils obtenus en AFM.

Conditions	pH = 4 avec oxydant	pH = 7.4 avec oxydant
R_a (nm)	39.1 ± 5.5	23.7 ± 5.2

La formation d'agrégats, et donc la réaction de couplage entre les différents peptides D, s'explique par la réactivité du groupement L-DOPA oxydé. En effet, les groupements quinones formés sont des intermédiaires de réaction instables et très réactifs envers les espèces nucléophiles. Les quinones peuvent réagir avec les amines selon trois mécanismes de réaction : l'addition de Michael, la réaction de formation de base de Schiff et la dégradation de Strecker (Figure 3.8). Les espèces formées peuvent ensuite réagir entre elles et ainsi conduire à la formation de polymères. La réaction de dégradation de Strecker présente une cinétique plus faible et nécessite de fortes températures pour être compétitive par rapport aux deux autres réactions¹², ce qui n'est pas le cas dans nos expériences.

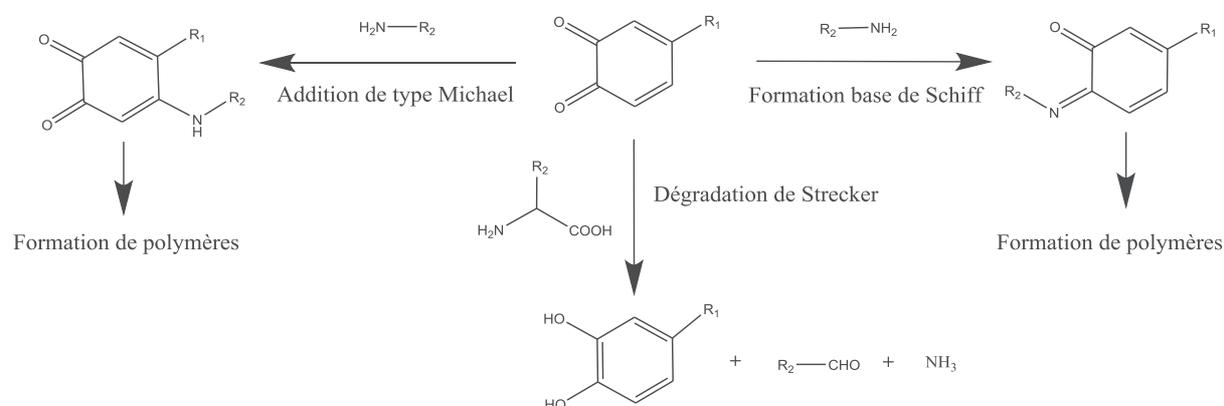


Figure 3.8 : Schéma réactionnel des quinones avec les amines.

Lors du dépôt du peptide D en présence de l'oxydant NaIO_4 , les amines présentes sur les lysines réagissent avec les quinones formées par une réaction de Michael ou par la formation d'une base de Schiff, amenant à diverses réactions de couplage et la formation d'agrégats. Selon la littérature, il a été démontré qu'à pH supérieur à 6, la vitesse de formation d'aminoquinones, via l'addition de Michael, diminue avec l'augmentation du pH¹⁶. Une autre étude a quant à elle déterminé que la vitesse de formation de quinone-imines, via la réaction de formation d'une base de Schiff, augmente avec la valeur du pH. En outre, cette étude a démontré que la réaction de formation d'une base de Schiff est favorisée pour des amines aliphatiques, telles que celles présentes sur les lysines¹⁷. En résumé, à pH acide, des aminoquinones se forment majoritairement tandis qu'à pH neutre, ce sont des quinone-imines qui sont favorisées. Les différences de cinétique de dépôt et d'aspect de la couche de peptides D oxydés déposée à pH acide et pH neutre, peuvent s'expliquer par la formation de deux espèces réactives majoritaires différentes selon le pH.

Il a été démontré que lorsque le peptide n'est pas oxydé, et donc en présence majoritaire de fonctions catéchols, aucun dépôt ne se fait à la surface recouverte de SiO_2 , contrairement à ce qui a été expliqué dans la littérature^{1,2,3,13}. Il est important d'observer que la majorité des études sur l'adhésion de L-DOPA s'est effectuée sur une surface recouverte d'oxyde de titane, tandis qu'ici nous sommes en présence d'une surface recouverte d'oxyde de silice. La différence de groupements présents en surface pour les deux entités ou encore la différence de point isoélectrique (aux alentours de 2 pour la silice et de 6 pour le titane) peut expliquer la différence de réactivité des L-DOPA par rapport à ce qui est démontré dans la littérature. Ces résultats nous prouvent aussi que le mécanisme d'accroche des catéchols est encore mal documenté et qu'il est probable que de nombreux mécanismes réactionnels entrent en jeu simultanément.

3.1.2. Accroche du peptide tribloc

Dans cette partie, le peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR, noté D-T-CTL, a été utilisé. L'étude du dépôt de ce peptide a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (Tableau 3.4).

Tableau 3.4 : Variation de la fréquence normalisée $-\frac{\Delta f_v}{\nu}$ (avec $\nu = 3$) lors du dépôt sous différentes conditions d'oxydation et de pH du peptide D-T-CTL sur la surface d'un cristal de quartz recouvert de SiO_2 . Les valeurs indiquées pour la condition pH = 7.4 sans oxydant représentent la moyenne et l'écart-type de trois expériences, tandis que pour les autres conditions l'expérience n'a été produite qu'une seule fois.

pH	4	7.4
$-\frac{\Delta f_v}{\nu}$ sans NaIO_4	0.8	10.4 ± 3.8
$-\frac{\Delta f_v}{\nu}$ avec NaIO_4	8.7	19.5

Bien que, comme attendu d'après les expériences précédentes, une quantité plus grande de peptide soit déposée sous conditions oxydantes, il apparait aussi qu'un dépôt est observé à pH neutre et en l'absence d'ajout d'oxydant. Le dépôt du peptide D-T-CTL ne résiste cependant pas à des rinçages successifs, une fraction se désorbe après rinçage. Le peptide D-T-CTL étant un peptide chargé positivement, il peut se déposer à la surface par un mécanisme similaire à celui du dépôt des polycations, c'est-à-dire grâce aux interactions électrostatiques entre le peptide et la surface. Afin d'augmenter les forces d'interactions entre le peptide et la surface, nous avons donc décidé de déposer le peptide sans oxydation, et après plusieurs rinçages (où une certaine quantité de peptide était perdue), nous avons ajouté une solution d'oxydant pour ainsi former des liaisons chimiques « fortes » entre le peptide et la surface tout en évitant la formation d'agrégats. En effet, la présence d'agrégats tels que ceux observés pour le peptide D, peut empêcher l'enzyme d'atteindre le site de clivage du peptide D-T-CTL à la surface et limiter aussi l'action antimicrobienne. Un exemple du dépôt du peptide suivi par QCM-D sans oxydation, puis rinçage et ajout de NaIO_4 , est illustré sur la figure 3.9.

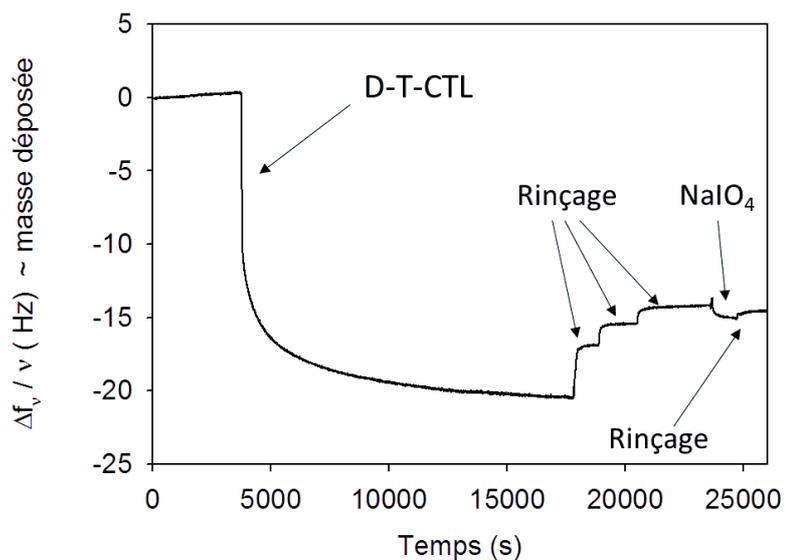


Figure 3.9 : Représentation de la variation de la fréquence normalisée $\frac{\Delta f_v}{\nu}$ (avec $\nu = 3$) lors du dépôt du peptide tribloc sur la surface d'un cristal de quartz recouverte de SiO_2 .

Après plusieurs répétitions de cette expérience, nous avons obtenu un dépôt moyen du peptide à la surface correspondant à 10.4 ± 3.8 Hz pour la fréquence normalisée $-\frac{\Delta f_v}{\nu}$ (avec $\nu = 3$). Selon la formule de Sauerbrey et compte tenu de la constante de notre cristal ($C = 17.7 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{Hz}^{-1}$), ce dépôt correspond à une masse de peptide D-T-CTL de $184 \pm 67 \text{ ng.cm}^{-2}$, soit $5.63 \pm 2.06 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$. Ce calcul nous permet de déterminer que l'aire occupée par molécule correspond à environ 3 nm^2 . En outre, nous savons que la longueur du peptide D-T-CTL est d'environ 2 nm .

3.2. Caractérisation du clivage peptidique

3.2.1. Clivage du peptide T-CTL en solution

Le peptide D-T-CTL possède la séquence TLRGGE. Cette séquence est nécessaire pour le clivage et la libération de la cateslytine en présence de *Staphylococcus aureus*. La détermination des paramètres optimaux pour le clivage du peptide D-T-CTL a été réalisée.

Dans un premier temps, le clivage en solution avec l'enzyme endoprotéinase Glu-C a été étudié. Pour ce faire, afin d'éviter des phénomènes d'accroche sur des surfaces pouvant interférer avec les résultats du clivage, le peptide TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR, ou T-CTL, a été utilisé. En outre,

deux groupements ont été attachés de part et d'autre de ce peptide afin d'utiliser la technique FRET pour caractériser le clivage : DABCYL-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR-E(EDANS), ou T-CTL-FRET. La technique FRET permet ainsi le suivi du clivage au cours du temps par mesure de la fluorescence émise à 490 nm en solution.

Le clivage du peptide T-CTL-FRET en présence de trypsine a été utilisé en tant que contrôle positif. En effet, la trypsine est une protéase à sérine hydrolysant les liaisons peptidiques situées du côté de l'extrémité C-terminal d'un résidu lysine ou arginine. Le peptide T-CTL-FRET présentant 6 résidus arginine dans sa séquence, son clivage par la trypsine devrait se réaliser pour donner des sous-unités peptidiques. La fluorescence du peptide et de l'enzyme séparément a été également mesurée en tant que contrôles négatifs. La quantité initiale d'enzyme utilisée a été calculée de telle sorte que le ratio peptide / enzyme soit de 4 / 1 (w / w). La cinétique de fluorescence en solution est représentée en figure 3.10.

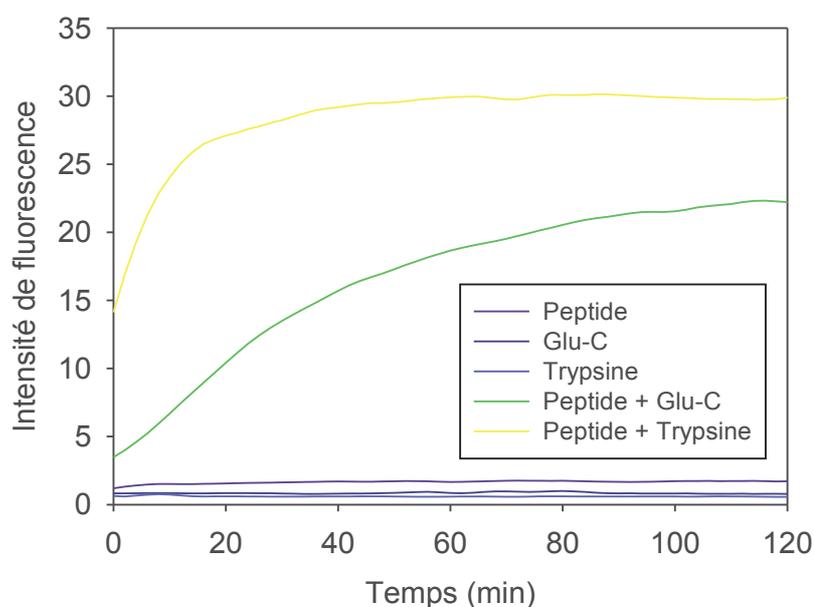


Figure 3.10 : Intensité de fluorescence émise à 490 nm en fonction du temps pour le peptide en présence ou non de l'enzyme endoprotéinase Glu-C ou de la trypsine. Ces courbes représentent la moyenne de 3 valeurs obtenues sur 3 échantillons.

Le peptide seul n'émet pas de fluorescence. Il en est de même pour les enzymes prises isolément. Mais lorsque le peptide et enzyme sont mis en contact, une augmentation du signal de fluorescence apparaît au cours du temps. Cette augmentation de fluorescence signifie que l'énergie émise par le groupement E(EDANS) n'est plus absorbée par le groupement DABCYL. Ces deux groupements se trouvent donc à distance éloignée l'un de l'autre. Nous avons donc ici la preuve qu'une scission s'est produite au sein du peptide T-CTL-FRET via l'enzyme endoprotéinase Glu-C. Afin de vérifier si cette scission est bien liée à un clivage, l'expérience a été répétée en utilisant l'enzyme

phosphatase alcaline en tant que contrôle négatif, celle-ci n'ayant pas les capacités de cliver le peptide T-CTL-FRET (Figure 3.11).

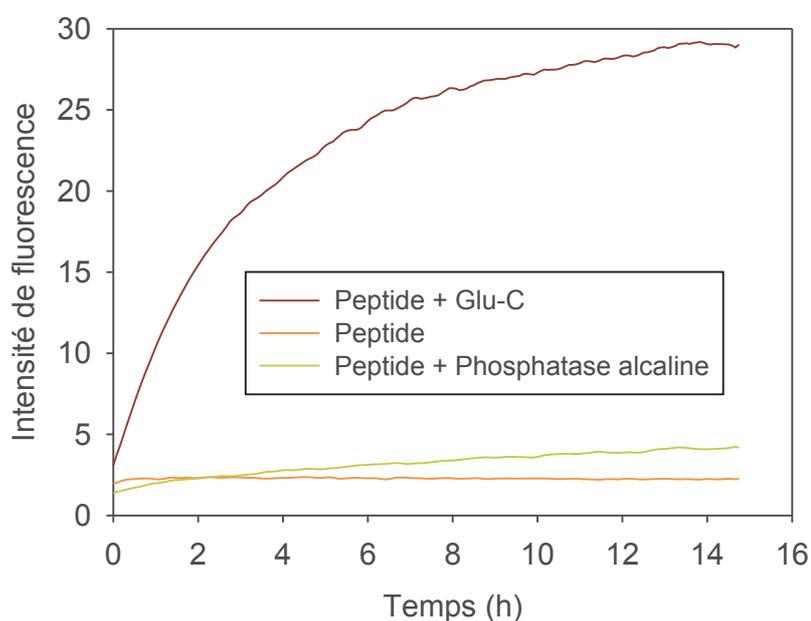


Figure 3.11 : Intensité de fluorescence émise à 490 nm en fonction du temps pour le peptide en présence de l'enzyme endoprotéinase Glu-C ou phosphatase alcaline. Ces courbes représentent la moyenne de 3 valeurs obtenues sur 3 échantillons.

Les résultats obtenus confirment que l'apparition d'un signal de fluorescence est le signe du clivage du peptide T-CTL-FRET puisque le peptide en présence de l'enzyme phosphatase alcaline n'émet aucune fluorescence à 490 nm. L'intensité de fluorescence étant liée à la quantité de peptide clivé, nous avons ensuite déterminé le ratio massique peptide / enzyme nécessaire pour atteindre une quantité de peptide clivé maximale (Tableau 3.5 et Figure 3.12).

Tableau 3.5 : Conditions étudiés lors du clivage du peptide T-CTL-FRET par l'enzyme endoprotéinase Glu-C en fonction du ratio peptide / enzyme et correspondance entre ratio massique et ratio molaire.

Conditions	1	2	3
Ratio massique peptide / enzyme	$\frac{4}{1}$	$\frac{10}{1}$	$\frac{50}{1}$
Correspondance ratio molaire peptide / enzyme	$\frac{38}{1}$	$\frac{96}{1}$	$\frac{481}{1}$

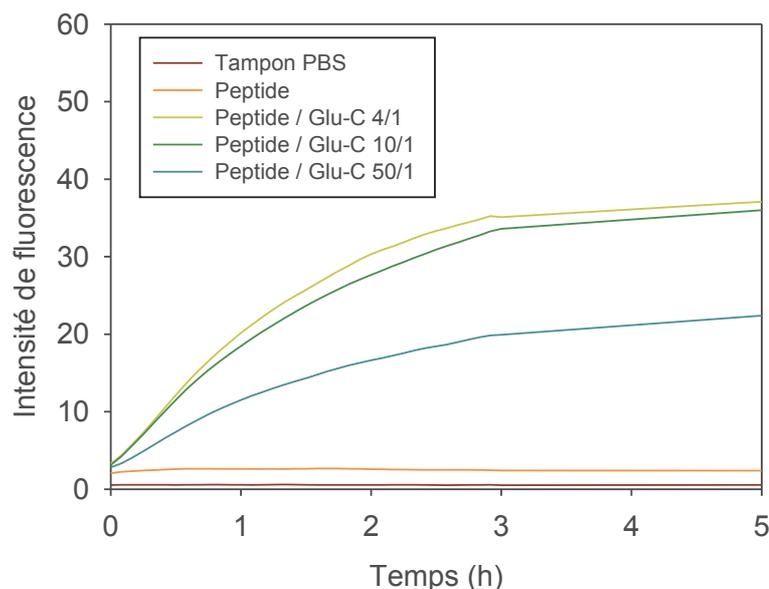


Figure 3.12 : Intensité de fluorescence émise à 490 nm en fonction du temps et du ratio peptide / enzyme endoprotéinase Glu-C avec un ratio massique de 4/1, 10/1 et 50/1. Ces courbes représentent la moyenne de 3 valeurs obtenues sur 3 échantillons.

Nous avons fait varier le ratio peptide / Glu-C pour un ratio massique 4/1, 10/1 et 50/1 en maintenant fixe la concentration peptidique. Pour les trois ratios étudiés, l'intensité de la fluorescence émise atteint un plateau au bout de 3h, signe de la fin de l'activité enzymatique. A cette étape, nous pouvons émettre l'hypothèse que la totalité des peptides ont été clivés, ou encore que l'activité enzymatique chute après 3h. En outre, l'intensité de fluorescence est maximale pour les ratios massiques 4/1 et 10/1, c'est-à-dire pour les concentrations les plus fortes en enzymes, tandis que l'intensité de fluorescence est plus faible pour un ratio massique 50/1. On voit cependant que pour un ratio massique 4/1, l'activité maximale est atteinte et donc il n'y a plus nécessité d'augmenter la concentration enzymatique.

Après avoir déterminé les conditions optimales en solution pour le clivage du peptide T-CTL-FRET, il est important de démontrer que le clivage est présent uniquement entre l'acide glutamique (E) et l'arginine (R) dans la séquence TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR, afin de maintenir intacte le peptide cateslytine RSMRLSFRARGYGFR ainsi que son activité antimicrobienne. Pour ce faire, une solution contenant le peptide T-CTL-FRET avec ou sans l'enzyme endoprotéinase Glu-C a été analysée par HPLC. Les caractéristiques des différents pics obtenus par HPLC sont présentées dans le tableau 3.6 (peptide seul) et dans le tableau 3.7 (peptide en présence de l'enzyme). Les spectres obtenus par HPLC sont présentés en annexe (Figure A.2. et Figure A.3).

Tableau 3.6 : Pics obtenus par HPLC du peptide T-CTL-FRET

Pic	Temps de rétention (min)	Hauteur (mAU)	Aire relative (%)
1	28.8	19.5	3
2	29.7	579.8	97

Tableau 3.7 : Pics obtenus par HPLC du peptide T-CTL-FRET en présence de l'enzyme endoprotéinase Glu-C

Pic	Temps de rétention (min)	Hauteur (mAU)	Aire relative (%)
1	22.8	91.7	3
2	23.7	628.5	40
3	25.7	163.2	7
4	29.5	617.0	38
5	33.3	56.2	5

Le peptide T-CTL-FRET présente un temps de rétention majoritaire à environ 30 min (pic numéro 2 du tableau 3.6 et pic numéro 4 du tableau 3.7). Il a aussi été déterminé que l'enzyme endoprotéinase Glu-C présente un temps de rétention d'environ 33 min (pic numéro 5 du tableau 3.7). Lorsque peptide et enzyme sont mélangés, de nouveaux pics apparaissent (pic numéros 1, 2 et 3 du tableau 3.7). Afin d'identifier les pics obtenus, les solutions collectées par HPLC correspondant aux temps de rétention des pics numéro 1, 2 et 3 du tableau 3.7 ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le tableau 3.8 résume les pics obtenus par HPLC du peptide T-CTL-FRET en présence de l'enzyme endoprotéinase Glu-C ainsi que leur identification déduite des mesures MALDI-TOF.

Tableau 3.8 : Correspondance moléculaire des pics obtenus par HPLC du peptide T-CTL-FRET en présence de l'enzyme endoprotéinase Glu-C selon le poids moléculaire obtenu par MALDI-TOF.

Pic	Temps de rétention (min)	Pic majoritaire MALDI-TOF (g.mol ⁻¹)	Correspondance
1	22.8	2253	Inconnue
2	23.7	2237	RSMRLSFRARGYGFR-E(Edans)
3	25.7	883	DABCYL-TLRGGE
4	29.5		DABCYL-TLRGGE- RSMRLSFRARGYGFR-E(EDANS)
5	33.3		Enzyme endoprotéinase Glu-C

Les pics numéros 2 et 3 représentent les fragments obtenus après clivage par l'enzyme endoprotéinase Glu-C. Il apparaît que, selon les poids moléculaires obtenus par MALDI-TOF, deux séquences peptidiques sont récupérées : le fragment DABCYL-TLRGGE ainsi que le fragment RSMRLSFRARGYGFR-E(EDANS). Nous pouvons ainsi confirmer que le clivage du peptide T-CTL-FRET par l'enzyme endoprotéinase Glu-C se produit uniquement entre l'acide glutamique et l'arginine, comme attendu. Concernant le pic numéro 1, celui-ci n'a pu être identifié.

Nous avons confirmé le clivage du peptide T-CTL-FRET par l'enzyme endoprotéinase Glu-C, clivage s'effectuant uniquement au niveau de l'extrémité C-terminal de l'acide glutamique. Ces résultats indiquent que le clivage du peptide D-T-CTL est effectif en solution. Il reste cependant à confirmer l'effet du clivage lorsque le peptide est ancré en surface.

3.2.2. Clivage du peptide tribloc en surface

L'étude du clivage du peptide tribloc D-T-CTL greffé sur une surface de silice a été réalisée. L'étude du changement de fréquence de résonance par QCM-D après dépôt de l'enzyme a été employée pour observer le clivage du peptide à la surface.

Nous avons démontré en 3.2.1. que, la quantité de peptide D-T-CTL déposée à la surface d'un cristal de quartz correspond à $184 \pm 67 \text{ ng.cm}^{-2}$, soit $5.63 \pm 2.06 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$. Après le passage d'une solution d'endoprotéinase Glu-C, nous observons une diminution de fréquence indiquant probablement un dépôt de cette enzyme sur la surface et correspondant à une variation de fréquence de 2 Hz, soit 35.4 ng.cm^{-2} (Figure 3.13).

Selon nos calculs, l'aire occupée par une enzyme correspond à 140 nm^2 alors que nous avons démontré précédemment que l'aire occupée par un peptide correspondait à 3 nm^2 . Cela signifie qu'il y a 47 peptides disponibles à la surface pour une enzyme absorbée. Pour information, la taille d'une bactérie étant d'environ $1 \mu\text{m}$, l'aire occupée par une bactérie correspond à $7.9 \times 10^5 \text{ nm}^2$. Cela signifie qu'il y a 2.6×10^5 peptides disponibles pour une bactérie.

Dans le cas de figure où tous les peptides de la surface seraient clivés, on devrait libérer une quantité de cateslytine correspondante de $5.63 \pm 2.06 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$, soit $105 \pm 38 \text{ ng.cm}^{-2}$, ou encore à une variation de fréquence de $5.9 \pm 2.2 \text{ Hz}$. Malgré cela, après 15h de contact à 37°C , aucune variation de fréquence supplémentaire n'est observée sur le cristal de quartz (Figure 3.13), malgré un léger signal de désorption apparu lors du dépôt de l'enzyme endoprotéinase Glu-C. Pour rappel, lors de

l'étude du clivage en solution, un maximum de peptides clivés était observé après 3h de réaction enzymatique. Il semblerait donc qu'aucun clivage à la surface ne soit observé par QCM-D.

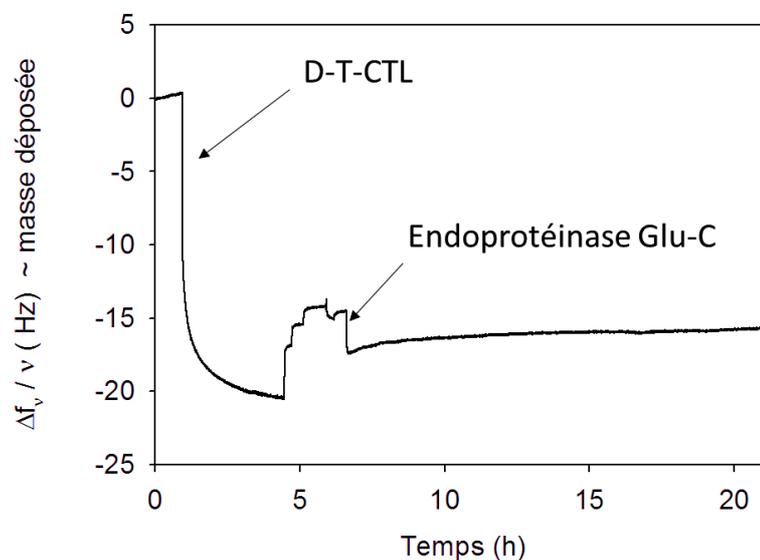


Figure 3.13 : Variation de la fréquence normalisée $\frac{\Delta f_v}{\nu}$ (avec $\nu = 3$) lors du dépôt du peptide D-T-CTL sur la surface d'un cristal de quartz recouvert d'une couche de SiO_2 et après dépôt de l'enzyme endoprotéinase Glu-C.

3.3. Modification chimique du peptide tribloc

L'absence de clivage du peptide en surface suggère que l'enzyme ne parvient pas à atteindre le site de clivage en raison du manque d'espacement entre les peptides, alors que le clivage attendu est présent en solution. Des modifications chimiques du peptide tribloc ont été réalisées par l'intégration d'un espaceur entre le site d'accroche et le site de clivage afin d'éviter le phénomène d'encombrement stérique. Trois espaceurs différents ont été étudiés:

- (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)-**GGGGGGGGGG**-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR, ou D-G10-T-CTL
- (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)-**GSGSGS**-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR, ou D-GS3-T-CTL
- (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)-**PEG24**-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR, ou D-PEG24-T-CTL

3.3.1. Utilisation d'espaceurs à base d'acides aminés

Les espaceurs à base de glycine et de sérine sont utilisés pour leur grande flexibilité¹⁸. Nous avons étudié deux espaceurs différents : un espaceur composé de dix résidus glycines (D-G10-T-CTL), et un autre espaceur composé de trois résidus sérines et trois résidus glycines (D-GS3-T-CTL). La glycine présente dans les deux espaceurs étant un acide aminé apolaire, ces deux peptides modifiés seront dissouts dans un solvant DMSO / PBS avec un ratio 5 / 95.

Dans un premier temps, le dépôt des deux peptides modifiés a été étudié par QCM-D. Les figures 3.14.a et 3.14.b représentent l'observation du dépôt des peptides D-GS3-T-CTL et D-G10-T-CTL, respectivement.

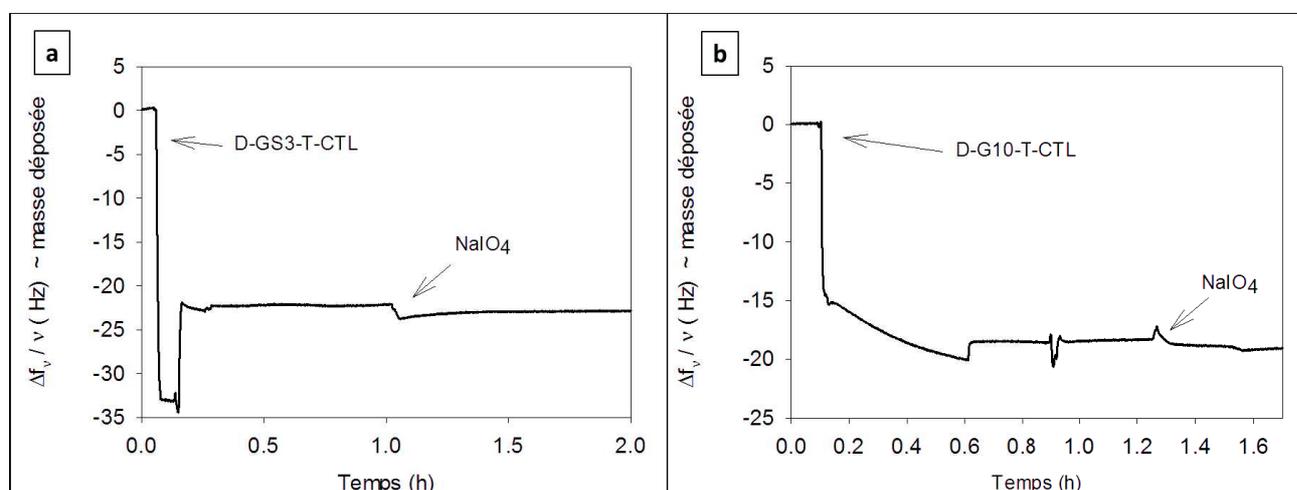


Figure 3.14 : Variation de la fréquence normalisée $\frac{\Delta f_v}{v}$ (avec $v = 3$) sur une surface SiO_2 d'un cristal de quartz **a)** lors du dépôt du peptide D-GS3-T-CTL **b)** lors du dépôt du peptide D-G10-T-CTL.

Bien que les cinétiques de dépôt soient différentes, la variation totale de la fréquence normalisée pour les deux peptides adsorbés et après rinçage est similaire. La quantité de peptide déposée correspond à $1.1 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ pour D-GS3-T-CTL et $8.7 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$ pour le peptide D-G10-T-CTL. Nous avons ensuite mis ces deux surfaces traitées en contact avec l'enzyme endoprotéinase Glu-C et observé la variation de fréquence normalisée pendant 15h. La figure 3.15 représente cette variation en présence de l'enzyme endoprotéinase Glu-C pour les deux surfaces traitées.

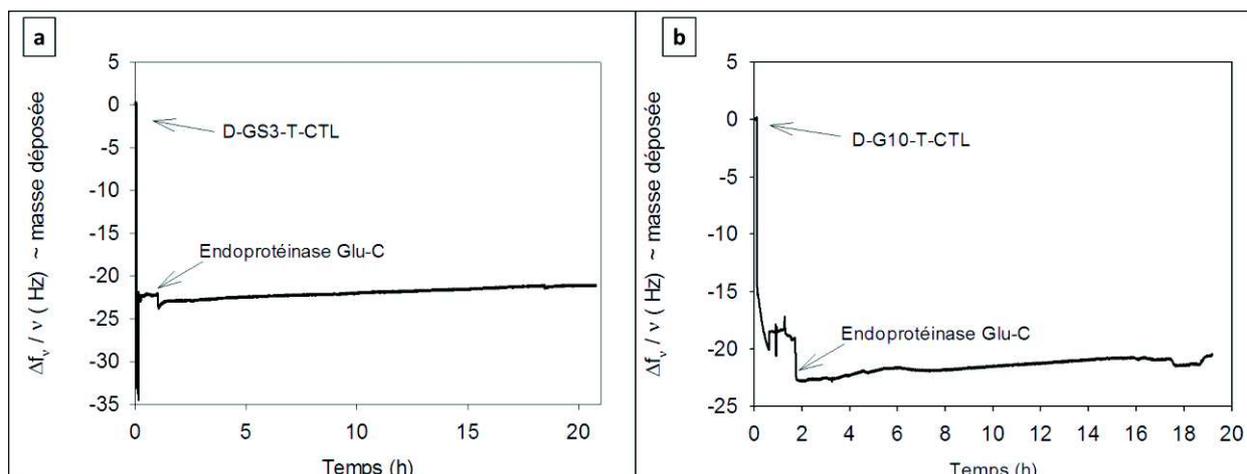


Figure 3.15 : Représentation de la variation de la fréquence normalisée $\frac{\Delta f_v}{v}$ (avec $v = 3$) sur une surface SiO_2 d'un cristal de quartz et en présence de l'enzyme endoprotéinase Glu-C **a)** avec le dépôt du peptide D-GS3-T-CTL **b)** avec le dépôt du peptide D-G10-T-CTL.

Selon les courbes QCM-D obtenues, il apparaît ici qu'aucun clivage apparent ne s'est produit pour les deux peptides modifiés, puisqu'aucune variation de fréquence supplémentaire n'est observée, hormis celle correspondant au dépôt de l'enzyme. Les espaceurs à base d'acides aminés, et ayant une taille comprise entre 6 et 10 résidus, ne semblent donc pas permettre une meilleure accessibilité de l'enzyme au site de clivage.

3.3.2. Utilisation d'espaceurs à base de poly(éthylène glycol)

Le poly(éthylène glycol) (PEG) est l'espaceur le plus fréquemment utilisé sur les surfaces traitées à base de peptides^{18,19,10,20}. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'espaceur noté PEG24 (24 groupements éthylène glycol). Afin de lier l'espaceur au peptide T-CTL ainsi qu'à la séquence d'accroche, ces PEG possèdent à leurs extrémités des groupements réactifs, tels qu'un groupement disulfide de pyridine (OPSS), ainsi qu'un groupement N-hydroxysuccinimide (NHS) (Figure 3.16). Dans le cadre de l'obtention d'un revêtement avec le peptide D-PEG24-T-CTL, un procédé en plusieurs étapes est alors utilisé.

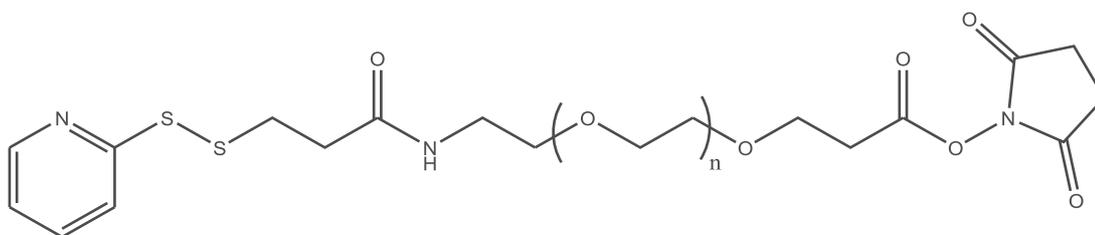


Figure 3.16 : Structure moléculaire du composé OPSS-PEG-NHS

Dans un premier temps, le composé OPSS-PEG24-NHS est mis en contact avec le peptide T-CTL en solution. Ce composé doit réagir avec l'amine primaire présente à l'extrémité du peptide T-CTL ce qui libère la molécule NHS en solution (Figure 3.17). La solution est ensuite dialysée afin de ne récupérer que le peptide OPSS-PEG24-T-CTL. Cette première partie a été réalisée au sein de l'équipe Ingénierie Macromoléculaire aux Surfaces de l'Institut Charles Sadron (Strasbourg).

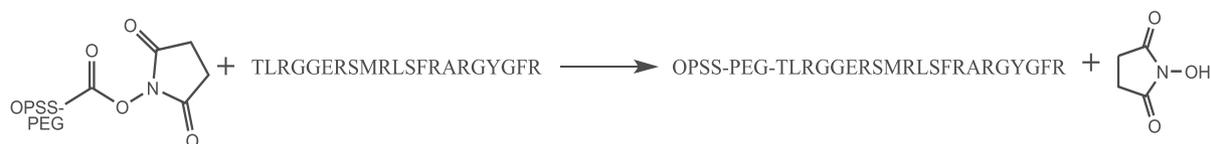


Figure 3.17 : Réaction de couplage entre le peptide T-CTL et OPSS-PEG-NHS

Dans un deuxième temps, la déprotection du peptide OPSS-PEG24-T-CTL a été réalisée afin d'obtenir le composé HS-PEG24-T-CTL. Pour ce faire, un agent réducteur, le tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) est utilisé. Le TCEP permet en effet de couper les liaisons disulfides présents sur le composé OPSS-PEG24-T-CTL. La réduction du composé OPSS-PEG24-T-CTL par l'agent TCEP produit le composé HS-PEG24-T-CTL ainsi que la pyridine-2-thione (Figure 3.18).

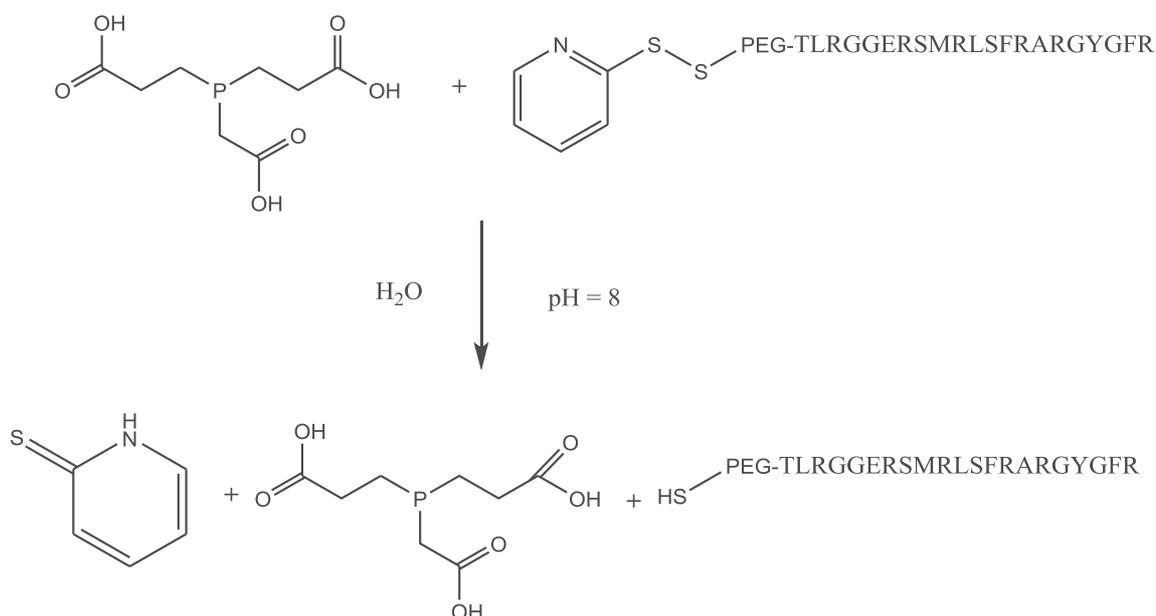


Figure 3.18 : Réaction de déprotection du peptide OPSS-PEG-T-CTL

Le suivi, ainsi que la détermination du rendement de la réaction, ont été effectués par mesure de l'absorbance à 343 nm. En effet, la pyridine 2-thione produite est la seule à absorber l'énergie lumineuse à cette longueur d'onde avec un coefficient d'extinction molaire $\varepsilon = 8.05 \times 10^3 \text{ cm.M}^{-1}$. Le tableau 3.9 représente l'absorbance mesurée à 343 nm après 5 min de mise en contact entre le peptide

OPSS-PEG24-T-CTL et le TCEP. Les absorbances du TCEP et du peptide OPSS-PEG24-T-CTL a été mesurée séparément en tant que contrôle.

Tableau 3.9 : Absorbance mesurée à 343 nm pour les solutions contenant le TCEP, le peptide OPSS-PEG24-T-CTL ainsi que les deux composés réunis.

Conditions	TCEP	OPSS-PEG24-T-CTL	OPSS-PEG24-T-CTL + TCEP
Absorbance à 343 nm	0.042	0.236	1.165

Selon la loi de Beer-Lambert, nous avons déterminé que le peptide HS-PEG24-T-CTL s'est formé avec un rendement de 93%. Afin de confirmer la présence de groupements thiols à l'extrémité du peptide modifié, nous avons déposé ce peptide sur un cristal de quartz recouvert d'or et suivi ce dépôt par QCM-D. En effet, les thiols réagissent fortement avec l'or²¹. La figure 3.19 représente la variation de fréquence normalisée pour un cristal de quartz recouvert d'or en présence d'une solution contenant le peptide OPSS-PEG24-T-CTL et TCEP. Il apparaît alors que les fonctions thiols sont présentes sur le peptide puisqu'un dépôt apparaît à la surface du cristal en quartz recouvert d'or. Le dépôt se fait selon une cinétique extrêmement rapide, puis subitement, un plateau est atteint correspondant probablement à la saturation de la surface par le peptide. Ce type de cinétique est inhabituel pour un peptide CTL non modifié et nous indique que probablement la liaison du peptide sur la surface s'est faite par un procédé différent, probablement via l'interaction thiol/or.

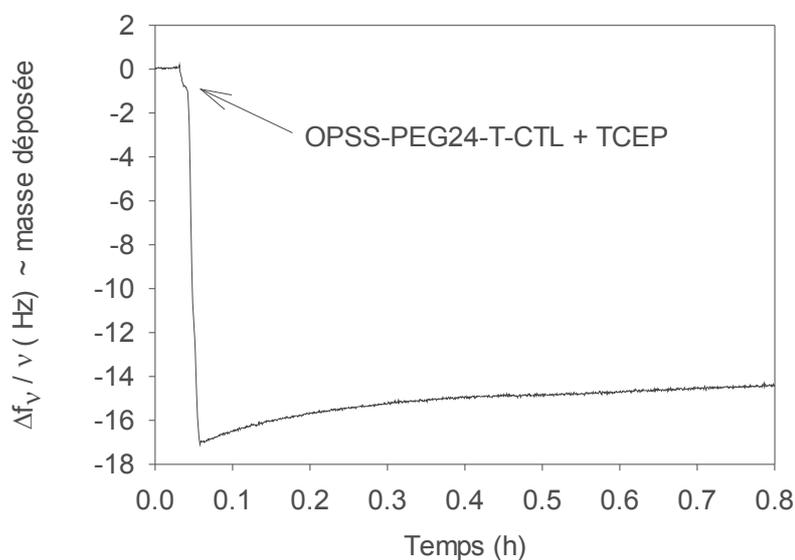


Figure 3.19 : Variation de la fréquence normalisée $\frac{\Delta f_v}{\nu}$ (avec $\nu = 3$) sur une surface en or d'un cristal de quartz avec le dépôt du peptide OPSS-PEG24-T-CTL en présence de TCEP.

Enfin, le dépôt du peptide HS-PEG24-T-CTL a été réalisé sur une surface recouverte du peptide d'accroche D. D'après Lee *et al.*²², la réaction entre les quinones, formées par l'oxydation des catéchols, et les thiols se fait selon une réaction d'addition de Michael (Figure 3.20).

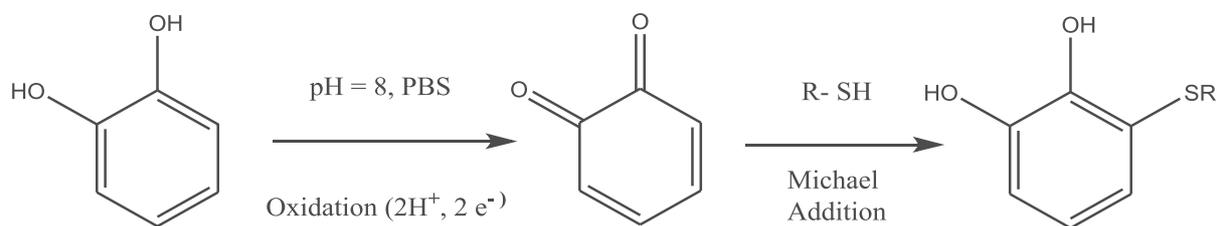


Figure 3.20 : Schéma réactionnel entre les quinones et les composés R-SH.

Le processus de fonctionnalisation d'une surface de SiO₂ par le peptide D-PEG24-T-CTL a été suivi par QCM-D. Pour ce faire, la surface de SiO₂ du cristal de quartz a été recouverte du peptide d'accroche D à pH 7.4 et en présence de NaIO₄. Après rinçage, le peptide HS-PEG24-T-CTL est déposé. La figure 3.21 illustre la variation de fréquence normalisée sur un cristal de quartz après dépôt de peptide d'accroche et du peptide contenant l'espaceur PEG24²⁴.

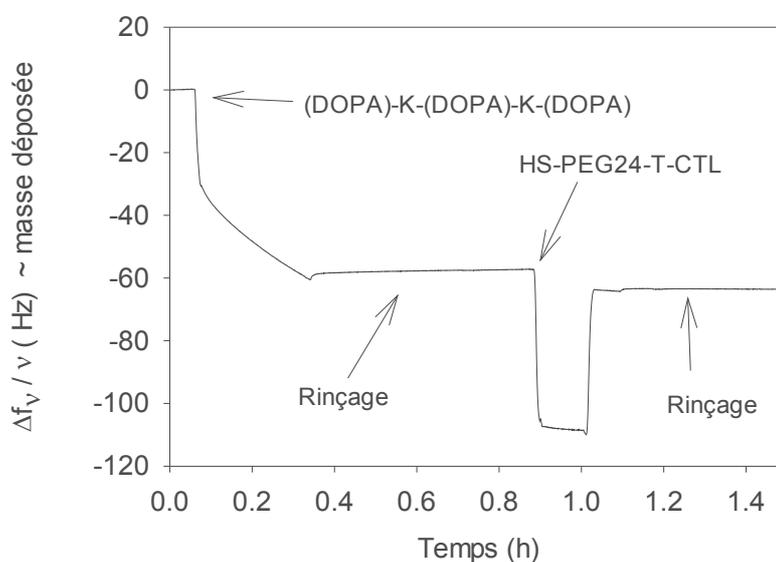


Figure 3.21 : Variation de la fréquence normalisée $\frac{\Delta f_v}{\nu}$ (avec $\nu = 3$) sur une surface en or d'un cristal de quartz avec le dépôt du peptide d'accroche D, suivi du peptide HS-PEG24-T-CTL.

Après rinçage, la variation de la fréquence normalisée liée au dépôt du peptide HS-PEG24-T-CTL est de 8 Hz, ce qui représente une quantité déposée de $3.84 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$, cette concentration surfacique étant similaire à celle obtenue pour le peptide D-T-CTL ou encore les peptides modifiés avec les espaceurs à base d'acides aminés sur SiO₂. Après avoir recouvert la surface du peptide D-PEG24-T-

CTL, nous avons suivi le clivage à la surface en présence de l'enzyme endoprotéinase Glu-C (Figure 3.22). Après 15h en présence de l'enzyme aucune variation de fréquence supplémentaire n'est observée. L'espaceur à base de PEG24 n'a donc pas d'effet sur le clivage du peptide à la surface.

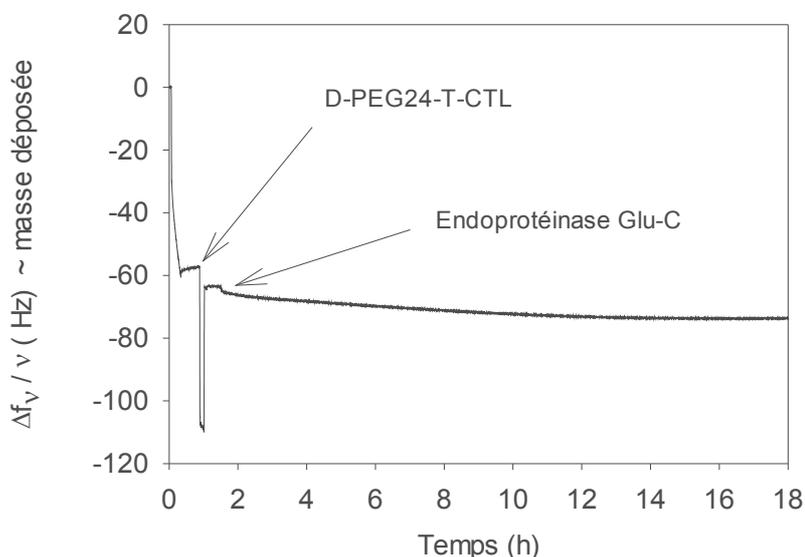


Figure 3.22 : Variation de la fréquence normalisée $\frac{\Delta f_v}{\nu}$ (avec $\nu = 3$) sur une surface en or d'un cristal de quartz avec le dépôt du peptide d'accroche D, suivi du peptide HS-PEG24-T-CTL et après mise en contact avec l'enzyme endoprotéinase Glu-C.

A ce stade de l'étude, il est alors envisagé que l'encombrement stérique du peptide à la surface ne serait pas la cause de l'absence de clivage. En effet, trois espaceurs ont été utilisés, avec des tailles différentes (de 6 à 24 résidus) et une polarité différente, la glycine étant un acide aminé apolaire, la sérine, un acide aminé polaire et le poly(éthylène) glycol, un polymère hydrophile. Malgré cela, aucun espaceur couplé au peptide T-CTL d'un côté, et (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA) de l'autre n'a permis un clivage à la surface par l'enzyme endoprotéinase Glu-C.

Une des hypothèses envisagée serait que l'accroche du peptide par la séquence (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA) empêcherait l'enzyme endoprotéinase Glu-C d'accéder au site de clivage. Il serait alors intéressant d'étudier le clivage du peptide HS- T-CTL (sans espaceur) et du peptide HS-T- PEG24-CTL (avec espaceur) déposé sur une surface d'or afin de vérifier ou non l'implication de la séquence d'accroche à base de L-DOPA dans le mauvais fonctionnement du clivage.

Une autre hypothèse serait que la conformation du peptide en surface compromettrait le clivage. En effet, Haynie *et al.*²³ ont démontré que de nombreux peptides présentaient une structure aléatoire en solution et une structure en hélice α en contact avec la membrane bactérienne et qu'une fois attachés, seuls les peptides qui maintenaient une conformation tridimensionnelle en hélice α en surface, possédaient une activité antimicrobienne. En outre, des études précédentes au laboratoire

ont démontré qu'en solution la cateslytine présentait la caractéristique d'être en feuillet β lors de conditions mimant la membrane bactérienne²⁴. Malgré le fait que ces résultats concernent l'activité microbienne et non le clivage, il serait intéressant d'élaborer une méthode permettant de déterminer la conformation tridimensionnelle des peptides en présence de l'enzyme. La mesure par dichroïsme circulaire serait un exemple de technique afin de mesurer la conformation de ces peptides en solution mais aussi greffés sur un film.

3.4. Activité antimicrobienne

3.4.1. Surfaces traitées avec le peptide tribloc

Malgré l'absence de clivage détectable en surface, l'étude bactériologie d'une surface en silice greffée avec le peptide D-T-CTL a été réalisée. Pour ce faire, les bactéries *Staphylococcus aureus* issues de la souche V8 et produisant l'enzyme endoprotéinase Glu-C ont été déposées pendant 3h sur une surface de silice traitée avec le peptide tribloc. Après 3h, le surnageant est prélevé puis un nouveau milieu de culture sans bactéries est déposée afin d'étudier uniquement la prolifération des bactéries en contact avec la surface. Après 18h d'incubation, les bactéries présentes à la surface ont été marquées à l'aide d'un fluorochrome afin de les observer par microscopie à fluorescence. Les marqueurs fluorescents démontrent que des bactéries vivantes étaient présentes sur la surface traitée à la même concentration que le contrôle négatif (Figure 3.23).

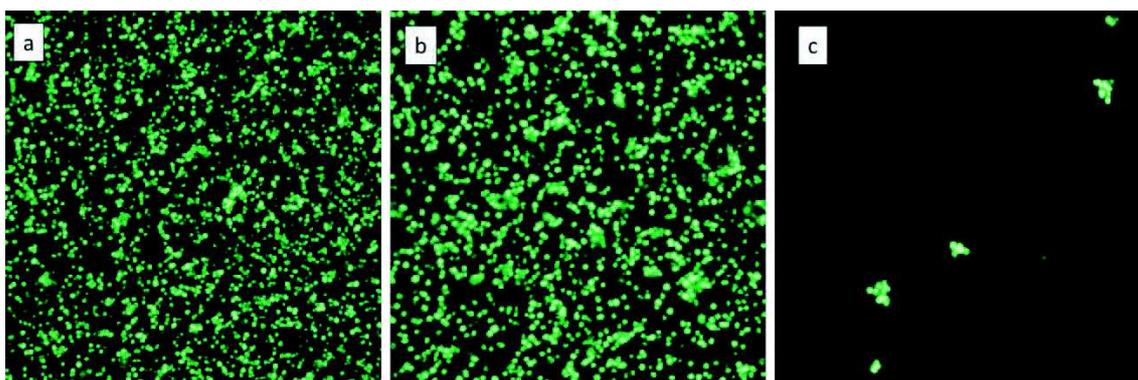


Figure 3.23 : Images obtenues par microscopie confocale des bactéries *S.aureus* V8 couplées avec le fluorochrome Syto 24 (fluorescence verte). **a)** Surface de silice avec greffage du peptide à la surface **b)** Contrôle négatif (surface en verre non traitée) **c)** Contrôle positif (surface en verre non traitée avec présence d'antibiotiques dans le surnageant initial). Taille des images : 100 x 100 μm^2 .

En outre, des études précédentes au laboratoire ont déterminé que la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la cateslytine ainsi que pour le peptide tribloc était de 50 μM en solution pour la souche *S. aureus* V8. Selon nos calculs, si toute la cateslytine déposée en surface était libérée par

clivage, la concentration en cateslytine présente en solution serait de $0.23 \pm 0.08 \mu\text{M}$, ce qui est très largement inférieur à sa CMI. Bien que n'ayant aucune indication quant à la quantité minimale nécessaire de peptides présents à la surface afin d'obtenir un effet antibactérien et ne sachant pas si un effet en surface peut être relié à la CMI, un autre procédé permettant d'augmenter la concentration peptidique à la surface pourrait être envisagé. Ces peptides étant chargés positivement, la technique des films multicouches utilisée dans le chapitre 4 pourrait être une alternative.

3.4.2. Surfaces traitées avec le peptide tribloc modifié

De nombreuses publications démontrent que certains peptides antimicrobiens en surface sont actifs uniquement en présence d'un espaceur¹⁹. Par exemple, Gabriel *et al.*²⁵ ont démontré que le peptide antimicrobien LL-37 n'est actif que sur une surface en titane en présence d'un espaceur PEG. En outre, Lodzeau *et al.*²⁶ ont mesuré l'activité bactéricide d'une surface traitée avec le peptide antimicrobien chrysopsin-1 couplé à des PEG de différentes tailles. Ils ont ainsi démontré que le mécanisme antimicrobien de la chrysopsin-1 était dépendant de la taille du PEG utilisé.

Nous avons étudié l'effet antimicrobien d'une surface traitée avec le peptide D-T-G10-CTL selon les mêmes conditions que pour le peptide D-T-CTL. L'effet bactériostatique a été mesuré en observant la quantité de bactéries présentes à la surface tandis que l'effet bactéricide a été mesuré par la croissance des bactéries présentes dans le surnageant et mises en contact avec les surfaces traitées (cf partie 2.8.3.) (Figure 3.24).

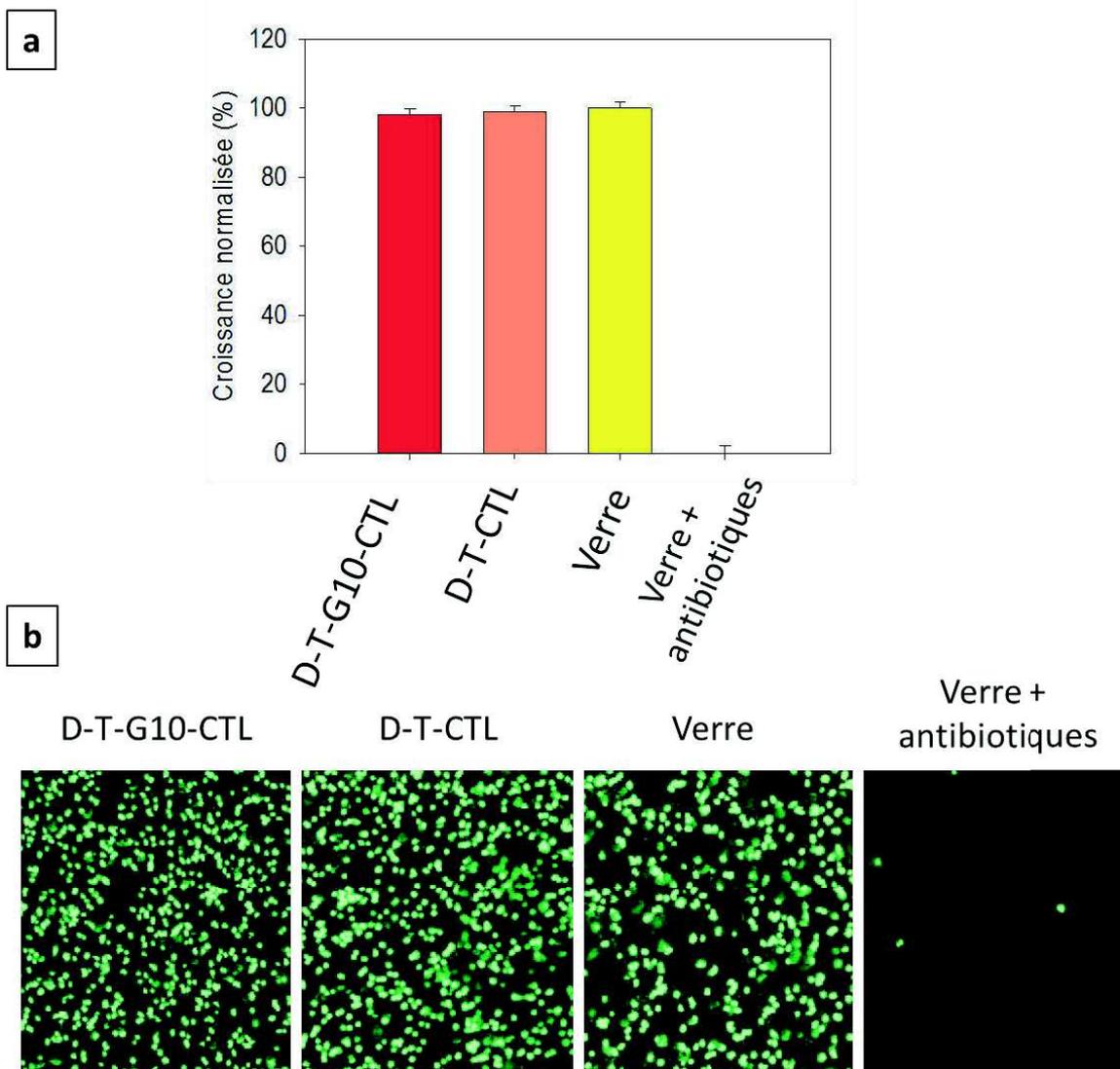


Figure 3.24 : **a)** Croissance normalisée (%) des bactéries *S. aureus* présentes dans le surnageant après 24h en contact avec les surfaces en verre traitées avec le peptide D-T-CTL et D-G10-T-CTL. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 échantillons par condition et la barre d'erreur correspond à l'écart-type. **b)** Images obtenues par microscopie à fluorescence des bactéries *S. aureus* présentes à la surface des échantillons en verre traités avec le peptide D-T-CTL et D-G10-T-CTL ainsi que pour le contrôle négatif (surface en verre non traitée) et le Contrôle positif (surface en verre non traitée avec présence d'antibiotiques dans le surnageant initial). Taille des images : 100 x 100 μm^2 .

Selon les résultats obtenus, il semblerait que l'espaceur comportant 10 acides aminés glycines n'a aucun effet sur le caractère antimicrobien du peptide présent à la surface d'une lamelle de verre. En effet, il apparaît que la quantité de bactéries présentes à la surface traitée avec le peptide D-G10-T-CTL est similaire à celle observée sur une surface non traitée ou traitée avec le peptide D-T-CTL. En outre, la croissance normalisée de *S. aureus* dans le surnageant est similaire dans les trois conditions (surface non traitée, surface traitée avec le peptide D-T-CTL ou D-G10-T-CTL). A ce stade de l'étude, il serait intéressant d'étudier les propriétés antimicrobiennes de surfaces traitées avec les autres peptides modifiés (espaceur à base de glycine et de sérine et espaceur composé de PEG).

Conclusion et perspectives

L'étude de l'accroche du peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA) sur une surface en SiO₂ a démontré que seule la L-DOPA présente sous forme oxydée (quinone) permet un dépôt durable du peptide malgré une réaction entre la forme quinone de la L-DOPA et les lysines présentes sur le peptide, amenant à la formation d'agrégats en solution. Nous avons ainsi décidé de déposer le peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR, ou D-T-CTL sous forme réduite. Après plusieurs rinçages, nous avons ajouté une solution d'oxydant pour former des liaisons chimiques « fortes » entre le peptide et la surface, en évitant ainsi la formation d'agrégats.

Concernant le clivage du peptide, nous avons confirmé ce clivage en solution par l'enzyme endoprotéinase Glu-C. Malgré cela, après accroche du peptide D-T-CTL sur une surface en SiO₂, aucun clivage apparent ne se produit d'après les résultats obtenus par QCM-D. En outre, les résultats microbiologiques ont démontré qu'une surface traitée avec le peptide tribloc ne présente aucun effet antimicrobien en présence de *S. aureus* et de l'enzyme. Bien que n'ayant aucune indication quant à la quantité minimum nécessaire de peptides présents à la surface afin d'obtenir un effet antibactérien, des études précédentes au laboratoire ont déterminé que la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la cateslytine ainsi que pour le peptide tribloc était de 50 µM en solution pour la souche *S. aureus* V8 alors que si la cateslytine libérée par clivage correspondait au maximum à la quantité déposée en surface, la concentration en cateslytine présente en solution serait de 0.23 ± 0.08 µM, ce qui est très inférieure à la valeur de la CMI. Un autre procédé permettant d'augmenter la concentration peptidique à la surface pourrait être envisagé. Ces peptides étant chargés positivement, la technique des films multicouches utilisée dans le chapitre 4 pourrait être une alternative.

Face à l'absence de clivage du peptide en surface, l'hypothèse émise est que les peptides présents à la surface empêcheraient l'enzyme d'atteindre le site de clivage à la surface par le manque d'espaceur entre ces peptides. Des modifications chimiques du peptide tribloc ont donc été réalisées en intégrant un espaceur entre le site d'accroche et le site de clivage. Trois espaceurs ont été utilisés, avec des tailles différentes (de 6 à 24 résidus) et une polarité différente, d'un espaceur composé d'unités uniquement hydrophiles et un espaceur composé uniquement d'unités hydrophobes. Malgré cela, aucun clivage n'est observé pour ces peptides modifiés. Il a aussi été démontré que l'un des peptides modifiés ne produit aucun effet antimicrobien.

Une des hypothèses envisagée serait que l'accroche du peptide par la séquence (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA) empêcherait le clivage par l'enzyme Glu-C. Il serait alors intéressant d'étudier le clivage du peptide HS-T-CTL (sans séquence d'accroche et sans espaceur) et du peptide HS-PEG24-T-

CTL (sans séquence d'accroche et avec espaceur) déposée sur une surface d'or afin de vérifier ou non la responsabilité de la séquence d'accroche dans le mauvais fonctionnement du clivage. En outre, une étude a démontré que le peptide antimicrobien magainine, couplé à un espaceur PEG et à une L-DOPA, présentait un effet antimicrobien en surface¹⁰. Il serait alors intéressant de mesurer l'effet microbiologique selon nos conditions et avec le peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)-PEG24-Maigainine déposée sur une surface afin de discriminer ou non le rôle de la séquence d'accroche dans l'absence de clivage.

Une autre hypothèse est que la conformation du peptide en surface compromettrait le clivage. Il serait intéressant d'élaborer une méthode permettant de déterminer la conformation tridimensionnelle des peptides en présence de l'enzyme.

Enfin, la QCM-D étant la seule méthode employée afin de déterminer le clivage du peptide en surface, la technique FRET serait intéressante à employer afin de vérifier l'absence de clivage. Des études préliminaires au laboratoire ont par ailleurs démontré que lorsque le peptide T-CTL-FRET est adsorbé sur une surface recouverte du peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA) oxydé et non-oxydé, la fluorescence émise en solution augmentait en présence de l'enzyme endoprotéinase Glu-C (Figure 3.25). Il serait alors intéressant d'utiliser le peptide complet D-T-CTL avec des groupements utilisés en FRET et présents aux extrémités afin d'étudier le clivage du peptide à la surface dans les mêmes conditions qu'en solution.

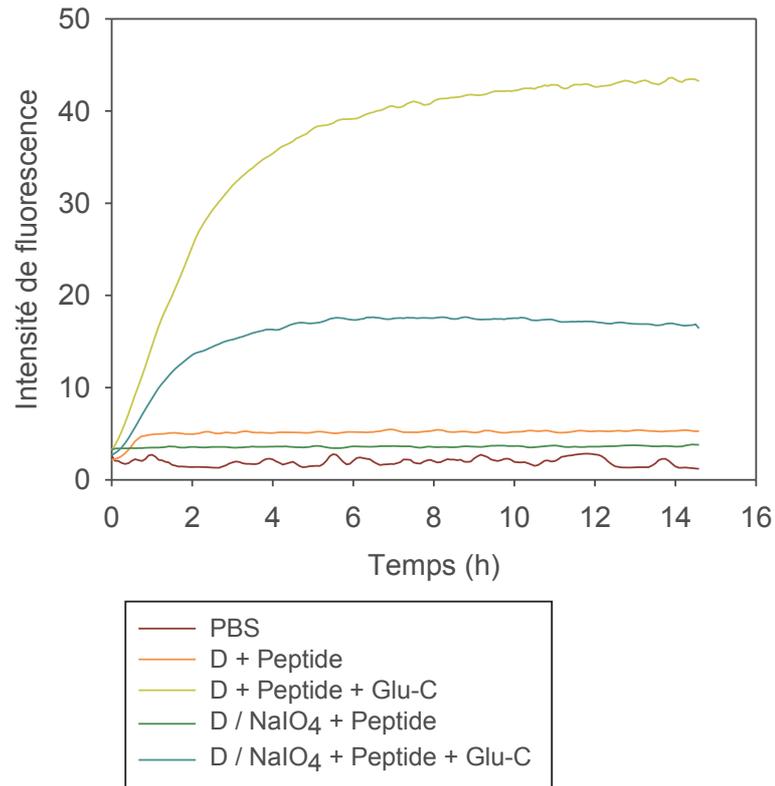


Figure 3.25 : Intensité de fluorescence émise à 490 nm en fonction du temps dans une solution en contact avec une surface en verre non traitée (**courbe rouge**) ; traitée avec le peptide D et le peptide T-CTL-FRET (**courbe orange**) et en présence de l'enzyme endoprotéinase Glu-C (**courbe verte claire**) ; traitée avec le peptide D oxydé et le peptide T-CTL-FRET (**courbe verte**) et en présence d'enzyme endoprotéinase Glu-C (**courbe bleue**). Ces courbes représentent la moyenne de 3 valeurs obtenues sur 3 échantillons.

Références bibliographiques

1. Dalsin, J. L.; Messersmith, P. B., Bioinspired antifouling polymers. *Materials Today* **2005**, *8*, 38-46.
2. Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B., Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science* **2007**, *318*, 426-430.
3. Lee, H.; Scherer, N. F.; Messersmith, P. B., Single-molecule mechanics of mussel adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 12999-13003.
4. Aslam, R.; Marban, C.; Corazzol, C.; Jehl, F.; Delalande, F.; Van Dorsselaer, A.; Prevost, G.; Haikel, Y.; Taddei, C.; Schneider, F.; Metz-Boutigue, M. H., Cateslytin, a chromogranin A derived peptide is active against *Staphylococcus aureus* and resistant to degradation by its proteases. *PLoS one* **2013**, *8*, e68993.
5. Drapeau, G. R.; Boily, Y.; Houmard, J., Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* **1972**, *247*, 6720-6726.
6. Brubaker, C. E.; Messersmith, P. B., The present and future of biologically inspired adhesive interfaces and materials. *Langmuir* **2012**, *28*, 2200-2205.
7. Danner, E. W.; Kan, Y.; Hammer, M. U.; Israelachvili, J. N.; Waite, J. H., Adhesion of mussel foot protein Mefp-5 to mica: an underwater superglue. *Biochemistry* **2012**, *51*, 6511-6518.
8. Maier, G. P.; Rapp, M. V.; Waite, J. H.; Israelachvili, J. N.; Butler, A., Adaptive synergy between catechol and lysine promotes wet adhesion by surface salt displacement. *Science* **2015**, *349*, 628-632.
9. Statz, A. R.; Meagher, R. J.; Barron, A. E.; Messersmith, P. B., New peptidomimetic polymers for antifouling surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 7972-7973.
10. Peyre, J.; Humblot, V.; Methivier, 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. *Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 13839-13847.
11. Krogsgaard, M.; Nue, V.; Birkedal, H., Mussel-Inspired Materials: Self-Healing through Coordination Chemistry. *Chemistry* **2016**, *22*, 844-857.
12. Yang, J.; Cohen Stuart, M. A.; Kamperman, M., Jack of all trades: versatile catechol crosslinking mechanisms. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 8271-8298.
13. Yu, J.; Wei, W.; Danner, E.; Ashley, R. K.; Israelachvili, J. N.; Waite, J. H., Mussel protein adhesion depends on interprotein thiol-mediated redox modulation. *Nature Chemical Biology* **2011**, *7*, 588-590.
14. Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B., Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces : continuum mechanics approach. *Physica Scripta* **1999**, *59*, 391-396.
15. Lee, B. P.; Dalsin, J. L.; Messersmith, P. B., Synthesis and gelation of DOPA-modified poly(ethylene glycol) hydrogels. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1038-1047.
16. Khalafi, L.; Rafiee, M.; Shahbak, M.; Shirmohammadi, H., Kinetic Study of the Oxidation of Catechols in the Presence of N-Methylaniline. *Journal of Chemistry* **2013**, *2013*, 5.
17. Manthey, M. K.; Pyne, S. G.; Truscott, R. J. W., Addition of aliphatic and aromatic-amines to catechol in aqueous-solution under oxidizing conditions. *Australian Journal of Chemistry* **1989**, *42*, 365-373.
18. Liu, Z.; Ma, S.; Duan, S.; Xuliang, D.; Sun, Y.; Zhang, X.; Xu, X.; Guan, B.; Wang, C.; Hu, M.; Qi, X.; Zhang, X.; Gao, P., Modification of Titanium Substrates with Chimeric Peptides Comprising

Antimicrobial and Titanium-Binding Motifs Connected by Linkers To Inhibit Biofilm Formation. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8*, 5124-5136.

19. Costa, F.; Carvalho, I. F.; Montelaro, R. C.; Gomes, P.; Martins, M. C. L., Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomaterialia* **2011**, *7*, 1431-1440.

20. Aumsuwan, N.; Heinhorst, S.; Urban, M. W., Antibacterial surfaces on expanded polytetrafluoroethylene; penicillin attachment. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 713-718.

21. Pensa, E.; Cortés, E.; Corthey, G.; Carro, P.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Benítez, G.; Rubert, A. A.; Salvarezza, R. C., The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45*, 1183-1192.

22. Lee, Y.; Chung, H. J.; Yeo, S.; Ahn, C.-H.; Lee, H.; Messersmith, P. B.; Park, T. G., Thermo-sensitive, injectable, and tissue adhesive sol-gel transition hyaluronic acid/pluronic composite hydrogels prepared from bio-inspired catechol-thiol reaction. *Soft Matter* **2010**, *6*, 977-983.

23. Haynie, S. L.; Crum, G. A.; Doele, B. A., Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, *39*, 301-307.

24. Jean-Francois, F.; Castano, S.; Desbat, B.; Odaert, B.; Roux, M.; Metz-Boutigue, M. H.; Dufourc, E. J., Aggregation of cateslytin beta-sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new mode of action for antimicrobial peptides? *Biochemistry* **2008**, *47*, 6394-6402.

25. Gabriel, M.; Nazmi, K.; Veerman, E. C.; Nieuw Amerongen, A. V.; Zentner, A., Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 548-550.

26. Lozeau, L. D.; Alexander, T. E.; Camesano, T. A., Proposed Mechanisms of Tethered Antimicrobial Peptide Chrysopsin-1 as a Function of Tether Length Using QCM-D. *Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*, 13142-13151.

Chapitre 4 :

Revêtements à base de polypeptides

Chapitre 4 : Revêtements à base de polypeptides

Introduction	127
4.1. Les revêtements (PAR/HA).....	129
4.1.1. Résumé	129
4.1.2. Article	130
4.1.3. Résultats complémentaires.....	154
4.1.3.1. <i>Variation du nombre de bicouches.....</i>	<i>154</i>
4.1.3.2. <i>Efficacité à long terme.....</i>	<i>155</i>
4.1.3.3. <i>Utilisation de PAR polydisperses.....</i>	<i>156</i>
4.1.3.4. <i>Influence de l'état de surface des lamelles en verre.....</i>	<i>157</i>
4.2. Effet du polyanion sur les films antibactériens à base de PAR	160
4.2.1. Résumé	160
4.2.2. Article	160
4.3. Etablissement d'un modèle général de films antibactériens (polypeptide/HA)₂₄	179
4.3.1. Efficacité antibactérienne et fongicide des homopolypeptides.....	179
4.3.2. Efficacité antibactérienne des films (polypeptide/HA) ₂₄	181
4.3.3. Mécanisme bactéricide des films multicouches.....	185
Conclusion.....	187
Références bibliographiques	189

Introduction

La conception de matériaux nanostructurés permet de nombreuses applications dans le domaine biomédical^{1,2,3}. Les films multicouches développés par Decher *et al.*⁴ en 1992 présentent un intérêt majeur dans ce domaine puisqu'ils possèdent de nombreux avantages : facilité de mise en œuvre, contrôle de la construction des films, capacité d'intégrer une grande variété de biomolécules, etc. Le principe de construction de ces films est basé sur les interactions électrostatiques entre des polyélectrolytes, ce qui conduit à déposer successivement des polymères chargés positivement (polycations) et des polymères chargés négativement (polyanions), d'où l'appellation « layer-by-layer » pour le mode de dépôt.

Les films multicouches utilisant la technique « layer-by-layer » (LbL) ont été largement développés au sein du laboratoire pour des applications biomédicales diverses. Pour exemple, Richert *et al.*⁵ ont étudié l'effet de la réticulation des films poly(L-lysine)/acide hyaluronique sur l'adhésion cellulaire et ont démontré que cette adhésion était favorisée pour des surfaces de rigidité importante, tels que les films réticulés. En outre, Chluba *et al.*⁶ ont montré que ces films pouvaient être rendus biologiquement actifs par insertion de polyélectrolytes sur lesquels sont couplés de manière covalente des peptides actifs.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à concevoir des films LbL antibactériens et à comprendre leur mécanisme d'action. Des études précédentes⁷ au laboratoire ont démontré qu'un film composé de poly(L-arginine) (PAR) comme polycation et d'acide hyaluronique (HA) comme polyanion possédait non seulement des propriétés anti-inflammatoires, mais également un effet antibactérien contre *Staphylococcus aureus*.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si la taille des chaînes de PAR avait une influence sur la propriété antibactérienne des films. Durant cette étude, quatre poly(L-arginine) monodisperses et de longueurs de chaîne différentes ont été étudiées : PAR10, PAR30, PAR100 et PAR200, correspondant respectivement à des chaînes comportant 10, 30, 100 et 200 résidus d'arginines. Le mécanisme d'action des films a aussi été étudié. On pourra noter que ce travail représente la première étude de multicouches de polyélectrolytes utilisant des polymères monodisperses et de relativement petite taille (de 10 à 200 unités monomériques).

Nous avons aussi voulu vérifier si l'effet antibactérien était maintenu avec d'autres polyanions. Quatre polysaccharides (acide alginique, chondroïtine sulfate A, héparine et acide hyaluronique), un

polypeptide (poly(acide L-glutamique) et un polymère synthétique (poly(styrène sulfonate)) ont été étudiés en combinaison avec la PAR pour former des films (PAR/polyanion).

Enfin, comme la propriété antibactérienne des films (PAR/HA) semble être reliée à la composition des PAR, nous avons voulu établir un modèle général en utilisant d'autres polypeptides positivement chargés dans la construction des films (polycation/HA). La poly(L-lysine) et la poly(L-ornithine) ont donc été étudiées en tant qu'agents antibactériens. L'effet de ces films sur les pathogènes ainsi que leur mécanisme d'action ont été étudiés.

4.1. Les revêtements (PAR/HA)

4.1.1. Résumé

Durant cette étude, quatre poly(L-arginine) (abrégé PAR) monodisperses et de longueurs de chaîne différentes ont été étudiées : PAR10 (10 arginines), PAR30 (30 arginines), PAR100 (100 arginines) et PAR200 (200 arginines). L'effet antimicrobien en solution de ces quatre PAR a tout d'abord été étudié et la concentration minimale bactéricide (CMB) obtenue s'est avérée similaire pour ces polymères : 2 μM , excepté pour la PAR10 qui possède une CMB de 10 μM .

Ces quatre PAR ont été étudiées par dépôt alterné avec l'acide hyaluronique pour former des films de 24 bicouches sur une surface de verre. Après 24h d'incubation à 37°C avec *Staphylococcus aureus*, seul le film (PAR30/HA)₂₄ a révélé un effet antibactérien. En effet, seul celui-ci a permis d'obtenir une concentration bactérienne en solution proche de zéro et une absence de biofilm en surface. Ce revêtement a montré son efficacité sur d'autres types de bactéries à Gram positif (*Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline) et à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*).

Dans un second temps, nous avons tenté d'élucider le mécanisme responsable de l'effet antimicrobien du film (PAR30/HA)₂₄. Une première hypothèse a considéré que les PAR30 présentes dans le film étaient capables de migrer hors du film et ainsi d'apporter la dose bactéricide directement en solution. Pour vérifier cela, nous avons greffé un composé fluorescent sur les chaînes de PAR afin de quantifier le nombre de PAR30 libérées dans une solution bactérienne en contact avec le film (PAR30/HA)₂₄. Après 24h à 37°C, nous avons déterminé que la PAR30 était présente en solution à une concentration de 0.2 – 0.3 μM . Or la CMB correspondant à la PAR30 est de 2 μM . Ce résultat démontre que la libération des chaînes de PAR30 hors du film dans le surnageant ne peut être à l'origine de l'effet antimicrobien du film. Le mécanisme d'inhibition bactérienne serait alors relié aux propriétés intrinsèques du film composé de PAR30 et nécessiterait un contact direct entre les bactéries et le film. Cette deuxième hypothèse a été étudiée et validée par vidéomicroscopie, démontrant que les bactéries présentes à la surface du film sont immédiatement lysées, sans prolifération possible. Nous avons finalement construit un film antibactérien à la propriété dite de « contact-killing ».

Il a été démontré que, dans un film multicouche, deux populations de polycations coexistent : une population dite « immobile », participant à la construction du film par interaction avec le polyanion et une population dite « mobile », diffusant librement dans le film. La diffusion des PAR au sein du film (PAR/HA)₂₄ a été étudiée pour chaque type de polycations : PAR10, PAR30, PAR100 et

PAR200. Pour ce faire, le pourcentage de chaînes mobiles au sein du film a été déterminé par la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP). Nous avons montré que, lorsque la taille des chaînes du polycation augmente, la mobilité du polycation diminue au sein du film. Cela nous permet de conclure que pour obtenir un film LbL antimicrobien ayant une propriété de « contact-killing » il est nécessaire qu'une grande quantité de polycations mobiles soit présente dans le film, ce qui constitue un réservoir de polycations capables de diffuser du cœur du film vers la surface.

4.1.2. Article

Publié dans le journal *Chemistry of Materials*, le 31 octobre 2016.

Unexpected Bactericidal Activity of Poly(arginine)/Hyaluronan Nanolayered Coatings

Angela Mutschler, Lorène Tallet, Morgane Rabineau, Camille Dollinger, Marie-Hélène Metz-Boutigue, Francis Schneider, Bernard Senger, Nihal Engin Vrana, Pierre Schaaf, and Philippe Lavalle.

INTRODUCTION

Year after year, implantation of prostheses and medical devices is increasing and the prevalence of infections related to implants reported in the literature is constantly on the rise. Some of the papers predict a "tsunami" of peri-implantitis in the near future.⁸ The incidence of infections following implantations is increasing,⁹ more particularly in cardiac implantable electronic device where local contamination during implantation is the main risk of infection. Then, this requires to change the device and a second implantation with a high risk of mortality.

It is known that half of all nosocomial infections worldwide involve a medical device.^{10,11} Some key factors are at the origin of the increase in medical-device related infections like *i)* ageing of the population, *ii)* multiple drug resistance bacteria, *iii)* poor development of new designed antibiotic molecules. In the case of medical devices like implants, the surgical site is an attractive entrance door and target for pathogens and it generally leads to early complications. To prevent such infections, a local treatment for the first 6-12 h post-implantation would be a potential remedy.

Innovative, bioactive, smart coatings and materials are urgently needed to slow this trend. Thus, one strategy consists in the design of anti-adhesive coatings to inhibit attachment and growth of pathogens on the device.¹² However, as the pathogens are not killed by this method, the risk of colonization of another surrounding site is high, in particular in the case of fragile and immunodeficient people. Some strategies based on release of active compounds from coatings have been designed to

reduce implant-related infections. These are interesting approaches, but the release profile in situ should be perfectly controlled to avoid negative effects of possible overdose of delivered drugs with pertaining side effects. Moreover, generally the release is passive which means that antimicrobial agents can be delivered in an unnecessary way, *i.e.* in the absence of bacteria. To circumvent these drawbacks, contact-killing strategies could be more advantageous and consist in damaging the bacteria only when they come in contact with the surface of the material. Some smart coatings where antimicrobial activity is triggered by pathogens itself have also been designed recently,^{13,14,15} however they are multicomponent systems and they require a bioactive substance. Some innovative strategies based on a minimal number of bio-derived components, without chemical processes, need to be designed to make further progress towards biomedical applications. Antimicrobial activity of positively charged molecules have been shown for metal ions and also natural antimicrobial peptides, thus coating designs based on charged macromolecular systems can provide a solution in fight against nosocomial infections.

The alternate deposition of polyanions and polycations on a substrate leads usually to the formation of a film, called polyelectrolyte multilayer, whose thickness increases with the number of deposition steps.^{4, 16} The potential applications of these kinds of films are widespread ranging from energy storage devices to anti-fogging coatings and bioactive substrates.^{1, 17, 18, 19, 20} In this latter area, antimicrobial coatings are receiving extensive attention due to their importance in the fight against nosocomial infections.²¹ There exist two kinds of multilayers, depending on the strength of the interactions between the polyelectrolytes: there are films whose thickness increases linearly with the number of deposition steps and other ones whose thickness increases exponentially with this number.²² This second type of film growth is related to the diffusion, in and out of the whole film, of at least one polyelectrolyte constituting the multilayer.²³ Whereas the molecular weight of the constituting polyelectrolytes can affect the thickness increment per deposition step, in particular for exponentially growing films, to our knowledge no study reported an effect of the molecular weight on the functionality of the multilayer. This is probably one of the reason why the number of studies devoted to investigate the effect of the molecular weight of the constituting polyelectrolytes on the film properties is minor when compared to those investigating the influence of other physico-chemical parameters like pH or ionic strength.

In a previous study we found for the first time that poly(L-arginine)/hyaluronic acid (PAR/HA) multilayers are particularly interesting for biological applications because they possess powerful immunomodulatory properties and in addition they show antimicrobial properties against *S. aureus*.⁷ (PAR/HA) multilayers is an exponentially growing film like their widespread studied poly(L-lysine)/HA. However in our previous study the poly(L-arginine) used was not monodisperse but the batch was

composed of a distribution of molecular weight with a mean value of about 70 000 (which correspond to chains with about 400 arginine residues).

In the present study, we have selected well-defined poly(L-arginine) chains with either 10, 30, 100 or 200 residues to buildup layer-by-layer films with HA as polyanion. Incubation of *S. aureus* on these films show a strong inhibition of bacterial growth only for films made of poly(L-arginine) containing 30 residues (PAR30). Absolutely no inhibition of *S. aureus* was observed for the films made of shorter or longer poly(L-arginine) chains. Relationship between this behavior and physico-chemical properties of the films demonstrated that films composed of poly(L-arginine) with 30 residues possess specific features that could explain their inhibiting properties on bacterial growth which sheds light on the basis of polycation based antimicrobial agents.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The polyelectrolyte multilayer films have been built up with the following polyelectrolytes. Polycations consist in poly(L-arginine hydrochloride) (PAR) and was purchased from Alamanda Polymers, USA. The different PAR polymers used differ by the numbers of arginine residues per chain: PAR10 (10R, Mw = 2.1 kDa, PDI = 1), PAR30 (30R, Mw = 6.4 kDa, PDI = 1.01), PAR100 (100R, Mw = 20.6 kDa, PDI = 1.05), and PAR200 (200R, Mw = 40.8 kDa, PDI = 1.06). Hyaluronic acid (HA, Mw = 150 kDa) used as the polyanion was from Lifecore Biomed, USA. Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS) was purchased by Merck (Germany).

Monitoring the buildup of films

Film buildup was followed using an in situ quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D, E1, Q-Sense, Sweden). The quartz crystal is excited at its fundamental frequency (about 5 MHz), as well as at the third, fifth, seventh and ninth overtones (denoted by $\nu = 3$, $\nu = 5$, $\nu = 7$ and $\nu = 9$ corresponding respectively to 15, 25, 35 and 45 MHz). Changes in the resonance frequencies ($-\Delta f_\nu$) are measured at these four frequencies. An increase of the normalized frequency $-\Delta f_\nu/\nu$ is often associated to a proportional increase of the mass coupled with the quartz (Sauerbrey's approximation). However when the normalized frequency shifts for the various overtones are unequal, it is advisable to use the model developed by Voinova *et al.*²⁴ where both the measured frequency shifts and dissipations for several overtones are processed to derive the thickness. This model relied on the hypothesis that the film is a homogeneous, isotropic and non-sliding viscoelastic stratum deposited on the quartz crystal. Data corresponding to the overtones $\nu = 3, 5, 7$ and 9 have been used to determine the thicknesses of all films used here. PAR and HA were dissolved at 0.5 mg.mL⁻¹ in sterilized buffer containing 150 mM NaCl and 10 mM of TRIS at pH 7.4. The polyelectrolyte solutions were successively

injected into the QCM-D cell containing the quartz crystal and PAR was the first deposited polyelectrolyte. Each polyelectrolyte was adsorbed for 8 min and then, a rinsing step of 5 min with NaCl-TRIS buffer was performed.

Buildup of (PAR/HA)₂₄ films with a dipping robot

For the construction of 24 bilayers of PAR/HA ((PAR₃₀/HA)₂₄) an automated dipping robot was used (Riegler & Kirstein GmbH, Germany). Glass slides (12 mm in diameter) were first washed with Hellmanex® II solution at 2%, HCl 1M, H₂O, and ethanol and dried with an air flow. Solution of polyelectrolytes were prepared as described above for QCM experiments. Glass slides were dipped alternatively in the polycation and polyanion solutions and extensively rinsed in NaCl-TRIS buffer between each step. After construction, the films were dried with air flow and then immersed in NaCl-TRIS buffer and stored at 4°C before use. The thickness of the obtained film were evaluated by deposition of 100 µL of PAR-FITC (see below "*Fluorescent labelling of PAR*, 0.5 mg.mL⁻¹ in NaCl-TRIS buffer) on top of the PAR/HA multilayer films. After 5 minutes and diffusion of PAR-FITC through the whole film, a rinsing step was performed with Tris-NaCl buffer. Observations of the films was carried out with a confocal microscope Zeiss LSM 710 microscope (Heidelberg, Germany) using 20× Plan Apo (0.8 NA) objective (Zeiss).

Antibacterial Assay

Staphylococcus aureus (*S. aureus*, ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* Methicillin Resistant (MRSA, ATCC BAA-44), *Micrococcus luteus* (*M. luteus*, ATCC 9341), *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, ATCC 27853) strains were used to assess the antibacterial properties of the samples. Bacterial strain was cultured aerobically at 37°C in a Mueller Hinton Broth (MHB) medium (Merck, Germany), pH 7.4. One colony was transferred to 10 mL of MHB medium and incubated at 37°C for 20 h. To obtain bacteria in the mid logarithmic phase of growth, the absorbance at 620 nm of overnight culture was adjusted to 0.001, corresponding to a final density of 8.10⁵ CFU.mL⁻¹. Glass slides coated with (PAR/HA)₂₄, are sterilized by using UV-light during 15 minutes, then washed with NaCl-TRIS buffer. After washing, each glass slides were deposited in 24-well plates with 300 µL of *S. aureus*, A₆₂₀ = 0.001, and incubated during 24 hours at 37°C. For negative control, uncoated glass slides were directly incubated with *S. aureus* using a similar method. For positive control, Tetracycline (10 µg.mL⁻¹) and Cefotaxime (0.1 µg.mL⁻¹) were added in the *S. aureus* solution in contact with uncoated glass slides. To quantify bacteria growth or inhibition after 24h, the absorbance of the supernatant at 620 nm was measured.

Bacteria Live Dead Assay

To evaluate the health of bacteria which are on the surface, the BacLight™ RedoxSensor™ CTC Vitality Kit (ThermoFischer Scientific Inc., France) was used. This kit gives a semi-quantitative estimate of healthy vs unhealthy bacteria. SYTO® 24 green-fluorescent nucleic acid stain (ThermoFischer Scientific Inc., France) is used for counting all bacteria. A solution of 50 mM CTC and 0.001 mM Syto 24 in pure water is prepared. Each glass slides were washed with phosphate-buffered saline buffer (PBS), pH = 7.4. Then 270 µL of PBS and 30 µL of CTC/Syto 24 solution were added. The plate were incubated 30 min at 37°C, away from light. Each surfaces was observed with confocal microscope (Zeiss LSM 710 microscope, Heidelberg, Germany), using 63× Plan Apo (1.4 NA) objective immersed in oil. Excitation / emission wavelength of stains was 450/630 nm for CTC and 490/515 nm for Syto 24.

Biocompatibility test

Human fibroblasts from skin/foreskin (CRL-2522 from ATCC/LGC Standards, France) were cultured at 37°C in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC/LGC) with 10% of Fetal Bovin Serum (FBS, Gibco/ThermoFischer Scientific Inc., France) and 1% of penicillin streptomycin (Pen Strep, Life Technologies / ThermoFischer Scientific Inc., France). 50 000 cells were incubated in each well of a 24 well-plates during 24h. Glass slides coated with (PAR/HA)₂₄ were incubated simultaneously in a 6 well-plates with 3 mL of medium. After 24h, the medium of the wells containing cells was removed and replaced by the supernatant that was in contact with the films for 24h. Human fibroblasts were incubated during 24h at 37°C. Then, the supernatant was removed and incubated with 10% of resazurin (Fluorometric Cell viability kit I, Promocell, Germany) during 2h. The cell viability was determined by measuring the fluorescence of produced resorufin (Excitation / emission wavelength = 560/590 nm). Cells were washed twice with PBS and fixed with PFA 4% solution during 10 minutes, and then again washed twice with PBS. A solution of Phalloidin was prepared in PBS buffer with 1% of bovin serum albumin (BSA). The staining solution was placed on the fixed cells for 30 minutes at room temperature and then washed two times with PBS buffer. A solution of DAPI was prepared and deposited on the cells at the same conditions as previously. Fluorescence images were captured using the Nikon Elipse Ti-S microscope with a 10× Plan APO (1.4 NA) objective equipped with Nikon Digital Camera (DS-Q11MC with the NIS-Elements software, Nikon, France), and processed with ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Excitation / emission wavelength for Alexa Fluor® 568 Phalloidin was 578/600 nm and for DAPI 358/461 nm.

Time-lapse microscopy

Glass slides coated with (PAR/HA)₂₄ were sterilized by using UV-light during 15 minutes, then washed with NaCl-TRIS buffer. After washing, each glass slides were mounted in a Ludin Chamber (Life Imaging Services, Switzerland)) with 1 mL of *S.aureus* ($A_{620} = 0.001$) in MHB medium. The time-lapse sequence was performed during 24 h with a Nikon TIE microscope equipped with a 60× PL APO oil (1.4 NA) objective and an Andor Zyla sCMOS camera (Andor Technology Ltd. United Kingdom) was used with Nikon NIS-Elements Ar software (Nikon, France). Phase contrast and fluorescence images were acquired every 5 min for 24 h. Images were processed with ImageJ.

Circular Dichroism

Circular dichroism (CD) spectra were recorded using a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco Corporation, UK) as an average of 3 scans obtained using a 0.1 mm path length quartz cuvette at 22°C from 180 to 300 nm with data pitch of 0.1 nm and a scan speed of 20 nm.min⁻¹. All spectra were corrected by subtraction of the buffer spectra. Spectra for each PAR in solution were obtained at a concentration of 2 mg.mL⁻¹ in NaCl-TRIS buffer. Spectra for each (PAR/HA)₂₄ were obtained by coating poly(dimethylsiloxane) (PDMS) sheets of 254 μm thickness (Specialty Manufacturing Inc., Saginaw, USA). All CD data were expressed as mean residue ellipticity.

Fluorescent labeling of PAR

For labeling PAR chains, PAR (15 mg.mL⁻¹ in 100 mM NaHCO₃ pH 8.3 buffer) was incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma Aldrich, France) at 1:2 molar ratio of PAR/FITC at room temperature for 3 h. This solution was dialyzed against 1 L of water at 4°C with a Slide-A-Lyser Dialysis Cassette (Thermo Fischer Scientific Inc, USA), cut-off = 3500 MWCO. PAR-FITC was then produced and stored in aliquots of 2 mL (0.5 mg.mL⁻¹ in NaCl-TRIS buffer).

Release Experiments

For the first experiment, a (PAR30/HA)₂₄ film was built by using PAR-FITC. Release experiments were performed at 37°C during 24 h in presence of MHB medium or a *S.aureus* / MHB solution ($A_{620} = 0.001$). 300 μL of mineral oil were added on the top of the supernatant to prevent any evaporation during the monitoring. The release of PAR-FITC in solution was performed by measuring the fluorescence of the supernatant over time with a spectrofluorimeter (SAFAS Genius XC spectrofluorimeter, Monaco) with excitation / emission wavelength of 488/517 nm. Three samples were studied for each conditions.

For the second experiment, a (PAR30/HA)₂₄ film was incubated at 37°C with two conditions : A) with 300 μL of a *S. aureus* solution ($A_{620} = 0.001$) and B) 300 μL of MHB only. After 24 h, the

supernatant in contact with the LbL was taken and incubated with a new *S. aureus* solution to have a final $A_{620} = 0.001$. After 24h of incubation at 37°C, the absorbance at 620 nm was measured.

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments

The proportion of mobile molecules p was measured for (PAR/HA)₂₄ films containing PAR-FITC by performing photobleaching experiments (FRAP). A glass slide coated with a PAR/HA film was introduced in a home-made sample holder and immersed in 200 μ L of NaCl-TRIS buffer. One circular region (4.4 μ m in radius and referred to as "R4" in an image of 35 μ m \times 35 μ m or 10.6 μ m in radius and referred to as "R10" in an image of 85 μ m \times 85 μ m) was exposed for 700 ms to the light of a laser set at its maximum power ($\lambda = 488$ nm). Then, the recovery of fluorescence in the bleached area was followed over time. Observations were carried out with a Zeiss LSM 710 microscope (Heidelberg, Germany) using a 20 \times Plan Apo (0.8 NA) objective (Zeiss). In the same time, three equally sized circular reference areas are monitored. The intensity in these areas serves to normalize the intensity in the bleached area so that bleaching during the recovery is accounted for.

Under the hypothesis that i) the recovery is due to the Brownian diffusion of the mobile labeled molecules, ii) all moving labeled molecules have the same diffusion coefficient, and iii) the initial intensity profile (i.e. immediately after the bleaching) has a sharp edge (a circle in the present case), the time evolution of the normalized intensity can be derived theoretically.^{25 26} It depends on the diffusion coefficient, D , and the proportion of mobile labeled molecules, p , as well as the radius, R , of the initially bleached area. Note that, according to the aforementioned theory, the area observed during the recovery must have the same radius and the same center as the bleached area.

Cross-linking of (PAR30/HA)₂₄ films

Crosslinking was performed by immersing the (PAR30/HA)₂₄ films in a solution containing EDC (100 mM) and N-hydroxysuccinimide (10 mM) in NaCl (0.15 M) during 15 h at 4 °C. Films were rinsed 2 times with a NaCl (0.15 M) solution then immersed in a solution of ethanolamine (1M) during 40 minutes at 4°C to neutralize all carboxylates functions that have not react. The films were rinsed with NaCl solution and the NaCl-TRIS buffer solution was used for the last rinsing step.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to test the buildup of the PAR/HA films, we first used quartz crystal microbalance (QCM). Figure 4.1a corresponds to the layer-by-layer deposition monitored with QCM for various molecular weight of PAR (10, 30, 100 or 200 residues corresponding to notation PAR10 PAR30, PAR100 or PAR200 respectively). In a first approximation, it is known that the increase in the normalized frequency is related to an increase in the deposited mass or thickness.²⁷ An exponential growth of the

normalized frequency ($\frac{\Delta f_V}{\nu}$) with the number of deposition step was observed for all the films even with the shorter PAR chains consisting of 10 residues (PAR10) (Figure 4.2). We also estimated the thicknesses of the film by using the model of Voinova *et al.*²⁴ and after 8 deposited bilayers, the thicknesses of films buildup with PAR10, PAR30, PAR100 or PAR200 as polycations correspond to 70, 130, 200 and 450 nm respectively (Figure 4.3). Finally for a given number of deposition steps, the deposited thickness increases with increasing molecular weight of PAR. An opposite behavior was previously reported for multilayer films buildup with chitosan/HA with various molecular weights of chitosan.²⁸ An exponential growth of the films was observed for all the molecular weights of chitosan used but the mass increment after each layer was more important when the mass of the chitosan chains was smaller. This behavior was explained by the diffusive properties of the chitosan chains in the films: shorter chains should be more diffusive in the film which should lead to a higher increase in the mass increment after each layer deposition. However in the present study, experimental conditions were different as we selected a homopolypeptide as the polycation instead of a polysaccharide and the range of their chain length is smaller.

Then, films with 24 bilayers ((PAR/HA)₂₄) were observed with confocal microscopy. In order to visualize these films we used PAR labeled with fluorescein isothiocyanate (PAR-FITC) as the last PAR layer. Cross-section images of films buildup with PAR of different residue numbers depict green labeling bands through the whole surface (Figure 4.1b). This indicates that the films were all homogeneously deposited on the surface in all conditions (for PAR with 10 to 200 residues).

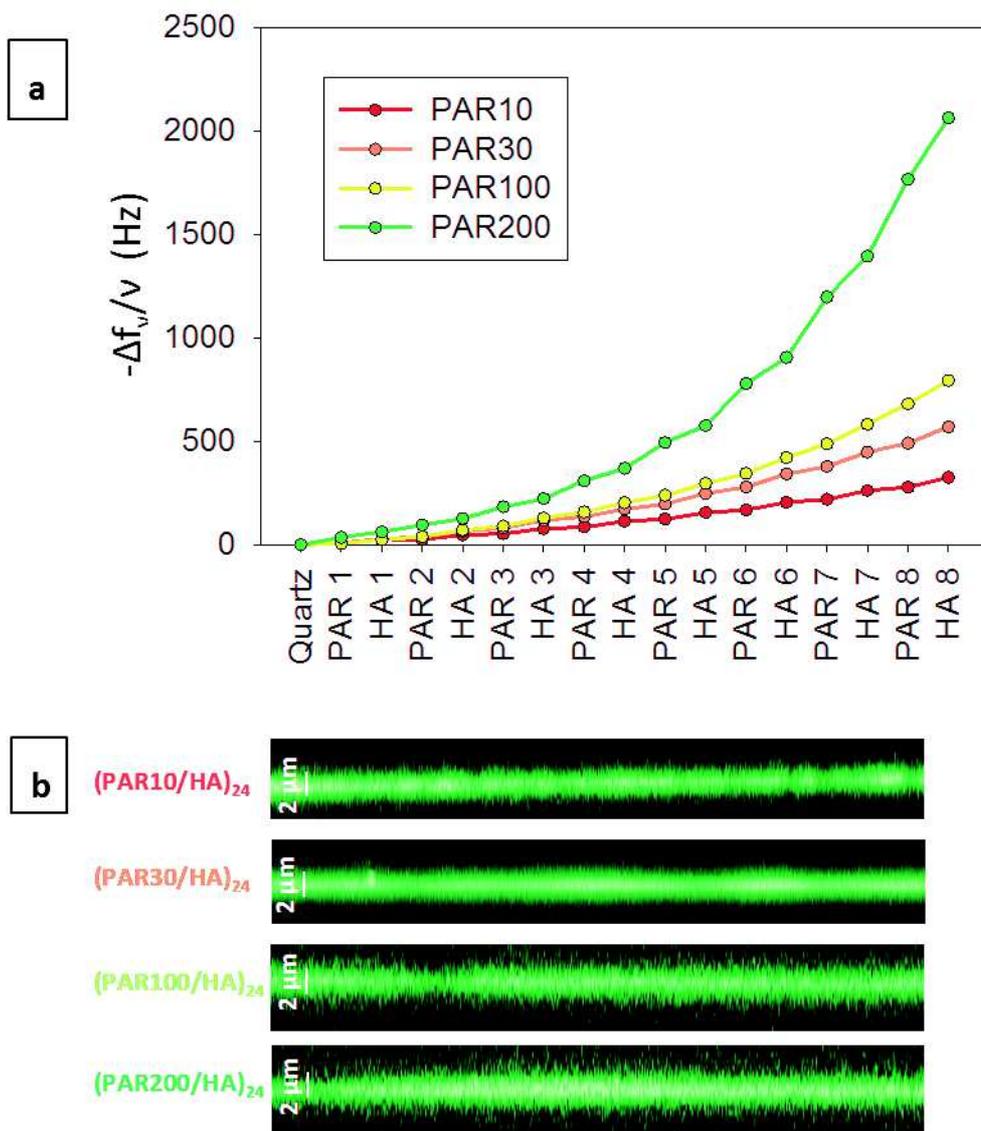


Figure 4.1. a) Buildup of (PAR/HA) multilayer film on a SiO₂ coated crystal followed by QCM. Various molecular weight of PAR (10, 30, 100 or 200 residues corresponding to notation PAR10 PAR30, PAR100 or PAR200 respectively) are used in association with HA. The evolution of the normalized frequency $\frac{\Delta f_v}{v}$ (for $v = 3$) as a function of the number of adsorbed layers is shown. **b)** Observation by confocal microscopy of PAR/HA film sections (x, z) for films buildup with various molecular weight of PAR (10, 30, 100 or 200 residues corresponding to notation PAR10 PAR30, PAR100 or PAR200 respectively).

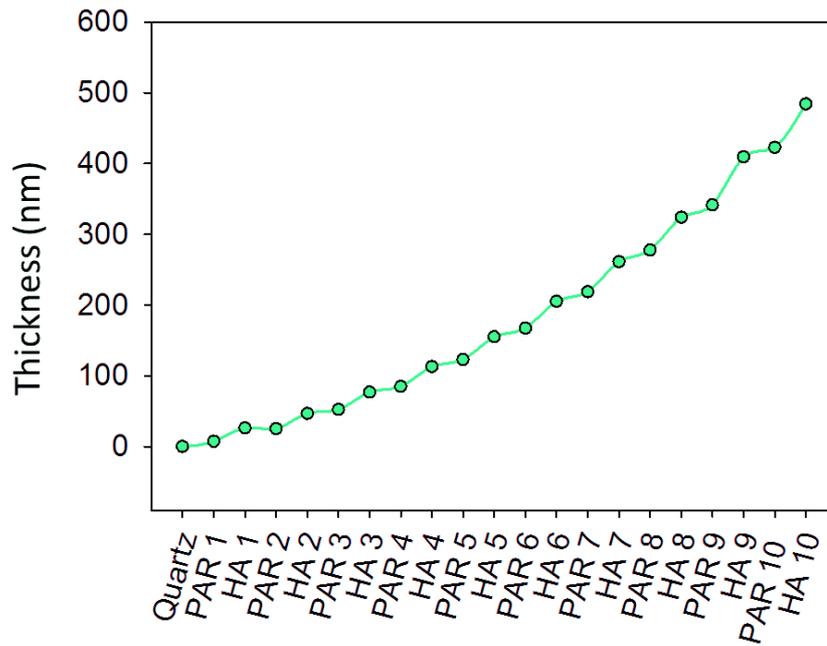


Figure 4.2: Buildup of (PAR10/HA)₁₀ multilayer film on a SiO₂ coated crystal followed by QCM-D. Evolution of the normalized frequency $-\Delta f_v/\nu$ (for $\nu = 3$) as a function of the number of layers adsorbed.

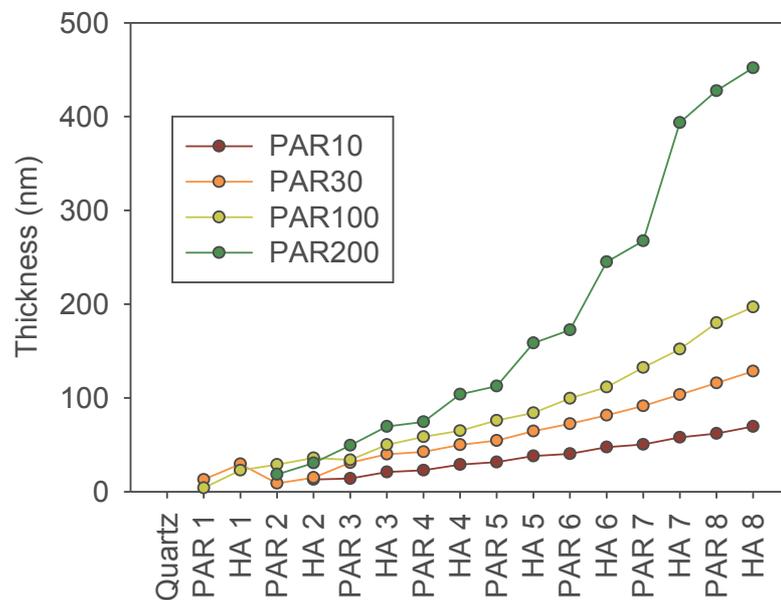


Figure 4.3: Buildup of (PAR/HA) multilayer film on a SiO₂ coated crystal followed by QCM-D. Various molecular weight of PAR (10, 30, 100 or 200 residues per chain corresponding to the notation PAR10 PAR30, PAR100 or PAR200, respectively) are used in association with HA. Evolution of the estimated thickness as a function of the number of adsorbed layers.

Next, the antimicrobial properties of (PAR/HA)₂₄ multilayers for PAR of different numbers of residues was evaluated. The films were tested against a gram positive bacteria, *Staphylococcus aureus*, a strain well known to be associated with nosocomial infections and more particularly with implant-related infections. For example in the case of orthopedic implants, *S. aureus* with *S. epidermis* is involved in 70% of infections.²⁹ *S. aureus* were incubated for 24 h at 37°C in the presence of MHB medium on the (PAR/HA)₂₄ coatings. The bacteria were incubated at 8 x 10⁵ CFU.mL⁻¹ on surfaces for 24 h at 37°C in the presence of MHB medium. The normalized growth of pathogens (%) was estimated by monitoring the absorbance at 620 nm in the presence of multilayer films in comparison with the positive control (without multilayer films and in presence of antibiotics in the medium) and the negative control (without multilayer films and in the absence of antibiotics in the medium) (Figure 4.4a). No significant inhibition was observed for films built with PAR10, PAR100 and PAR200. However, for PAR30 (30 residues), more than 95% of bacterial growth inhibition was observed after 24 h. This suggests that PAR30 strongly impact viability of *S. aureus*. It must be pointed out that the molecular weight effect is extremely striking and up to now such an effect on the multilayer film functionality, any affected function, was never observed.

To evaluate more precisely the health of bacteria in contact with the surfaces, we monitored the respiratory activity of *S. aureus* using 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC). Healthy bacteria will absorb and reduce CTC into an insoluble, red fluorescent formazan product and bacteria which are dead will not reduce CTC and consequently will not produce any fluorescent product. Figure 4.4.b shows images of the surfaces with labeled bacteria. We clearly observed a total inhibition of bacteria growth on (PAR30/HA)₂₄ surfaces and it was extremely rare to find an area where at least few bacteria were present (Figure 4.4b, "PAR30"). Comparatively, PAR10, PAR100 or PAR200 surfaces did not prevent bacterial adhesion and growth and we found a similar density of healthy bacteria as on non-treated surfaces. This outstanding result is in full correlation with growth inhibition of bacteria in the supernatant described above where PAR30 was also the only strongly effective coating.

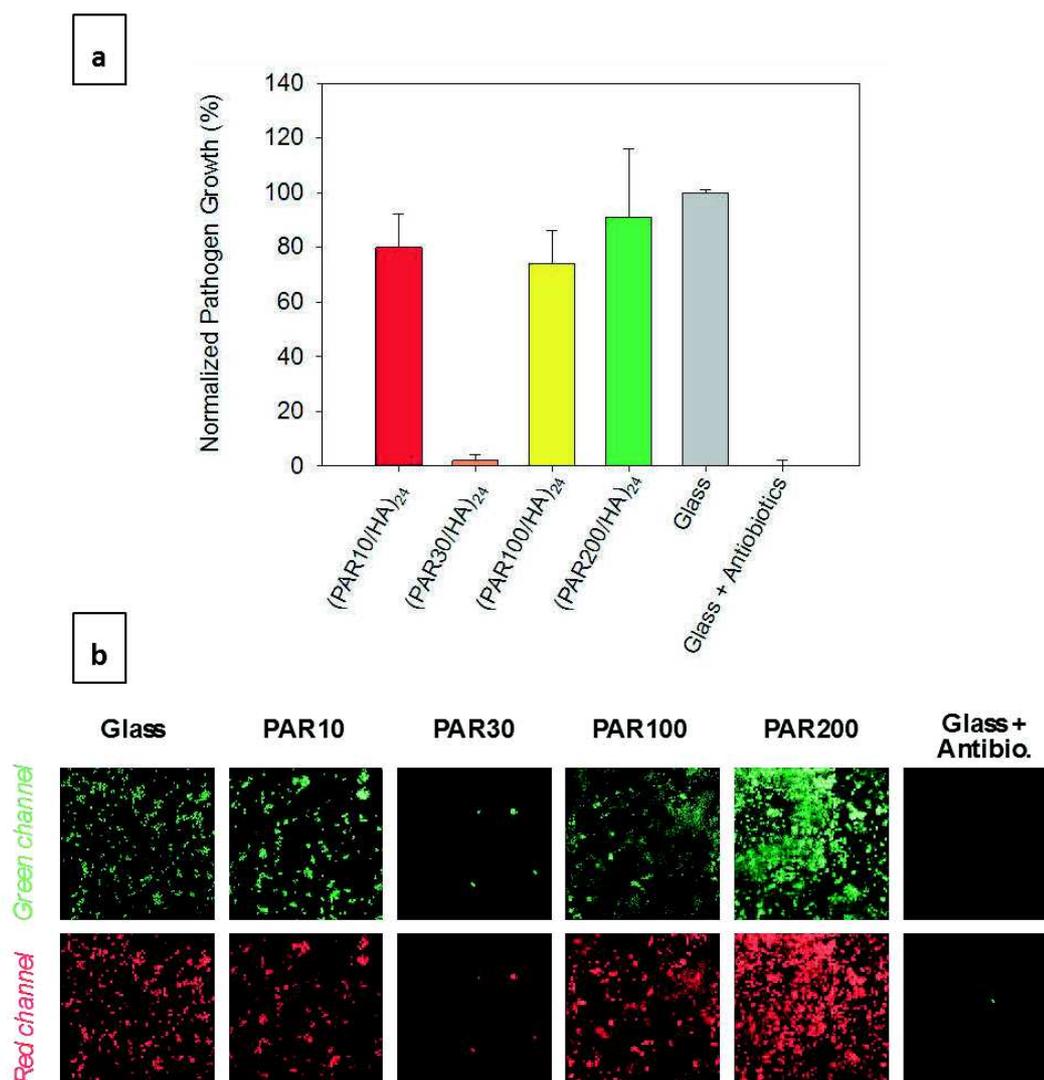


Figure 4.4: **a)** Normalized *S. aureus* growth (%) in supernatant after 24 h in contact with (PAR/HA)₂₄ multilayers films composed of poly(L-arginine) with various number of residues. Each value corresponds to the mean value of 3 individual experiments (3 samples per experiment and condition) and error bars correspond to standard deviations. **b)** Confocal images of *S. aureus* after 24 h of incubation on glass substrates, on (PAR/HA)₂₄ films built with PAR10, PAR30, PAR100 or PAR200 and on glass slide with antibiotics in the supernatant. Confocal images in the green channel correspond to SYTO® 24 labeling for counting all bacteria and in the red channel to healthy bacteria through metabolism of CTC (5-cyano- 2,3-ditoyl tetrazolium chloride), into an insoluble, red fluorescent formazan. Image sizes are 67 x 67 μm².

In an attempt to elucidate the underlying mechanism that confers to the PAR30/HA surfaces such a strong inhibitory property, we first determined the minimal inhibitory concentration (MIC) in PAR in solution using bacterial assay as described in Experimental Section. For concentrations up to 0.2 mg.mL⁻¹, all PAR (PAR10, PAR30, PAR100 or PAR200) totally inhibited *S. aureus* growth (Figure 4.5). However when PAR concentrations were decreased, a discrepancy between PAR was observed: a total inhibition of *S. aureus* growth was monitored for all PAR at concentrations of 0.02 mg.mL⁻¹ except for the longer one, *i.e.* PAR 200 where only a partial inhibition (about 45%) was measured. Finally for PAR

at concentrations of 0.01 mg.mL^{-1} , inhibition of 100% was shown only for PAR30. Longer or shorter PAR chains (PAR10, PAR100 or PAR200) inhibit only partially (less than 40%) *S. aureus* growth. This suggests that PAR30 is the most effective in solution. This reasoning is valid when PAR concentration values are expressed in mass (mg.mL^{-1}) which is directly related to the number of arginine monomers. However when the graph is plotted with concentrations in μM , which means that concentration is related to number of peptidic chains in solution, a different interpretation can be made (Figure 4.6). At low concentrations, longer chains PAR100 and PAR200 are more effective as $1 \mu\text{M}$ totally inhibit bacterial growth whereas PAR30 needs to be at about $5\text{-}10 \mu\text{M}$ to obtain a similar inhibition.

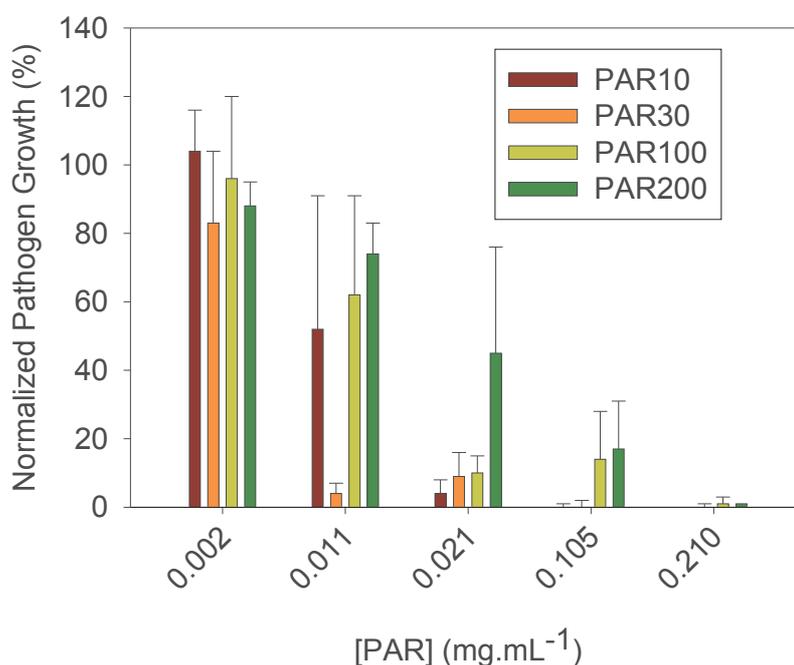


Figure 4.5: Normalized pathogen growth of *S. aureus* as a function of PAR concentration (mg.mL^{-1}) measured in solution and leading to 100% inhibition of *S. aureus*. PAR with 10, 30, 100 or 200 arginine residues were tested. Each PAR was incubated 24 h at 37°C in $300 \mu\text{L}$ of MHB medium with *S. aureus* ($A_{620} = 0.001$). Each value corresponds to the mean value of 3 individual experiments (3 samples per experiment and condition) and error bars correspond to standard deviations.

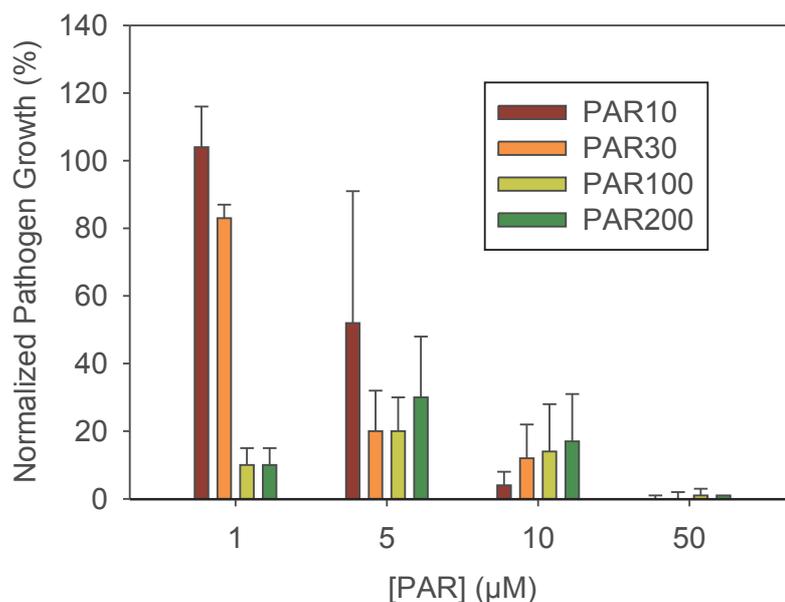


Figure 4.6: Normalized pathogen growth of *S. aureus* as a function of PAR concentration (μM) measured in solution and leading to 100% inhibition of *S. aureus*. PAR with 10, 30, 100 or 200 arginine residues per chain were tested. Each PAR was incubated 24 h at 37°C in 300 μL of MHB medium with *S. aureus* ($A_{620} = 0.001$). Each value corresponds to the mean value of 3 individual experiments (3 samples per experiment and condition) and error bars correspond to standard deviations.

Finally from these results we can conclude that all PAR chains are effective in solution for inhibiting *S. aureus* growth. For a given mass of PAR chains in the supernatant, PAR30 is the most effective. Moreover the MIC_{100} values obtained for PAR30, 100 or 200 ranges at very low concentrations of about 50 μM (Figure 4.6) or 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 4.5). However, even if there are differences in some of values in inhibition between the PAR of different length, they do not differ by orders of magnitude and thus seem not to be, at least solely, at the origin of the striking molecular weight effect observed on PAR/HA multilayers.

To address the eventual effect of conformations of PAR chains in the antimicrobial activity we check if PAR30 chains have a specific secondary structure that could explain their inhibitory properties compared to longer or shorter chains. Circular dichroism (CD) experiments were performed and in a first step, secondary structures of PAR chains in NaCl-Tris buffer solution (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4) were determined (Figure 4.7.a). All CD spectra of PAR chains (PAR10, PAR30, PAR100 and PAR 200) show a unique negative minimum at about 200 nm characteristic of a random coil conformation in solution.³⁰ In a second step, we monitored PAR conformation in (PAR/HA)₂₄ films (Figure 4.7.b). Surprisingly, spectra of the films depict totally different profiles: one minimum at about 208 nm and another smaller one at about 222 nm were monitored, except for (PAR10/HA)₂₄, which presents a unique negative minimum at 200 nm (random coil). These spectra are typical of α -helix conformations. They cannot be attributed to HA chains as it is known that in solution at pH 7.4 HA has an unordered

conformation.³¹ This indicates that PAR chains should change from a coil conformation in solution to an α -helix in the film. Similar behavior were previously observed for LbL buildup with poly(L-lysine) and poly(glutamic acid).³² Interestingly, unordered antimicrobial peptides are known to adopt an α -helix conformation when they interact with the bacterial membrane and this structural change is a key point in their mechanism of action.³³ In the present case of polyelectrolyte multilayer films, PAR chains already adopt an α -helix conformation which can be helpful to fight faster and in a more efficiency way against invading bacteria. But, because the films built with different PAR chain lengths present similar characteristic minima, the secondary structure of PAR chains cannot explain the striking molecular weight effect on the bactericidal property of the PAR30/HA films.

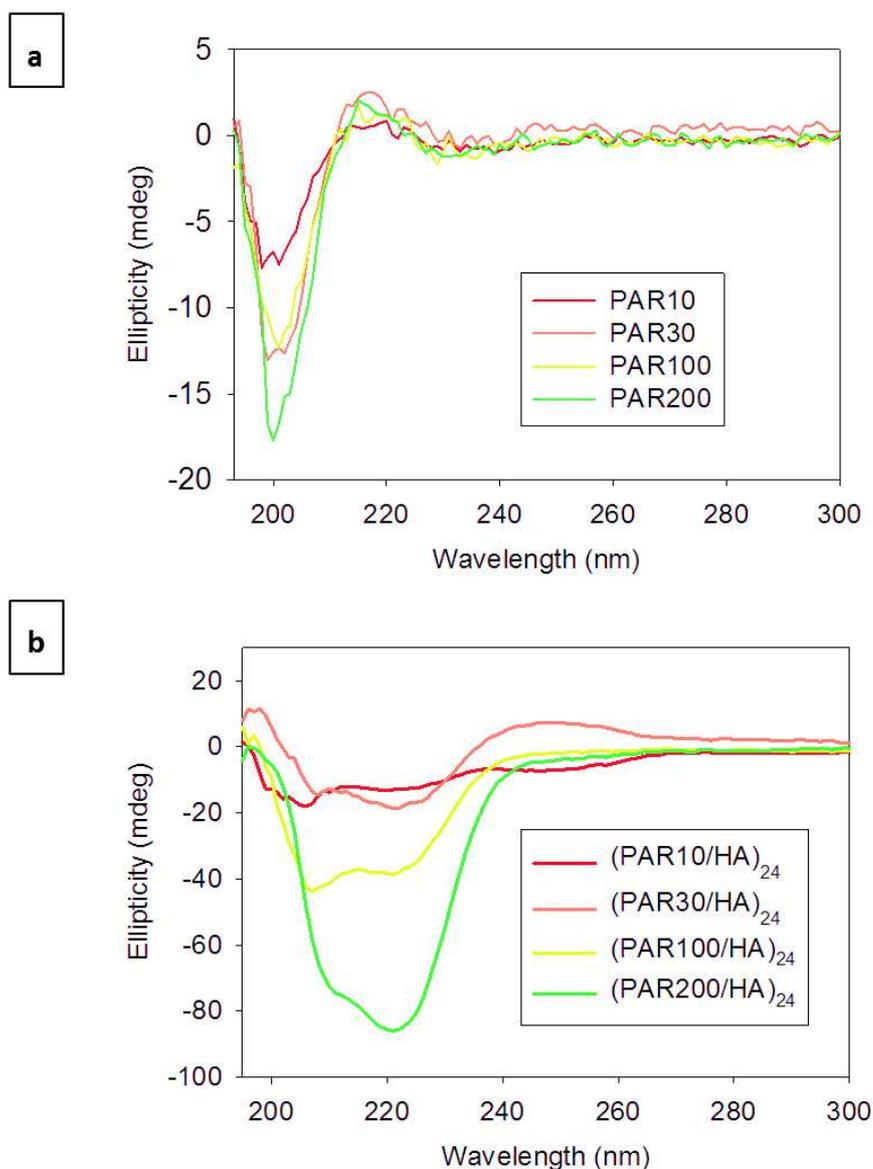


Figure 4.7 : Circular dichroism spectra of **a)** PAR in NaCl-Tris buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4) and **b)** (PAR/HA)₂₄ multilayer film in NaCl-Tris buffer. PAR with 10, 30, 100 or 200 arginine residues were tested. Each value corresponds to the mean value of 3 measurements performed on 3 samples.

In view of the absence of specific properties of PAR30 in solution compared to shorter or longer PAR chains, the antimicrobial abilities of PAR30/HA films should be related to the film property by itself. In this context, we investigated if the bactericidal property of the film is due to the release of PAR30 chains from the multilayer into the solution or if bacteria need to come in contact with the film to be killed. For this purpose two types of experiments were performed. Using fluorescently labeled PAR30 chains we first determined the release of PAR30 chains into the solution containing MHB medium with or without *S. aureus*. Figure 4.8.a shows a typical release kinetic curve. Indeed, a slow release process over a time scale of the order of 24 h was observed but it is evident that even after 24 h the PAR30 concentration reached in the supernatant lies significantly below the corresponding MIC concentration in the presence or absence of *S. aureus*: PAR30 released is about 0.20 - 0.30 μM after 24 h while MIC_{100} is about 50 μM . Moreover when a bacterial suspension was seeded (at a final bacterial concentration identical to previous experiments) with these supernatants, absolutely no bacteria growth inhibition was observed (Figure 4.8.b and 4.9.). This confirms that not enough PAR has been released and thus the MIC was not reached in the used supernatants. These results demonstrate that the release of the PAR30 chains from the film in the supernatant cannot be at the origin of the bactericidal effect. Finally we can hypothesize that the bactericidal effect is directly related to the contact of the bacteria with the PAR30/HA multilayer film which acts as a contact-killing coating.

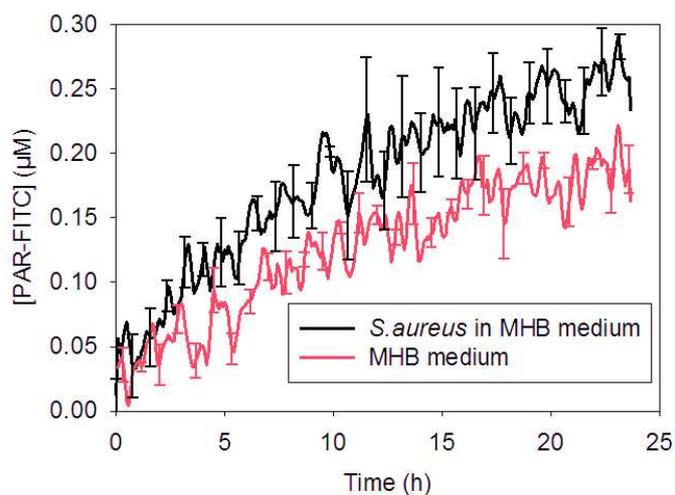
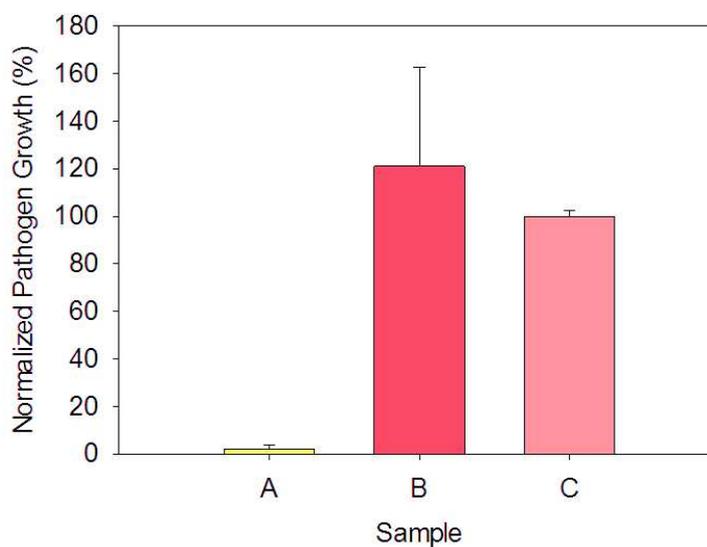
a**b**

Figure 4.8 : a) Released of PAR30-FITC from $(\text{PAR30-FITC/HA})_{24}$ films in MHB medium with (black line) or without (red line) presence of *S. aureus* ($A_{620} = 0.001$). Release experiments were performed at 37°C during 24 h by measurements of PAR-FITC with a fluorimeter. **b)** Normalized growth of *S. aureus* after 24 h in contact with a multilayer film $(\text{PAR30/HA})_{24}$ (sample A). Then, after these 24 h, the supernatant of this sample A was removed and incubated in a new well without coating but with a fresh *S. aureus* solution at a final concentration of ($A_{620} = 0.001$) (sample B). Finally sample C corresponds to a control where a fresh *S. aureus* ($A_{620} = 0.001$) solution was incubated 24 h in a well without any coating. Each value corresponds to the mean value of 3 measurements performed on 3 samples and error bars correspond to standard deviation.

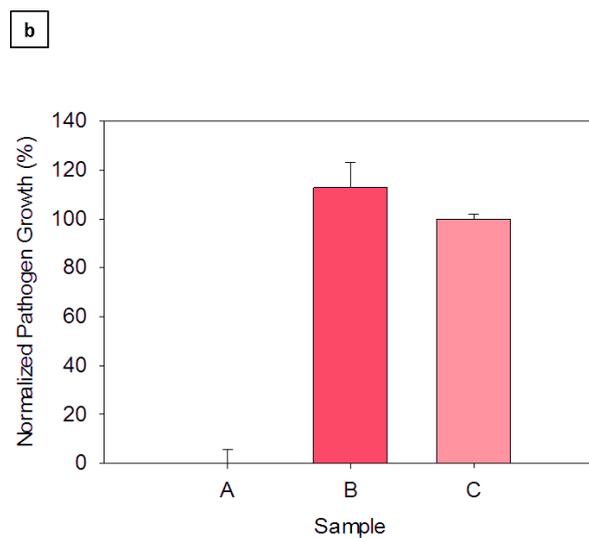
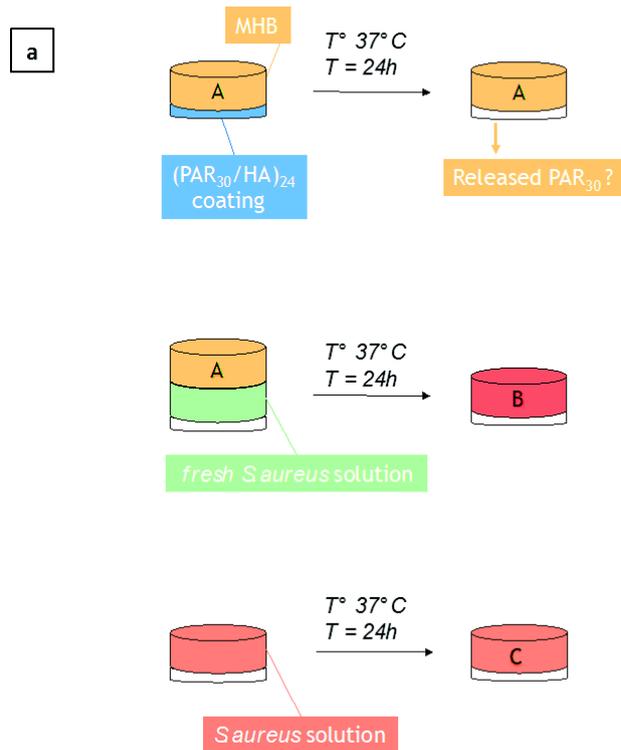
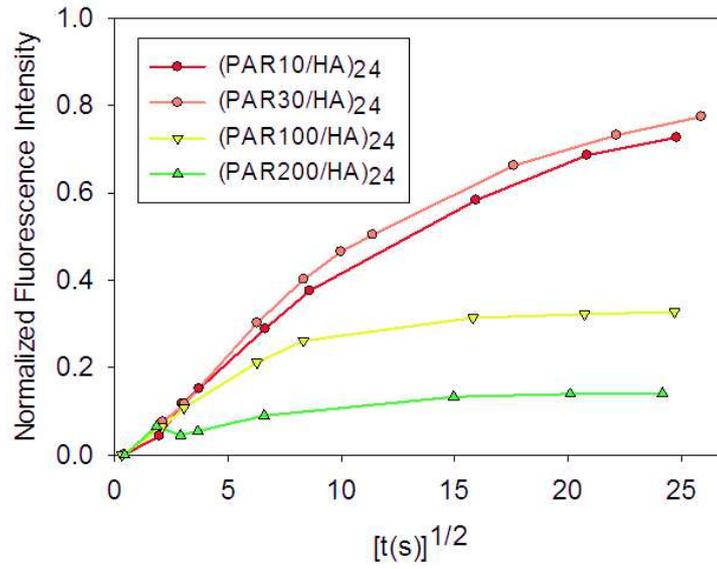


Figure 4.9 : Various samples have been produced as depicted in scheme **a**): sample A corresponds to MHB medium (without *S. aureus*) incubated for 24 h with a (PAR30/HA)₂₄ film. After time, the supernatant was removed and incubated in a new well without coating but with a fresh *S. aureus* solution ($A_{620} = 0.001$) (sample B). Finally sample C corresponds to a control where a fresh *S. aureus* ($A_{620} = 0.001$) solution was incubated 24 h in a well without any coating. Normalized growth of *S. aureus* in each of these samples was monitored ($A_{620} = 0.001$). Each value corresponds to the mean value of 3 measurements performed on 3 samples and error bars correspond to standard deviations.

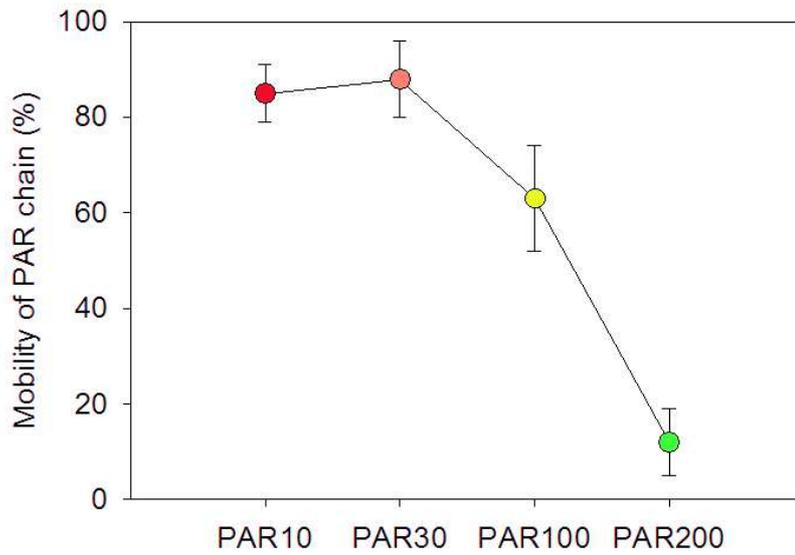
Then we investigated if the bactericidal activity of the PAR30/HA multilayer is related to the mobility of these chains in the films. Indeed, it is known that the exponential character of a multilayer is related to the diffusion ability of at least one of its constituents in and out of the film during each deposition step.³⁴ We first determined the mobility of the different chains, PAR10, PAR30, PAR100 and PAR200 in the (PAR/HA)₂₄ multilayer by using FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) method. Figure 4.10.a shows the evolution of the normalized fluorescence in the bleached area as a function of the square root of time. From these curves we can deduce the percentage of mobile chains over the timescale of the experiments. It clearly appears that PAR10 and PAR30 chains are more mobile (between 85 to 90% of mobile fraction) than the PAR100 (only 63% of mobile fraction). The largest chains PAR200 correspond to the slowest with about 12% of the population which is mobile (Figure 4.10.b).

To confirm the dependence of mobility on the bactericidal effect of the film, we cross-linked the PAR30/HA multilayers using a standard EDC-NHS cross-linking method³⁵ which creates a covalent link between amine groups of PAR and carboxylic groups of HA. The proportion of mobile chains measured by FRAP method decreases significantly from 88% for the non-cross-linked multilayer to 20% for the cross-linked one (Figure 4.10.c). When the cross-linked film was brought in contact with *S. aureus*, only about 40% of inhibition of the bacterial growth was observed after 24 h of contact (Figure 4.10.d). These results confirm that the mobile PAR chains are essential to confer antimicrobial properties of the film and the ratio of these mobile chains should be sufficient to confer the bactericidal effect.

a



b



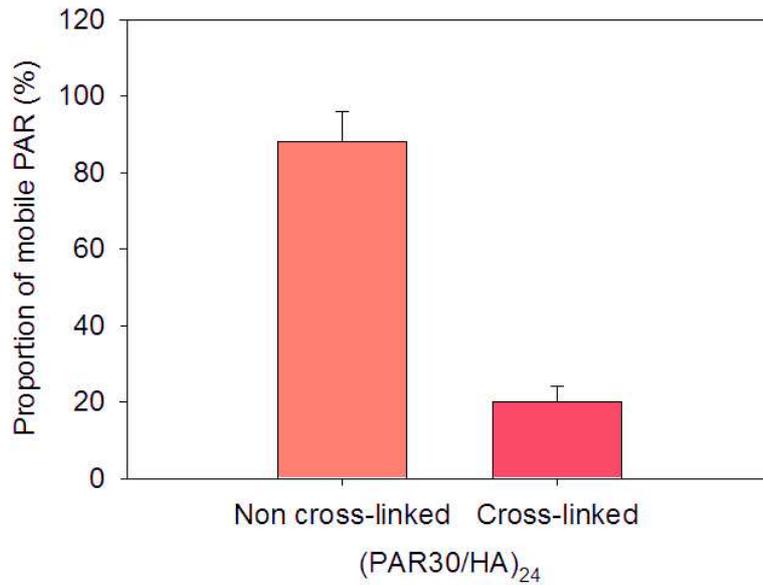
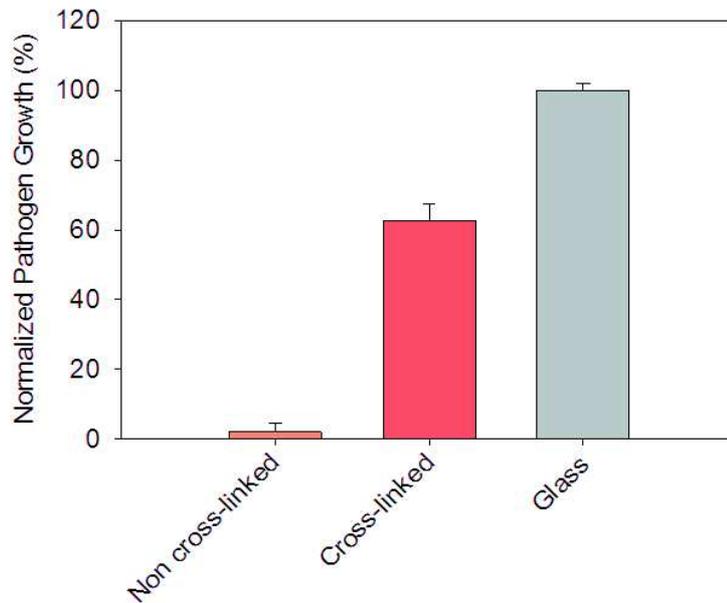
c**d**

Figure 4.10 : **a)** Normalized fluorescence intensity of a photobleached area according to $[t(s)]^{1/2}$ for each film: $(PAR10-FITC/HA)_{24}$, $(PAR30-FITC/HA)_{24}$, $(PAR100-FITC/HA)_{24}$ and $(PAR20-FITC/HA)_{24}$. $t=0$ corresponds to the end of the photobleaching step. **b)** Proportion of mobile PAR (%) estimated from data in a) for $(PAR10-FITC/HA)_{24}$, $(PAR30-FITC/HA)_{24}$, $(PAR100-FITC/HA)_{24}$ and $(PAR200-FITC/HA)_{24}$ films. **c)** Proportion of mobile PAR (%) estimated for $(PAR30-FITC/HA)_{24}$ in comparison with $(PAR30-FITC/HA)_{24}$ that has been cross-linked with EDC-NHS. **d)** Normalized *S. aureus* growth (%) in supernatant after 24 h in contact with non-crosslinked $(PAR30/HA)_{24}$ multilayers films in comparison with $(PAR30/HA)_{24}$ cross-linked with EDC/NHS. Each value corresponds to the mean value of 3 measurements performed on 3 individual experiments and error bars correspond to standard deviation.

PAR30/HA films were also tested with four other pathogens which are associated with nosocomial infections related to medical devices¹⁰ (Figure 4.11). At least 90% of inhibition of *S. aureus* methicillin resistant (MRSA), *M. luteus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* was observed in the supernatant at 24 h in the presence of the film. This demonstrates that PAR30/HA films have a broad spectrum of activity and especially they are efficient towards gram positive or negative bacteria.

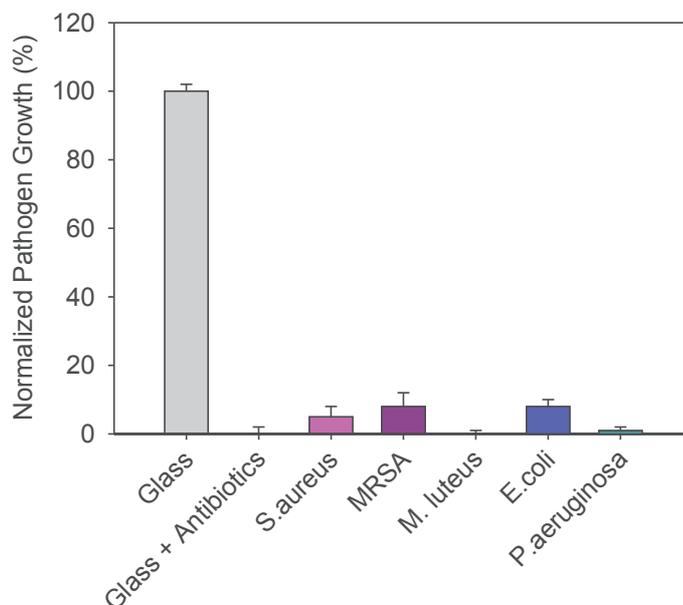


Figure 4.11 : Normalized growth (%) of *S. aureus*, *S. aureus* Methicillin Resistant (MRSA), *M. luteus*, *E.coli*, *P. aeruginosa* in supernatant after 24 h in contact with (PAR/HA)₂₄ multilayers films composed of poly(L-arginine) with various number of residues. Each value corresponds to the mean value of 3 individual samples per condition and error bars correspond to standard deviations.

In order to investigate the biocompatibility of the PAR/HA coatings, we seeded human primary fibroblasts from skin with medium that was in contact for 24 h with (PAR30/HA)₂₄ glass slides. After 24 h of seeding, no sign of toxicity was observed, the viability was equivalent to control conditions, *i.e.* glass surfaces (Figure 4.12). This preliminary test demonstrates that the PAR released in the presence of medium in the supernatant shows no apparent sign of toxicity for the primary cells used which is a positive point for application as coating of implanted medical devices.

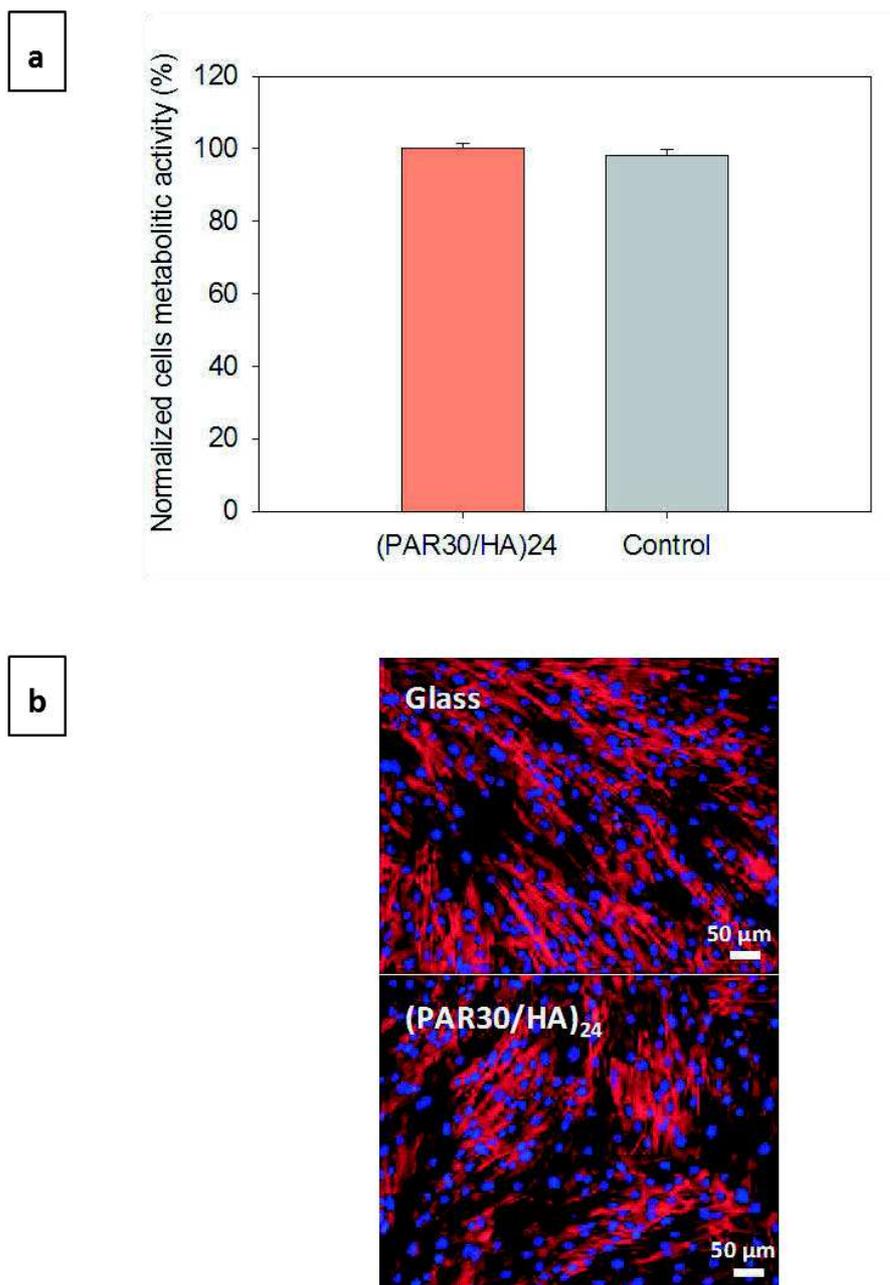


Figure 4.12 : a) Metabolic activity (%) of human primary fibroblasts incubated with medium in contact with (PAR30/HA)₂₄ multilayers films for 24 h. Glass surface was used as a control. **b)** Actin filaments (phalloidin labeling, red) and nucleus (dapi labeling, blue) were also observed in cells growing on the surfaces. Each value corresponds to the mean value of 5 individual samples per condition and error bars correspond to standard deviations.

Finally, we clearly demonstrate that the final property of the coating is related to the length of the PAR polyelectrolyte chain. The concentration of the mobile PAR chains is a key-factor in the antimicrobial effectiveness and thus the films buildup with PAR containing 30 residues of arginine are optimal for such bioactivity. PAR containing 10 residues is not active in (PAR/HA) films despite its high mobility in the films and its MIC which is closed to PAR30. This can be attributed to the film buildup which is about two times thinner with PAR10 compare to PAR30. After 24 bilayers, the number of free PAR10 chains able to inhibit for 24 h bacterial growth is probably too low. Concerning the mechanism

of action of PAR30, it should be related to diffusion of PAR30 chains out of the film through electrostatic interactions between positively charged PAR and negatively charged bacterial membrane. This interaction should occur as soon as the bacteria come in contact with the PAR/HA film. From time-lapse microscopy experiments, we clearly observed that the bacteria are killed when they touch the PAR30/HA surface (Figure 4.13). As PAR chains are mobile, they can diffuse and stick to the membrane. Then the mechanism should be closed to the mechanism of action of antimicrobial peptides, which are positively charged peptides that interact with bacterial membrane.³⁶ The second part of the mechanism, *i.e.* how the cationic peptide kill the bacteria, has been studied since 30 years however it has not yet been elucidated.³⁷

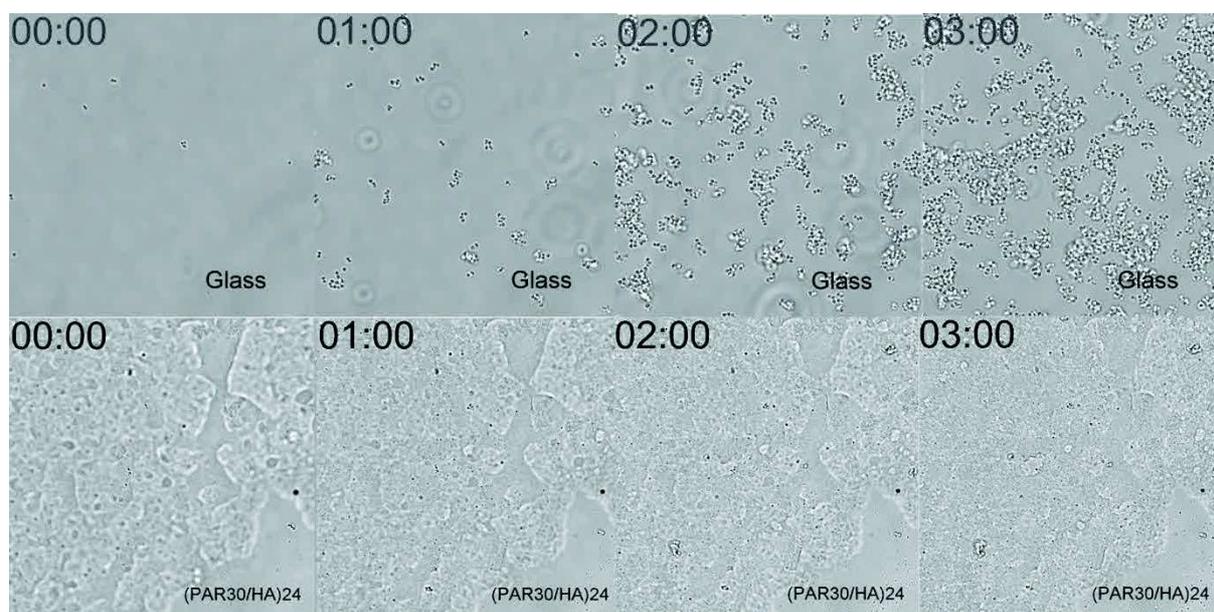


Figure 4.13 : Time-lapse images of *S. aureus* solution incubated on a control surface and a surface coated with a (PAR30/HA)₂₄ film. Time is indicated in hours.

CONCLUSION

Effective contact-killing antimicrobial coatings is a potential remedy for nosocomial infections. Herein, we demonstrated that (PAR/HA) films present a strong antimicrobial activity against bacteria known involved in medical device related infections. The unexpected chain-length dependency of contact killing opens a new route in the use of versatile polyelectrolyte based coatings where the functionality can be tuned by imposing specific conditions on polyelectrolyte conformation and mobility. Our future work will focus on the harnessing of such effects for other polycations and polyanions and for different biological events (cell differentiation, inflammation, apoptosis, migration etc.).

4.1.3. Résultats complémentaires

4.1.3.1. Variation du nombre de bicouches

Le mécanisme antimicrobien du film (PAR30/HA)₂₄ est donc lié à la capacité des chaînes de PAR30 à diffuser librement dans le film. Nous avons voulu vérifier si l'activité antimicrobienne de ces films était également liée au nombre de couches de polyélectrolytes les constituant, et donc, à la quantité de PAR30 présente dans le film. Pour ce faire, des films (PAR30/HA)_N ont été construits avec $N = 6, 12, 18, 24$ et 48 bicouches. Les films ont ensuite été mis en contact avec *S. aureus* selon le protocole décrit précédemment. Les mesures de l'absorbance du surnageant au bout de 24h de contact montrent que l'effet antimicrobien n'apparaît que pour $N \geq 18$ (Figure 4.14). Cette observation apporte un élément supplémentaire à la compréhension du mécanisme d'action des films (PAR30/HA) : la quantité de PAR30 présente à la surface d'un film est renouvelée par la libre diffusion de chaînes de PAR30 au sein du film. Nous proposons donc l'hypothèse que les PAR30 présentes à la surface et interagissant avec les bactéries sont absorbées par celles-ci et, grâce à la mobilité des chaînes de PAR30 dans le film, des nouvelles molécules de PAR30 deviennent disponibles à la surface pour les bactéries suivantes.

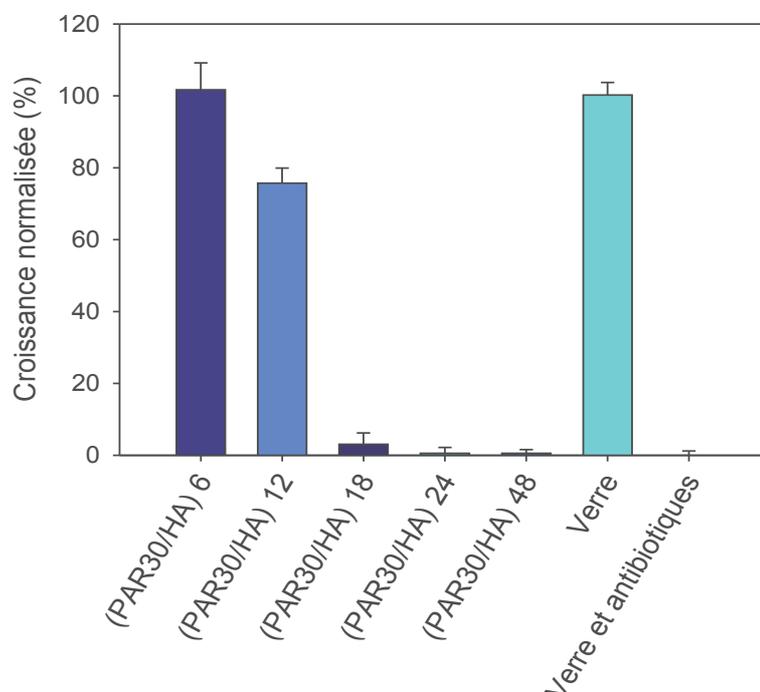


Figure 4.14 : Croissance normalisée de *S. aureus* (%) présent dans le surnageant après 24h de contact avec le film (PAR30/HA)_N avec $N = 6, 12, 18, 24$ et 48 . Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 échantillons par condition et la barre d'erreur correspond à l'écart-type.

4.1.3.2. Efficacité à long terme

Nous avons donc démontré qu'une quantité minimale de PAR30 stockée dans le film réservoir (PAR30/HA) est nécessaire pour obtenir l'effet antibactérien. Il est alors intéressant de déterminer l'efficacité à long terme de ces revêtements. Pour ce faire, des films de (PAR30/HA)₂₄ ont été construits et mis en contact avec une solution de *S. aureus* de concentration 8×10^5 CFU.mL⁻¹. Au bout de 24h de contact, la solution de *S. aureus* est prélevée, la concentration bactérienne est mesurée, et une nouvelle solution de *S. aureus* de concentration 8×10^5 CFU.mL⁻¹ est mise en contact avec le film (Figure 4.15). Après 3 jours d'expériences, un tiers des lamelles traitées avec le film ne présentent plus d'effet bactéricide, signe d'une quantité insuffisante de PAR30 restante dans le film. Néanmoins, pour limiter, voire empêcher, l'apparition d'une infection nosocomiale dans les 24h ou 48h suivant une intervention, l'efficacité des films (PAR30/HA)₂₄ semble être suffisante. En outre, l'augmentation du nombre de couches de polyélectrolytes et donc de la quantité de PAR30 présente dans le film pourrait augmenter la durée d'efficacité du revêtement. Une relation entre la durée de l'action antimicrobienne et le nombre de couches PAR/HA pourrait ainsi être établie.

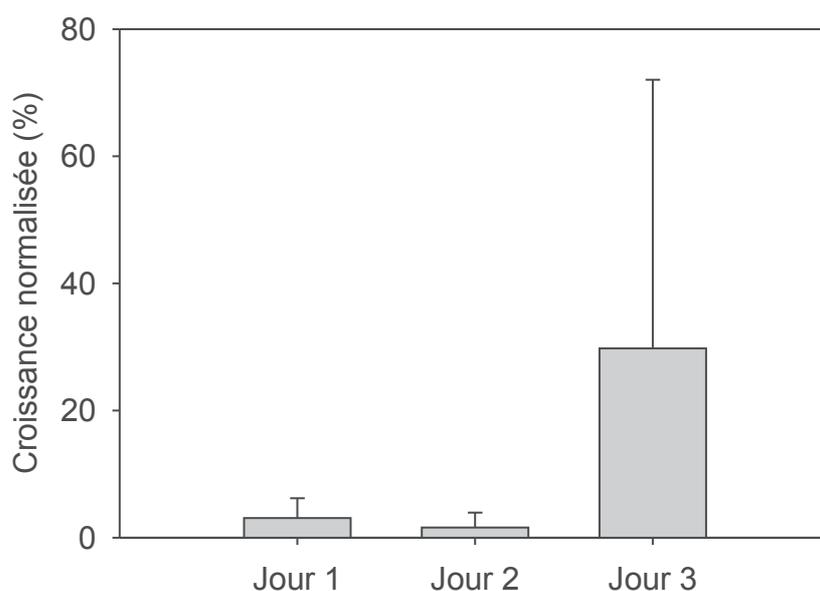


Figure 4.15 : Croissance normalisée (%) de *S. aureus* présent dans le surnageant mis en contact avec le film (PAR30/HA)₂₄ après 1, 2 et 3 jours d'inoculation. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 échantillons par condition et la barre d'erreur correspond à l'écart-type.

4.1.3.3. Utilisation de PAR polydisperses

Après avoir démontré que l'effet antimicrobien était sensible à la quantité de bactéricide au sein du film (PAR30/HA), nous avons tenté de déterminer si seule la PAR30 présentait un effet dans le film (PAR/HA) ou bien si un film construit avec un lot de PAR polydisperses de tailles comprises entre 10 et 100 résidus pouvaient aussi présenter un tel effet. Pour ce faire, des chaînes de PAR polydisperses et synthétisées par la société Sigma ont été utilisées, avec trois gammes différentes de longueur : un lot comprenant des PAR entre 25 et 90 résidus (PAR 25-90), un lot comprenant des PAR entre 90 et 400 résidus (PAR 90-400) et un lot ayant des PAR ayant au moins 400 résidus d'arginine (PAR \geq 400).

Ces trois lots ont été utilisés pour la construction des films (PAR/HA)₂₄ et leur effet antibactérien a été étudié tel que décrit précédemment. Après mesure de la prolifération bactérienne en solution et en surface (Figure 4.16), nous avons observé que seul le film (PAR/HA)₂₄ utilisant des PAR de tailles comprises entre 25 et 90 résidus possédait un effet antibactérien. Cette observation prouve que la PAR comportant 30 résidus n'est pas l'unique taille de PAR à conférer des propriétés bactéricides à un film (PAR/HA)₂₄. Ces résultats avancent l'hypothèse qu'il existe un certain intervalle de longueur de chaîne dans lesquelles les PAR possèdent un effet antimicrobien. Il serait alors intéressant d'utiliser d'autres PAR monodisperses avec une taille proche de 30 résidus afin de délimiter parfaitement la gamme de taille des PAR ayant des propriétés bactéricides.

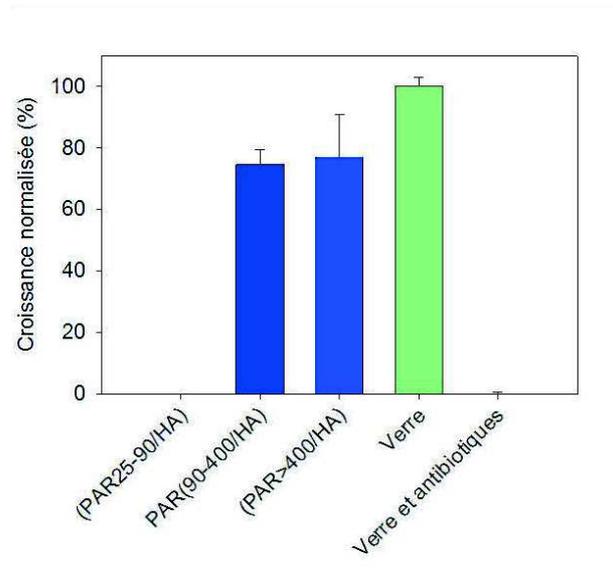
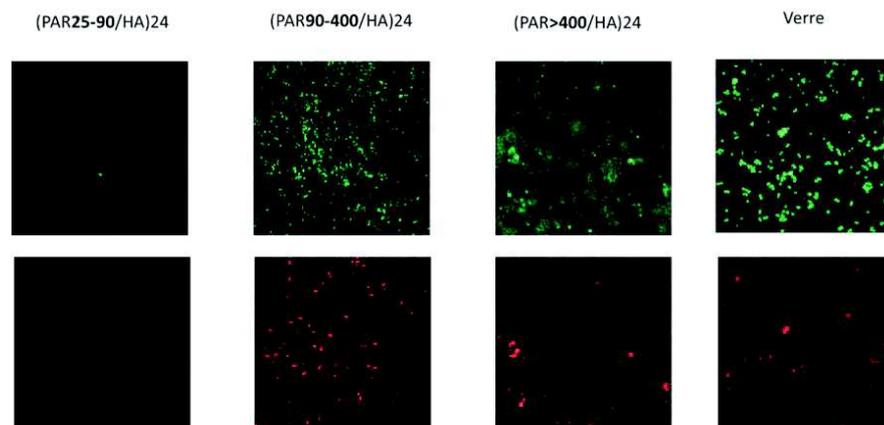
a**b**

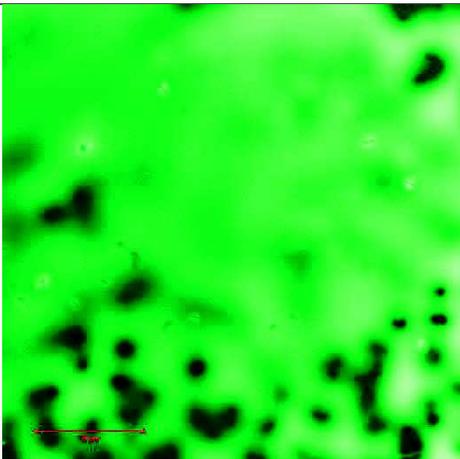
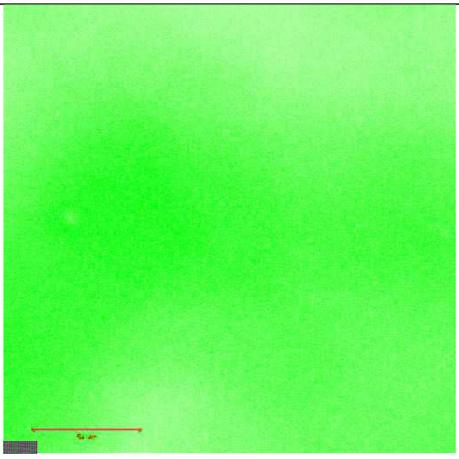
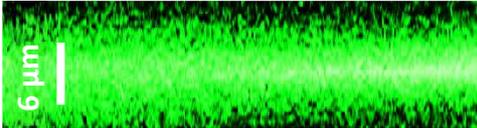
Figure 4.16 : a) Croissance normalisée (%) de *S. aureus* présent dans le surnageant après 24h en contact avec les films $(PAR/HA)_{24}$ où PAR est représentée dans trois gammes de tailles : PAR 25-90, PAR 90-400 et $PAR \geq 400$. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 échantillons par condition et la barre d'erreur correspond à l'écart-type. **b)** Images obtenues par microscopie confocale des bactéries *S. aureus* présentes à la surface des films $(PAR/HA)_{24}$. Taille des images : $67 \times 67 \mu m$.

4.1.3.4. Influence de l'état de surface des lamelles en verre

Dans les travaux exposés jusqu'ici, les lamelles de verre utilisées pour la construction des films (PAR/HA) ont été nettoyées selon un protocole chimique, c'est-à-dire par l'utilisation d'un tensioactif et de solvants aqueux et organiques. Ce protocole garantissait une surface nettoyée de toutes impuretés organiques et inorganiques. Malgré cela, après construction, les films déposés sur le verre présentaient dans la plupart des cas des défauts tels que l'apparition de « trous », signe d'une mauvaise mouillabilité de ces lamelles de verre. Afin de pallier ce problème, une autre technique de nettoyage permettant le maintien de la mouillabilité des lamelles de verre a été envisagée : le

nettoyage sous atmosphère présente à l'état plasma. En effet les molécules présentes dans l'atmosphère, à l'état plasma, sont sous forme radicalaire et cela permet d'ôter les impuretés présentes à la surface mais, de plus, ces radicaux permettent la création de groupements chargés négativement à la surface du verre, assurant ainsi une bonne hydrophilie de celle-ci. L'influence du nettoyage des lamelles de verre avant construction a ainsi été étudiée par observation des films (PAR30-FITC/HA)₂₄ en microscopie confocale (Tableau 4.1) .

Tableau 4.1 : Observation des films (PAR30-FITC/HA)₂₄ en microscopie confocale selon une coupe (x,y) (surface) ou une coupe (x,z) (épaisseur) selon la condition de nettoyage des lamelles de verre (traitement chimique ou plasma).

Nettoyage	Chimique	Par traitement plasma
Surface		
Epaisseur		

Les films (PAR30-FITC/HA)₂₄ obtenus après traitement plasma des lamelles de verre ne présentent aucun défaut et ont une épaisseur plus importante que ceux obtenus après nettoyage des lamelles de verre selon un protocole chimique. Cela prouve l'importance de la mouillabilité des films pour la première couche déposée, qui influencera ensuite l'aspect du film entier.

Les films (PAR/HA)₂₄ avec différentes tailles de PAR (10, 30, 100 et 200) ont ensuite été construits après nettoyage des lamelles de verre par traitement plasma et ensuite été étudiés *in vitro* avec *S. aureus* (Figure 4.17). Si ce traitement n'a aucun effet sur l'activité bactérienne des films (PAR100/HA)₂₄ et (PAR200/HA)₂₄, le film (PAR10/HA)₂₄, auparavant inefficace contre les bactéries, empêche la prolifération bactérienne avec un traitement des lamelles de verre sous plasma. L'hypothèse avancée semble être que ces films (PAR10/HA)₂₄ construits après plasma présentent une

épaisseur plus importante que les films construits sans plasma et donc la quantité de PAR10 disponible devient suffisante pour conférer un effet bactéricide. En effet, comme décrit dans le premier article, les PAR10 ont une mobilité aussi importante que celles des chaînes PAR30 dans le film (PAR/HA).

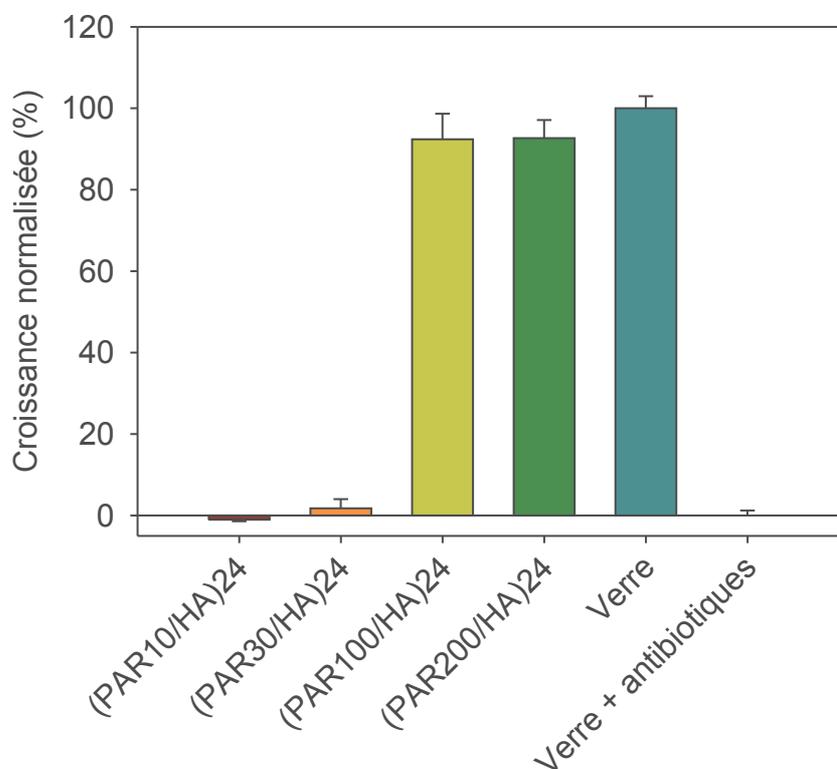


Figure 4.17 : Croissance normalisée (%) de *S. aureus* présent dans le surnageant et au bout de 24h de contact avec des films (PAR/HA)₂₄ avec PAR10, 30, 100 et 200. Les lamelles de verre utilisées pour la construction des films ont précédemment été nettoyées par traitement plasma. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 échantillons par condition et la barre d'erreur correspond à l'écart-type.

4.2. Effet du polyanion sur les films antibactériens à base de PAR

4.2.1. Résumé

Nous avons démontré que les films multicouches à base de poly(L-arginine) (PAR) de 30 résidus et d'acide hyaluronique (HA) possédaient un fort effet bactéricide grâce à un mécanisme dit de « contact-killing ». Cette propriété est liée à la capacité des chaînes de PAR30 à diffuser librement dans ces films, même en étant associées aux chaînes de HA. Nous avons alors tenté de vérifier si cette relation « effet bactéricide – diffusion des chaînes » restait valable pour d'autres polyanions. Quatre polysaccharides (acide alginique, chondroïtine sulfate A, héparine et acide hyaluronique), un polypeptide (poly(acide L-glutamique)) et un polymère synthétique (poly(styrène sulfonate)) ont été utilisés.

Après construction des films (PAR30/polyanion)₂₄, leur propriété bactéricide a été déterminée *in vitro* vis à vis de *S. aureus*. Étonnamment, seul le film (PAR30/HA)₂₄ présente un effet antibactérien. Après détermination de la mobilité des chaînes de PAR30 au sein de chaque film (PAR30/polyanion)₂₄, il a été observé que le pourcentage de chaînes mobiles de PAR30 était de l'ordre de 90% pour le film (PAR30/HA)₂₄ tandis que pour les autres films, ce pourcentage ne dépasse pas 20%. Les expériences de microcalorimétrie isotherme montrent que l'interaction en solution des chaînes de PAR30 avec les différents polyanions est caractérisée par une enthalpie de réaction négative, excepté avec HA, où l'enthalpie de réaction est positive. En outre, le poids moléculaire de HA ne semble pas être un paramètre significatif pour la capacité de diffusion des chaînes de PAR30 responsables de l'activité antibactérienne des films. Ces résultats constituent une étape importante dans l'établissement des règles définissant les films multicouches de polyélectrolytes ayant un pouvoir antimicrobien.

4.2.2. Article

Publié dans le journal *Chemistry of Materials*, le 30 mars 2017.

Nature of the Polyanion Governs the Antimicrobial Properties of Poly(arginine)/Polyanion Multilayer Films

Angela Mutschler, Cosette Betscha, Vincent Ball, Bernard Senger, Nihal Engin Vrana, Fouzia Boulmedais, André Schroder, Pierre Schaaf, and Philippe Lavalle.

INTRODUCTION

Infections represent one of the major risks accompanying implant surgery.^{38, 39} In parallel, the rise of resistance of some bacteria strains to antibiotics renders their treatment increasingly difficult and constitutes a major medical threat in the future.⁴⁰ These observations stimulate the development of antimicrobial coatings aimed to prevent implant infections during the first hours or days after implantation.^{41,42}

Among the different methods that are under investigation to confer an antimicrobial character to a material, polyelectrolyte multilayers have received great attention.⁴³ Obtained by the alternate deposition of polyanions and polycations, they allow functionalizing almost any kind of surface and their applications range from optical coating, super-hydrophobic and conductive surfaces up to biomaterial functionalization.^{44,45} Polyelectrolyte multilayers allow designing, in particular, antimicrobial surfaces.^{46,47} Three strategies are reported to achieve antimicrobial polyelectrolyte multilayers:¹²(i) multilayers that prevent bacterial adhesion,⁴⁸ (ii) multi multilayers that kill bacteria through direct contact¹⁴ and (iii) multilayers that release antimicrobial agents.^{49,50, 51}

Recently, we found that poly(L-arginine)/hyaluronic acid (PAR/HA) multilayers present interesting biological behaviors.⁵² They show some immunomodulatory properties and in addition they present a strong antimicrobial character against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). More interestingly, this latter property is strongly dependent upon the molecular weight of PAR.⁵³ Whereas multilayers constituted of 24 PAR/HA bilayers built with PAR of 10, 100 or 200 residues show almost no effect against *S. aureus*, films built with PAR chains with 30 residues display strong antimicrobial properties. This constitutes to our knowledge, the first example of a multilayer whose functional property is dependent upon the size of the polyelectrolyte chains used for the film buildup. PAR/HA is a multilayer whose thickness increases exponentially with the number of deposition steps (at least during the first 10-15 bilayer deposition steps). This growth mechanism is related to the ability of at least one of the polyelectrolytes constituting the film to diffuse *in* and *out* of the whole film during each deposition step.⁵⁴ For PAR30/HA multilayers, PAR30 chains are the diffusing species and this diffusion ability is at the origin of the contact-killing property of the film. When bacteria adhere to the film, the positively charged PAR chains diffuse from the film towards the negatively charged bacterial membranes and destabilize them. The difference in antimicrobial efficiency of PAR/HA films is explained by the smaller diffusion ability (smaller proportion of mobile chains) of longer PAR chains (above 100 residues) compared to smaller one (30 residues). For films built with PAR chains of 10 residues, it appears that with 24 bilayers the number of PAR chains is not sufficient to kill all the bacteria after 24 h.

With the idea to develop a new family of antimicrobial films and to establish rules to design contact killing polyelectrolyte multilayer films, here we investigate the effect of the nature of different polyanions on the antimicrobial activity of the PAR30/polyanion multilayers. In other words, is hyaluronic acid essential for antimicrobial properties of PAR based films? HA will be compared to three polysaccharides, alginate (ALG), heparin (HEP), chondroitin sulfate A (CSA), to an homopolypeptide, poly(L-glutamic acid) (PGA) and to a synthetic polyelectrolyte, poly(styrene sulfonate) (PSS), one of most investigated polyanion in the multilayer literature. The chemical structures of the different polyanions are given in Figure 4.18. PAR chains with 30 monomers will be used as polycations along this study (PAR30).

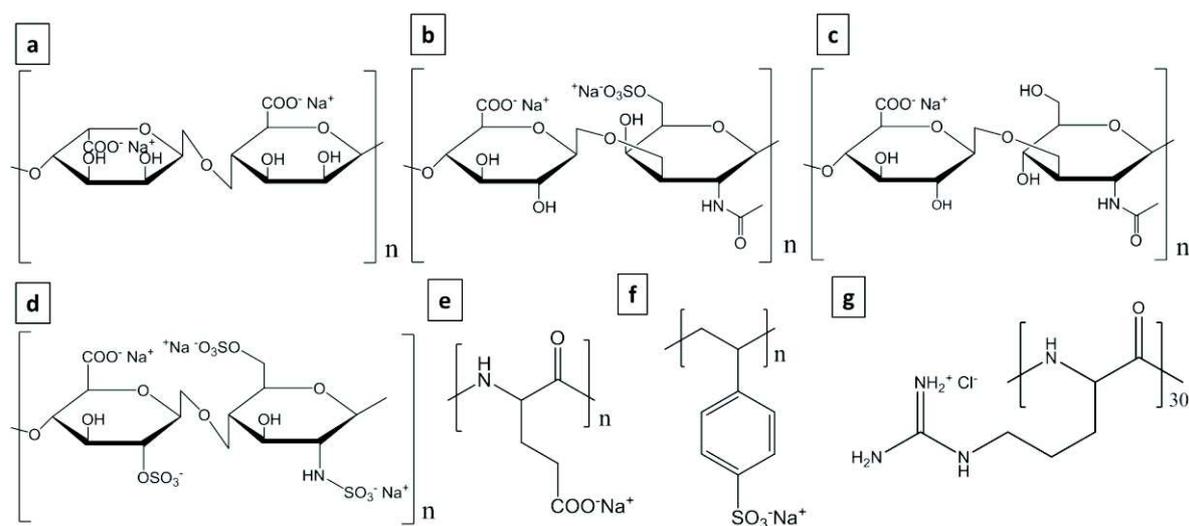


Figure 4.18 : Chemical structures of the polyanions used in the present study: ALG (a), CSA (b), HA (c), HEP (d), PGA (e) and PSS (f). These polyanions are associated with the polycation PAR (g).

EXPERIMENTAL SECTION

Materials

The polyelectrolyte multilayer films have been built up with the following polymers. The polycation was poly(L-arginine hydrochloride) whose chains consisted in 30 residues (PAR30, 30R, Mw = 6.4 kDa, PDI = 1.01) and was purchased from Alamanda Polymers, USA. Hyaluronic acid (HA, Mw = 29 and 150 kDa) used as a polyanion was produced by Lifecore Biomed, USA. Alginic acid is purified from brown algae (ALG, Mw = 240 kDa, Sigma, France), chondroitin sulfate A from bovine trachea (CSA, Sigma, France), heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (HEP, Mw = 18 kDa, Sigma, France). Poly(L-glutamic acid) (PGA) and poly(styrene sodium sulfonate) (PSS, Mw = 70 kDa) used as the polyanions were purchased from Sigma. Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS) was purchased from Merck, Germany.

Monitoring the buildup of films

Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D, E1, Q-Sense, Sweden) was used to monitor in situ film buildup. The quartz crystal was excited at its fundamental frequency (about 5 MHz), as well as at the third, fifth, seventh and ninth overtones (denoted by $\nu = 3, 5, 7$ and $\nu = 9$ and corresponding respectively to 15, 25, 35 and 45 MHz). Changes in the resonance frequencies ($-\Delta f_\nu$) were measured at these four frequencies. An increase of the normalized frequency $-\Delta f_\nu/\nu$ is often associated to a proportional increase of the mass coupled with the quartz crystal (Sauerbrey's approximation).⁵⁵ However when the normalized frequency shifts for the various overtones are unequal, it is advisable to use the model developed by Voinova and al.²⁴ where both the measured frequency shifts and dissipations for several overtones are processed to derive the thickness. This model relies on the hypothesis that the film is a homogeneous, isotropic and non-sliding viscoelastic stratum deposited on the quartz crystal. Data corresponding to the overtones $\nu = 3, 5, 7$ and 9 have been used to determine the thicknesses of all films used here.

PAR and polyanions were dissolved at $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in sterilized buffer containing 150 mM NaCl and 10 mM of TRIS at pH 7.4. Polycationic and polyanionic solutions were successively injected into the QCM-D cell containing the SiO_2 coated quartz crystal. PAR30 was the first deposited polyelectrolyte. Each polyelectrolyte was adsorbed for 5 min and then a rinsing step with NaCl-TRIS buffer was performed for 5 min.

Buildup of (PAR/HA)₂₄ films

For the construction of 24 bilayers of PAR30/polyanion (denoted as (PAR30/polyanion)₂₄), an automated dipping robot was used (Riegler & Kirstein GmbH, Germany). Glass slides (12 mm in diameter) were first washed with Hellmanex® II solution at 2%, HCl 1M, H₂O, and ethanol and dried with an air flow. Solutions of polyelectrolytes were prepared as described above for QCM-D experiments. Glass slides were dipped alternately in the polycation and polyanion solutions and extensively rinsed in NaCl-TRIS buffer between each step. After construction, the films were dried with an air flow and then immersed in NaCl-TRIS buffer and stored at 4°C before use. Observations of the films were carried out with a confocal Zeiss LSM 710 microscope (Heidelberg, Germany) using a 20× Plan Apo (0.8 NA) objective (Zeiss). The microscopic observations of the obtained films were evaluated by deposition of 100 μL of PAR-FITC (PAR labeled with fluorescein isothiocyanate, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in NaCl-TRIS buffer) on top of the PAR30/polyanion multilayer films. Fluorescent labeling of PAR was previously described.⁵³ After 5 min of deposition and diffusion of PAR-FITC through the whole film, a rinsing step was performed with NaCl-TRIS buffer.

Antibacterial Assay

Staphylococcus aureus (*S. aureus*, ATCC 25923) strain was used to assess the antibacterial properties of the samples. Bacterial strain was cultured aerobically at 37°C in a Mueller Hinton Broth (MHB) medium (Merck, Germany), pH 7.4. One colony was transferred to 10 mL of MHB medium and incubated at 37°C for 20 h. To obtain bacteria in the mid logarithmic phase of growth, the absorbance at 620 nm of overnight culture was adjusted to 0.001, corresponding to a final density of 10^5 CFU.mL⁻¹. Glass slides coated with (PAR30/polyanion)₂₄ films were sterilized by using UV-light during 15 min, then washed with NaCl-TRIS buffer. After washing, all glass slides were deposited in 24-well plates with 300 µL of *S. aureus*, $A_{620} = 0.001$, and incubated during 24 h at 37°C. For negative control, uncoated glass slides were directly incubated with *S. aureus* using a similar method. To quantify bacteria growth or inhibition after 24h, the absorbance of the supernatant at 620 nm was measured.

Bacteria Live Dead Assay

The BacLight™ RedoxSensor™ CTC Vitality Kit (Thermo Fischer Scientific Inc., France) was used for evaluation of the health of bacteria present on the surface. This kit gives a semi-quantitative estimate of healthy vs unhealthy bacteria. SYTO® 24 green-fluorescent nucleic acid stain (Thermo Fischer Scientific Inc., France) was used for counting all bacteria. A solution of 50 mM CTC and 0.001 mM SYTO® 24 in pure water was prepared. All glass slides were washed with phosphate-buffered saline buffer (PBS), pH = 7.4. Then 270 µL of PBS and 30 µL of CTC/ SYTO® 24 solution were added. The plates were incubated 30 min at 37°C, away from light. Each surface was observed by confocal microscopy (Zeiss LSM 710 microscope, Heidelberg, Germany), using 63× Plan Apo (1.4 NA) objective immersed in oil. Excitation/emission wavelength of stains was 450/630 nm for CTC and 490/515 nm for SYTO® 24.

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments

The proportion of mobile molecules, p , was measured for (PAR30/polyanion)₂₄ films containing PAR30-FITC by performing FRAP experiments. A glass slide coated with a PAR30/polyanion film was introduced in a home-made sample holder and immersed in 200 µL of NaCl-TRIS buffer. One circular region (4.4 µm in radius in an image of 35 µm × 35 µm) was exposed for 700 ms to the light of a laser set at its maximum power ($\lambda = 488$ nm). Then, the recovery of fluorescence in the bleached area was followed over time. Observations were carried out with a Zeiss LSM 710 microscope (Heidelberg, Germany) using a 20× Plan Apo (0.8 NA) objective (Zeiss). In the same time, three equally sized circular reference areas outside of the bleached area were monitored. The intensities in these areas are used to normalize the intensity in the bleached area so that bleaching due to image acquisition was accounted for.

Under the hypothesis that i) the recovery is due to the Brownian diffusion of the mobile labeled molecules, ii) all moving labeled molecules have the same diffusion coefficient, and iii) the initial intensity profile (i.e. immediately after the bleaching) has a sharp edge (a circle in the present case), the time evolution of the normalized intensity can be derived theoretically.^{56, 26} It depends on the diffusion coefficient, D , and the proportion of mobile labeled molecules, p , as well as the radius, R , of the initially bleached area. Note that, according to the aforementioned theory, the area observed during the recovery must have the same radius and the same center as the bleached area. Bleached areas were observed for at least 6 min.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

We used a Nano ITC Standard Volume micro-calorimeter (TA Instruments, USA) to measure interaction isotherms during the titration of the polyanions solutions with PAR30. Experiments were performed at 25 °C. The micro-calorimeter measurement and reference cell volumes were 1 mL. The reference cell contained Milli-Q water and the sample cell contained the polyanions solution. PAR30 and polyanions were separately dissolved in NaCl-TRIS buffer solutions with concentrations 5.16 mM and 0.516 mM of residue respectively. PAR30 was placed in a 250 μ L motor-driven syringe (titrant), each titration experiment consisting into a series of 25 injections of 10 μ L, with a waiting time of 600 s between two successive injections, at a constant stirring rate of 300 rpm. As a consequence, the arginine/anionic residues ratio reached the final value of 2.5 at the end of a titration experiment. The heat associated with the dilution of PAR30 in NaCl-TRIS buffer was measured with the same conditions, leading to an average value -20 μ J per injection. This contribution was subtracted from the surface area of the peaks in the thermograms before calculating the molar heat associated with the interaction of PAR30 with a polyanion.

Statistical analysis

The data concerning evaluation of pathogen growth were processed by using SigmaPlot (Systat Software Inc., USA). The one-way ANOVA test was performed at a significance level $\alpha = 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

We first investigated the growth of the different multilayers by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D). Figure 4.19 represents the evolution of the frequency shift of the third overtone (15 MHz) during the first 8 deposition steps. After 8 deposited pairs of layers (or "bilayers") the thicknesses of the films built with PAR30 and HA, PGA, ALG, CSA, HEP and PSS equal to 120, 95, 72, 68, 42 and 40 nm, respectively (Figure 4.20). Between all combinations, PAR30/HA has the strongest exponential behavior. Among the different investigated polysaccharides, HEP is the most negatively charged (1 sulfonate group, 2 sulfate groups and 1 carboxylate group per monomer), CSA

and ALG are intermediate (1 carboxylate and 1 sulfate group per CSA monomer and 2 carboxylate groups per ALG monomer) whereas HA is the least negatively charged polysaccharide (1 carboxylate group per monomer) (Scheme 1). As can be observed on Figures 4.19 and 4.20, the exponential character decreases in the order HA >ALG ~ CSA >HEP while the negative charge on the chains increases in the order HA <ALG ~ CSA <HEP. Moreover it was previously shown that due to the kosmotropic character of COO⁻ and chaotropic character of SO₃⁻, films formed with HA are more hydrated than films formed with HEP or CSA.⁵⁷ (PAR/HA) films seem not only to be the most hydrated ones but they also have the weakest electrostatic interactions. This point will be discussed later. This result strengthens the conclusion that the exponential character of the films increases when the polycation/polyanion interaction decreases.⁵⁷

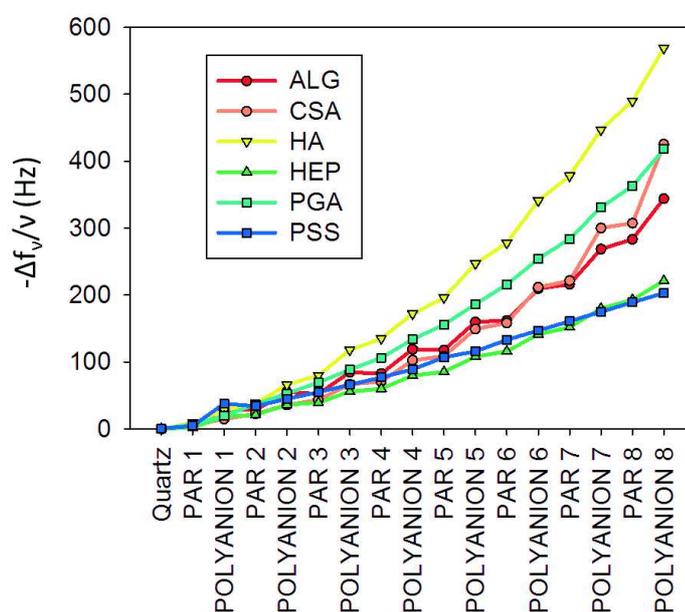


Figure 4.19 : Buildup of (PAR30/polyanion)₈ multilayer film on a SiO₂-coated crystal followed by QCM-D with ALG(dark red), CSA (orange), HA (light green), HEP (dark green), PGA (light blue), and PSS (dark blue) as polyanions. The evolution of the normalized frequency $-\Delta f_v/\nu$ (for $\nu = 3$) as a function of the number of adsorbed layers is shown.

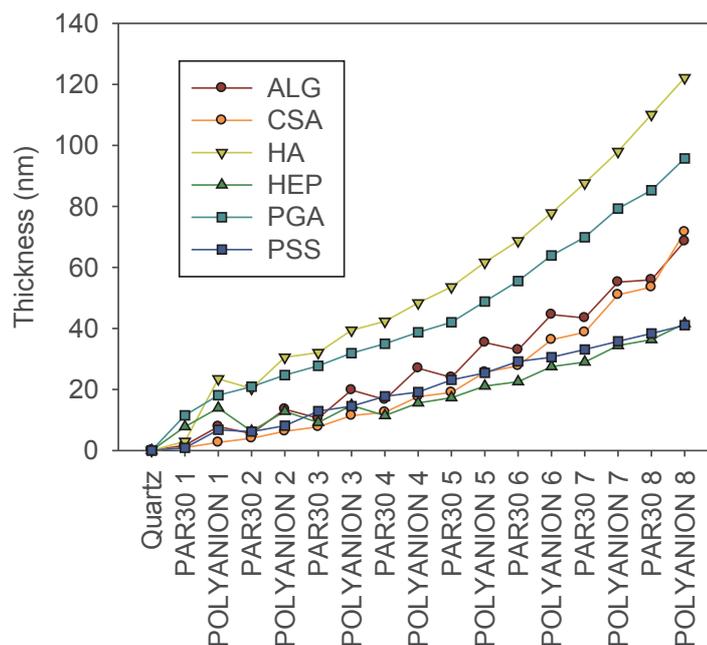


Figure 4.20 : Buildup of (PAR30/polyanion)₈ multilayer film on a SiO₂ coated crystal followed by QCM-D. Various polyanions (ALG, CSA, HEP, HA, PGA and PSS) are used in association with PAR30. Evolution of the estimated thickness as a function of the number of adsorbed layers

Next we investigated the homogeneity of the films. PAR labeled with FITC (PAR-FITC) and confocal microscopy were used for this purpose. Along the (x,y) plane, all films appeared very homogeneous and a uniform coating on the surface was obtained as stated by the green homogenous bands observed in Figure 4.21. This property was not guaranteed since some polysaccharide/polyanion multilayers form some droplet-like structures whose origin has been subject of studies.⁵⁸ Yet, the homogeneity of the films is important to expect antimicrobial properties of the functionalized surfaces.

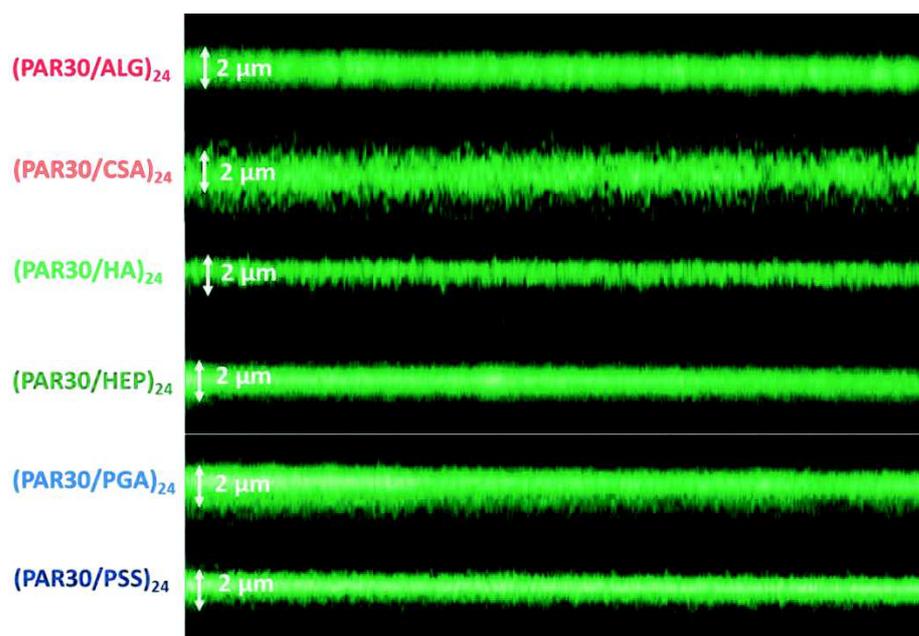


Figure 4.21 : Observation by confocal microscopy of the (x,z) sections of (PAR30-FITC/Polyanions) with polyanions as ALG, CSA, HEP, HA, PGA and PSS.

We then investigated the antimicrobial property of these PAR-based multilayers against *S. aureus* which is at the origin of more than 50% of the infections associated with implantable devices.⁵⁹ Two types of experiments were performed. A solution of *S. aureus* in MH medium was brought in contact with the polyelectrolyte multilayer under stirring and the pathogen growth in the solution was determined after 24 h of contact by measuring the absorbance at 620 nm of the supernatant. In the second method, we evaluated the presence of the bacteria deposited on the substrate after 24 h of contact by microscopy. When using PAR30 chains, only (PAR30/HA)₂₄ multilayers showed a quasi-total inhibition of bacterial growth in solution (Figure 4.22.a). Moreover, using the live/dead test and microscopic observations, it was hard to visualize an area with the presence of bacteria on this surface (Figure 4.22.b). For all other multilayers, the normalized *S. aureus* growth in solution lay between 81 and 97% of the control (non-coated surface, 100%). By statistical analysis (one-way ANOVA test), we confirmed a significant difference between (PAR30/HA)₂₄ and glass, as well as (PAR30/HA)₂₄ and the other multilayers. The same test revealed also a significant difference between (PAR30/ALG)₂₄ and glass. However inhibition of bacterial growth is weak for (PAR30/ALG)₂₄ and this is confirmed by microscopic observations. The other multilayers showed neither mutual statistical differences in the pathogen growth in solution, nor a difference with glass. Finally, we observe a significant growth inhibition of *S. aureus* on PAR30/HA films in contrast to other multilayers.

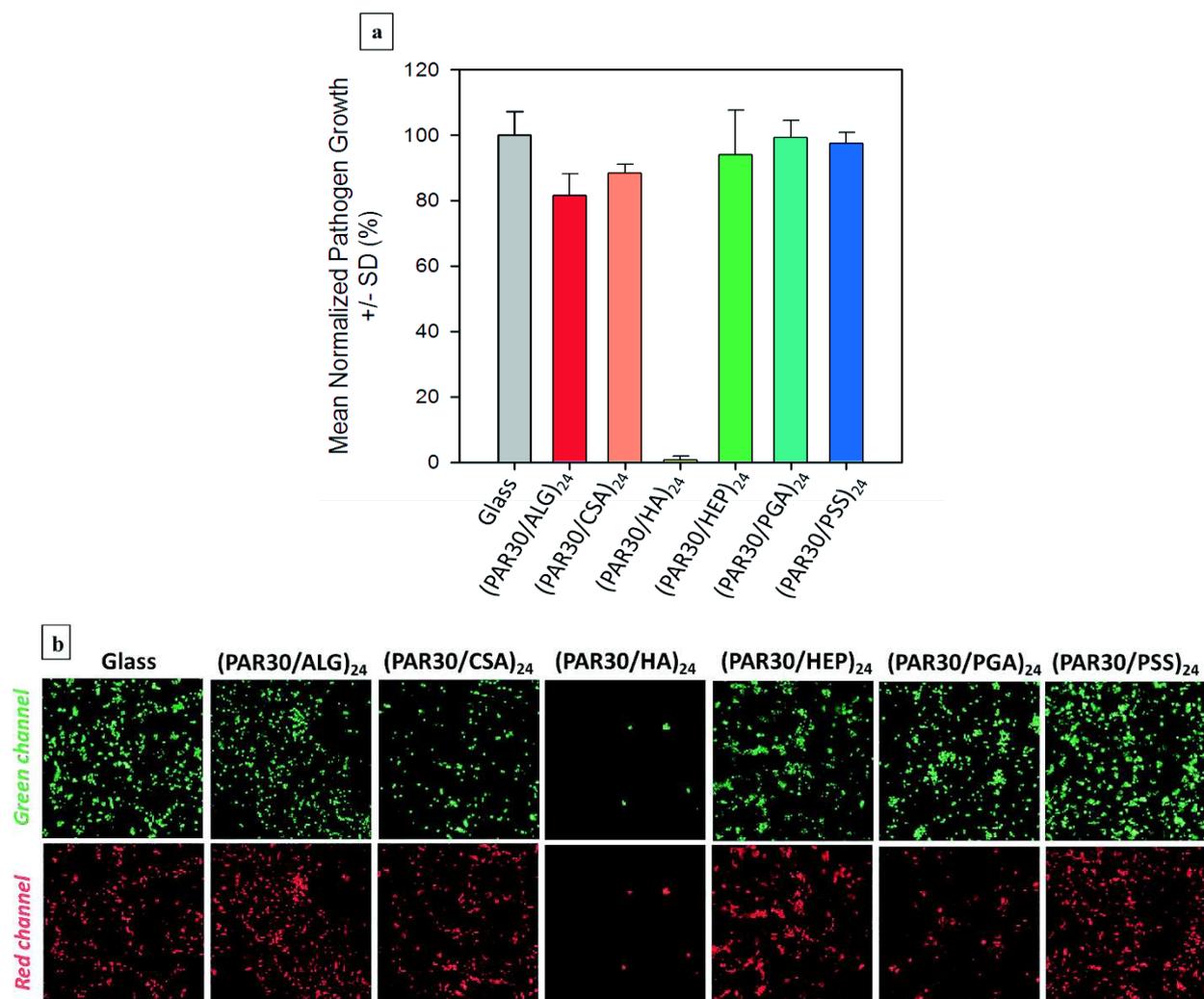


Figure 4.22 : a) Normalized *S. aureus* growth in the supernatant after 24h in contact with (PAR30/polyanion)₂₄ multilayer films built with ALG, CSA, HEP, HA, PGA and PSS as polyanions. The height of the colored bar represents the mean value of several independent measurements, and the error bars correspond to standard deviations (SD). Sample sizes: $n = 15$ for glass and $n = 3$ for PAR30/polyanions. The pathogen growth has been arbitrarily normalized to 100% for glass (gray bar) and the other measurements have been normalized accordingly. **b)** Confocal images of *S. aureus* after 24h of incubation and on glass substrates, on (PAR/polyanion)₂₄ films. Images in the green channel correspond to SYTO® 24 labeling for counting all bacteria and images in the red channel correspond to healthy bacteria through metabolism of CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) into an insoluble red fluorescent formazan. Image sizes are $67 \times 67 \mu\text{m}^2$.

The activity of the film could not be explained by a bactericidal effect of the polyanionic chains because inhibition of the bacterial growth up to $50 \mu\text{M}$ (Figure 4.23) was very limited when polyanions were incubated in solution with bacteria. We observed that none of the ALG, CSA, HA, HEP, PGA, or PSS chains show strong antimicrobial properties, PSS being the more effective at $50 \mu\text{M}$ but with a reduction of proliferation limited to 70%. Comparatively, PAR chains at $50 \mu\text{M}$ show 100% inhibition and, at $10 \mu\text{M}$, inhibition is close to 90%.

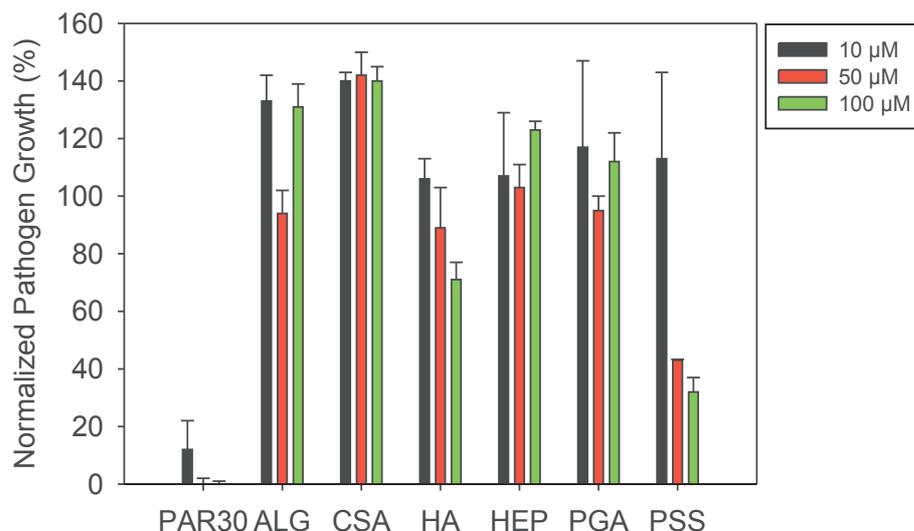


Figure 4.23 : Normalized pathogen growth of *S. aureus* as a function of polyelectrolyte concentration (μM) measured in solution. Tested polyelectrolyte consists in one polycation (PAR) and six polyanion (ALG, CSA, HA, HEP, PGA and PSS). Each polyelectrolyte was incubated 24h at 37 °C in 300 μL of MHB medium with *S. aureus* ($A_{620} = 0.001$). Pathogen growth of 0% corresponds to medium with antibiotics (and without PAR) and 100% to medium without polyelectrolyte. Each value corresponds to the mean value of three individual experiments (three samples per experiment and condition), and error bars correspond to standard deviations.

Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments were performed in order to determine the diffusion ability of the PAR30 chains in the different films. Figure 4.24 represents the evolution of the recovered fluorescence of the bleached zone for each couple (PAR30-FITC/polyanion). Striking differences exist between the different polyanions over the FRAP experimental timescale (about 20 min). Whereas up to 90% of the PAR30 chains diffuse in PAR/HA films, only 20% diffuse in CSA based films, of the order of 10% diffuse in HEP and PGA based films and of the order of 5% in ALG and PSS based films. These results show that the antimicrobial character of the PAR/polyanion multilayers is probably directly related to the ability of the PAR chains to diffuse in the film. In particular, this provide an explanation of the antimicrobial effect observed only with HA. The diffusion ability of the PAR chains thus appears to be extremely sensitive not only to the PAR chain length but also to the nature of the associated polyanion. These results show how by knowing the basic physicochemical rules governing a multilayer film behavior, one can predict and finely tune its properties for functionalization purposes.

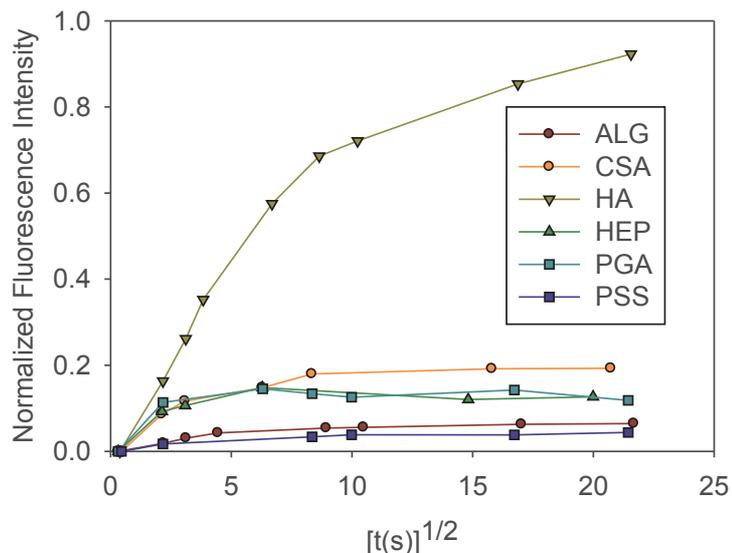


Figure 4.24 : Normalized fluorescence intensity of a photobleached area according to $[t(s)]^{1/2}$ for each film: (PAR30-FITC/polyanion)₂₄, with ALG (dark red), CSA (orange), HA (light green), HEP (dark green), PGA (light blue), and PSS (dark blue) as polyanions. $t=0$ corresponds to the end of the photobleaching step.

The stability of the (PAR30-FITC/HA)₂₄ and (PAR30-FITC/ALG)₂₄ multilayers (ALG is used as control) was also tested through observations with confocal microscopy after incubation at 37 °C during 24h in contact with MH medium with or without *S. aureus* (Figure 4.25). Images of (PAR30-FITC/HA)₂₄ show vermiculate patterns with “islands” after 24 h of incubation with or without bacteria. However, as demonstrated previously, practically no release of the PAR takes place during this process and no degradation of the film was monitored. These patterns could be due to a rearrangement of the film and a dewetting process induced by the MH medium but not to a degradation process. Moreover, bacteria seem not to be responsible for this rearrangement. For (PAR30-FITC/ALG)₂₄ control films, after 24 h of incubation in MH medium with or without *S. aureus* the multilayer remains homogeneous and no patterns are observed. As demonstrated before, most of the ALG chains are not mobile in the film. This suggests that probably the high mobility of PAR30 chains is at the origin of the vermiculate pattern observed with PAR30/HA films during incubation in MH medium.

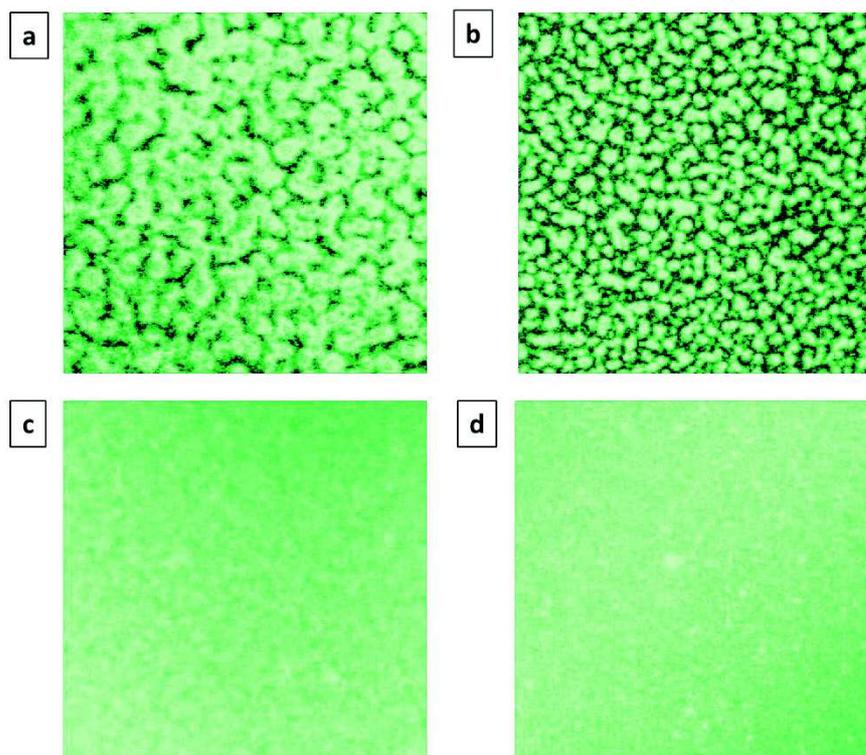


Figure 4.25 : **a)** Observation by confocal microscopy of the (x,y) sections of (PAR30-FITC/HA) after 24h at 37°C in MH medium, **b)** observation of (PAR30-FITC/HA) after 24h at 37°C in MH medium with *S.aureus*, **c)** observation of (PAR30-FITC/ALG) after 24h at 37°C in MH medium, **d)** observation of (PAR30-FITC/ALG) after 24h at 37°C in MH medium with *S.aureus*. Image sizes are 100 x 100 μm^2 .

To better understand the mechanism responsible for PAR diffusion, we determined the heat of complexation for each couple (PAR30/polyanion). Previous studies showed that an endothermic complexation process between polycations and polyanions is characteristic of an exponential film growth, whereas a strongly exothermic process corresponds to a linear growth regime.⁶⁰ Thus, the strength of the polycation/polyanion interaction, measured by the heat of complexation, could be related to the polyelectrolyte diffusion ability in the films and finally a direct relation could be established with the antimicrobial character of the corresponding film. In order to validate this hypothesis, we used isothermal titration microcalorimetry (ITC) to determine the enthalpy of the polycation/polyanion complexation in solution (Figure 4.26). Table 4.2 represents the reaction enthalpy measured for each couple of (PAR30/polyanion).

Table 4.2 : Reaction Enthalpies For The Investigated PAR30/polyanion Couple

Polyanion	Negative charge/residue	Growth regime of the film	Antimicrobial properties of the (PAR30/polyanion) film	Reaction enthalpy (kJ.mol ⁻¹)
ALG	1	exponential	-	- 3.81
CSA	1	exponential	-	- 3.90
HA	0.5	exponential	+	+ 0.35
HEP	2	weakly exponential	-	- 5.87
PGA	1	exponential	-	- 4.21
PSS	1	linear	-	- 7.99

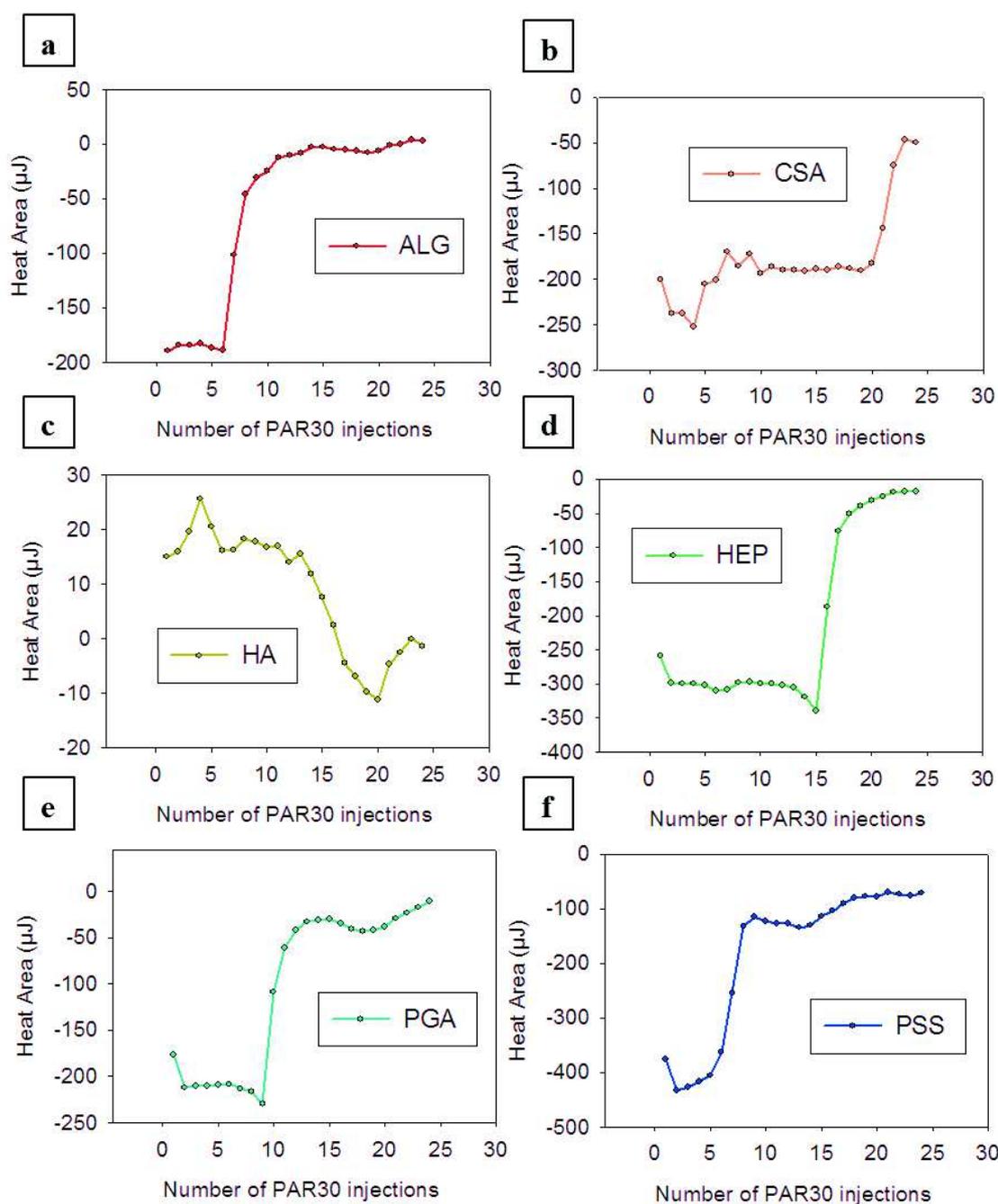
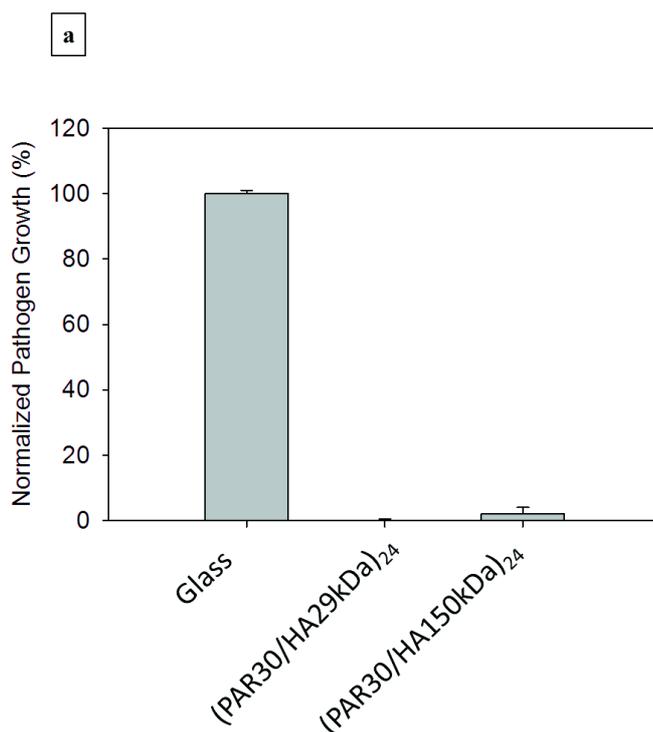


Figure 4.26 : Representative isothermal titration calorimetry data for PAR30 injected in NaCl-TRIS solution with ALG (a), CSA (b), HA (c), HEP (d), PGA (e) and PSS (f). Curves represent integrated and dilution corrected peak areas of the titration data.

One clearly observes that among the six investigated systems, the interaction of PAR with HA is the only one that is endothermic, indicating a weak interaction. The PAR/HA film buildup must be driven by an entropic process. After buildup, the diffusion ability of the PAR chains should no longer depend upon the entropy associated to the PAR/HA complexation but rather upon the strength of the arginine/HA monomer interaction and thus to the reaction heat. This suggests some correlations

between the strength of the interaction between the polyelectrolytes (*i.e* reaction enthalpy), diffusion ability of the one of them in the multilayer film, the exponential character of the film and finally its antimicrobial properties.

All the above data were obtained by using HA whose molecular weight is 150 kDa. We also investigated if the molecular weight of HA has an influence on the antimicrobial properties. For this purpose, we performed antimicrobial experiments with (PAR30/HA)₂₄ films using HA chains with a molecular weight of 29 kDa. The molecular weight of HA seems to have no influence on the antimicrobial character of the film, a similar bacterial growth inhibition was obtained for both HA 29 kDa and HA 150 kDa based films (Figure 4.27.a and b). We also checked that the molecular weight of HA does not affect the diffusion ability of the PAR chains in the multilayer (Figure 4.27.c). This was expected since one PAR chain should interact with different HA chains in the multilayer. Moreover, ITC experiments show that the interaction of PAR with HA is endothermic, independently of the molecular weight of HA (Table 4.3 and Figure 4.28).



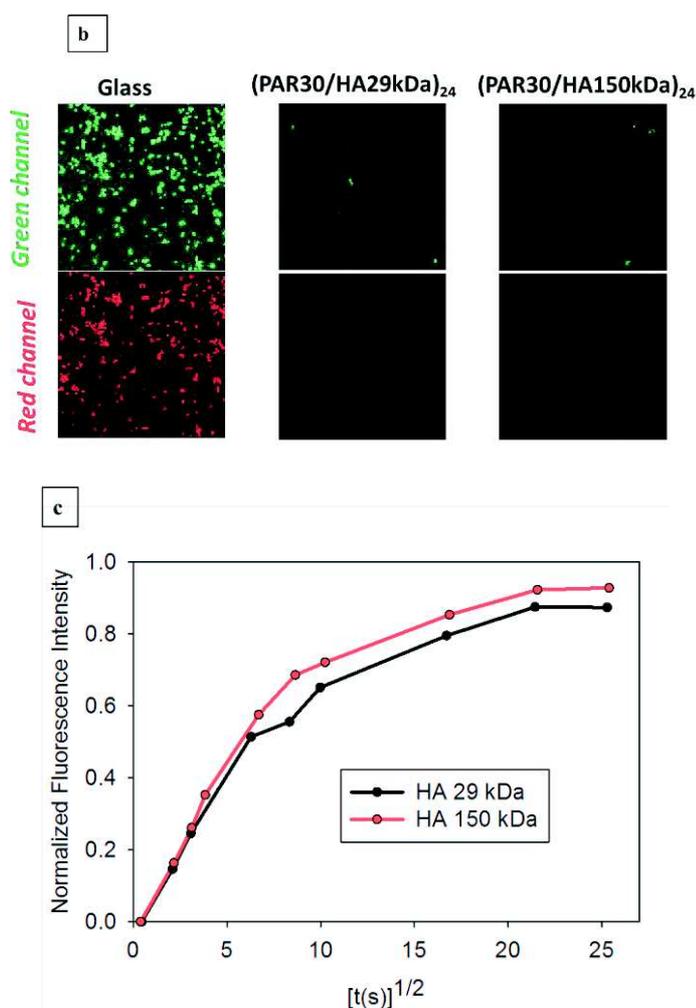


Figure 4.27 : **a)** Normalized *S. aureus* growth in the supernatant after 24h in contact with (PAR30/HA)₂₄ multilayers built with HA of molecular weights of 29 or 150 kDa. Each value corresponds to the mean value of 3 individual experiments and error bars correspond to standard deviations. **b)** Confocal images of *S. aureus* after 24h of incubation on glass substrates and on (PAR30/HA)₂₄ films. Images in the green channel correspond to SYTO[®] 24 labeling for counting all bacteria and images in the red channel correspond to healthy bacteria through metabolism of CTC (5-cyano- 2,3-ditolyl tetrazolium chloride) into an insoluble red fluorescent formazan. Image sizes are 67 × 67 μm². **c)** Normalized fluorescence intensity of a photobleached area according to $[t(s)]^{1/2}$ for (PAR30-FITC/HA)₂₄ multilayers, built with HA of molecular weights of 29 (black) or 150 kDa (red). $t=0$ corresponds to the end of the photobleaching step.

Table 4.3 : Reaction Enthalpies For The Investigated PAR30/HA Couple

MW of HA (kDa)	Antimicrobial properties of the (PAR30/HA) film	Reaction enthalpy (kJ.mol ⁻¹)
29	+	+ 0.78
150	+	+ 0.35

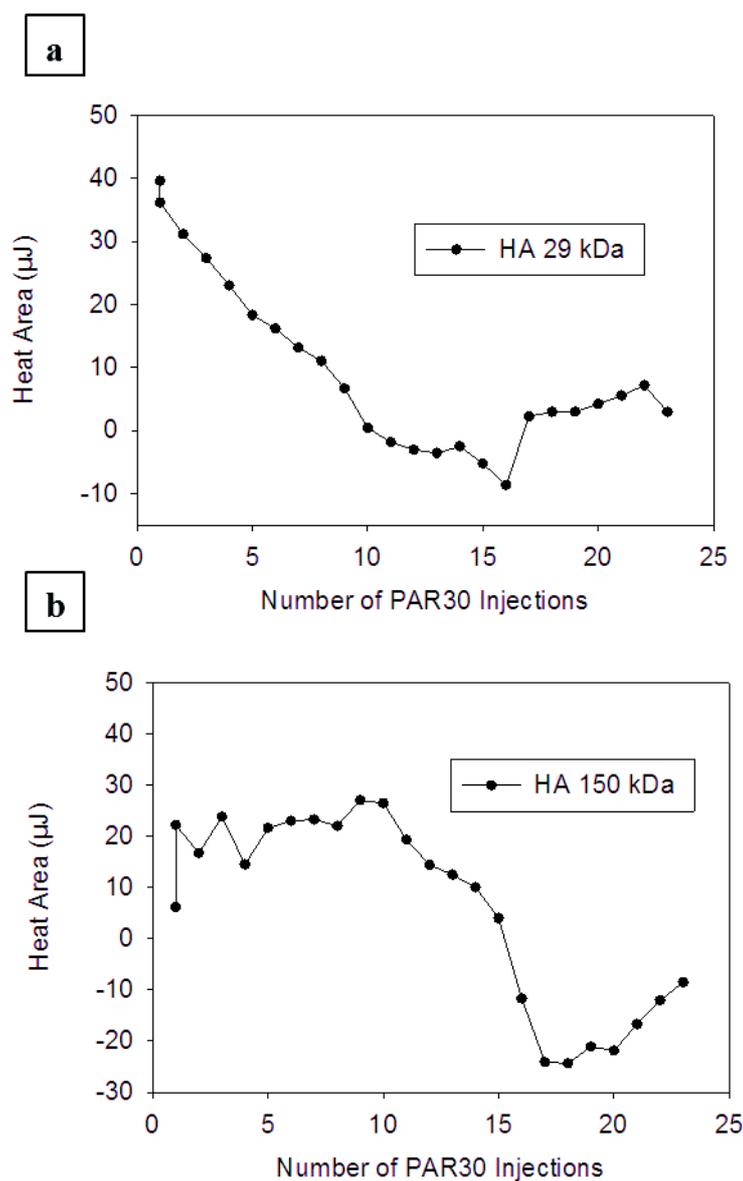


Figure 4.28 : Representative isothermal titration calorimetry data for PAR30 injected in NaCl-TRIS solution with HA with molecular weight of 29 kDa (a), and 150 kDa (b). Curves represent integrated and dilution corrected peak areas of the titration data.

CONCLUSION

Effective contact-killing antimicrobial coatings constitute a potential remedy for some nosocomial infections related with medical devices. We demonstrated previously that (PAR30/HA) films present a strong antimicrobial activity against bacteria known to be involved in nosocomial infections. Here we investigated the influence of the polyanion component on the physicochemical and bioactivity properties of the film. For this purpose, we investigated the antimicrobial character of multilayers based on PAR30 and a series of polyanions (4 polysaccharides, 1 homopolypeptide and 1 synthetic polymer). We found that only (PAR30/HA)₂₄ multilayers have an antimicrobial activity correlated with the most pronounced exponential growth regime and the highest diffusion ability of

the PAR30 chains in the film compared to the other systems. Finally, HA is the only investigated polyanion for which the reaction enthalpy with PAR30 is endothermic. PAR30 have the weakest interaction with HA which contributes to the strong diffusion ability of its chains in PAR30/HA films. These results explain, at a molecular level, the diffusion ability of PAR30 and thus the origin of the contact killing antimicrobial property of this film.

4.3. Etablissement d'un modèle général de films antibactériens (polypeptide/HA)₂₄

Nous avons obtenu un revêtement antibactérien par utilisation d'un polycation peptidique chargé positivement, la PAR, combiné à un polyanion pour former un film « layer-by-layer ». La propriété antimicrobienne du film n'est effective que pour des chaînes de PAR de 30 résidus arginine associées à l'acide hyaluronique en tant que polyanion. Nous nous sommes alors attachés à établir un modèle général de films multicouches antimicrobiens à base d'acide hyaluronique et d'un polycation peptidique. Pour ce faire, deux autres homopolymères composés d'acides aminés chargés positivement ont été utilisés : la poly(L-lysine) (PLL) et la poly(L-ornithine) (PLO). Les PLL et PLO utilisées sont aussi de type monodisperse avec les tailles de chaînes suivantes : PLL10, PLL20, PLL30, PLL50, PLL100, PLL250 ainsi que PLO30, PLO100 et PLO250.

4.3.1. Efficacité antibactérienne et fongicide des homopolypeptides

Dans un premier temps, les propriétés antibactériennes et fongicides intrinsèques ont été déterminées pour chaque homopolypeptide utilisé lors de la construction des films. Pour ce faire, la concentration minimale bactéricide et fongicide a été déterminée en solution selon le protocole défini dans le chapitre matériels et méthodes. Quatre souches bactériennes différentes ont été utilisées avec deux souches à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), deux souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*), ainsi qu'une levure (*Candida albicans*). Les concentrations minimales bactéricides ou fongicides (CMB ou CMF, respectivement) en mg.mL⁻¹ pour la PAR30, PLL30 et PLO30 sont données dans la figure 4.29 tandis les CMB et CMF en μM sont présentées en annexe (Figure A.4).

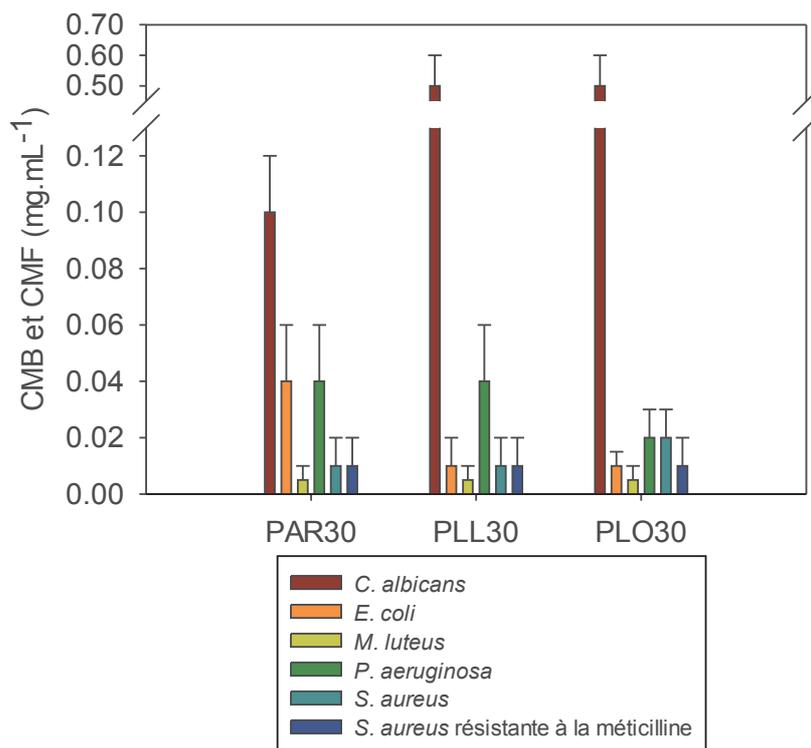


Figure 4.29 : Concentration minimale bactéricide et fongicide (en mg.mL^{-1}) de la PAR30, PLL30 et PLO30 en fonction de la souche utilisée. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 échantillons par expériences et conditions et la barre d'erreur correspond à l'écart-type.

A travers les résultats obtenus, il apparaît que l'efficacité antimicrobienne envers les souches bactériennes, qu'elles soient à Gram positif ou à Gram négatif, est indépendante de l'homopolypeptide cationique utilisé, et ce, à taille de chaîne équivalente. Ainsi, toutes les CMB sont inférieures à 0.04 mg.mL^{-1} alors que la CMB pour les antibiotiques est généralement comprise entre 1 et 10 mg.mL^{-1} pour *S. aureus*⁶¹. Ces résultats nous démontrent que le mécanisme d'action de ces homopolypeptides est uniquement lié à la présence d'un groupement chargé positivement et présent sur les chaînes latérales du polypeptide.

Néanmoins, il apparaît aussi que les polypeptides chargés positivement n'ont un effet fongicide (cas de la levure *C. albicans*) qu'à une concentration au minimum 3 fois supérieure à la CMB pour la PAR30, et une CMF jusqu'à 10 fois supérieure à la CMB pour la PLL30 et la PLO30. Ce résultat démontre que les charges positives présentes sur les chaînes latérales de ces polymères interagissent avec la membrane cytoplasmique bactérienne chargée négativement, et que cette interaction est responsable de l'effet bactéricide. En effet, la membrane cytoplasmique des levures est composée d'une bicouche de phospholipides ayant des groupements phosphates dirigés vers l'extérieur, comme dans le cas des cellules procaryotes, mais présente aussi de l'ergostérol, qui est une espèce amphiphile interagissant avec ces groupements phosphates. L'ergostérol diminue ainsi la concentration de

charges négatives présentes à la surface, ce qui a pour conséquence une interaction entre les polycations et la membrane cytoplasmique beaucoup plus faible, limitant alors l'effet fongicide. Les concentrations minimales bactéricides et fongicides des poly(L-arginine), poly(L-lysine) et poly(L-ornithine) ayant des tailles de chaîne différentes (de 10 à 250 résidus) sont présentées en annexe (Figure A.5 à A.9).

4.3.2. Efficacité antibactérienne des films (polypeptide/HA)₂₄

Afin de progresser vers un modèle général, les poly(L-lysine) et poly(L-ornithine), monodisperses et ayant des tailles de chaîne comprises entre 10 et 250 résidus, ont été associées avec l'acide hyaluronique afin de former des films multicouches de 24 bicouches, de manière similaire aux films (PAR/HA)₂₄. Leur activité antimicrobienne a été étudiée comme précédemment. La figure 4.30 représente la prolifération des bactéries du surnageant au bout de 24h de contact avec les films (PLO_n/HA)₂₄ avec $n = 30, 100$ et 250 . Tout comme le film (PAR30/HA)₂₄, le film (PLO30/HA)₂₄ empêche la prolifération bactérienne mais étonnement le film (PLO100/HA)₂₄ possède aussi un pouvoir antibactérien.

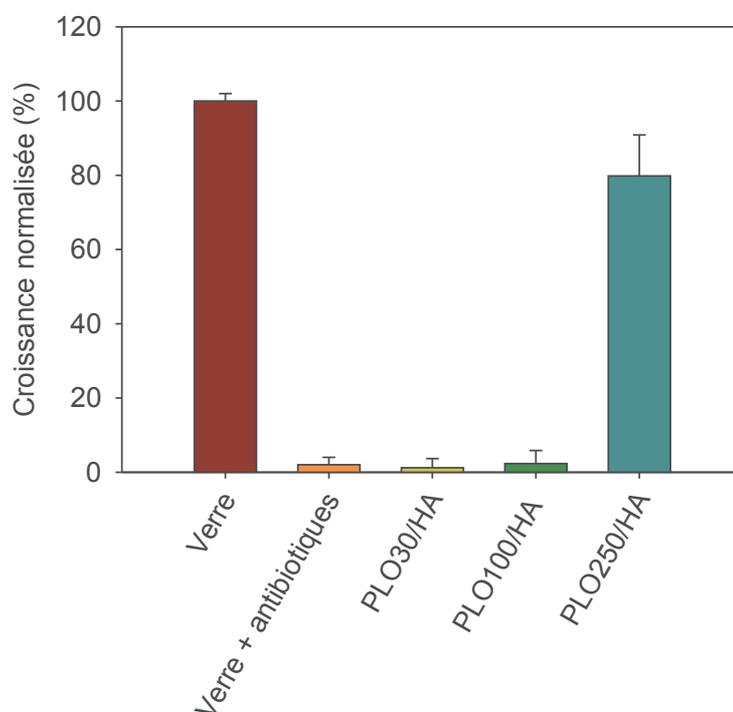


Figure 4.30 : Croissance normalisée (%) de *S. aureus* présent dans le surnageant et après 24h en contact avec des films (PLO_n/HA)₂₄ avec $n = 30, 100$ et 250 . Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 échantillons par expériences et conditions et la barre d'erreur correspond à l'écart-type.

La figure 4.31 représente la prolifération des bactéries du surnageant au bout de 24h de contact avec les films (PLL*n*/HA)₂₄ avec *n* = 10, 20, 30, 50, 100 et 250.

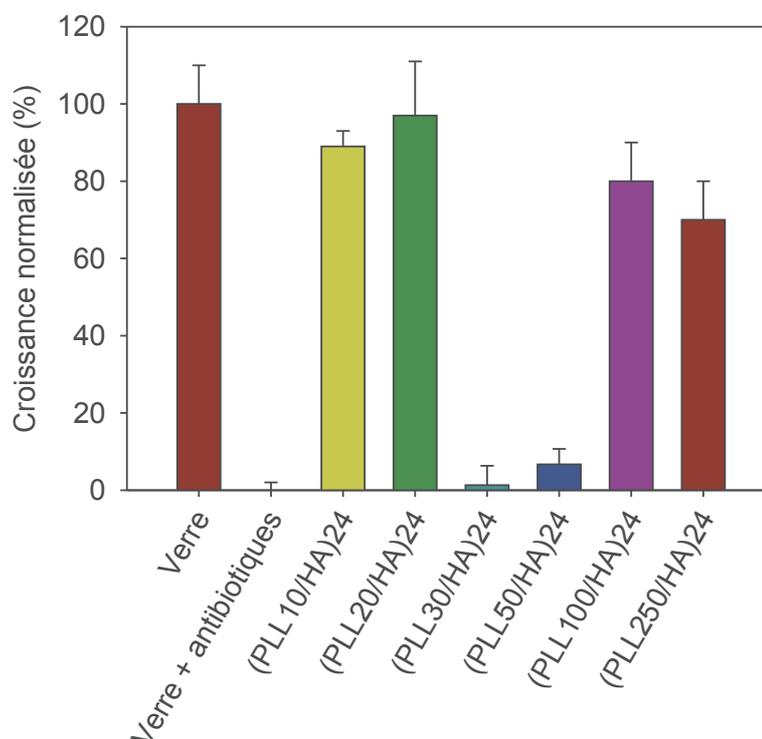


Figure 4.31 : Croissance normalisée (%) de *S. aureus* présent dans le surnageant et après 24h en contact avec des films (PLL*n*/HA)₂₄ avec *n* = 10, 20, 30, 50, 100 et 250. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 échantillons par expériences et conditions et la barre d'erreur correspond à l'écart-type.

Concernant les chaînes de poly(L-lysine), seuls les films (PLL30/HA)₂₄ et (PLL50/HA)₂₄ présentent une activité antimicrobienne. Ces résultats démontrent que, quel que soit l'homopolypeptide chargé positivement utilisé pour la construction des films multicouches combiné avec HA, l'effet bactéricide est préservé pour les polycations étudiés dans un certain intervalle de longueur de chaîne et en particulier avec 30 résidus.

Nous avons alors voulu vérifier si les propriétés physico-chimiques des films (polycation30/HA)₂₄ étaient similaires quel que soit l'homopolypeptide chargé positivement utilisé. Pour ce faire, nous avons tout d'abord suivi la construction des films (PAR30/HA)₈, (PLL30/HA)₈ et (PLO30/HA)₈ par microbalance à cristal de quartz (QCM-D). La figure 4.32.a représente l'évolution de la variation de la fréquence normalisée $-\frac{\Delta f_v}{v}$ (avec *v* = 3) pour chaque film construit. Il apparaît qu'une construction du type exponentiel est observée quel que soit le polypeptide cationique utilisé. La détermination de l'épaisseur selon le modèle de Voinova et al.²⁴ indique que les films (PAR30/HA)₈, (PLL30/HA)₈ et (PLO/HA)₈ ont une épaisseur de 127, 125 et 109 nm, respectivement. La variation de

l'épaisseur calculée ainsi que la dissipation ΔD_ν (avec $\nu = 3$) en fonction du nombre de couches polycations / HA déposé sont représentées en annexe (Figure A.11).

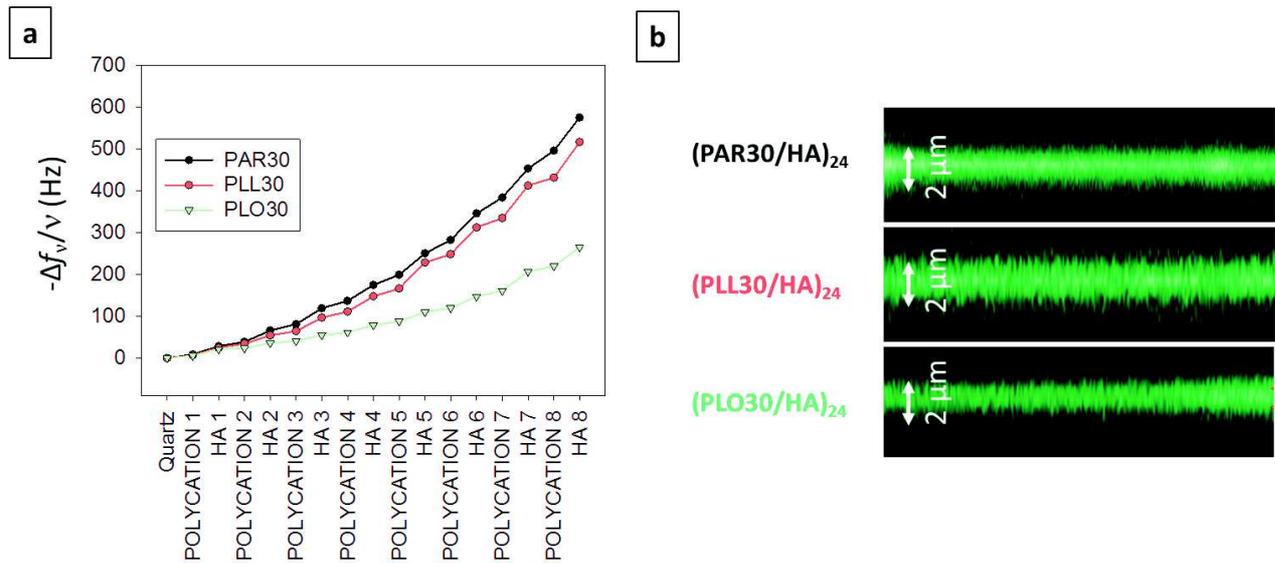


Figure 4.32 : **a)** Suivi par QCM-D de la construction des films (PAR30/HA); (PLL30/HA) et (PLO30/HA) sur un cristal de quartz recouvert de SiO₂. Représentation de la variation de la fréquence normalisée $-\frac{\Delta f_\nu}{\nu}$ (avec $\nu = 3$) en fonction du nombre de couches absorbées. **b)** Observation par microscopie confocale des sections (x,z) des films (PAR30-FITC/HA)₂₄, (PLL30-FITC/HA)₂₄ et (PLO30-FITC/HA)₂₄.

La figure 4.32.b montre l'aspect des films formés sur des surfaces de verre après 24 dépôts successifs de polycation/polyanion. Il apparaît que, quel que soit le polycation utilisé, le film se forme de manière homogène à la surface de verre. Ainsi la construction des films multicouches (polypeptide30/HA)₂₄ semble indépendante du polycation utilisé puisque l'épaisseur et la morphologie du film obtenue est identique pour les trois systèmes testés.

Nous avons précédemment indiqué l'importance de la mobilité des chaînes de PAR au sein du film LbL afin d'obtenir la propriété antimicrobienne. Nous avons donc voulu mesurer cette mobilité pour la PLL30 ainsi que la PLO30 au sein des films multicouches. Pour ce faire, les films (PLL30-FITC/HA)₂₄ et (PLO30-FITC/HA)₂₄ ont été construits sur des lamelles de verre et le pourcentage de chaînes mobiles ainsi que le coefficient de diffusion des chaînes de polymères PLL30 et PLO30 ont été déterminés par FRAP selon le même protocole que pour la PAR30. Les résultats sont donnés dans la figure 4.33 et dans le tableau 4.4.

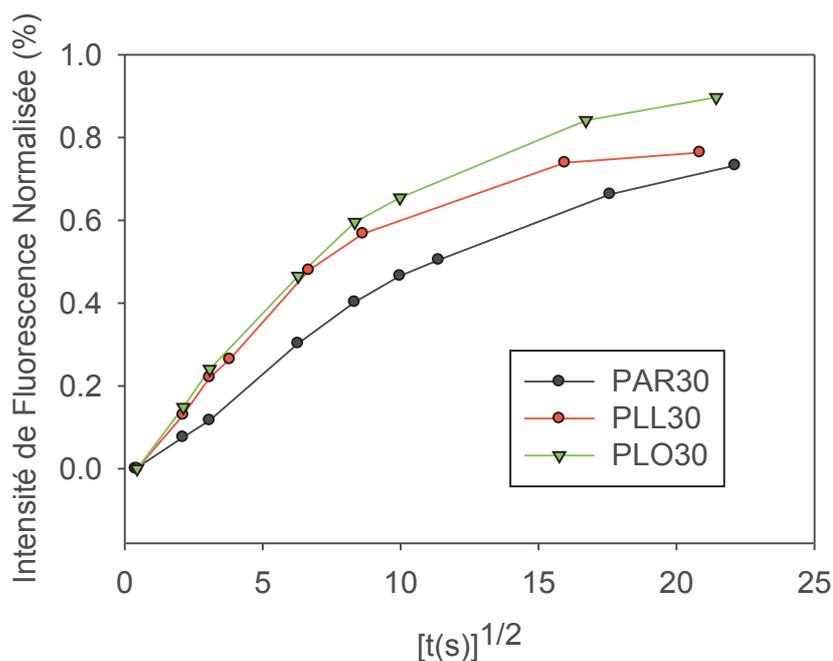


Figure 4.33 : Intensité de fluorescence normalisée d'une zone photoblanchie en fonction de $[t(s)]^{1/2}$ pour les films (PAR30-FITC/HA)₂₄, (PLL30-FITC/HA)₂₄ et (PLO30-FITC/HA)₂₄. $t = 0$ correspond à la fin de l'étape de photoblanchiment.

Tableau 4.4 : Proportion de chaînes mobiles p (en %) et coefficient de diffusion D (en $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) des polycations pour les films (PAR30-FITC/HA)₂₄, (PLL30-FITC/HA)₂₄ et (PLO30-FITC/HA)₂₄. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 échantillons par expériences et conditions et la barre d'erreur correspond à l'écart-type.

Polycation	PAR	PLL	PLO
Proportion de chaînes mobiles p (%)	88.5 ± 8.5	91.0 ± 8.5	89.5 ± 11.0
Coefficient de diffusion D ($\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	0.22 ± 0.08	0.84 ± 0.33	0.87 ± 0.58

A travers les résultats obtenus, la proportion de chaînes mobiles semble indépendante de l'homopolypeptide utilisé pour les films (Polypeptide/HA)₂₄. En effet, environ 90% de chaînes mobiles sont présentes dans les films (PAR30-FITC/HA)₂₄, (PLL30-FITC/HA)₂₄ et (PLO30-FITC/HA)₂₄.

Les caractéristiques physico-chimiques des films semblent donc indépendantes de l'homopolypeptide chargé positivement utilisé, ce qui explique la conservation de la propriété antibactérienne des films (polycation30/HA)₂₄.

A travers l'ensemble de ces résultats, nous avons ainsi pu établir un modèle général de films multicouches antimicrobiens à base de polypeptide. En effet nous avons démontré que les

homopolypeptides chargés positivement, et, combinés uniquement avec l'acide hyaluronique, permettent d'obtenir des films antimicrobiens. Le haut pourcentage de chaînes mobiles de polycations semble être le paramètre-clé responsable de la propriété antibactérienne de ces films.

4.3.3. Mécanisme bactéricide des films multicouches

Afin de mieux comprendre l'effet antibactérien de ces films (polycation30/HA), nous avons tenté de développer un modèle permettant de visualiser l'effet du polypeptide cationique sur la membrane bactérienne. Pour ce faire, la souche *E. coli* ATCC 2146 résistant à l'ampiciline, à la kanamycine et produisant la protéine fluorescente verte GFP, a été utilisée avec un film (PAR30-Rho/HA)₂₄ où la PAR30 a été marquée à de la rhodamine selon le même protocole de marquage que celui utilisé pour l'isothiocyanate de fluorescéine. Après dilution, les bactéries fluorescentes ont été mises en contact avec le film (PAR30-Rho/HA)₂₄. Nous avons observé la fluorescence des bactéries immédiatement après leur contact avec le film et au bout de 24h de contact. Une surface de verre non traitée a été utilisée en tant que contrôle. L'observation a été réalisée à la surface du film par utilisation d'un microscope confocal aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission des protéines fluorescentes vertes ($\lambda_{exc} = 395 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 509 \text{ nm}$) et de la Rhodamine ($\lambda_{exc} = 570 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$).

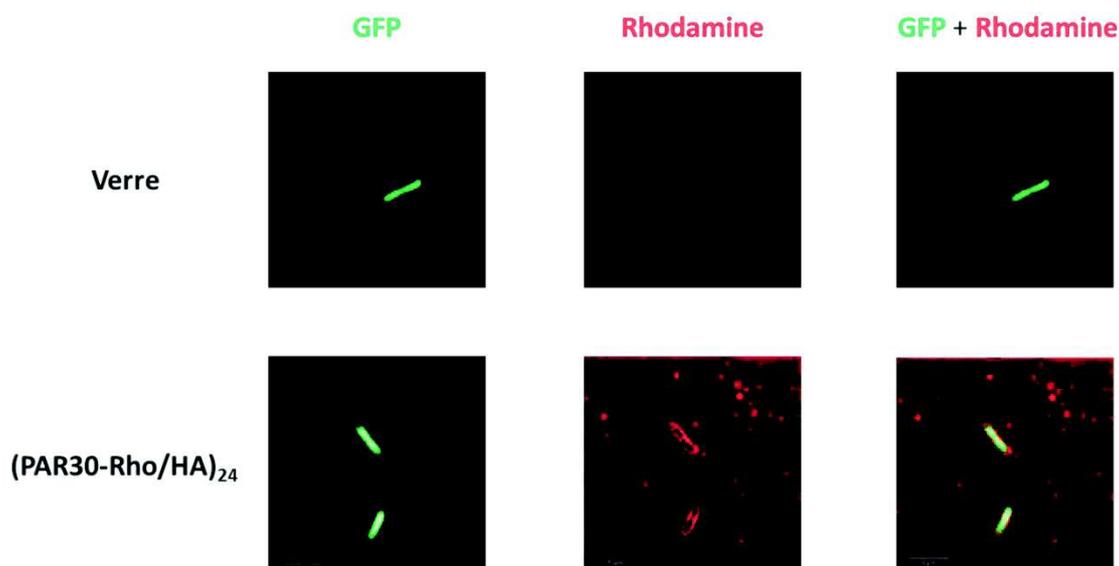


Figure 4.34 : Observation par microscopie confocale (plan x,y) de *E. coli* immédiatement après leur contact avec le film (PAR30-Rho/HA)₂₄. Taille de l'image : 5 x 5 μm^2 .

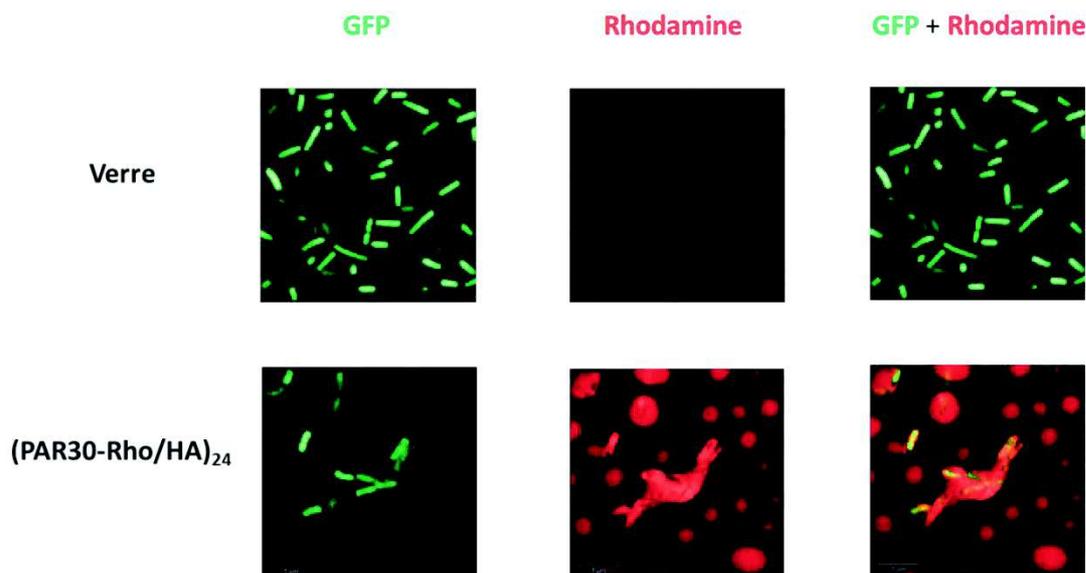


Figure 4.35 : Observation par microscopie confocale de *E. coli* après 24h de contact sur le film (PAR30-Rho/HA)₂₄. Taille de l'image : 5 x 5 μm^2 .

Au contact des films (PAR30-Rho/HA)₂₄, la bactérie émet alors à la longueur d'onde d'émission de la rhodamine, ce qui suppose que la PAR30 provenant du film se fixe à la membrane bactérienne après contact de la bactérie avec le film (Figure 4.34). Au bout de 24h, les bactéries au contact du film (PAR30-Rho/HA)₂₄ n'ont que peu, voire pas proliféré en comparaison des bactéries au contact d'une lamelle de verre non traitée (Figure 4.35). En outre, le peu de bactéries présentes à la surface émettent à la longueur d'onde d'émission de la rhodamine au niveau membranaire et intracellulaire. Aussi, probablement beaucoup de bactéries en surface ont été lysées et ne sont donc plus visibles. L'hypothèse émise dans la première partie du chapitre 4 est alors vérifiée. Pour rappel, nous émettions l'hypothèse que les PAR30 présentes à la surface et interagissant avec les bactéries sont absorbées par celles-ci et, grâce à la mobilité des chaînes de PAR30 dans le film, des nouvelles molécules de PAR30 deviennent disponibles à la surface du film pour les bactéries suivantes.

Le mécanisme d'action de la PAR semble être lié à l'interaction PAR/membrane, avec une altération de la membrane cytoplasmique et une pénétration à l'intérieur de celle-ci. La PAR30 présente donc un mécanisme similaire à celui des peptides antimicrobiens pénétrant dans les cellules, détaillé dans le chapitre 1. Pour rappel, le mode d'action de ces peptides est lié à l'interaction avec des cibles intracellulaires et, dans certains cas, un endommagement de la membrane cellulaire. Ce mécanisme est vérifié pour les bactéries à Gram négatif telles *E. coli* mais l'étude sur les bactéries à Gram positif telles que *S. aureus* en utilisant des souches autofluorescentes reste encore à réaliser, en particulier par microscopie confocale ou encore par microscopie à haute résolution.

Conclusion et perspectives

L'effet antimicrobien des films multicouches (PAR10/HA)₂₄, (PAR30/HA)₂₄, (PAR100/HA)₂₄ et (PAR200/HA)₂₄ a été étudié. Nous avons démontré que seul le film (PAR30/HA)₂₄ possède un effet antibactérien contre trois souches bactériennes à Gram positif et deux souches à Gram négatif. Le mécanisme d'action de ce film a été élucidé : nous avons démontré que la libération des chaînes de PAR30 hors du film dans le surnageant ne peut être à l'origine de l'effet bactéricide du film. Le mécanisme d'inhibition bactérienne est alors relié à la grande mobilité des chaînes de PAR30 au sein des films, permettant à la surface d'être continuellement alimentée en polycations lors du contact avec les bactéries.

Nous avons alors tenté de vérifier si ce mécanisme demeurerait toujours valable pour d'autres polyanions. Quatre polysaccharides, un homopolypeptide et un polymère synthétique ont été utilisés. Seul le film (PAR30/HA)₂₄ présente un effet antibactérien. Il a été observé une importante proportion de chaînes de PAR30 mobiles dans les films (PAR30/HA) tandis que, combinées à d'autres polyanions, cette proportion est comparativement faible. Nous avons démontré que l'interaction, en solution, des chaînes de PAR30 avec HA est caractérisée par une enthalpie de réaction positive tandis que cette interaction possède une enthalpie de réaction négative avec les autres polyanions. Ces résultats peuvent permettre d'être prédictif sur les capacités antimicrobiennes d'un polycation au sein d'un film multicouche.

Ce travail a aussi démontré que les caractéristiques physico-chimiques ainsi que les propriétés antimicrobiennes sont maintenues lorsque d'autres homopolypeptides chargés positivement et ayant 30 résidus sont associés à l'acide hyaluronique. La propriété antimicrobienne de ces polycations, et donc des films (polycation30/HA), est liée à la structure moléculaire de ceux-ci. En effet, la présence de charges positives sur les groupements présents à l'extrémité des chaînes aliphatiques des polycations permet l'interaction de ces derniers avec la membrane bactérienne chargée négativement. La poly(L-arginine), la poly(L-lysine) et la poly(L-ornithine) ont été étudiées mais la poly(histidine), un autre poly(acide aminé) chargé positivement dans les conditions physiologiques, reste à étudier.

A partir des conclusions formulées dans ce mémoire, l'application de ce revêtement pour des implants sur des modèles infectieux animaux pourrait être envisagée. Il serait intéressant d'étudier la biocompatibilité des revêtements antimicrobiens, notamment par des tests *in vivo*. L'aspect anti-inflammatoire de films à base de PAR pourrait être validé également via un modèle animal. Enfin, il serait aussi intéressant de développer d'autres revêtements comme par exemple en utilisant un support à base d'hydrogel et d'y intégrer des chaînes de PAR30. Leur libération sera maîtrisée par des

interactions chimiques entre l'hydrogel et la PAR30. Un autre exemple serait de contrôler l'effet antibactérien, en combinant la PAR30 avec une séquence de clivage spécifique au pathogène afin de n'obtenir l'effet antimicrobien de la PAR30 qu'une fois en contact avec ce pathogène.

Références bibliographiques

1. Tang, Z. Y.; Wang, Y.; Podsiadlo, P.; Kotov, N. A., Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering. *Advanced Materials* **2006**, *18*, 3203-3224.
2. Min, J.; Choi, K. Y.; Dreaden, E. C.; Padera, R. F.; Braatz, R. D.; Spector, M.; Hammond, P. T., Designer Dual Therapy Nanolayered Implant Coatings Eradicate Biofilms and Accelerate Bone Tissue Repair. *ACS Nano* **2016**, *10*, 4441-4450.
3. Liu, Y.; He, T.; Gao, C., Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* **2005**, *46*, 117-126.
4. Decher, G., Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232-1237.
5. Richert, L.; Boulmedais, F.; Lavalle, P.; Mutterer, J.; Ferreux, E.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Picart, C., Improvement of Stability and Cell Adhesion Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films by Chemical Cross-Linking. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 284-294.
6. Chluba, J.; Voegel, J.-C.; Decher, G.; Erbacher, P.; Schaaf, P.; Ogier, J., Peptide Hormone Covalently Bound to Polyelectrolytes and Embedded into Multilayer Architectures Conserving Full Biological Activity. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 800-805.
7. Özçelik, H.; Vrana, N. E.; Gudima, A.; Riabov, V.; Gratchev, A.; Haikel, Y.; Metz-Boutigue, M.-H.; Carradó, A.; Faerber, J.; Roland, T.; Klüter, H.; Kzhyshkowska, J.; Schaaf, P.; Lavalle, P., Harnessing the Multifunctionality in Nature: A Bioactive Agent Release System with Self-Antimicrobial and Immunomodulatory Properties. *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4*, 2026-2036.
8. Huynh-Ba, G., Peri-implantitis: "tsunami" or marginal problem? *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **2013**, *28*, 333-337.
9. Tarakji, K. G.; Ellis, C. R.; Defaye, P.; Kennergren, C., Cardiac implantable electronic device infection in patients risk. *Arrhythmia Electrophysiology Review* **2016**, *5*, 65-71.
10. Sampedro, M. F.; Patel, R., Infections associated with long-term prosthetic devices. *Infectious Disease Clinics of North America* **2007**, *21*, 785-819.
11. Guggenbichler, J. P.; Assadian, O.; Boeswald, M.; Kramer, A., Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials - catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. *GMS Krankenhhygiene Interdisziplinär* **2011**, *6*.
12. Seon, L.; Lavalle, P.; Schaaf, P.; Boulmedais, F., Polyelectrolyte Multilayers: A Versatile Tool for Preparing Antimicrobial Coatings. *Langmuir* **2015**, *31*, 12856-12872.
13. Pavlukhina, S. V.; Kaplan, J. B.; Xu, L.; Chang, W.; Yu, X.; Madhyastha, S.; Yakandawala, N.; Mentbayeva, A.; Khan, B.; Sukhishvili, S. A., Noneluting enzymatic antibiofilm coatings. *ACS Applied Materials and Interfaces* **2012**, *4*, 4708-4716.
14. Cado, G.; Aslam, R.; Seon, L.; Garnier, T.; Fabre, R.; Parat, A.; Chassepot, A.; Voegel, J. C.; Senger, B.; Schneider, F.; Frere, Y.; Jierry, L.; Schaaf, P.; Kerdjoudj, H.; Metz-Boutigue, M. H.; Boulmedais, F., Self-Defensive Biomaterial Coating Against Bacteria and Yeasts: Polysaccharide Multilayer Film with Embedded Antimicrobial Peptide. *Advanced Functional Materials* **2013**, *23*, 4801-4809.
15. Zhuk, I.; Jariwala, F.; Attygalle, A. B.; Wu, Y.; Libera, M. R.; Sukhishvili, S. A., Self-defensive layer-by-layer films with bacteria-triggered antibiotic release. *ACS Nano* **2014**, *8*, 7733-7745.

16. Silva, J. M.; Reis, R. L.; Mano, J. F., Biomimetic Extracellular Environment Based on Natural Origin Polyelectrolyte Multilayers. *Small* **2016**.
17. Stuart, M. A.; Huck, W. T.; Genzer, J.; Muller, M.; Ober, C.; Stamm, M.; Sukhorukov, G. B.; Szleifer, I.; Tsukruk, V. V.; Urban, M.; Winnik, F.; Zauscher, S.; Luzinov, I.; Minko, S., Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nature Materials* **2010**, *9*, 101-113.
18. Boudou, T.; Crouzier, T.; Ren, K. F.; Blin, G.; Picart, C., Multiple Functionalities of Polyelectrolyte Multilayer Films: New Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2010**, *22*, 441-467.
19. Lavallo, P.; Voegel, J. C.; Vautier, D.; Senger, B.; Schaaf, P.; Ball, V., Dynamic aspects of films prepared by a sequential deposition of species: perspectives for smart and responsive materials. *Advanced Materials* **2011**, *23*, 1191-221.
20. Hammond, P. T., Building biomedical materials layer-by-layer. *Materials Today* **2012**, *15*, 196-206.
21. Guyomard, A.; Dé, E.; Jouenne, T.; Malandain, J. J.; Muller, G.; Glinel, K., Incorporation of a hydrophobic antibacterial peptide into amphiphilic polyelectrolyte multilayers: A bioinspired approach to prepare biocidal thin coatings. *Advanced Functional Materials* **2008**, *18*, 758-765.
22. Porcel, C.; Lavallo, P.; Ball, V.; Decher, G.; Senger, B.; Voegel, J. C.; Schaaf, P., From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **2006**, *22*, 4376-4383.
23. Picart, C.; Mutterer, J.; Richert, L.; Luo, Y.; Prestwich, G. D.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Lavallo, P., Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 12531-12535.
24. Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B., Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces : continuum mechanics approach. *Physica Scripta* **1999**, *59*, 391-396.
25. Soumpasis, D. M., Theoretical-Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Experiments. *Biophysical Journal* **1983**, *41* , 95-97.
26. Picart, C.; Mutterer, J.; Arntz, Y.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Senger, B., Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film. *Microscopy Research and Technique* **2005**, *66*, 43-57.
27. McNamara, T. P.; Blanford, C. F., A sensitivity metric and software to guide the analysis of soft films measured by a quartz crystal microbalance. *The Analyst* **2016**, *141*, 2911-2919.
28. Richert, L.; Lavallo, P.; Payan, E.; Shu, X. Z.; Prestwich, G. D.; Stoltz, J. F.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C., Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir* **2004**, *20*, 448-458.
29. Raphael, J.; Holodniy, M.; Goodman, S. B.; Heilshorn, S. C., Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. *Biomaterials* **2016**, *84*, 301-314.
30. Greenfield, N. J., Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2876-2890.
31. Zahouani, S.; Chaumont, A.; Senger, B.; Boulmedais, F.; Schaaf, P.; Jierry, L.; Lavallo, P., Stretch-Induced Helical Conformations in Poly(L-lysine)/Hyaluronic Acid Multilayers. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8*, 14958-14965.
32. Boulmedais, F.; Schwinté, P.; Gergely, C.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P., Secondary structure of polypeptide multilayer films: An example of locally ordered polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **2002**, 4523-4525.

33. Lugardon, K.; Chasserot-Golaz, S.; Kieffer, A. E.; Maget-Dana, R.; Nullans, G.; Kieffer, B.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M. H., Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 35875-35882.
34. Lavallo, P.; Voegel, J. C.; Vautier, D.; Senger, B.; Schaaf, P.; Ball, V., Dynamic aspects of films prepared by a sequential deposition of species: perspectives for smart and responsive materials. *Advanced Materials* **2011**, *23*, 1191-1221.
35. Schneider, A.; Francius, G.; Obeid, R.; Schwinté, P.; Hemmerlé, J.; Frisch, B.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Senger, B.; Picart, C., Polyelectrolyte Multilayers with a Tunable Young's Modulus: Influence of Film Stiffness on Cell Adhesion. *Langmuir* **2005**, *22*, 1193-1200.
36. Wang, G.; Mishra, B.; Lau, K.; Lushnikova, T.; Golla, R.; Wang, X., Antimicrobial peptides in 2014. *Pharmaceuticals* **2015**, *8*, 123-150.
37. Wimley, W. C., Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chemical Biology* **2010**, *5*, 905-917.
38. Sampedro, M. F.; Patel, R., Infections associated with long-term prosthetic devices. *Infectious disease clinics of North America* **2007**, *21*, 785-819.
39. Schierholz, J. M.; Beuth, J., Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *Journal of Hospital Infection* **2001**, *49*, 87-93.
40. Gbejuade, H. O.; Lovering, A. M.; Webb, J. C., The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthopædica* **2015**, *86*, 147-158.
41. Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R., A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* **2013**, *34*, 8533-8554.
42. Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R., The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2331-2339.
43. Decher, G., Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232-1237.
44. Tang, Z. Y.; Wang, Y.; Podsiadlo, P.; Kotov, N. A., Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. *Advanced Materials* **2006**, *18*, 3203-3224.
45. Richardson, J. J.; Cui, J.; Bjornmalm, M.; Braunger, J. A.; Ejima, H.; Caruso, F., Innovation in layer-by-layer assembly. *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 14828-14867.
46. Shukla, A.; Fleming, K. E.; Chuang, H. F.; Chau, T. M.; Loose, C. R.; Stephanopoulos, G. N.; Hammond, P. T., Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2348-2357.
47. Wang, B. L.; Ren, K. F.; Wang, H.; Ji, J., Construction of Degradable Multilayer Films for Enhanced Antibacterial Properties. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5*, 4136-4143.
48. Lichter, J. A.; Thompson, M. T.; Delgadillo, M.; Nishikawa, T.; Rubner, M. F.; Van Vliet, K. J., Substrata mechanical stiffness can regulate adhesion of viable bacteria. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1571-1578.
49. Min, J.; Braatz, R. D.; Hammond, P. T., Tunable staged release of therapeutics from layer-by-layer coatings with clay interlayer barrier. *Biomaterials* **2014**, *35*, 2507-2517.
50. Podsiadlo, P.; Paternel, S.; Rouillard, J. M.; Zhang, Z. F.; Lee, J.; Lee, J. W.; Gulari, L.; Kotov, N. A., Layer-by-layer assembly of nacre-like nanostructured composites with antimicrobial properties. *Langmuir* **2005**, *21*, 11915-11921.
51. Agarwal, A.; Nelson, T. B.; Kierski, P. R.; Schurr, M. J.; Murphy, C. J.; Czuprynski, C. J.; McAnulty, J. F.; Abbott, N. L., Polymeric multilayers that localize the release of chlorhexidine from biologic wound dressings. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6783-6792.

52. Özçelik, H.; Vrana, N. E.; Gudima, A.; Riabov, V.; Gratchev, A.; Haikel, Y.; Metz-Boutigue, M. H.; Carrado, A.; Faerber, J.; Roland, T.; Kluter, H.; Kzhyshkowska, J.; Schaaf, P.; Lavallo, P., Harnessing the multifunctionality in nature: a bioactive agent release system with self-antimicrobial and immunomodulatory properties. *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4*, 2026-2036.
53. Mutschler, A.; Tallet, L.; Rabineau, M.; Dollinger, C.; Metz-Boutigue, M.-H.; Schneider, F.; Senger, B.; Vrana, N. E.; Schaaf, P.; Lavallo, P., Unexpected bactericidal activity of poly(arginine)/hyaluronan nanolayered coatings. *Chemistry of Materials* **2016**, *28*, 8700-8709.
54. Picart, C.; Mutterer, J.; Richert, L.; Luo, Y.; Prestwich, G. D.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Lavallo, P., Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 12531-12535.
55. Sauerbrey, G., Verwendung von Schwingquartzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **1959**, *155*, 206-222.
56. Soumpasis, D. M., Theoretical-analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal* **1983**, *41*, 95-97.
57. Cruzier, T.; Picart, C., Ion pairing and hydration in polyelectrolyte multilayer films containing polysaccharides. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 433-442.
58. Guillaume-Gentil, O.; Zahn, R.; Lindhoud, S.; Graf, N.; Voros, J.; Zambelli, T., From nanodroplets to continuous films: how the morphology of polyelectrolyte multilayers depends on the dielectric permittivity and the surface charge of the supporting substrate. *Soft Materials* **2011**, *7*, 3861-3871.
59. Steinberg, J. P.; Clark, C. C.; Hackman, B. O., Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clinical Infectious Diseases* **1996**, *23*, 255-259.
60. Laugel, N.; Betscha, C.; Winterhalter, M.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Ball, V., Relationship between the growth regime of polyelectrolyte multilayers and the polyanion/polycation complexation enthalpy. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 19443-19449.
61. Amorena, B.; Gracia, E.; Monzón, M.; Leiva, J.; Oteiza, C.; Pérez, M.; Alabart, J.-L.; Hernández-Yago, J., Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1999**, *44*, 43-55.

Conclusion générale

Prévenir l'apparition de biofilms constitue un enjeu majeur pour les dispositifs médicaux puisque leurs surfaces sont des supports idéaux pour le développement des micro-organismes pathogènes, entraînant alors l'apparition d'infections. Avec une population vieillissante, l'augmentation du taux d'obésité, l'utilisation de plus en plus fréquente des dispositifs médicaux et l'apparition de souches multi-résistantes aux antibiotiques, il devient urgent de développer des stratégies de traitement de surfaces afin d'y limiter l'adhésion et la prolifération bactérienne.

Les peptides antimicrobiens, déjà présents dans la réponse immunitaire de nombreux animaux et végétaux, semblent être des agents idéaux dans la lutte contre les infections. Leur mécanisme d'action est basé sur la perturbation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique des bactéries et/ou sur l'inhibition de composés contenus à l'intérieur des cellules provoquant alors une lyse cellulaire. La stratégie d'attache des peptides sur des surfaces peut se faire par insertion de ceux-ci dans des multicouches de polyelectrolytes ou par greffage chimique sur les surfaces.

Les revêtements antimicrobiens peuvent empêcher uniquement l'adhésion des bactéries à la surface (revêtement « anti-adhésifs »), mais aussi empêcher la prolifération bactérienne, par contact de la bactérie avec l'agent antimicrobien contenu dans le revêtement (revêtement « contact-killing ») ou par libération des agents antimicrobiens du revêtement vers le milieu environnant (revêtement « release-killing »). Ce dernier type de revêtement possède le principal désavantage d'être actif même en l'absence de souche bactérienne ce qui réduit considérablement sa durée de vie. Des nouvelles stratégies basées sur la libération de l'agent antimicrobien uniquement en présence de bactéries ont donc été développées, mais les bactéries n'étant pas toutes des pathogènes, il serait intéressant de mettre au point un revêtement qui ne devienne actif qu'en présence du pathogène choisi.

Les peptides antimicrobiens, ne pouvant se fixer sur des surfaces inertes, nous avons conçu un peptide s'accrochant sur tous types de supports et actif uniquement en présence d'un pathogène : le peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR. La séquence (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA) est un mimétisme des protéines contenues dans les fibrilles des mollusques. Ces protéines, riches en résidus lysine et en L-DOPA, favorisent l'accroche des mollusques sur des supports solides en milieu marin. L'étude de l'accroche du peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA) sur une surface en SiO₂ a démontré que seule la L-DOPA présente sous forme oxydée (quinone) permet un dépôt durable du peptide malgré une réaction entre la forme quinone de la L-DOPA et les lysines présentes au sein du peptide, amenant à la formation d'agrégats en solution. Afin d'éviter la formation d'agrégats en solution, nous avons décidé d'adsorber sur la surface le peptide complet (L-DOPA)-K-(L-

DOPA)-K-(L-DOPA)-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR (ou D-T-CTL) sous forme réduite avant d'ajouter une solution d'oxydant pour former des liaisons chimiques « fortes » entre la L-DOPA présente au sein du peptide et la surface.

La séquence intermédiaire TLRGGE, est un site de clivage spécifique à *Staphylococcus aureus*. Seule cette bactérie produit l'enzyme endoprotéinase Glu-C, permettant de cliver l'extrémité C-terminale de l'acide glutamique E présent dans la séquence. Ainsi, en présence de *Staphylococcus aureus*, le peptide (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA)-TLRGGE-RSMRLSFRARGYGFR, préalablement greffé en surface, est clivé, et la séquence antimicrobienne RSMRLSFRARGYGFR, ou cateslytine, est libérée en solution, permettant ainsi d'éliminer les pathogènes présents. Concernant le clivage du peptide par l'enzyme endoprotéinase Glu-C, nous l'avons confirmé en solution en utilisant la technique FRET. Malgré cela, après accroche du peptide D-T-CTL sur une surface en SiO₂, aucun clivage apparent n'a pu être détecté en surface par QCM-D en présence de l'enzyme. En outre, les résultats microbiologiques ont démontré qu'une surface traitée avec le peptide D-T-CTL ne présente aucun effet antimicrobien en présence de *S. aureus* et de l'enzyme.

Face à l'absence de signal obtenu en QCM-D indiquant le clivage du peptide en surface et face à l'absence d'effet antimicrobien pour une surface recouverte de peptides D-T-CTL, l'hypothèse émise est que le manque d'espacement entre les peptides présents à la surface empêcherait l'enzyme d'atteindre le site de clivage. Des modifications chimiques du peptide D-T-CTL ont donc été réalisées en intégrant un espaceur entre le site d'accroche et le site de clivage. Trois espaceurs ont été utilisés, avec des tailles différentes (de 6 à 24 résidus) et une polarité différente. Malgré cela, aucun clivage n'est observé pour ces peptides modifiés et ancrés sur la surface. Il a aussi été démontré que l'un des peptides modifiés ne produit aucun effet antimicrobien une fois adhérent à la surface en présence de *S. aureus* et de l'enzyme. Une autre hypothèse envisagée serait que l'accroche du peptide par la séquence (L-DOPA)-K-(L-DOPA)-K-(L-DOPA) empêcherait le clivage par l'enzyme Glu-C. Il serait alors intéressant d'étudier le clivage du peptide en ôtant la séquence d'accroche et en immobilisant celui-ci à la surface selon un autre procédé afin de vérifier ou non la responsabilité de la séquence d'accroche dans le mauvais fonctionnement du clivage. On peut également imaginer que la conformation du peptide en surface pourrait compromettre le clivage. Il serait intéressant d'élaborer une méthode permettant de déterminer la conformation tridimensionnelle des peptides en présence de l'enzyme en solution et en surface. Enfin, la QCM-D étant la seule méthode employée afin de déterminer le clivage du peptide en surface, l'utilisation d'autres techniques afin de vérifier l'absence de clivage en surface serait envisageable, notamment des techniques basées sur le FRET afin d'obtenir une corrélation entre l'étude du clivage en solution et en surface.

Les films de polyélectrolytes obtenues par dépôt « couche-par-couche » ont été largement développés pour des applications biomédicales diverses, notamment dans le cadre de la conception de revêtements antibactériens. Ces revêtements sont, dans la plupart du temps, axés sur la délivrance locale d'un agent antimicrobien. Cela nécessite généralement l'ajout d'une molécule supplémentaire lors de la construction du film. On observe également un risque d'apparition de réactions inflammatoires et de cytotoxicité. Des études précédentes au laboratoire ont démontré qu'un film composé de poly(L-arginine) (PAR) comme polycation et d'acide hyaluronique (HA) comme polyanion possédait non seulement des propriétés anti-inflammatoires, mais également un effet antibactérien contre *S. aureus*. La PAR étant responsable de l'effet antimicrobien au sein du film, nous avons voulu élucider le mécanisme d'action de ces films et vérifier si la taille des chaînes de PAR avait une influence sur leur propriété antibactérienne. Nous avons donc utilisé des chaînes de PAR composée de 10 (PAR10), 30 (PAR30), 100 (PAR100) et 200 (PAR200) monomères d'arginine et ensuite combiné à HA dans la construction des films.

L'effet antimicrobien des films multicouches (PAR10/HA)₂₄, (PAR30/HA)₂₄, (PAR100/HA)₂₄ et (PAR200/HA)₂₄ a été étudié. Nous avons démontré que seul le film (PAR30/HA)₂₄ possède un effet antibactérien. De plus ce film est actif contre trois souches bactériennes à Gram positif et deux souches à Gram négatif. Le mécanisme d'action de ce film a été élucidé : nous avons démontré que la libération des chaînes de PAR30 hors du film dans le surnageant ne peut pas être à l'origine de son effet bactéricide. Le mécanisme d'inhibition bactérienne semble être relié à la grande mobilité des chaînes de PAR30 au sein des films, permettant à la surface d'être continuellement alimentée en polycations lors du contact avec les bactéries. Nous avons alors tenté de vérifier si ce mécanisme demeurerait toujours valable avec d'autres polyanions que l'acide hyaluronique pour la construction des films multicouches. Quatre polysaccharides, un homopolypeptide et un polymère synthétique ont été utilisés. Seul le film (PAR30/HA)₂₄ présente un effet antibactérien. Corrélativement, nous n'avons observé une fraction importante (de l'ordre de 90%) de chaînes de PAR30 mobiles uniquement dans les films (PAR30/HA)₂₄. Avec les autres polyanions étudiés, cette proportion de chaîne de PAR30 mobiles est comparativement faible (inférieure à 20%). Afin de comprendre cette différence de mobilité des chaînes de PAR30 dans les différents films, nous avons entrepris des expériences de microcalorimétrie en solution visant à déterminer l'enthalpie de réaction entre PAR30 et les différents polyanions utilisés. Nous avons démontré que, l'interaction en solution des chaînes de PAR30 avec HA est caractérisée par une enthalpie de réaction positive tandis que cette enthalpie de réaction est négative avec les autres polyanions. Ces résultats peuvent permettre d'être prédictif sur les capacités antimicrobiennes d'un polycation au sein d'un film multicouche. Ce travail a aussi démontré que les caractéristiques physico-chimiques ainsi que les propriétés antimicrobiennes sont maintenues lorsque

d'autres homopolypeptides chargés positivement et ayant 30 résidus sont associés à l'acide hyaluronique.

A partir des conclusions formulées dans ce mémoire, l'application de ce revêtement pour des implants sur des modèles infectieux animaux pourrait être envisagée. L'aspect anti-inflammatoire de films à base de PAR pourrait être validé également via un modèle animal. Il serait aussi intéressant d'étudier la biocompatibilité des revêtements antimicrobiens, notamment par des tests *in vivo*. En outre, il serait intéressant de démontrer si la PAR30 peut provoquer un phénomène de résistance sur les bactéries, comme cela est le cas de nombreux antibiotiques.

Enfin, il serait aussi intéressant de développer d'autres revêtements antimicrobiens comme par exemple en utilisant un support à base d'hydrogel et en y intégrant des chaînes de PAR30. La libération des chaînes de PAR sera maîtrisée par des interactions chimiques entre l'hydrogel et la PAR. Un autre exemple serait de contrôler l'effet antibactérien des films multicouches PAR/HA, en combinant les chaînes de PAR30 avec une séquence de clivage spécifique au pathogène afin de n'obtenir l'activité antimicrobienne de la PAR30 uniquement en contact avec ce pathogène.

Annexe

Chapitre 3 : Revêtements à base de peptides naturels

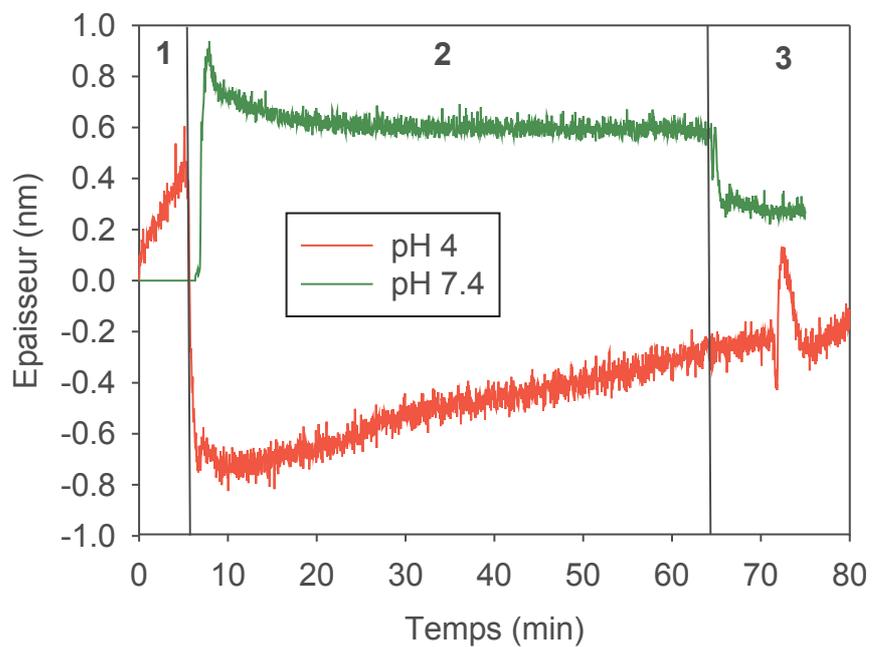


Figure A.1 : Suivi par QCM-D de l'épaisseur du peptide déposé sur le cristal de quartz recouvert de SiO₂ lors du passage d'une solution de peptide D à pH = 4 (courbe rouge) et à pH = 7.4 (courbe verte), sans NaIO₄. **1** : Cristal dans le tampon, **2** : Cristal en contact avec une solution de peptide D, **3** : Rinçage avec le tampon.

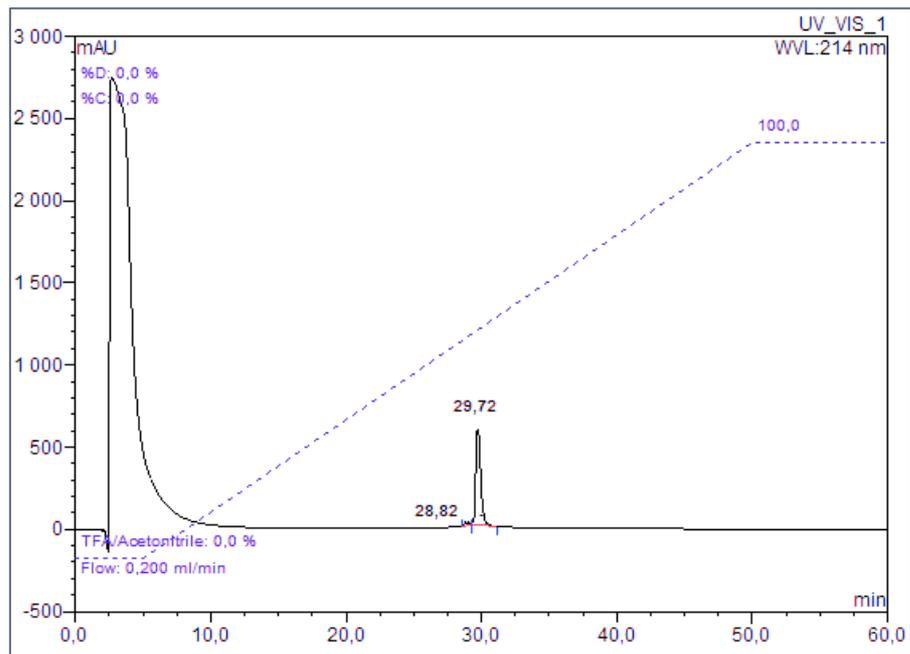


Figure A.2 : Spectre HPLC du peptide T-CTL-FRET

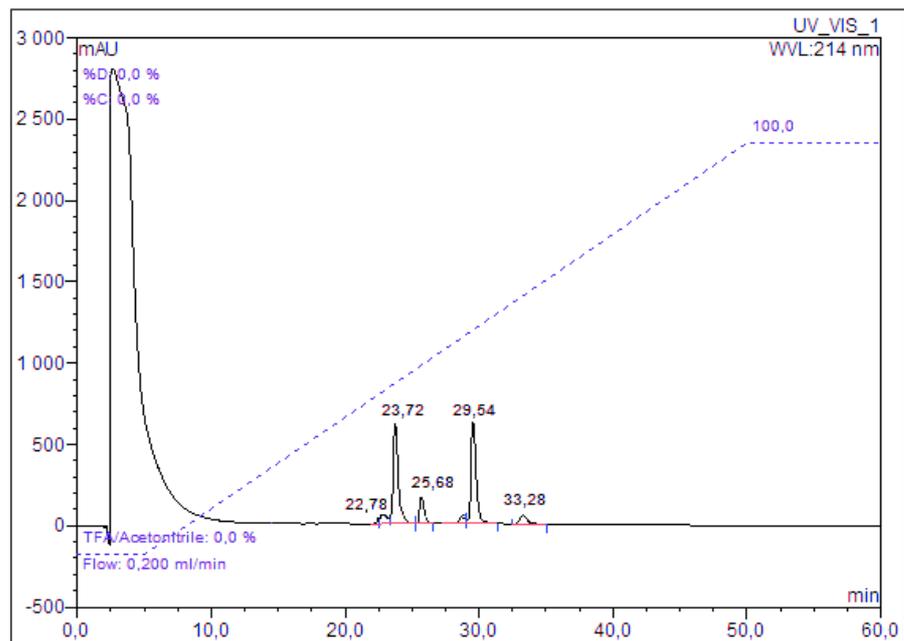


Figure A.3 : Spectre HPLC du peptide T-CTL-FRET en présence de l'enzyme endoprotéinase Glu-C

Chapitre 4 : Revêtements à base de polypeptides

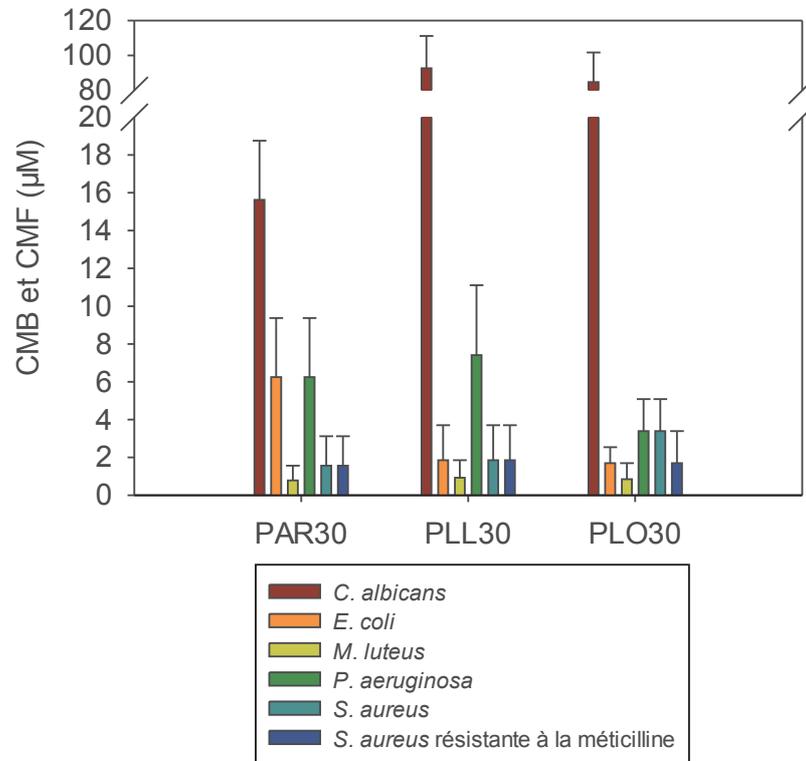


Figure A.4 : Concentration minimale bactéricide ou fongicide (en µM) de la PAR30, PLL30 et PLO30 en fonction de la souche utilisée.

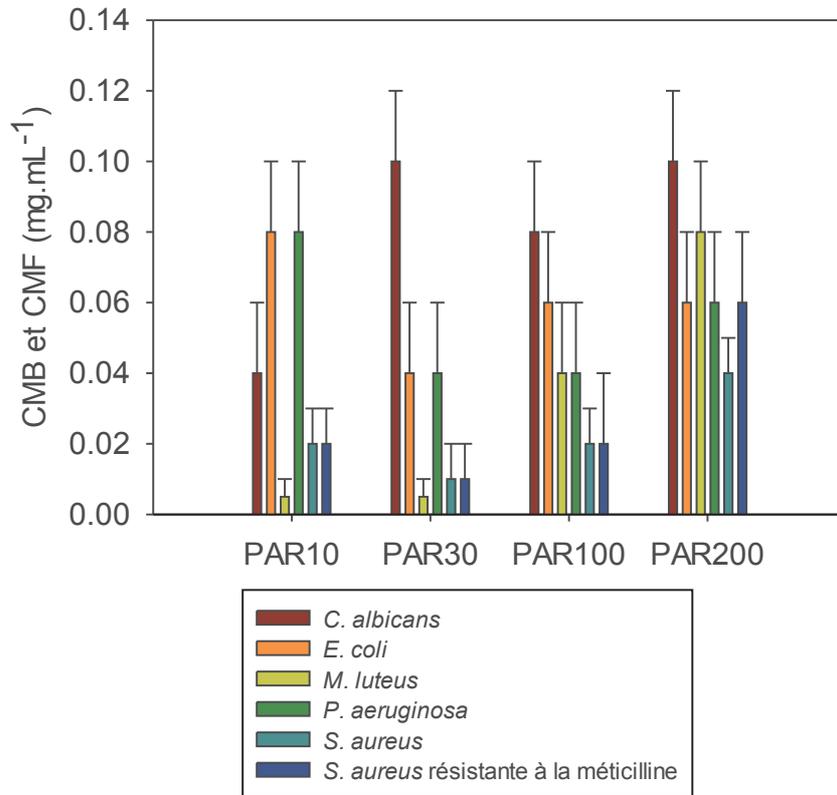


Figure A.5 : Concentration minimale bactéricide et fongicide (en mg.mL⁻¹) de la PAR 10, 30, 100 et 200 en fonction de chaque souche utilisée.

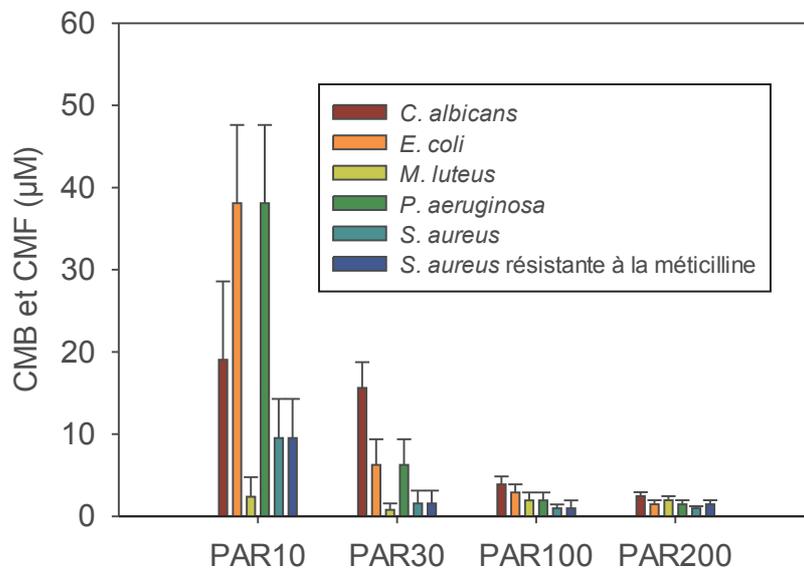


Figure A.6 : Concentration minimale bactéricide et fongicide (en μM) de la PAR 10, 30, 100 et 250 en fonction de chaque souche utilisée.

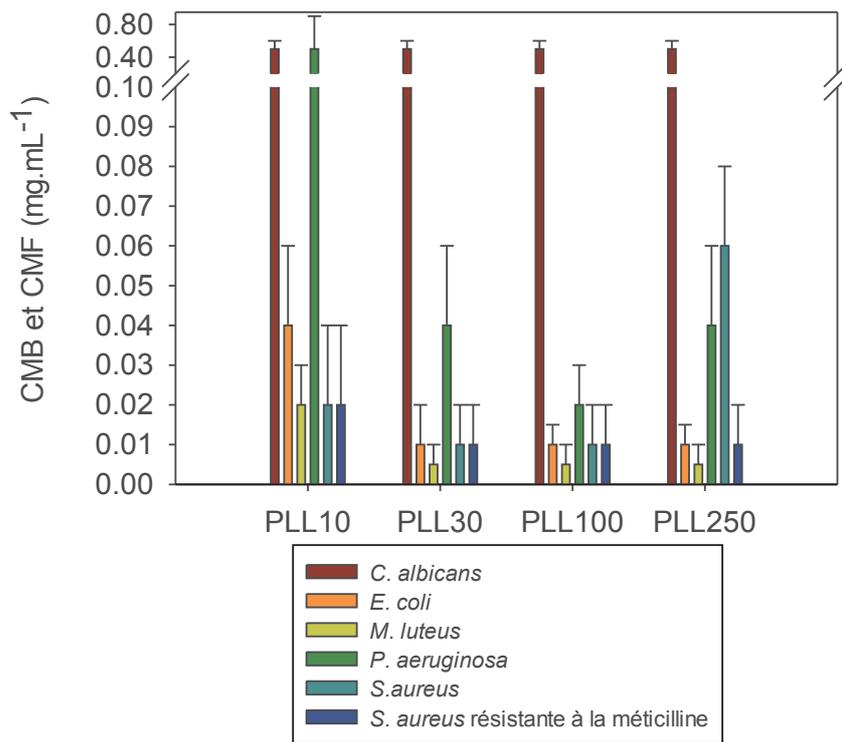


Figure A.7 : Concentration minimale bactéricide et fongicide (en mg.mL^{-1}) de la PLL10, 30, 100 et 250 en fonction de chaque souche utilisée.

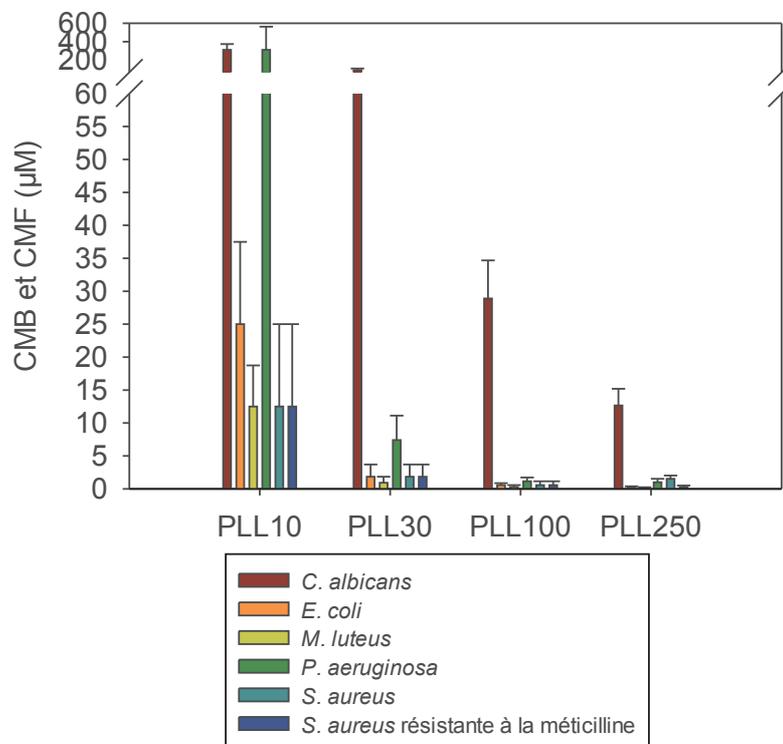


Figure A.8 : Concentration minimale bactéricide et fongicide (en μM) de la PLL10, 30, 100 et 250 en fonction de chaque souche utilisée.

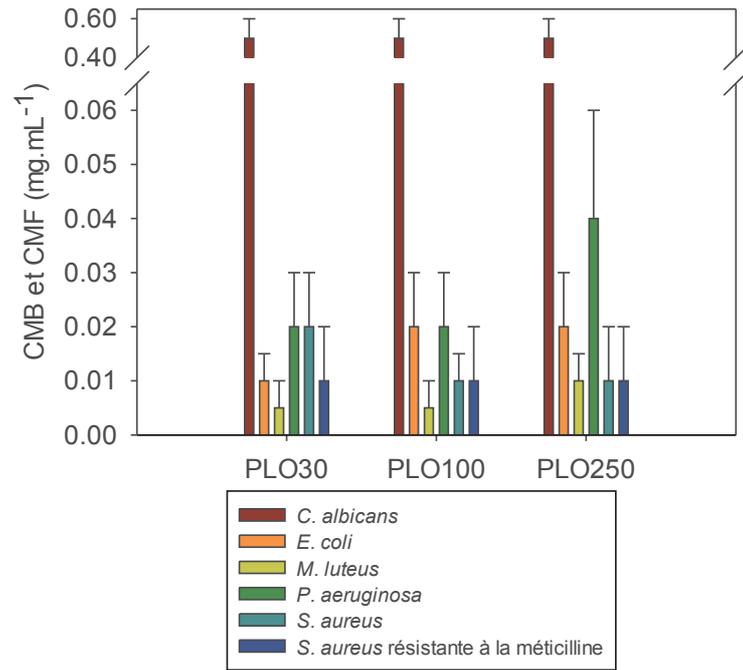


Figure A.9 : Concentration minimale bactéricide et fongicide (en mg.mL⁻¹) de la PLO 30, 100 et 250 en fonction de chaque souche utilisée.

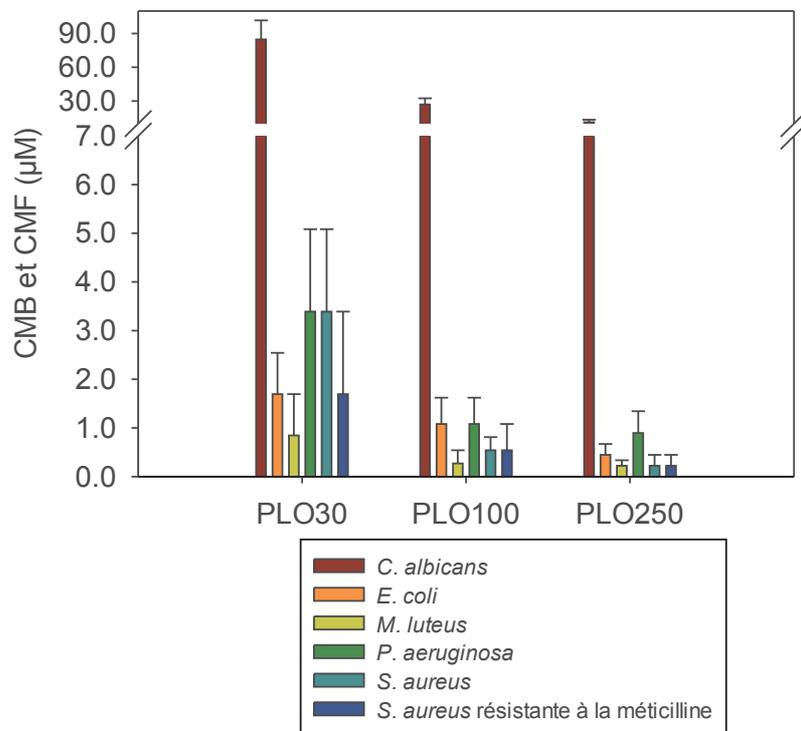


Figure A.10 : Concentration minimale bactéricide et fongicide (en μM) de la PLO 30, 100 et 250 en fonction de chaque souche utilisée.

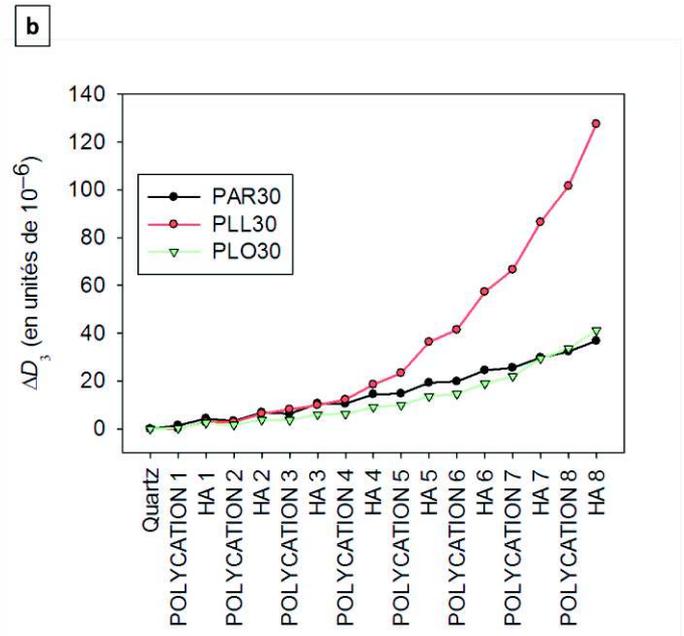
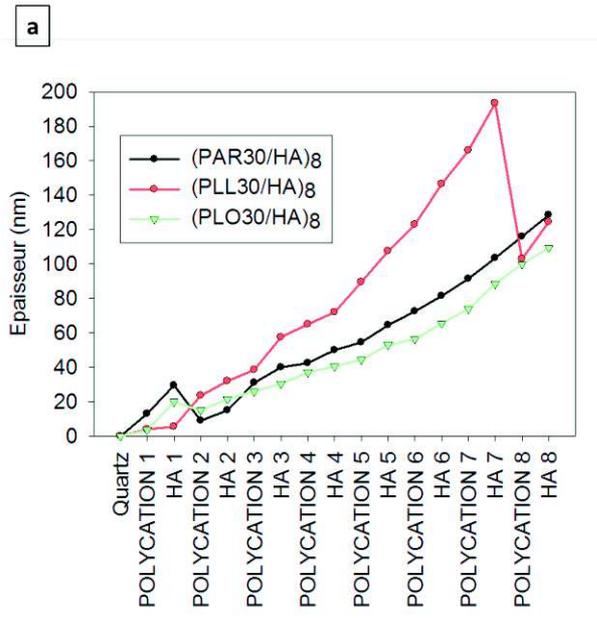


Figure A.11 : a) Variation de l'épaisseur calculée à partir de la variation de la fréquence normalisée $\frac{\Delta f_v}{\nu}$ et de la dissipation ΔD_v obtenus par QCM-D pour les films (polycations / HA) avec polycations : PAR, PLL ou PLO. b) Variation de la dissipation ΔD_v (avec $\nu = 3$) obtenus par QCM-D pour les films (polycations / HA) avec polycations : PAR, PLL ou PLO

Résumé

De nos jours, la moitié des infections nosocomiales sont liées à la pose de dispositifs médicaux. Dans ce contexte, nous avons développé deux types de revêtements antimicrobiens adaptés au domaine biomédical. Le premier s'appuie sur le greffage d'un peptide comprenant une séquence d'accroche, une séquence antimicrobienne et un site de clivage spécifique d'un pathogène. La séquence antimicrobienne sera alors libérée uniquement en présence du pathogène. Malgré la réussite de l'accroche du peptide, certains paramètres restent encore à optimiser afin d'obtenir un effet antimicrobien. Le deuxième revêtement s'appuie sur la conception d'un film antimicrobien « couche-par-couche » avec l'utilisation de poly(L-arginine) (PAR) et d'acide hyaluronique (HA). L'influence de la taille des chaînes de PAR a été étudiée et seul le film construit à partir de PAR de 30 résidus possède un effet antibactérien. Avec cette PAR, nous avons démontré que HA est le seul polyanion conduisant à des propriétés antibactériennes. Ces propriétés antimicrobiennes sont maintenues lorsque d'autres homopolypeptides cationiques sont associés à HA.

Mots clés : revêtement, film, antimicrobien, antibactérien, peptide, médical, infection, clivage, pathogène, arginine, acide hyaluronique

Abstract

Nowadays, about half of hospital-acquired infections are due to medical devices implantation. In this context, we have developed two types of antimicrobial coatings adapted to the biomedical field. The first one is based on peptide composed of an anchoring sequence, an antimicrobial sequence and a pathogen-specific cleavage site and grafted on the substrate. The antimicrobial site will be released only in the presence of the pathogen through the use of the cleavage site. Despite of the success of peptide grafting, some parameters must be optimized in order to obtain an antimicrobial effect. The second antimicrobial coating concept is based on the layer-by-layer technique by using poly(L-arginine) (PAR) and hyaluronic acid (HA). The effect of the size of PAR chains on the antimicrobial character of the coating was investigated and it is proven that only films composed with PAR of 30 residues present an antibacterial effect. Moreover HA is the only polyanion leading to such antimicrobial multilayer. It is also demonstrated that this antimicrobial properties is maintained when other cationic homopolypeptides are used in association with HA in layer-by-layer films.

Keywords: coating, film, antimicrobial, antibacterial, peptide, medical, infection, cleavage, pathogen, arginine, hyaluronic acid