

**ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET CHIMIE-PHYSIQUE**

Laboratoire Inserm / Université de Strasbourg,  
BioMatériaux et BioIngénierie UMR\_S 1121

**THÈSE** présentée par :

**Lorène TALLET**

soutenue le : 19 septembre 2019

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

Discipline/ Spécialité : Biomateriaux / Chimie-Physique

**Revêtement antibactérien intelligent à  
base de polyarginine et d'acide  
hyaluronique pour des applications  
biomédicales**

**THÈSE dirigée par :**

**M. LAVALLE Philippe**

Directeur de Recherche, Inserm / Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme. AUZELY Rachel**

**M. JOUENNE Thierry**

Professeur à l'Université Grenoble Alpes / CERMAV

Directeur de Recherche, PBS / Université de Rouen

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. FRANCIUS Grégory**

**Mme BOULMEDAIS Fouzia**

Directeur de Recherche, LCPME / Université de Lorraine, Nancy

Directeur de Recherche, ICS / Université de Strasbourg



*« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre »*

**Marie Curie**





# REMERCIEMENTS

Le résultat de ces trois années de thèse est loin d'être le fruit d'un travail solitaire. Je souhaite remercier ici toutes les personnes qui ont contribué à la réussite de ce projet.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Philippe Lavallo qui m'a donné l'opportunité d'intégrer le laboratoire pour mon stage de Master 2 et de poursuivre en thèse. Mon parcours de microbiologiste ne t'a pas effrayé et tu as su m'apprendre énormément pour toute la partie physico-chimie. Philippe, merci pour tout ce que tu m'as appris, pour ta confiance et ton soutien.

Je tiens également à remercier le directeur du laboratoire, Pierre Schaaf, qui s'est impliqué dans le projet et qui a su nous redonner espoir dans les moments de doute. Merci pour cette aide qui a été si précieuse et pour les expériences de la dernière chance qui ont permis à ce projet d'évoluer ainsi.

Je voudrais également remercier chaleureusement les membres du jury Rachel Auzely, Thierry Jouenne, Grégory Francius et Fouzia Boulmedais. Merci d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse et merci pour la discussion enrichissante lors de ma soutenance.

Je voudrais remercier les membres du labo 3Bio (UMR 7199) avec qui j'ai pu collaborer. Merci à toi, Benoit Frisch pour m'avoir apporté ton expertise de chimiste et de t'être rendu disponible pour la modification de mes PAR. Merci également à Marcella Di Giorgi pour m'avoir donné la possibilité de participer à ton projet sur les CoPECs et pour ta gentillesse et ton sourire. Et enfin je tiens à remercier Antoine Kichler pour la collaboration sur les foldamères. Ce fût un travail très enrichissant qui m'a une fois de plus montré l'importance de la chimie en biologie.

Un grand merci à mes collègues de l'unité 1121 pour l'accueil chaleureux et leur gentillesse. Merci à Bernard, Vincent, Florent, Engin, Marie-Hélène et Dominique pour votre dévouement et votre passion pour la Science que vous transmettez toujours avec joie. Merci à Émilie, qui a effectué son stage au sein du laboratoire, pour son professionnalisme et son efficacité au travail. Merci à Éric pour la formation au

microscope électronique à balayage et surtout pour ta patience et tes conseils pour l'optimisation du protocole de séchage/fixation. Merci à Angela qui m'a encadrée à mon arrivée dans le laboratoire. Enfin, merci à tous, Céline, Hélène, Julien, Sarah, Annie, Christine, Géraldine, Ludivine, Morgane, Sophie, Naji, François, Gaëtan, Lisa, Salima, Eya, Sébastien, Léa, Estéban, Claire, Leyla, Annabelle, Cosette, Eminé pour ces trois années passées à vos côtés et tous ces bons moments (sportifs, culinaires, scientifiques) que l'on a pu passer ensemble.

Je tiens à remercier particulièrement mes colocataires de bureau avec qui j'ai pu partager de nombreux moments et de nombreuses discussions scientifiques ou non. Merci Haseeb pour ton sourire et ta bonne humeur constante. Merci Cyril pour ces discussions et pour tes blagues qui donnent le sourire. Merci Varvara pour le partage de ton expérience et pour ta bonne humeur (surtout tous les nombreux gadgets que tu apportes). Enfin, j'adresse mon plus grand merci à Cynthia et Manon qui sont devenues des amies et sur qui j'ai toujours pu compter. Malheureusement nous avons perdu les crevettes en chemin mais ne t'inquiète pas Manon, avec Cynthia nous avons pris soin des deux derniers poissons ! Vous avez été toutes les deux des personnes très précieuses et je ne vous en remercierais jamais assez. Merci pour tout !

Merci à tous ceux présents le vendredi 20 septembre 2019, lendemain de la soutenance, pour cette soirée inoubliable : Benjamin, Charline, Mélissa, Charly, Anthony, Robin, Morgane, Ludivine, Céline, Géraldine, Manon, Cynthia.

Pour finir, je souhaiterais remercier ceux qui me soutiennent depuis le début. Merci à mes parents de m'avoir permis de faire ces longues études et de m'avoir sans cesse poussée et soutenue. Merci à mes grands-parents de m'avoir réconfortée et encouragée jusqu'au jour de la soutenance. J'ai également une pensée pour mes autres grands-parents qui je suis sûr auraient été fiers de moi. Merci à ma sœur Alizée, Aurélien, à mon neveu Raphaël et ma filleule Agathe de me changer les idées à chaque coup de téléphone ou chaque vacances. J'aimerais également remercier Nico, celui qui m'a accompagné et surtout qui m'a supportée pendant mes pics de stress. D'un calme irréprochable, tu as su me tempérer et m'encourager tout au long de la thèse. Merci à tous pour votre soutien sans faille, c'est grâce à vous si j'en suis là.



# TABLE DES MATIERES

<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des publications et brevets .....</b>	<b>15</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>17</b>
Bibliographie .....	19
<b>Chapitre 1. Revue bibliographique : les biomatériaux antimicrobiens intelligents.....</b>	<b>21</b>
1.1. Introduction.....	25
1.2. Hydrogels.....	28
1.2.1. pH-responsive.....	28
1.1.1. Enzyme-triggered.....	35
1.2. Nanoparticles .....	37
1.2.1. pH-responsive.....	37
1.2.2. Enzyme-triggered.....	39
1.3. Thin films .....	43
1.3.1. pH-responsive.....	43
2.1.1. Enzyme-triggered.....	47
1.3. Conclusion et perspectives.....	50
Bibliographie .....	52
<b>Chapitre 2. Matériel et méthodes .....</b>	<b>59</b>
2.1. Matériel.....	63
2.1.1. Polyélectrolytes utilisés pour la construction des films.....	63
2.1.2. Composés pour la fabrication du polymère clivable.....	63

2.1.3. Solutions tampons.....	64
2.1.4. Oxydant.....	65
2.1.5. Enzyme.....	65
2.1.6. Agents fixateurs .....	65
2.2. Construction des films multicouches de polyélectrolytes .....	65
2.2.1. Nettoyage du substrat .....	65
2.2.2. Construction des films multicouches.....	66
2.2.3. Les solutions utilisées.....	67
2.3. Tests biologiques.....	67
2.3.1. Tests cellulaires.....	67
2.3.2. Tests microbiologiques.....	70
2.4. Microbalance à cristal de quartz (QCM) .....	77
2.4.1. Principe de la technique .....	77
2.4.2. Principe de la microbalance à cristal de quartz avec dissipation (QCM-D) .....	80
2.4.3. Dispositif expérimental.....	81
2.5. Spectroscopie UV-visible .....	82
2.6. Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes.....	83
2.6.1. Principe.....	83
2.6.2. Conditions au transfert d'énergie.....	83
2.6.3. Matériel.....	85
2.6.4. Mesure du FRET .....	86
2.7. Microscopie à épifluorescence .....	88
2.7.1. Principe de la fluorescence .....	88
2.7.2. Principe de la technique .....	89
2.7.3. Utilisation.....	89
2.8. Microscopie confocale à balayage laser.....	90

2.8.1. Principe de la technique .....	90
2.8.2. Utilisation.....	92
<b>2.9. Microscopie électronique à balayage .....</b>	<b>95</b>
2.9.1. Principe de la technique .....	95
2.9.2. Utilisation.....	96
Bibliographie .....	97
<b>Chapitre 3. Films multicouches à base de poly(arginine) et d'acide hyaluronique .....</b>	<b>99</b>
3.1. Introduction.....	103
3.1.1. Les films multicouches .....	103
3.1.2. Choix des composants .....	104
3.2. Article .....	108
3.2.1. Abstract.....	108
3.2.2. Introduction.....	109
3.2.3. Materials and methods.....	111
3.2.4. Results and discussion .....	117
3.2.5. Conclusion .....	131
Bibliographie .....	132
<b>Chapitre 4. Revêtement antibactérien intelligent avec système de clivage auto-induit par les pathogènes.....</b>	<b>137</b>
4.1. Introduction.....	141
4.1.1. La protéase V8 .....	142
4.1.2. La séquence clivable.....	143
4.2. Smart antimicrobial enzyme responsive surfaces: towards theranostic antimicrobial coatings .....	145
4.2.1. Abstract.....	145

4.2.2. Introduction.....	145
4.2.3. Experimental Section.....	150
4.2.4. Results.....	155
4.2.5. Conclusion .....	168
<b>4.3. Résultats complémentaires .....</b>	<b>169</b>
4.3.1. Activité antibactérienne sur 24h.....	169
4.3.2. Étude du clivage en solution.....	170
4.3.3. Autres constructions du polymère tribloc.....	176
4.4. Conclusion .....	180
Bibliographie .....	182
<b>Chapitre 5. Conception de foldamères antimicrobiens et antifongiques</b> .....	<b>185</b>
5.1. Introduction.....	189
5.2. Design of potent antimicrobial and antifungal oligourea-based foldamers.....	190
5.2.1. Introduction.....	190
5.2.2. Materials and methods.....	191
5.2.3. Results and Discussion.....	194
5.3. Conclusion .....	205
Bibliographie .....	206
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>209</b>





# LISTE DES ABREVIATION

<b>5(6)-FAM</b>	5(6)-carboxyfluorésceine
<b><i>A. fumigatus</i></b>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<b>AA</b>	Acide aminé
<b>AAc</b>	acrylic acid ; acide acrylique
<b>AgNP</b>	silver nanoparticles ; nanoparticule d'argent
<b>AMP</b>	antimicrobial peptide
<b>APTES</b>	aminopropyltriethoxysilane
<b>ATA</b>	adamantyl-core tetrakisaldehyde
<b>BPQDs</b>	Black phosphorous quantum dots
<b><i>C. albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i>
<b>CD</b>	circular dichroism ; dichroïsme circulaire
<b>CDC</b>	Disease Control and Prevention
<b>CFU</b>	colony-forming unit ; unité formant colonie
<b>CH</b>	chitosan
<b>CIP</b>	ciprofloxacin
<b>CLP</b>	chymotrypsin-like protease
<b>CMB</b>	concentration miniale bactéricide
<b>CMI</b>	concentration miniale inhibitrice
<b>CMS</b>	Chymotrypsin
<b>CPP</b>	cell-penetrating peptide
<b>CTC</b>	5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride
<b>DABCYL</b>	acide 4-((4-(diméthylamino)phényl)azo)benzoïque
<b>Dex-CHO</b>	dextran aldehyde
<b>DMEMHg</b>	Dulbecco's Modified Eagle's medium High Glucose
<b>DMSO</b>	dimethyl sulfoxide
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid ; acide désoxyribonucléique
<b>DO</b>	Densité optique
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDANS</b>	5-((2-aminoéthyl)amino)naphthalène-1-sulfonique
<b>FITC</b>	isothiocyanate de fluorescéine
<b>FRAP</b>	fluorescence recovery after photobleaching ; recouvrement de fluorescence après photoblanchiment
<b>FRET</b>	fluorescence Resonance Energy Transfer ; transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
<b>GluC</b>	glutamyl endopeptidase V8
<b>GS</b>	Gentamicin sulfate
<b>HA</b>	hyaluronic acid ; acide hyaluronique

<b>HAase</b>	Hyaluronidase
<b>HMDS</b>	hexamethyldisilazane
<b>LbL</b>	layer-by-layer ; couche par couche
<b><i>M. luteus</i></b>	<i>Micrococcus luteus</i>
<b>MEB</b>	microscopie électronique à balayage
<b>MHB</b>	Mueller Hinton Broth
<b>MIC</b>	minimal inhibitory concentration
<b>MMT</b>	montmorillonite
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
<b>MSNs</b>	mesoporous silica nanoparticles
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
<b>NaCl</b>	chlorure de sodium
<b>NC</b>	nanocomposite
<b>NF</b>	nanofibers
<b>NMR</b>	nuclear magnetic resonance
<b>NP</b>	nanoparticule
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PAA</b>	poly (acrylic acid)
<b>PAM</b>	peptide antimicrobien
<b>PAR</b>	poly(L-arginine)
<b>PAR-FITC</b>	poly(L-arginine) marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine
<b>PBS</b>	tampon phosphate salin
<b>PCL</b>	poly( $\epsilon$ -caprolactone)
<b>PDA</b>	polydiacetylene
<b>PDop</b>	polydopamine
<b>PEEK</b>	polyetheretherketone
<b>PEG</b>	polyethylene glycol
<b>PEI</b>	polyethylenimine
<b>PFA</b>	paraformaldéhyde
<b>PLGA</b>	poly(lactide-glycolide acid)
<b>PLL</b>	poly(L-lysine)
<b>PMAA</b>	poly(methacrylic acid)
<b>PONI-GAT</b>	tetraethylene glycol monomethyl ether groups
<b>PVA</b>	poly (vinyl alcohol)
<b>PVCL</b>	poly(vinyl caprolactam)
<b>QCM-D</b>	microbalance à cristal de quartz avec dissipation
<b>QS</b>	quorum-sensing
<b>RMN</b>	résonance magnétique nucléaire

<b>ROI</b>	region of interest
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SAB</b>	Sabouraud Dextrose Broth
<b>SEM</b>	scanning electronic microscopy
<b>Sr</b>	swelling ratio
<b>SVF</b>	sérum de veau foetal
<b>TA</b>	tannic acid ; acide tannique
<b>TCA</b>	triclosan
<b>TCEP</b>	tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
<b>TOB</b>	tobramycin
<b>TP</b>	thiopyridone
<b>TRIS</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethane
<b>Van</b>	vancomycin
<b>WHO</b>	World Health Organization



# LISTE DES PUBLICATIONS ET BREVETS

- 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. Chem. Mater. 2016, 28, 8700–8709.

- Brevet européen déposé le 02/11/2017 ; Demande internationale PCT/EP2018/080033 le 02/11/2018 (Univ. Strasbourg / Inserm Protip, / SATT Conectus) **L. Tallet**, C. Calligaro, E. Vrana, P. Lavalle, Crosslinkable polypeptide and hyaluronic acid coatings EP17306513.7.

- Brevet européen déposé le 02/05/2019 (Univ. Strasbourg / Inserm Protip, / SATT Conectus) V. Gribova, **L. Tallet**, C. Calligaro, E. Vrana, P. Lavalle, Hyaluronic acid hydrogels with prolonged antimicrobial activity EP19305562.1.



# INTRODUCTION GENERALE

L'utilisation de dispositifs médicaux implantables pour des applications temporaires ou permanentes est devenue une pratique courante dans presque tous les domaines de la médecine. Cependant, les corps étrangers sont associés à un risque important d'infections bactériennes. Les infections associées aux dispositifs médicaux sont responsables d'environ la moitié des infections nosocomiales.<sup>1</sup> Les principaux facteurs à l'origine de la récente augmentation du nombre d'infections liées aux dispositifs médicaux pourraient être attribués à i) l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques ; ii) vieillissement de la population ; iii) le manque de nouvelles molécules antibiotiques ; iv) l'élargissement du groupe de personnes portant des implants. Par exemple, dans le cas des implants dentaires, les diabétiques et les fumeurs sont désormais pris en compte. Il est donc reconnu que les infections liées à des dispositifs médicaux entraînent une morbidité substantielle et une forte augmentation des coûts de soins de santé.<sup>2-5</sup>

Les dispositifs médicaux, tels que les implants, les cathéters, les canules... constituent un support idéal pour la prolifération des bactéries. De façon générale, les bactéries préfèrent vivre associées à une surface plutôt que de manière libre dans le milieu.<sup>6</sup> La première raison à cela est qu'attachée à une surface, la bactérie va pouvoir initier la formation d'un biofilm et se protéger de l'environnement extérieur. Dans le biofilm, la bactérie est intégrée au sein d'une matrice extracellulaire dans laquelle elle est protégée contre les agressions externes telles que les agents antimicrobiens ou encore le système immunitaire de l'hôte. Comparée à une bactérie planctonique, une bactérie associée à un biofilm peut être jusqu'à 1000 fois plus résistante aux agents antimicrobiens.<sup>7</sup>

De nouvelles stratégies de lutte contre les agents pathogènes impliqués dans les infections associées à des implants sont devenues urgentes. Le développement de revêtements à la surface de ces dispositifs constitue un moyen potentiel de résoudre ces complications. Les revêtements à base d'argent ou d'antibiotiques n'ont probablement plus d'avenir dans le domaine des dispositifs médicaux pour le risque de toxicité<sup>8,9</sup> et l'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques.<sup>10</sup>

De nombreuses stratégies de développement de tels revêtements sont apparues et consistent, la plupart du temps, en la constitution d'une matrice polymère dans laquelle un principe actif est ajouté pour conférer l'activité antimicrobienne.<sup>11,12</sup> Ils consistent en une administration passive de l'agent actif, avec ou sans la présence de l'agent pathogène, pouvant ainsi entraîner la libération fortuite de la molécule antimicrobienne en l'absence de pathogène. La plupart des agents antibactériens concentrés à fortes doses étant toxiques pour les cellules de mammifères, le contrôle de leur libération est essentiel pour concevoir un revêtement antibactérien limitant les effets secondaires.

Les travaux présentés dans cette thèse consistent à élaborer un revêtement antibactérien dont l'activité antibactérienne est déclenchée uniquement en présence de l'agent pathogène.

Le manuscrit se divise en cinq chapitres. Le premier chapitre présente l'état de l'art des revêtements antimicrobiens sensibles à des stimuli biologiques tels que le pH et la présence d'enzymes extracellulaires. Le deuxième chapitre décrit le matériel ainsi que les différentes méthodes utilisées pour l'ensemble de ces travaux de thèse. Le troisième chapitre est consacré à la présentation de la première génération de revêtements à base de poly(arginine) (PAR) et d'acide hyaluronique (HA). Pour ensuite, présenter dans le chapitre 4, la deuxième génération de revêtements PAR/HA dont l'activité antibactérienne est auto-induite par les pathogènes. Enfin, dans le chapitre 5, je présenterai les recherches qui ont été réalisées pour trouver de nouvelles molécules antimicrobiennes pouvant, par la suite, être intégrées dans les films multicouches construits au laboratoire. Je conclurai sur ces travaux ainsi que sur les perspectives qu'ils ouvrent.



## BIBLIOGRAPHIE

- 1 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* **6**, Doc18, (2011).
- 2 Gradinger, R., Graf, R., Grifka, J. & Löhr, J. Das infizierte implantat. *Der Orthopäde* **3**, 257-269, (2008).
- 3 Hellmann, M., Mehta, S. D., Bishai, D. M., Mears, S. C. & Zenilman, J. M. The estimated magnitude and direct hospital costs of prosthetic joint infections in the United States, 1997 to 2004. *Journal of Arthroplasty* **25**, 766-771.e761, (2010).
- 4 Sampedro, M. F. & Patel, R. Infections associated with long-term prosthetic devices. *Infectious disease clinics of North America* **21**, 785-819, (2007).
- 5 Tokarczyk, A. J., Greenberg, S. B. & Vender, J. S. Death, dollars, and diligence: prevention of catheter-related bloodstream infections must persist! *Critical Care Medicine* **37**, 2320-2321, (2009).
- 6 Filloux, A. & Vallet, I. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *médecine/sciences (Paris)* **19**, 77-83, (2003).
- 7 Mukherji, R., Patil, A. & Prabhune, A. Role of Extracellular Proteases in Biofilm Disruption of Gram Positive Bacteria with Special Emphasis on Staphylococcus aureus Biofilms. *Enzyme Engineering* **4**, (2015).
- 8 AshaRani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P. & Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **3**, 279-290, (2009).
- 9 Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J. J. & Hofmann, M. C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences* **88**, 412-419, (2005).
- 10 Annual report of the European Antimicrobial Resistance - Surveillance Network (EARS-Net) 2017. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).
- 11 Pavlukhina, S. *et al.* Small-molecule-hosting nanocomposite films with multiple bacteria-triggered responses. *Npg Asia Materials* **6**, e121, (2014).
- 12 Min, J. *et al.* Designer Dual Therapy Nanolayered Implant Coatings Eradicate Biofilms and Accelerate Bone Tissue Repair. *ACS Nano* **10**, 4441-4450, (2016).



**Chapitre 1. Revue  
bibliographique : les  
biomatériaux antimicrobiens  
intelligents**



## SOMMAIRE

<b>Chapitre 1. Revue bibliographique : les revêtements antimicrobiens intelligents.....</b>	<b>21</b>
1.1. Introduction.....	25
1.2. Hydrogels.....	28
1.2.1. pH-responsive.....	28
1.1.1. Enzyme-triggered.....	35
1.2. Nanoparticles .....	37
1.2.1. pH-responsive.....	37
1.2.2. Enzyme-triggered.....	39
1.3. Thin films .....	43
1.3.1. pH-responsive.....	43
1.3.2. Enzyme-triggered.....	47
1.3. Conclusion et perspectives.....	50
Bibliographie .....	52



## 1.1. Introduction

In recent years, there was an increase in antibiotic-resistant bacteria <sup>1</sup> and a decline in the rate of new antibiotic development.<sup>2</sup> The World Health Organization (WHO) has declared antibiotic resistance as one of the biggest threats to humanity. In the United States, the Center for Disease Control and Prevention (CDC) has estimated that two million patients a year suffer from infections due to drug-resistant bacteria.<sup>3</sup> If this trend continues to evolve, it is estimated that in 2050 there will be 10 million deaths worldwide and cost up to \$100 trillion.<sup>4</sup> Moreover, antibiotic resistance has spread worldwide. In high-income countries, antibiotics are used excessively in hospitals but also in food industry. The latter contributed to the selection pressure that maintained resistant strains, forcing to switch to more expensive and broad-spectrum antibiotics. In low- and middle-income countries, the use of antibiotics increases with rising incomes, high hospitalization rates, and high prevalence of hospital infections.<sup>5</sup>

Over the past 50 year, the use of biomaterials and medical devices such as catheters, joint implants and contact lenses, is more and more common. The causes of this increase are the aging of the population and advances in materials technology. The surface of such devices is conducive to bacterial adhesion and biofilm formation.<sup>6</sup> If bacteria succeed in adhering to the device, bacterial biofilm will form. According to the US National Institutes of Health, biofilms accounting for over 80% of microbial infection in the body.<sup>7</sup> Once the biofilm is in place, the treatment of the infection becomes compromised. Indeed, the extracellular polymeric substance synthesized by bacteria provides a physical protection by restricting the transport of compound, including biocidal agents, through the biofilm.<sup>8</sup> Furthermore, some bacteria exist in a slow-growing or starved state with severely altered metabolic activity which reduce their sensitivity to treatment with antibiotics.<sup>9,10</sup> To eradicate a biofilm, it is sometimes necessary to increase a thousand times the dose of antibiotic compared to that needed to eradicate planktonic bacteria.<sup>11</sup> The administration of an antibiotic treatment is rarely localized, most of the time patients are treated with intravenous injections or by oral intake,<sup>10,12</sup> which causes selection pressure in the whole body and not only at the infection point. In addition, the drugs can be partially degraded before reaching the infected site, which reduces their effectiveness.<sup>13,14</sup> Thus, a repeated or higher dose of the drug is needed for effective treatment of bacterial infections. Moreover, special attention has been given recently to the design of coatings aimed at

reducing or even eliminating infections on the surface of medical devices. Several strategies have emerged including contact-killing, adhesion resistance and release-killing. The final aim in infection treatments is to administer locally high dose of antibiotics around infection sites.

In the development of antibacterial coatings and materials, research efforts have focused on the local administration of antibiotics.<sup>12,15,16</sup> Most of these coatings have a similar release profile that can be split into two phases: a phase with a rapid release of antibiotics and a second phase with a slower release often over a few days. Their antibacterial efficacy has been demonstrated many times; however, the release of antibacterial agents occurs whether or not there is an infection. Furthermore, an excessive release of antibiotic in a given area may facilitate the development of resistant bacterium strains but also can cause cytotoxicity and damages on tissues. Therefore, smart antibacterial systems with targeting and responsiveness to the microenvironment of bacterial infections have been increasingly studied in recent years with the aim to fight against medical devices-associated infections and drug resistance (**figure 1.1**). The ability to control the release of antibiotics in response to an infection allows for better efficacy of antibacterial treatment by increasing the local drug concentration in the infectious site. This antibacterial strategy makes it possible to limit the accumulation of drug in healthy host tissues, minimizing the risks of toxicity and collateral damages to the commensal microflora that can promote the development of resistance.<sup>17</sup>

Smart antibacterial coatings can be classified into two groups: those that respond to non-biological stimuli and those that respond to biological stimuli. The first class of coatings combines light,<sup>18-23</sup> temperature,<sup>24-31</sup> electric and magnetic fields<sup>32,33</sup> as stimuli. The release of antibacterial molecules is induced by an external event such as an irradiation or the application of an electric or magnetic field. For example, Zhang and co-workers<sup>34</sup> developed a photon-controlled antibacterial platform for skin infections that efficiently kill resistant bacteria. For this, they encapsulate black phosphorous quantum dots (BPQDs) inside a thermal-sensitive liposome. Drug encapsulating inside liposomes can release in a spatial-, temporal- and dose-controlled fashion with the disruption of liposomes under near-infrared light stimulation of BPQDs. By combining photothermal effect of BPQDs with pharmaco-therapy, this antibacterial system achieved a synergistic antibacterial effect.



The second class of coatings includes those that respond to an internal stimulus, directly related to the presence of bacteria. To make this possible, the researchers relied on the differences that could exist between a healthy and an infected environment. The microenvironment of bacterial infection sites is different from that of a healthy tissue especially by the abundance of extracellular bacterial enzymes and by the pH variations induced by the enzymes. Bacteria release several enzymes during their proliferation: hyaluronidases (HAase), chymotrypsin (CMS), lipases, metalloproteinase, etc.<sup>35-37</sup> Hyaluronidases are the most largely used in enzyme-triggered system, they are capable to cleave hyaluronate but also chondroitin sulfate which are interesting ingredient for coating formulation as they are biocompatible.<sup>36</sup> *Staphylococcus aureus*, gram-positive bacteria which are the most usual and versatile from all human pathogens, secrete four major extracellular protease: a metalloproteinase, a serine glutamyl endopeptidase and two related cysteine proteinase.<sup>37</sup> On a smaller scale, they also produce hyaluronidase.<sup>38</sup> The extracellular proteins produced by bacteria are varied and should allow the buildup of enzyme-triggered antibacterial systems specific to a particular genus or species. The second parameter that differs from infected site to normal tissues is the pH. When a device is colonized by bacteria, the latest will form a biofilm and product metabolites. The structure of a biofilm allows anaerobic bacteria to growth in an aerobic environment and fermentation products of these bacteria generate acidification.<sup>39-41</sup> When a wound is infected, the pH of the skin (normally between 5.4-5.6) will tend to increase because underlying tissue with the body's internal pH of 7.4 becomes exposed.<sup>42</sup> Higher pH values promote a proliferation of commensal skin species and lead to alkalization of pH by production of ammonia by bacteria.<sup>43</sup> To design pH responsive systems, as a triggering stimulus, the intended application of the coating must be previously considered because the pH does not vary in the same way from one tissue to another.

Herein, we will summarize the recent research progress concerning smart drug delivery systems. We will focus on bacterial-induced systems that we have classified according to the nature of the material they concern: hydrogels, nanoparticles and thin films.

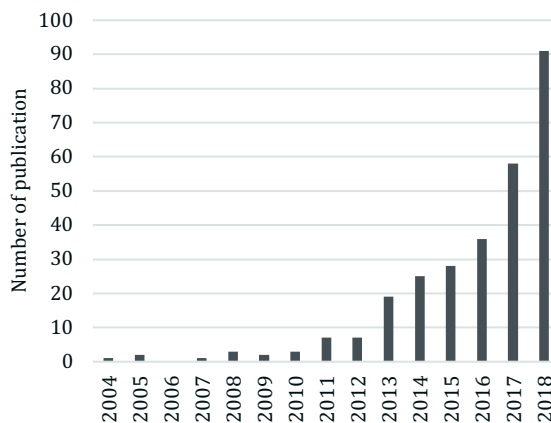


Figure 1.1: Total publications by year obtained on the basis of the following key words: "smart", "antibacterial" and "coating".

## 1.2. Hydrogels

### 1.2.1. pH-responsive

Hydrogels are three-dimensional network of hydrophilic cross-linked polymer that can respond to the fluctuations of the environmental stimuli. They possess a degree of flexibility very similar to natural tissue due to their large water content which makes them biocompatible. Hydrogels are used in various number of biomedical applications: tissue engineering, wound dressing, contact lens etc. By changing the type and composition of the monomers, the degree of crosslinking and the environment (pH, temperature), their mechanical properties can be modulated according to the intended application. Hydrogels are a versatile tool that allow in particular the loading of drugs and their release in a control manner according to the mechanical and chemical properties of the network.

Most of the antibacterial hydrogels respond to pH variations. Albright and co-workers<sup>44</sup> developed a layer-by-layer (LbL) hydrogel coatings of poly(methacrylic acid) (PMAA) and poly(vinyl caprolactam) (PVCL) loaded with an antibiotic: gentamicin. Alternating layer of PVCL and PMAA were constructed *via* spin-assisted deposition and were crosslinked *via* ethylenediamine. As shown in **Figure 2A**, after crosslinking, PVCL was removed from the LbL by slowly adjusting the pH of the solution to 8 to form PMAA hydrogel-like coating. Carboxylic groups of PMAA can act as negative charges and be used to bind positively charged antibiotics. Gentamicin was chosen as antimicrobial agent and was

loaded in the hydrogel at pH 7.5. Gentamicin release in solution was tested with various pH. When the hydrogel is immersed in a pH 7.5 solution, 70% of the drug is released in the medium. When the pH of the solution decrease, the percentage of antibiotics released increases (**Figure 2C**). This phenomenon is related to the degree of ionization of the PMAA. This result is consistent with the swelling behavior shown in **Figure 2B**. This hydrogel shows a pH-dependent release but has still a passive release at pH 7.5. PMAA derivative has also been used to encapsulate silver nanoparticles in the hydrogel matrix.<sup>45</sup> Poly(methyl methacrylate-co-methacrylic acid)/silver nanoparticles (P(MMA-co-MAA)/AgNPs) copolymer networks are made with various component ratios in order to modulate the network size and swelling behavior. This hydrogel exhibits a swelling behavior depending on the pH of the medium. Pore modulation of the network will allow to control the diffusion of the Ag<sup>+</sup> ions.

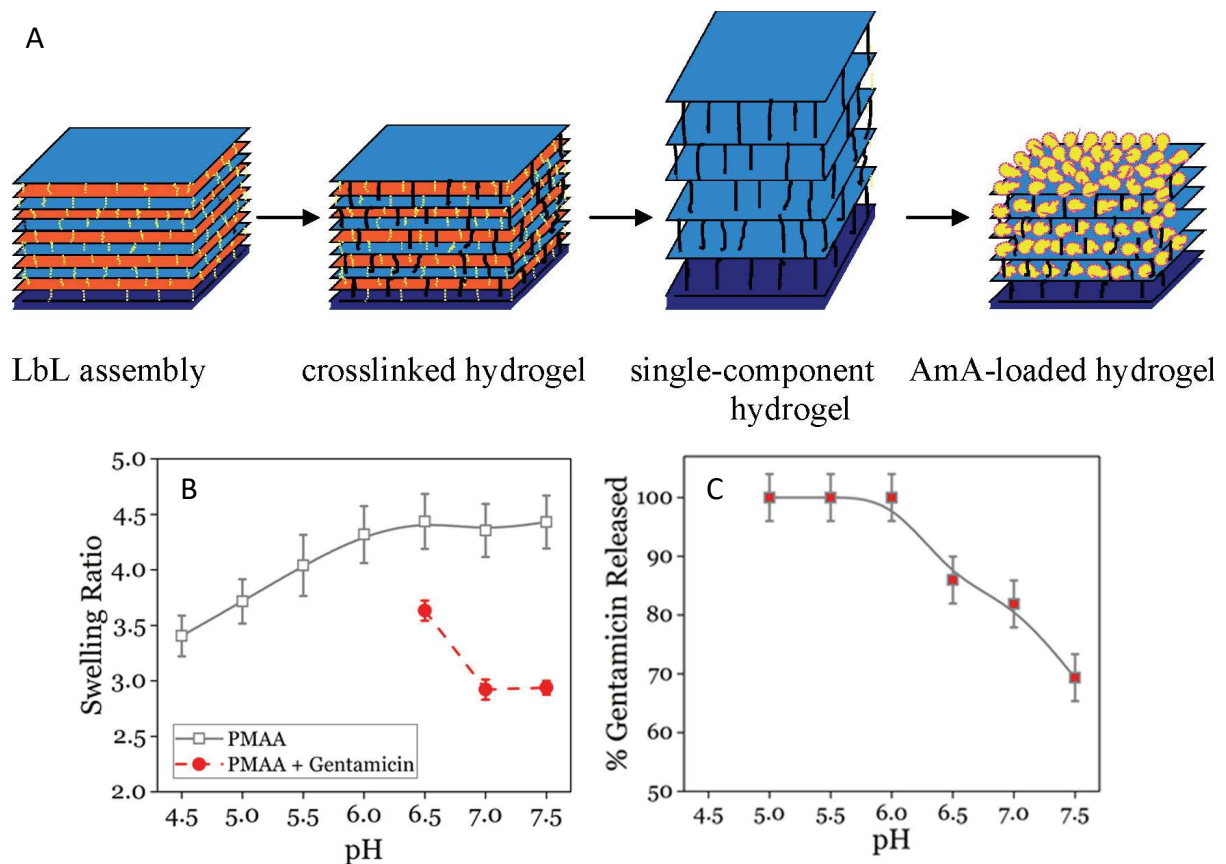


Figure 1.2: Procedure for preparation of PMAA-gentamicin loaded hydrogel (A). Copyright <sup>46</sup>. In situ ellipsometry data for the swelling ratios for unloaded and gentamicin-loaded 18-layer PMAA coatings in PBS as a function of pH (B) and percentage gentamicin released as measured by decrease in dry film thickness using ellipsometry after sequential 2 h exposures of the coatings to PBS with decreasing pH (C). Reproduced with permission.<sup>44</sup> Copyright 2017, Elsevier.

Zhou *et al.*<sup>47</sup> have also created a LbL hydrogel coating that respond to pH variation. They have built a bi-functional coating that both detects and inhibits bacterial infection by modification of the surrounding pH. This hydrogel is specifically created for urinary catheters and is composed of 3 different layers (**Figure 3**): an inner layer of hydrogel PAA (poly (acrylic acid)), a middle layer of CH (chitosan) and a pH-response layer of EudragitS100 (a commercialized co-polymer of methyl methacrylate and methacrylic acid). Polydiacetylene (PDA) vesicles encapsulating ciprofloxacin (CIP) were integrated into the PAA and chitosan hydrogel layers which were alternately deposited through electrostatic interactions by adjusting the pH values of the solution. Urease-producing species like *Proteus mirabilis* are able to hydrolyse urea leading to elevation of urinary pH. The PDA vesicle system showed a chromatic color transition from blue–purple–red visible by naked eyes, took place in acidic media (pH < 7) to alkaline media (purple pH 7–8.8, and red pH > 8.8) at physiological temperature. In addition to being able to detect the presence of an infection in the urine, this coating can also limit the bacterial infection. Indeed, when pH < 7 no CIP is released indicating that no PDA vesicles were released from the coated polymers. However, the release rate is higher for higher pH values due to the gradual diffusion of the “trigger layer” of EudragitS100 and thus causing a gradual release of PDA vesicles into the external media. This coating shows a significant reduction of the viable number *P. mirabilis* of about  $7.10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> after overnight. Unlike *P. mirabilis*, *E. coli* is a urease-negative species and used as a control species. Thus, *E. coli* is not affected by this coating, the number of viable cells increases over time. *E. coli* being a urease-negative species, does not generate alkalinisation of the medium and therefore does not degrade the EudragitS100 layer. Finally, this coating is able to specifically recognize the presence of urease-producing pathogenic bacteria in urine solution and can send a colorimetric signal and in the same time it will inhibit their proliferation.

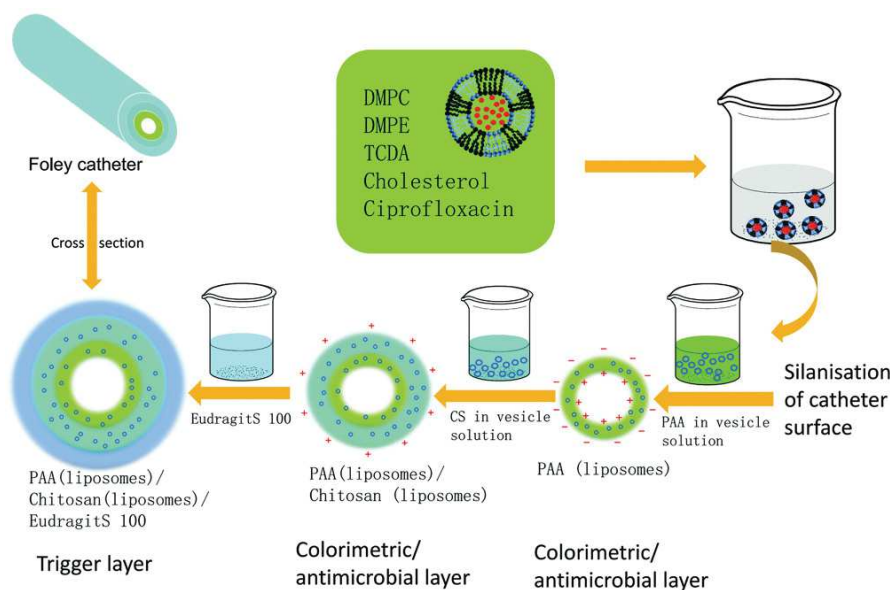


Figure 1.3: Schematic illustration of multilayer polymer on catheter surface by electrostatic self-assembly technique. PDA vesicles embedded in colorimetric layer and sealed by an outer layer of pH sensitivity. Reproduced with permission.<sup>47</sup> Copyright 2018, Wiley.

Another way to create a pH-sensitive hydrogel is to incorporate a Schiff base into the hydrogel.<sup>33,48-50</sup> The Schiff base is a compound having a C = N double bond and which is unstable at acidic pH. The advantage of integrating a Schiff base into a hydrogel is the possibility of inducing a degradation of the gel by varying the pH. The Schiff base which is formed between the —CHO of oxidized dextran and the —NH<sub>2</sub> of chitosan allows the formation of a hydrogel.<sup>33</sup> This hydrogel can be loaded with antibacterial agents such as amoxicillin by mixing them with the two other components before gelation. In this example, the antibacterial agents are only encapsulated in the gel matrix. When the hydrogel is immersed in a PBS solution at pH 7.4, about 55% of the drug was released after 36 h, while in a PBS solution at pH 5.5, 99% of the drug was released over the whole period of 36 h. With this formulation, there is nevertheless a non-specific release due to the simple diffusion of the antibiotic in the supernatant.

In order to avoid this passive diffusion of the antibacterial agents, aminoglycoside antibiotics, are useful antibacterial agents for this specific application since they have from three to six primary amine groups. By mixing them with oxidized polysaccharides, these antibiotics could serve as linkers via a Schiff base formation to create hydrogels. Polysaccharides are good candidates for the manufacturing of these hydrogels. Indeed, they are naturally occurring polymers providing them an excellent biocompatibility but also have high aqueous solubility and biodegradability. Hu et al.<sup>48</sup> have screened a large

number of aminoglycoside/polysaccharide combinations (**Figure 4a**). The authors chose to study particularly amikacin/dextran aldehyde (Dex-CHO) hydrogel due to its suitable gelation time ( $\sim 1$  min) and the broad-spectrum antibacterial activity of amikacin in clinic. The hydrogel weight is decreased by 36% and 45% when it was immersed in a buffer solution at pH 6.0 and pH 5.0 for 24 h, respectively (**Figure 4c**). In comparison, when the gel is kept in a pH 7.4 buffer solution, no weight loss is observed. As shown in **Figure 4d**, these hydrogels display a self-healing property, they are able to reform once environmental conditions have returned to normal (physiological pH). The erosion-based drug release behavior of this hydrogel avoids burst release of drugs and allows the drug release to synchronize with gel degradation. Dex-CHO was used in another study in complexation with a cationic dendrimers (amine-terminated generation 5 (G5) polyamido-amine (PAMAM)) with AgNPs.<sup>49</sup> In an acidic environment, the release ratio of AgNPs and G5 is two times greater than in a neutral environment after 24 h. The combination of cationic dendrimers and Ag NPs showed a synergistic effect in the treatment of bacterial infections.

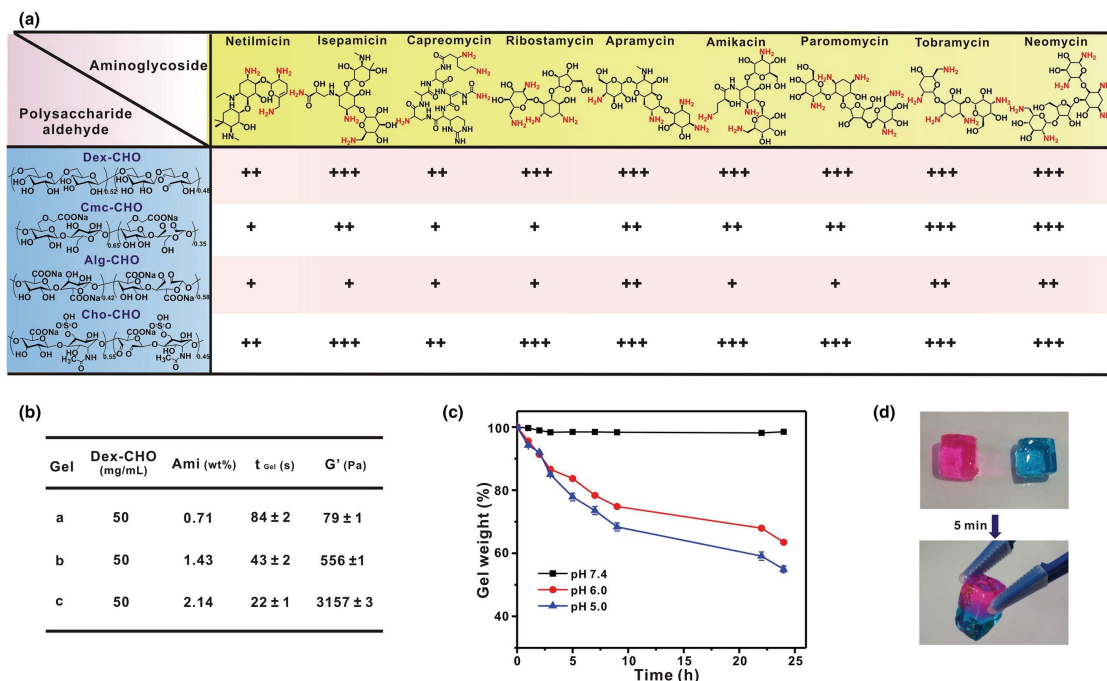


Figure 1.4: Properties of aminoglycoside hydrogels. (a) Gel formation between nine aminoglycosides and four types of polysaccharide aldehydes (dextran aldehyde (Dex-CHO); chondroitin aldehyde (Cho-CHO); carboxymethyl cellulose aldehyde (Cmc-CHO); alginate aldehyde (Alg-CHO)). “+”, “++”, and “+++” indicate the hydrogel forms within 15 min, 5 min, and 1 min, respectively. (b) Storage modulus and gelation time of amikacin/Dex-CHO hydrogels with different amikacin contents. (c) Degradation of the amikacin/Dex-CHO hydrogel (1.43 wt% amikacin) under pH 7.4, 6.0 and 5.0, respectively. (d) Self-healing behavior of the amikacin/Dex-CHO hydrogel. The two pieces of cube-shaped hydrogels were encapsulated with rhodamine B and methylene blue, respectively. Reproduced with permission.<sup>47</sup> Copyright 2017, Elsevier.

Another way to insert a Schiff base in hydrogel is to use polyethylene glycol (PEG). Bu and co-workers<sup>50</sup> have decided to create a hydrogel with 3 different PEG: 4-arm-PEG-NH<sub>2</sub>, 4-arm-PEG-NHS, and 4-arm-PEG-CHO loaded with vancomycin, a first-generation glycopeptide antibiotic (**Figure 5**). Three hydrogel formulations were made by tuning the ratios between the different PEGs. The number of Schiff bases present in the hydrogel varies according to its composition and the gel call “3” was built with a higher number of Schiff Bases compared to the gel call “2”. The gel 1 does not contain any Schiff base. Only 21% and 28% of vancomycin is released from the Gel 2 and the Gel 3 at pH 7.4 respectively, while 78% and 93% is released respectively at pH 5. These results suggest that the more Schiff bases there are, the more pH sensitive the hydrogel is and the more it releases vancomycin. These results have been confirmed by *in vitro* antibacterial activity studies which reveal a better activity of Gel 3 (the one containing the most Schiff bases) compare to the others. *In vivo* tests were performed with gel 2 having suitable mechanical strength, adhesion and release rate was applied to the infection model. *In vivo* hemostatic and antimicrobial experiments shown that hydrogels can inhibit the growth of bacteria and can stopped the blood loss. In addition to the antibacterial activity of vancomycin, PEG hydrogels reduce the initial attachment of bacteria.<sup>51</sup>

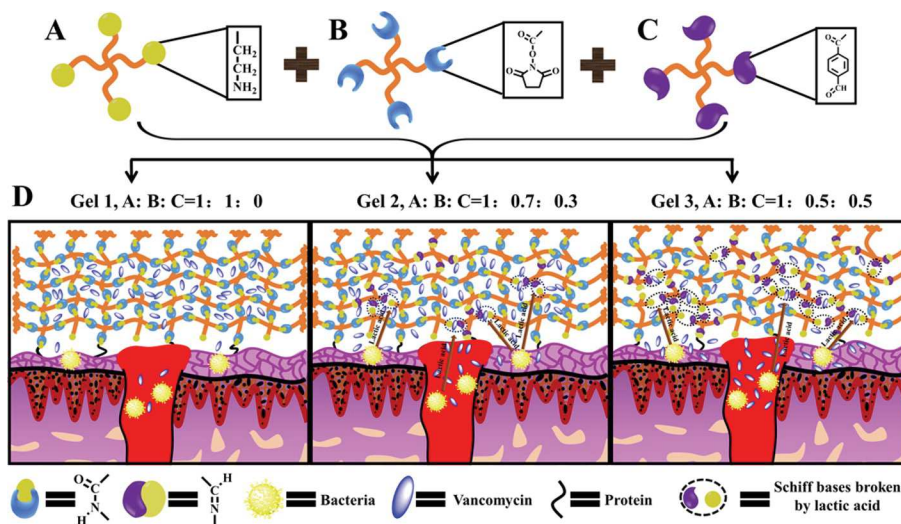


Figure 1.5: Vancomycin-loaded hydrogel systems formed by (A) 4-Arm-PEG-NH<sub>2</sub> reacting with (B) 4-Arm-PEG-NHS, (C) 4-Arm-PEG-CHO, and (D) polymer networks composed of different molar ratios of A: B: C. Reproduced with permission.<sup>48</sup> Copyright 2016, American Chemical Society.



For now, the hydrogels presented responded to a decrease in pH. In the case of a topical application, the acidic environment of the wound becomes basic in the presence of infection. Hydrogels are interesting for this kind of application because they help maintain a wet environment that will reduce pain, promote cell mobility and maintain hydration and tissue structure.<sup>52</sup> A hybrid hydrogel with keratin and Zinc Oxide nanoplates (nZnO) were developed by Villanueva and co-workers.<sup>53</sup> Keratin hydrogels show a pH-dependent swelling profile: the higher the pH is, the more the hydrogel swells. This characteristic allows, in the presence of bacteria and therefore with a pH increase, to increase the size of hydrogel's pores. Thus, there will be an increase in the water content of the pore that would shift the dissolution equilibrium of the nanoparticles by promoting the release of  $Zn^{2+}$  as biocidal agent. Zhu et al. <sup>54</sup> also developed a hydrogel for antibacterial wound dressing application. Their hydrogel, composed of peptide-based bis-acrylate and acrylic acid (AAc), exhibits a pH-dependent swelling behaviour (**Figure 6**). Four different gels were produced, with the ratio of peptide-based bis-acrylate to AAc increasing from Gel 1 to Gel 4. The pore sizes decrease with the increase in peptide-based bis-acrylate contents: with the increase of the crosslinker concentration, the distance between polymer chains decreases, leading to the decreasing of the pore size. The swelling ratio for these hydrogels increases when the solution becomes alkaline (**Figure 6**). The hydrogen-bonding interactions among the free carboxylic acid groups of the hydrogels network are stronger in an acid environment and lead to a lower swelling ratio. In an alkaline media, the hydrogen bonds would be broken, and electrostatic repulsion could repel chain segments, the hydrogel would have a higher swelling ratio. When applied at the bacterial infected wounds (in slight alkaline conditions), the peptide-based bis-acrylate/AAc hydrogels release the drug, triclosan, at a fast rate for killing the bacteria in a short period.



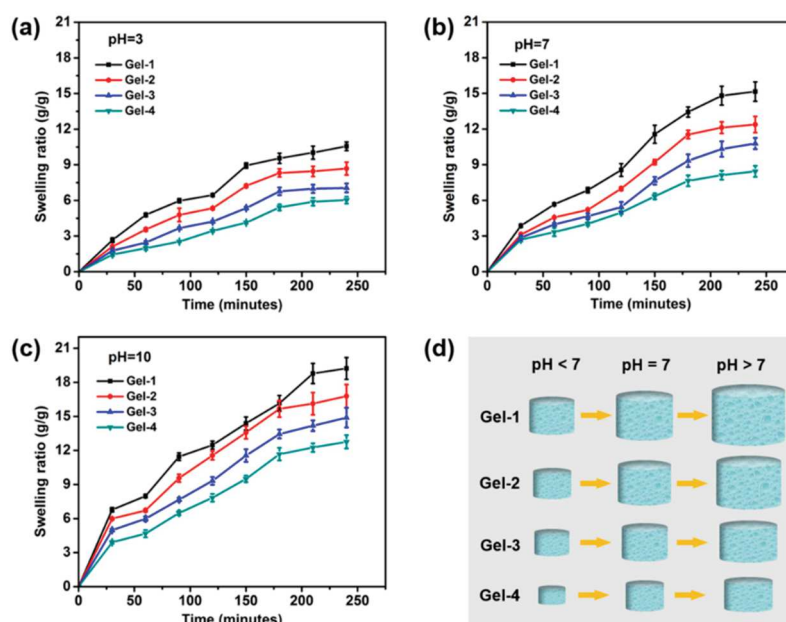


Figure 1.6: Swelling ratios of Gel-1 (black line), Gel-2 (red line), Gel-3 (blue line) and Gel-4 (green line) hydrogels at pH = 3 (a), pH = 7 (b) and pH = 10 (c) as a function of time. For gel production, the ratio of peptide-based bis-acrylate to AAC increasing from Gel 1 to Gel 4. (d) The trend of swelling vs hydrogels at pH = 3 (a), pH = 7 (b) and pH = 10 (c) as a function of time. (d) The trend of swelling vs pH of each hydrogel. The swelling ratio will increase when the solution became alkaline. Reproduced with permission.<sup>54</sup> Copyright 2018, MDPI

### 1.1.1. Enzyme-triggered

Another way to create hydrogels responding to a bacterial stimulus is to use proteases and virulence factors produced during an infection. Zhou *et al.*<sup>55</sup> designed a hydrogel that is able to respond to toxins or enzymes secreted by pathogenic bacteria such as *S. aureus* or *P. aeruginosa*. They developed phospholipid vesicle bilayer membranes with encapsulated antibiotics or fluorescent dye to kill bacteria in addition to giving a fluorimetric indication when infection occurs. These vesicles are embedded into biocompatible methacrylated gelatin (GelMA) for long term use in wound dressing. Two types of vesicles are loaded in the hydrogel: vesicles containing an antibiotic agent (gentamicin sulfate (GS) or silver nitrate) and vesicles containing the fluorescent dye (carboxyfluorescein). Carboxyfluorescein encapsulated at high concentration is non-fluorescence, but when the membrane of the vesicles is degraded, the dye becomes diluted and it makes fluorescence lighting. To test the antibacterial ability to degrade the phospholipid membrane, they choose three different bacteria: two pathogenic strains (*S. aureus* and *P. aeruginosa*) and one non-pathogenic strain (*E. coli*). Hydrogel were deposited on wound dressing and incubated for 4 hours at 37 °C with bacterial

suspensions and then adherent bacteria were removed and count into LB agar plate. Samples show a significant reduction in the number of viable cells for the two pathogenic bacteria and no effect was shown for *E. coli*. These results were correlated with the fluorescence intensity showing that non-pathogenic bacteria are unable to disrupted vesicle membrane. Only toxins and enzymatic factors from *S. aureus* and *P. aeruginosa* were able to damage the phospholipid vesicles. . Then, an *in vivo* proof of concept was performed by using a murine skin wound-healing model to verify the ability of the wound dressing to selectively kill pathogenic bacteria. The dressing sample applied on infected wound sites with pathogenic bacteria showed fluorescence under low UV light whereas no fluorescence was detected with the non-pathogenic bacteria indicating that vesicles are only degraded by pathogenic bacteria (**Figure 7**). Both *in vitro* and *in vivo* experiments shown that wound dressing was effective for inhibiting pathogenic bacteria without responding to commensal bacteria. This theranostic system is very interesting because it responds to pathogenic bacteria, indicate the presence of infection and could promote wound healing by its hydrogel formulation.

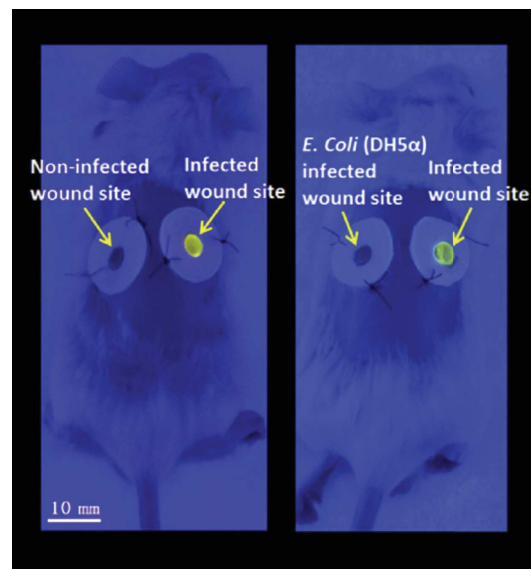


Figure 1.7: Representative imaging of colorimetric sensing property of the prototype wound dressing after 2-day surgery in Balb/c model. Non-infected wound site: blank control; infected wound site: *S. aureus* and *P. aeruginosa* of  $5.10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> inoculated on the wound site; *E. coli* (DH5α) infected wound site: *E. coli* (DH5α) of  $5.10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> inoculated on wound site. Reproduced with permission.<sup>55</sup> Copyright 2018, Elsevier.

## 1.2. Nanoparticles

### 1.2.1. pH-responsive

There are many ways to use nanocomposites (NCs) to make drug delivery systems. The first one is to use them in solution and the second one consists in their immobilization on the surface or to integrate them in a hydrogel or a in a coating. In this part, we will focus on the use of NCs in solution or grafted onto a surface.

Nanoparticles are increasingly used for drug delivery in cancer cells. Like infectious environment, cancerous tissues have a lower extracellular pH values than healthy tissues. It is therefore possible to combine the delivery of anticancer and antibacterial drugs. Zeynabad et al.<sup>56</sup> proposed a multifunctional drug delivery system based on cationic silica based polymer-clay nanocomposite for combination therapy. This nanocomposite was loaded with two anticancer and one antibacterial agent ciprofloxacin (CIP). The drug release behavior was shown to be pH dependent. The three drugs are released from about 5-10% under physiological conditions (pH 7.4) whereas at lower pH (pH 4), the release is greater, reaching 100% after 600 h. This can be explained by the fact that at pH 7.4, the electrostatic interactions between drugs and nanoparticles prevent the release, while for a lower pH, the degree of ionization changes and the nanoparticles release the drugs. This property allows to reduce the side effects of the drug on normal tissues.

Montari and co-workers<sup>57</sup> have developed nanoparticles (NPs) made of hyaluronic acid (HA) and tannic acid (TA). The presence of HA allows these particles to target bacteria that colonize cells presenting HA membrane receptors such as macrophages. HA modified with 3-aminophenyl boronic acid groups (HA-APBA) can react with TA by forming a boronate ester bond. These NPs are stable under neutral conditions they swell and dissolve in acidic conditions. The catechol-boronate complexation maintains TA in its reduced (catechol) form and allows to release an active form of TA under acidic conditions. These NPs have high potential for targeting macrophages intracellular pathogens. Sims et al.<sup>58</sup> designed pH-responsive polymer nanoparticle carriers (NPCs) loaded with farnesol, a hydrophobic antibacterial drug. The NPC, built with p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-co-BMA-co-PAA) and combined with a saturated farnesol solution, have a release life-time ( $t_{1/2}$ ) of 22.9 hours at pH 4.5 and 36.6 hours at pH 7.2. In the presence of

bacteria, the environmental acidification accelerates the drug release to kill bacteria. NPC were found to have pH-responsive CFU.mL<sup>-1</sup> reductions of approximately 2 logs between pH 7 and pH 5 against 16-hour *S. mutans* biofilms. They have also tested the anti-biofilm activity with the drug thonzonium bromide (TB) and TB-loaded NPCs showed reduced bacterial viability by about 6 log CFU.mL<sup>-1</sup>. Researchers aim with these nanoparticles to fight oral infection diseases with a topical application.

As we saw in the hydrogel part, the Schiff bases are interesting for creating pH-sensitive systems. Dynamically crosslinked polymer nanocomposites (DCPNs) created by Zhu et al. integrate Schiff bases for taking advantages of the acidic microenvironments within biofilms.<sup>59</sup> A poly(oxanorborneneimide) scaffold bearing guanidine, amino, and tetraethylene glycol monomethyl ether groups (PONI-GAT), an adamantyl-core tetrakisaldehyde (ATA) crosslinker, and carvacrol oil are used to generate the antimicrobial nanocomposites (**Figure 8a**). In the presence of ATA, PONI-GAT amines crosslink with ATA aldehydes, generating DCPNs. DCPNs appear spherical through transmission electron microscope imaging (**Figure 8b**) and have an average size of 220 nm measured by dynamic light scattering (**Figure 8c**). The advantage of this nanocomposite is their ability to penetrate the biofilms and to kill the most resistant bacteria. After 3 h in contact with the biofilm, the DCPNs reduced by more than 90% the cell viability within the biofilm. They also demonstrate that DCPNs have broad-spectrum activity, notably, Gram- negative and -positive bacterial biofilms can be treated.

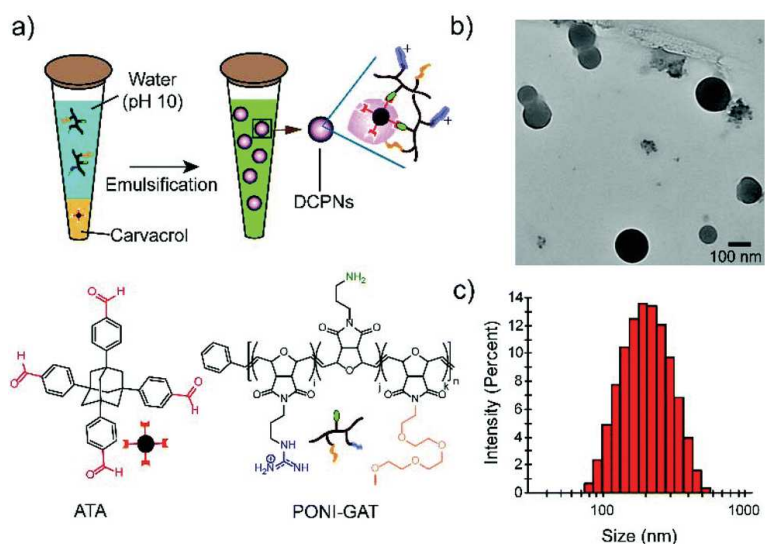


Figure 1.8: a) Schematic depiction of the strategy used to generate DCPNs along with the chemical structures of ATA crosslinker and PONI-GAT; b) TEM micrograph of DCPNs. Scale bar is 100 nm; c) DLS histogram indicating the size distribution of DCPNs in phosphate buffer saline (PBS, 150 mM). Reproduced with permission.<sup>59</sup> Copyright 2018, RSC Pub.

To use nanoparticles on a coating, the easiest way is first to produce these nanoparticles and then to immobilize them on the surface. Poly(vinyl alcohol) (PVA)/poly(lactide-glycolide acid) (PLGA) NPs with encapsulated vancomycin (Van) grafted onto the surface of titanium shown a pH-sensitive drug delivery system.<sup>60</sup> The presence of aminopropyltriethoxysilane (APTES) on the surface makes it possible to graft and thus immobilize the NPs of PVA/PLGA through the formation of an amide bond. Ester bonds between PVA and PLGA are easily cleaved under acidic condition, resulting in greater release of Van under bacterial infection conditions.

### 1.2.2. Enzyme-triggered

Nanoparticles are often combined with liposomes to create smart systems. Since the structure of the liposomes is close to the cell membrane, the toxins secreted by the bacteria can interact with these liposomes. Pornpattananankul and co-workers<sup>61</sup> used chitosan-modified gold nanoparticles (AuChi) to stabilize liposome with encapsulated Van. In this study, researchers used a toxin secreted by *S. aureus*, alpha hemolysin, also named  $\alpha$ -toxin. This protein is able to form pore into to the outer membranes of susceptible cells and thus to generate cell lysis. The mechanism is the same for the liposome; in the presence of bacteria and therefore of the toxin, the formation of pore

through the lipid bilayer will result in the release of the antibiotic and cause the death of the surrounding bacteria. The AuChi NPs stabilize liposomes against fusion with some other one and avoid antibiotic leakage in the absence of bacteria.

Some bacteria, for example *S. aureus*, can invade host cells, e.g. macrophages and osteoblasts, to escape the immune system.<sup>62</sup> Most antibacterial agents have a limited ability to act on intracellular bacteria, which makes them difficult to eliminate. In this case, nanoparticles are good candidates for targeting intracellular bacteria. Yang *et al.*<sup>63</sup> designed a toxin-sensitive intracellular antibiotic delivery nanoparticle. This nanoparticle is made of mesoporous silica core loaded with GS, a lipid bilayers surface shell and a cationic human antimicrobial peptide fragment ubiquicidin (UBI<sub>29-41</sub>) anchored into the shell (**Figure 9**). The liposome layer avoids non-specific release of antibiotics and allowed the targeting of particles to bacteria in infected tissues. In the presence of secreted bacterial phosphatase, lipase and phospholipase, the outer layer of liposomes is degraded which exposed the GS and cause elimination of bacteria. In this study, they have combined a bacteria-triggered released of antibiotics but also a controlled delivery into the cytosol of target cells thanks to UBI<sub>29-41</sub>.

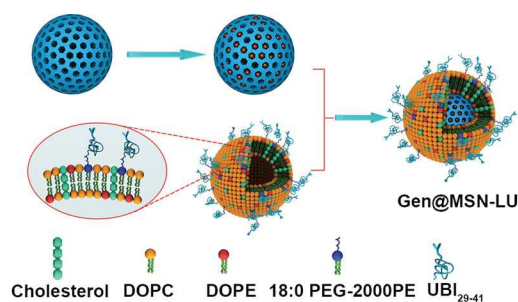


Figure 1.9: Schematics of the synthetic route of Gen@MSN-LU. UBI<sub>29-41</sub> was used to target the bacteria, and the outer layer of liposomes can be degraded by the bacterium-secreted toxins, leading to the Gen release. Reproduced with permission.<sup>63</sup> Copyright 2018, American Chemical Society.

Xiong and co-workers<sup>64</sup> also managed to develop a nanogel capable of delivering drug into infected macrophages. They have created a triple-layered nanogel (TLN) made of a bacterial lipase-sensitive poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) interlayer between the cross-linked polyphosphoester core and the shell of the poly(ethylene glycol) with an average diameter around 420 nm. TLN were loaded with Van (TLN-V) and cumulative release over time with or without lipase was followed. In absence of lipase, the cumulative release of

total encapsulated drug over 48 h of incubation in a Tris-HCl buffer is very low: 10%. In the presence of *P. aeruginosa* lipase, a rapid release of vancomycin was observed due to the rapid degradation of the PCL interlayer and the release rate was dependant of the concentration of lipase. With 0.5 mg.mL<sup>-1</sup> of lipase, the cumulative release of Van reached 40% after 48 h whereas with 1 mg.mL<sup>-1</sup> of lipase, the cumulative release achieved 70%. To test whether bacteria are able to cleave this system, they performed the same experiment but by incubating the PCL-V with a bacterial suspension of *S. aureus* MW2 (high lipase secretion) or *E. coli* strains TOP10 and BL21 (low lipase secretion). Without bacteria, only 1% of total encapsulated Van was released from the TLN-V after 1h of incubation. With bacteria, there was a huge difference between *S. aureus* MW2 and *E. coli* TOP10 and BL21 with respectively about 80%, 11% and 8% of Van release after 1 h of incubation. Researchers have also examined if TLN-V is able to deliver drug in bacterial-infected cells. To confirm the cell penetration of TLN, they have encapsulated a cell membrane impermeable fluorescent dye, propidium iodide (PI), instead of Van and incubated them with a mouse macrophage cell line. Then, they have compared the cellular uptake and release of PI from TLN-PI in cell infected or not with a green fluorescent protein (GFP)-expressing *S. aureus* strain. Cellular fluorescence of infected cells after incubation with TLN-PI was stronger than that of healthy cells after the same treatment. Using confocal laser scanning microscopy, they observed that PI and GFP-expression *S.aureus* colocalized and that in addition, the PI was found in the nucleus, confirming the degradation of the TLN-PI by the bacteria. Finally, they examined the ability of TLN-V to kill intracellular bacteria. As shown in **Figure 10**, they demonstrate that TLN-V have a better antibacterial activity against intracellular bacteria compared to Van in solution. This nanogel is very promising because it exhibits an efficient antibacterial activity against extracellular and intracellular bacteria and shown a very small release of Van in absence of lipase or lipase-secreting bacteria.

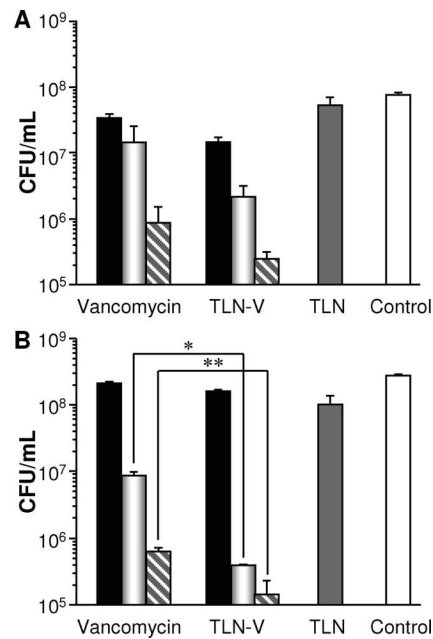


Figure 1.10: Intracellular survival of *S. aureus* MW2 in Raw264.7 cells. Infected cells were cultured with vancomycin, TLN-V, or empty TLN ( $476.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , equal to the concentration of TLN in culture that the cells were treated with TLN-V at a vancomycin concentration of  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) or left untreated (control). The final concentration of vancomycin in the culture was 5 (solid bar), 10 (gray bar), or 20 (striped bar)  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  when it was applied. The incubation was terminated after 12 h (A) or 24 h (B) to determine the intracellular survival of *S. aureus*. CFU, colony-forming units. \* represents  $p < 0.05$  and \*\* represents  $p < 0.01$  determined by Student's *t* test. Reproduced with permission.<sup>64</sup> Copyright 2012, American Chemical Society.

Recurrent or secondary caries, caused by acid-releasing cariogenic bacteria at the restoration-tooth interface, is a major cause of restoration failure and replacement.<sup>65</sup> Addition of antimicrobial agents into the restorative materials could affect the integrity of the materials but also have limited released period. In this context, Stewart and co-workers<sup>66</sup> developed mesoporous silica nanoparticles (MSNs) loaded with an antimicrobial amphiphilic drug (DMSNs): octenidine dihydrochloride (OCT). DMSNs are incorporating in a dental resin adhesive localized between the composite and remaining tooth. The advantage of incorporating the drug in MSNs is to obtain a long-term release that is stimulated by the presence of bacterial enzymes. Commercial dental resins are readily degraded by enzymes present in human saliva, both of host and bacterial origin. Researchers used these enzymes to activate their antibacterial system *via breakdown of resin polymer matrix*. In the study, they shown that the total release of drug increase of  $\sim 1.5$  times in a simulated human salivary esterase compare to PBS. These results indicate that the breakdown of polymer matrix and the release of loaded drug are related. In order to determine the antibacterial activity of this modified resin, this latter was incubated with *S. mutans* and cell viability was measured. DMSNs show a significant 4.4 log



reduction in viable cells and suggest that the local concentration of OCT due to release triggered by bacterial esterase is sufficient to inhibit *S. mutans* biofilm formation. In this system, the drug release is confined and thus limits systemic exposure.

## 1.3. Thin films

### 1.3.1. pH-responsive

Chapitre 2. Multilayer films are widely used for the manufacture of antibacterial coatings.

The layer-by-layer (LbL) assembly of polyelectrolytes can be used as a multifunctional platform to combine both antibacterial and stimuli-responsive components. Chitosan (CH) is a linear cationic polysaccharide whose protonation of amino groups of CH generating positively charged polymer chains results in swollen films specifically in an acidic aqueous environment (below  $pK_a \sim 6.3$ ). This biopolymer is widely used to create pH-sensitive coatings. Nalam *et al.*<sup>67</sup> studied the nanomechanical properties of the pH response of a bilayer film composed of CH and poly(acrylic acid) (PAA), another pH-sensitive polymer. The first layer of PAA is grafted on the surface to create a brush where CH chains will be crosslinked to form the second layer. The swelling ratio ( $S_r$ ) of this coating is higher at pH 4.0 ( $S_r \sim 260$ ) than at pH 7.4 ( $S_r \sim 102$ ). When the antibiotic tobramycin (TOB) is loaded into the film, a collapse and a decrease in thickness of the film at both pHs are observed. In fact, the competitive interactions between TOB and water molecules with PAA brushes modify the solvation state of the PAA brushes in the CH/PAA at both pHs. In an acidic environment, the PAA layer protonates and collapses and the CH layer swells, allowing the TOB molecules to release and diffuse into the surrounding medium (**Figure 11**). The antibacterial activity of the bilayer film where tested against *S. aureus*.<sup>68</sup> Antibacterial tests have shown that CH/PAATOBS can only prevent colonization at approximately  $10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup>, but the advantage of this film is that the amount of antibiotics loaded can be modified by varying the thickness of the PAA layer. Indeed, if the PAA brush length is longer and the cross-linking of CH and PAA at the bilayer interface is weaker, the concentration of TOB loaded will be higher.

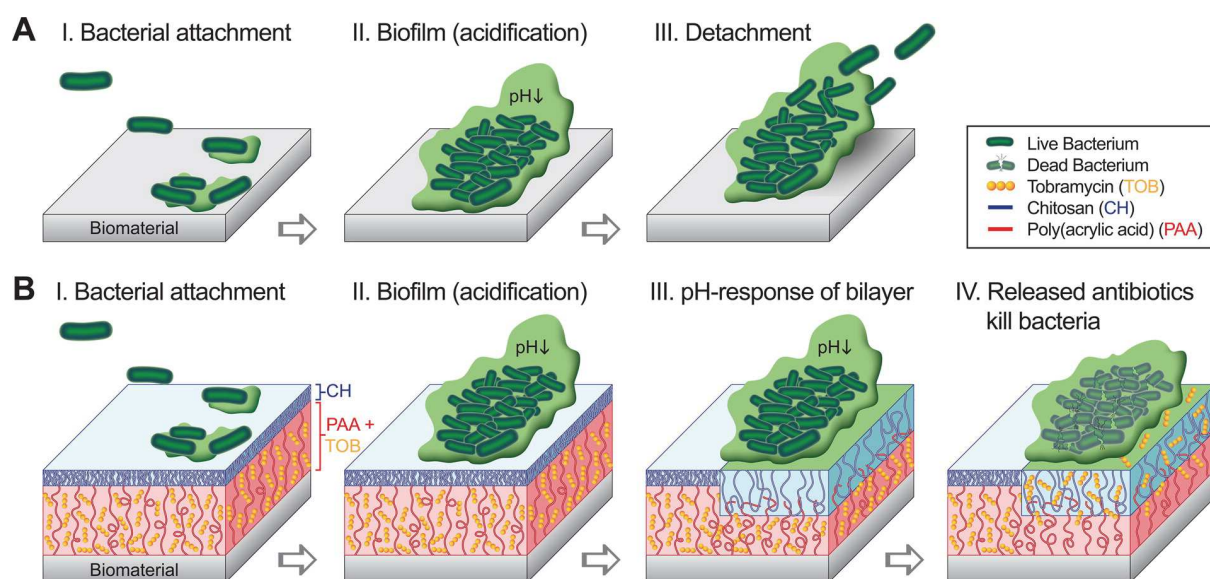


Figure 1.11: (A) Bacterial infection on biomaterials involves (I) bacterial attachment, (II) bacterial colonization and biofilm formation, and (III) biofilm detachment for bacterial proliferation. (B) pH-responsive, drug release polymer bilayer system has an outer layer of chitosan (CH, blue), which provides biocompatibility and hemocompatibility. This layer minimizes blood coagulation and inflammation when a biomaterial comes in direct contact with biological tissue and provides initial resistance against bacterial infection. An inner layer of poly(acrylic acid) (PAA, red) is grown from the biomaterial using surface-initiated atomic transfer radical polymerization (SI-ATRP). The molecular weight can be varied to tune the loading amount of tobramycin (TOB, yellow), which is electrostatically attracted to the PAA at pH 7. The depicted drug release mechanism is that bacterial colonization and formation of a biofilm on the TOB-loaded CH/PAA bilayer causes a local decrease in pH near the infected area (B.II). The reduced local pH triggers the outer CH layer to swell and reduces the electrostatic attraction between PAA and TOB (B.III). TOB loaded in PAA releases and diffuses into biofilm to kill the bacteria (B.IV). In summary, TOB is loaded at pH 4.5, retained at pH 7 and released at low pH. Reproduced with permission.<sup>68</sup> Copyright 2015, American Chemical Society.

Wang and co-workers<sup>69</sup> have constructed their LbL films with micelles, composed of CH and methoxy poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) (MPEG-PCL-CH), and PAA. MPEG-PCL-CH micelles can be loaded with hydrophobic drug such as triclosan (TCA). As shown in **Figure 12**, 92% of TCA was released after only 8 h. To avoid this quick release, the micelles were incorporated into a multilayer film by alternating micelles and PAA layers. Only 30% of TCA was released after 8h at pH 7.4. At pH 5.5, the drug delivery system displayed an enhanced TCA release rate because of the pH-responsiveness properties of CH and PAA. In order to verify whether the bacteria were capable of inducing antibiotic release by acidification of the medium, the TCA release profile in the multilayer films was followed with the presence of bacteria. The level of TCA released increases when the bacterial concentration is higher. The local acidification of the medium by the bacteria thus allows the release of TCA which will exert its antibacterial power. In another study, Chen *et al.*<sup>70</sup> used MPEG-PCL-CH with montmorillonite (MMT) to construct multilayer films. They chose MMT for its excellent drug retention properties in a multilayer film. As

for the precedent study,<sup>69</sup> this hybrid film presents a pH-responsive and on-demand release of TCA.

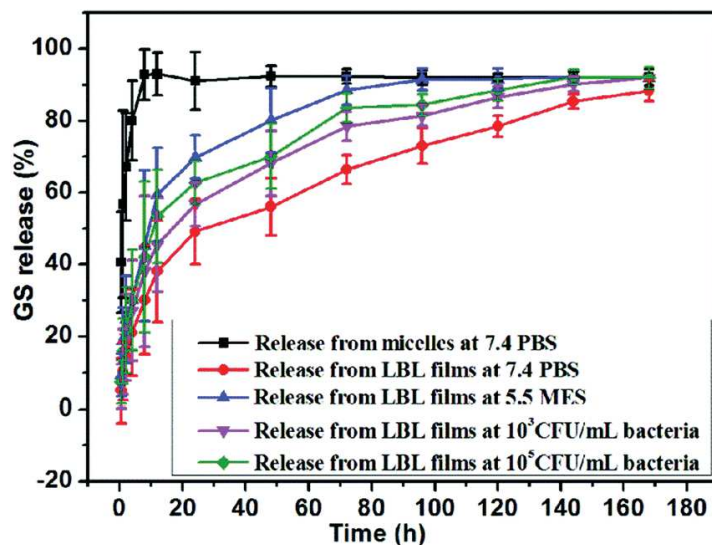


Figure 1.12: Normalized cumulative TCA release from (TCA/MPEG-PCL-CS)/PAA multilayer films in different medium. Reproduced with permission.<sup>69</sup> Copyright 2017, Royal Society of Chemistry.

In order to increase the higher density of antimicrobial material on surfaces, Sutrisno and co-workers<sup>71</sup> used CH nanofibers (NF) on which they deposited a multilayer film. They first deposited nanofibers composed of CH and PCL through electrospinning method on titanium substrates previously coated by polydopamine (PDop). Then, five bilayers of tannic acid/gentamicin sulfate (TA/GS) were added using dipping method. The drug release rate of the Ti-PDop/NF/LbL was affected by pH. At low pH, TA was increasingly protonated and resulted in electrostatic repulsion, thus achieving the burst release of GS from the substrates. Ti-PDop/NF/LbL shows a higher release of GS compared to Ti/LbL substrates. This trend can be explained by the larger surface area of nanofiber than native Ti substrate, which results in the deposit of a larger amount of GS per unit area. This high concentration of GS on the Ti-PDop/NF/LbL surface improves the antibacterial activity.

The introduction of a three-dimensional (3D) structures on the material surface is another strategy for increasing the deposition area of a multilayer film. Yan *et al.*<sup>72</sup> introduced a 3D porous structure into polyetheretherketone (PEEK) surface. After sulfonation treatment, a layer of PDop is deposited on the surface and AgNPs are added above. Then, three layers of silk fibroin were spun onto the surface and immersed into a solution of GS. Finally, another three silk layers were deposited. The combination of

AgNPs and GS exhibited synergistic bacteria killing effect on both Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*) bacteria (**Figure 13**) and showed higher releasing-killing than that of untreated PEEK. When pH decreases under infection, protonation degree of silk fibroin and the number of positive charges enhanced resulting in the release of positively charged  $\text{Ag}^+$  and GS to maintain electroneutrality. Silk fibroin plays a key role in this coating: it confers a pH-dependent release of biocidal agents ( $\text{Ag}^+$  and GS), acts as a barrier to prevent the cells from being in direct contact with the underlying AgNPs and increases the contact angle which would be better for cell adhesion. Finally, this 3D porous coating has a dual function: bacteria-triggered bactericidal effect and improvement of osteogenic capacities.

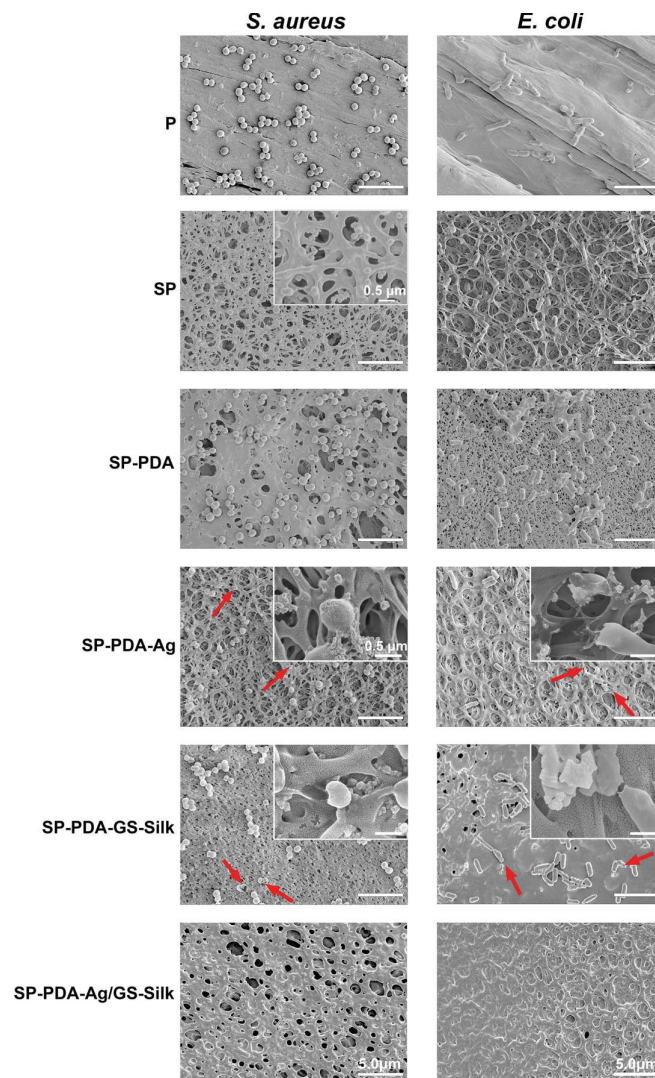


Figure 1.13: SEM morphology of bacteria adhered to the surfaces after incubated with samples for 24 h, and high magnification images of bacteria adhered to SP sample or bacteria damaged were inserted on the upper right corner. Red arrows indicate bacteria with impaired structure. Reproduced with permission.<sup>72</sup> Copyright 2018, Elsevier.

The problem with most of the coatings is that after a while, the corpses of bacteria accumulate on the surface and stop the antibacterial activity of the coating. In order to avoid this, Yan and co-workers<sup>73</sup> developed a bacteria-responsive coating that is able to be both antibacterial and cell-repellent. They have created a bilayer coating made of an inner layer loaded with antimicrobial peptide (AMP) and an outer layer of PMAA. Under physiological conditions, the outer layer of PMAA limits bacterial adhesion to the surface and sequester the AMPs thus making the surface biocompatible for mammalian cells. When the local environment became acidic, the PMAA chains dehydrated and collapsed. During an infection, the local pH decrease will cause dehydration and retraction of the PMAA layer. This will expose the inner layer of AMP to kill bacteria on surfaces. Once the pH becomes physiological, the layer of PMAA reforms a hydrated layer and switches between bactericidal to bacteria-repellent properties. The biggest advantage of this coating is that there is no need of additional reloading of new antibacterial agents to maintain an activity.

### 2.1.1. Enzyme-triggered

In order to be specific for a bacterial genus, Wang *et al.*<sup>74</sup> have designed a LbL film which responds to two stimuli: enzymatic and pH. They build their film by alternating 10 bilayers of PEG-bis(succinimidyl succinate) (NHS-PEG-NHS) and polyethylenimine (PEI) cellulose substrates (Cellulose<sub>LbL10</sub>) followed by immobilizing antibiotics *via* an acid-labile b-carboxylic linker and electrostatic adsorption of HA. The HA upper layer allows to have good biocompatibility under normal physiological conditions. The release mechanism of vancomycin (Van) takes place in two stages: the degradation of the HA layer by the hyaluronidase (HAase) produced by Gram-positive bacteria and the release of Van in response to the local bacteria-triggered acidification. As shown in **Figure 14**, the release of Van is more important at low pH (pH 5) than at pH 7.4 for the Cellulose<sub>LbL10</sub>-Van coating. The degradation of the HA layer by HAase is necessary to allow the release of Van at pH 5.

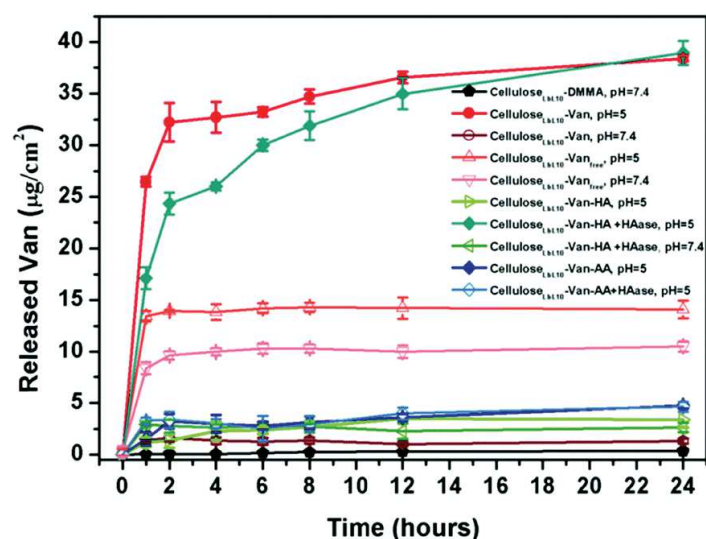


Figure 1.14: Time-dependent release profile of Van under different conditions. (Error bars: standard deviation,  $n = 3$ ). Reproduced with permission.<sup>74</sup> Copyright 2018, Royal Society of Chemistry.

Cado *et al.*<sup>75</sup> have developed a biocompatible and biodegradable polysaccharide multilayer film consisting of hyaluronic acid functionalized with an antimicrobial peptide: cateslytin (CTL), and CH. They showed that *S. aureus* and *C. albicans*, two pathogens secreting hyaluronidase, were able to degrade HA/CH film by hydrolysis of HA. In addition, they showed that a film of 15 bilayers (HA-CTL/CH)<sub>15</sub> totally inhibits the growth of these two pathogens after 24 hours of incubation. Thanks to the fluorescent labeling of HA (HA<sup>FITC</sup>) and HA-CTL (HA<sup>FITC</sup>-CTL), the interaction of these two molecules with *C. albicans* has been determined. HA<sup>FITC</sup>-CTL were detectable in cytoplasm without inducing cell lysis whereas HA<sup>FITC</sup> was found only around yeast cells. This result suggests that CTL is able to cross the cell membrane, even when it is coupled to HA. By hydrolysing the HA, the hyaluronidase-producing bacteria will allow the HA-CTL fragment to enter the cells and induce cell death.

Yao and co-workers<sup>76</sup> created a multilayer film built in two blocks and responding to the action of the HAase and chymotrypsin (CMS). The multilayer film is composed of 10 bilayers of HA/CH on which are added 10 bilayers of HA/ Poly-L-lysine hydrobromide (PLL). They have shown that after 3 days and 6 days with incubation in HAase/CMS solution or in presence of *S. aureus* respectively, the first block of (HA/PLL)<sub>10</sub> of a (HA/CH)<sub>10</sub>-(HA/PLL)<sub>10</sub> film is totally degraded. For the bottom (HA/CH)<sub>10</sub> multilayer films, CH through a blocking effect reduces the enzymatic degradation rate of HA by HAase. The role of this bottom multilayer is to provide a bactericidal function through



contact-killing thanks to the  $\text{NH}_3^+$  groups of the CH polycations. In addition, the degradation and detachment of fragments of the (HA/PLL)<sub>10</sub> film (10 bilayers) can reduce bacterial adhesion. *In vitro* test shown a good bactericidal activity against *S. aureus* and *E. coli* and a good eukaryotic cell biocompatibility. Liu *et al.*<sup>77</sup> have also used a CH/HA multilayer film but in combination with AgNPs. CH@AgNPs nanocomposite were synthesized using ascorbic acid as reducing agent and assembled with HA to obtain a (CH@AgNPs/HA)<sub>5</sub> coating. In contact with exogenous HAase, Ag ions rapidly released from the substrates during the first 24 hours and confer an antibacterial activity. This system is therefore sensitive to bacteria secreting HAase for the controlled delivery of Ag ions.

Wang and co-workers<sup>78,79</sup> have elaborated two bacteria self-defensive LbL films. The first one is made up of 8 bilayers of montmorillonite/poly-L-lysine-gentamicin sulfate ((MMT/PLL-GS)<sub>8</sub>) and the antibacterial activity is triggered by the action of chymotrypsin.<sup>78</sup> The second one is made up of 10 bilayers of montmorillonite/hyaluronic acid-gentamicin sulfate ((MMT/HA-GS)<sub>10</sub>) and the antibacterial activity is triggered by the action of HAase.<sup>79</sup> The mechanism of action of these two films is the same. The gradual degradation of the film by enzymes causes the GS release from the matrix. Furthermore, the peeling of the films from the surface leads to the elimination of the fixed bacteria. Antibacterial activity tests revealed that the two coatings present good inhibition of biofilm formation and long-term anti-adhesion properties for *E. coli* and *S. aureus*. *P. aeruginosa* is also widely found in medical devices-associated infections. Francesko *et al.*<sup>80</sup> developed an aminocellulose nanospheres (AC<sub>NSs</sub>)/HA multilayer film to fight against *P. aeruginosa* biofilm formation on urinary catheters. Aminocellulose in the form of nanospheres AC<sub>NSs</sub> reveals better antibacterial activity than its counterpart in solution (AC<sub>sol</sub>). As shown in **Figure 15**, the (AC<sub>NSs</sub>) in the multilayer coatings (5 and 10 bilayers) reduced planktonic bacterial growth (around 70%), whereas the AC<sub>sol</sub>-based coatings affected up to 42% the bacterial cells after 2 h incubation. For longer incubation times (7 days), the film with 10 bilayers proved to be the most effective against biofilm formation. The antibacterial activity of this coating is not due to the simple contact of the bacteria with AC<sub>NSs</sub> contained in the film but upon triggering by the bacteria degradation of the coating.

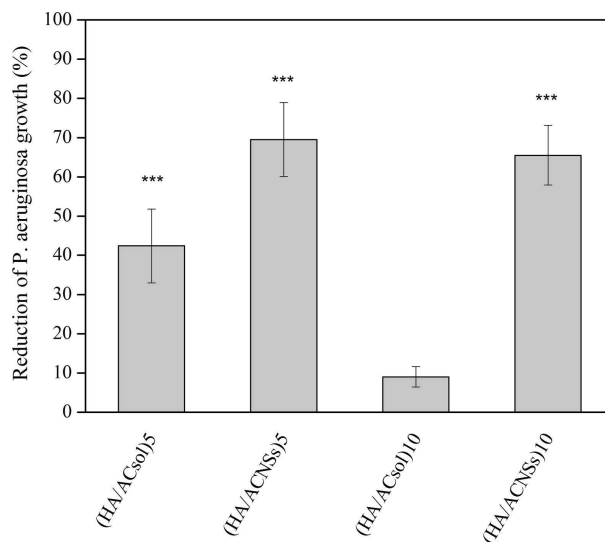


Figure 1.15: Antibacterial activity of silicone coated with HA/ACsol and HA/ACNs against *P. aeruginosa* as compared to pristine silicone. Statistical differences are represented as \*\*\* $p < 0.001$ . Reproduced with permission.<sup>80</sup> Copyright 2016, Elsevier.

### 1.3. Conclusion et perspectives

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique majeur. Ces dernières années, les chercheurs se sont concentrés sur l'administration locale d'antibiotiques *via* la conception de revêtements. Bien qu'ils soient innovants, ces revêtements ont des limites puisque la forte concentration locale d'antibiotiques peut induire l'apparition de bactéries résistantes mais peut également engendrer une forte toxicité sur les cellules environnantes. Ces dix dernières années, un nouveau type de revêtements a vu le jour : les revêtements dits « intelligents ». Le principal avantage de ces revêtements est la libération contrôlée de l'agent antibactérien. Pour cela plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu : les stimuli externes (non-biologiques) et les stimuli biologiques. La première catégorie regroupe les stimuli tels que la lumière, la température, les champs électriques et magnétiques. Le relargage des molécules antimicrobiennes va, dans ce cas, être induit par un événement externe. La seconde catégorie regroupe les stimuli microbiens tels que les variations de pH et la présence d'enzymes extracellulaires. Dans ce chapitre consacré à un état de l'art, nous nous sommes uniquement concentrés sur les revêtements dont l'activité antimicrobienne est induite par un stimulus produit des bactéries elles-mêmes.



La stratégie des revêtements sensibles aux variations de pH est basée selon deux principes. Le premier est le changement de structure secondaire des molécules du revêtement induisant un relargage de l'agent antimicrobien se trouvant dans le revêtement. Le second repose sur l'instabilité de la base de Schiff dans un milieu acide. L'hydrolyse de la base de Schiff en milieu acide, va permettre la libération de l'agent antibactérien. Chacune de ces méthodes est intéressante dans la construction de revêtements sensibles aux variations de pH mais la base de Schiff semble plus sensible au pH, limitant ainsi le relargage passif de l'agent antimicrobien.

Les revêtements sensibles aux enzymes extracellulaires bactériennes sont quant à eux plus spécifiques d'un groupe de bactéries données que les précédents revêtements. En effet, la dégradation d'un des composants du revêtement est spécifique d'une enzyme donnée alors que les changements de pH sont induits par toutes les bactéries. L'enzyme la plus utilisée comme stimulus est la hyaluronidase. Cette enzyme extracellulaire est capable de dégrader le hyaluronan mais également la chondroïtine sulfate, qui sont deux ingrédients intéressants pour la formulation de revêtement puisqu'ils sont biocompatibles. Le principal avantage des systèmes antibactériens à déclenchement enzymatique est donc la spécificité pour un genre ou une espèce de bactérie par sélection du couple molécule/enzyme.

Les systèmes sensibles au pH présentent l'avantage de ne pas induire un relargage fortuit d'agent antibactérien en absence d'infection. En revanche, ils ne peuvent être spécifiques des pathogènes et l'agent antibactérien sera libéré en présence d'un pathogène ou d'une souche commensale. Les systèmes sensibles aux enzymes bactériennes peuvent quant à eux être spécifiques des pathogènes mais sont encore trop peu étudiés et peu variés.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Annual report of the European Antimicrobial Resistance - Surveillance Network (EARS-Net) 2017. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).
- 2 WHO. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*, <<https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>> (April 2014).
- 3 *Antibiotic Resistance Threats in the United States 2013*, <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>> (2016).
- 4 O'Neill, J. *Review on Antimicrobial Resistance. Securing New Drugs for Future Generations: The Pipeline of Antibiotics*, <<http://amr-review.org/sites/default/files/SECURING%20NEW%20DRUGS%20FOR%20FUTURE%20GENERATIONS%20FINAL%20WEB%200.pdf>> (May 2015).
- 5 Ayukekbong, J. A., Ntemgwa, M. & Atabe, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **6**, 47, (2017).
- 6 Donlan, R. M. & Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 167-193, (2002).
- 7 NIH. *Research on microbial biofilms*, <<https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/pa-03-047.html>> (2002).
- 8 Wang, M. & Tang, T. Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning. *Journal of Orthopaedic Translation* **17**, 42-54, (2019).
- 9 Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322, (1999).
- 10 Huh, A. J. & Kwon, Y. J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release* **156**, 128-145, (2011).
- 11 Smith, A. W. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1539-1550, (2005).
- 12 Schmidmaier, G., Lucke, M., Wildemann, B., Haas, N. P. & Raschke, M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury-International Journal of the Care of the Injured* **37**, 105-112, (2006).
- 13 Gustafson, C. T. *et al.* Controlled Delivery of Vancomycin via Charged Hydrogels. *Plos One* **11**, 17, (2016).
- 14 Patton, J. S., Fishburn, C. S. & Weers, J. G. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. *Proceedings of the American Thoracic Society* **1**, 338-344, (2004).

- 15 Cho, D. Y. *et al.* In-vitro evaluation of a ciprofloxacin- and ivacaftor-coated sinus stent against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Forum of Allergy & Rhinology* **9**, 486-492, (2019).
- 16 Stigter, M., Bezemer, J., de Groot, K. & Layrolle, P. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. *Journal of Controlled Release* **99**, 127-137, (2004).
- 17 Pérez-Cobas, A. E. *et al.* Differential Effects of Antibiotic Therapy on the Structure and Function of Human Gut Microbiota. *Plos One* **8**, e80201, (2013).
- 18 Gao, G., Jiang, Y. W., Jia, H. R. & Wu, F. G. Near-infrared light-controllable on-demand antibiotics release using thermo-sensitive hydrogel-based drug reservoir for combating bacterial infection. *Biomaterials* **188**, 83-95, (2019).
- 19 Liu, Q. & Liu, L. Novel Light-Responsive Hydrogels with Antimicrobial and Antifouling Capabilities. *Langmuir* **35**, 1450-1457, (2019).
- 20 Chen, Q. *et al.* Continuous processing of phase-change materials into uniform nanoparticles for near-infrared-triggered drug release. *Nanoscale* **10**, 22312-22318, (2018).
- 21 Song, Z. Y. *et al.* pH-Responsive, Light-Triggered on-Demand Antibiotic Release from Functional Metal-Organic Framework for Bacterial Infection Combination Therapy. *Advanced Functional Materials* **28**, (2018).
- 22 Xie, Y., Chen, S., Qian, Y., Zhao, W. & Zhao, C. Photo-responsive membrane surface: Switching from bactericidal to bacteria-resistant property. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **84**, 52-59, (2018).
- 23 Gabriel, D., Monteiro, I. P., Huang, D., Langer, R. & Kohane, D. S. A photo-triggered layered surface coating producing reactive oxygen species. *Biomaterials* **34**, 9763-9769, (2013).
- 24 Werzer, O., Tumphart, S., Keimel, R., Christian, P. & Coclite, A. M. Drug release from thin films encapsulated by a temperature-responsive hydrogel. *Soft Matter*, (2019).
- 25 Pan, Y. *et al.* Superfast and Reversible Thermoresponse of Poly( N-isopropylacrylamide) Hydrogels Grafted on Macroporous Poly(vinyl alcohol) Formaldehyde Sponges. *ACS Applied Materials & Interfaces* **10**, 32747-32759, (2018).
- 26 Zavgorodnya, O. *et al.* Temperature-responsive nanogel multilayers of poly(N-vinylcaprolactam) for topical drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science* **506**, 589-602, (2017).
- 27 Arafa, M. G., El-Kased, R. F. & Elmazar, M. M. Thermoresponsive gels containing gold nanoparticles as smart antibacterial and wound healing agents. *Scientific reports* **8**, 13674, (2018).
- 28 Kritchenkov, A. S. *et al.* Natural polysaccharide-based smart (temperature sensing) and active (antibacterial, antioxidant and photoprotective) nanoparticles with potential

application in biocompatible food coatings. *International Journal of Biological Macromolecules*, (2019).

29 Yang, H. T. *et al.* Smart Antibacterial Surface Made by Photopolymerization. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**, 28047-28054, (2016).

30 Islan, G. A., Tornello, P. C., Abraham, G. A., Duran, N. & Castro, G. R. Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **143**, 168-176, (2016).

31 Wang, B. *et al.* Copolymer Brushes with Temperature-Triggered, Reversibly Switchable Bactericidal and Antifouling Properties for Biomaterial Surfaces. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**, 27207-27217, (2016).

32 Silva-Freitas, E. L. *et al.* Design of Magnetic Polymeric Particles as a Stimulus-Responsive System for Gastric Antimicrobial Therapy. *AAPS PharmSciTech* **18**, 2026-2036, (2017).

33 Qu, J., Zhao, X., Ma, P. X. & Guo, B. Injectable antibacterial conductive hydrogels with dual response to an electric field and pH for localized "smart" drug release. *Acta Biomaterialia* **72**, 55-69, (2018).

34 Zhang, L. *et al.* A Photon-Responsive Antibacterial Nanoplatform for Synergistic Photothermal-/Pharmaco- Therapy of Skin Infection. *ACS Applied Materials & Interfaces*, (2018).

35 Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, R. K. & Gupta, R. A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters* **22**, 495-498, (2000).

36 Hynes, W. L. & Walton, S. L. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **183**, 201-207, (2000).

37 Shaw, L., Golonka, E., Potempa, J. & Foster, S. J. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology-Sgm* **150**, 217-228, (2004).

38 Skalka, B. Hyaluronidase test in the diagnosis of staphylococci. *Veterinary Medicine (Praha)* **30**, 373-378, (1985).

39 Vroom, J. M. *et al.* Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 3502-3511, (1999).

40 Hannig, M. & Hannig, C. Nanomaterials in preventive dentistry. *Nature Nanotechnology* **5**, 565, (2010).

41 Hidalgo, G. *et al.* Functional Tomographic Fluorescence Imaging of pH Microenvironments in Microbial Biofilms by Use of Silica Nanoparticle Sensors. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 7426-7435, (2009).

- 42 Schneider, L. A., Korber, A., Grabbe, S. & Dissemond, J. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? *Archives of Dermatological Research* **298**, 413-420, (2007).
- 43 Gethin, G. *The significance of surface pH in chronic wounds*. Vol. 3 (2007).
- 44 Albright, V. *et al.* Self-defensive antibiotic-loaded layer-by-layer coatings: Imaging of localized bacterial acidification and pH-triggering of antibiotic release. *Acta Biomaterialia* **61**, 66-74, (2017).
- 45 Wei, Q. B., Fu, F., Zhang, Y. Q. & Tang, L. Preparation, characterization, and antibacterial properties of pH-responsive P(MMA-co-MAA)/silver nanocomposite hydrogels. *Journal of Polymer Research* **21**, (2014).
- 46 Pavlukhina, S., Lu, Y., Patimetha, A., Libera, M. & Sukhishvili, S. Polymer multilayers with pH-triggered release of antibacterial agents. *Biomacromolecules* **11**, 3448-3456, (2010).
- 47 Zhou, J. *et al.* Theranostic Infection-Responsive Coating to In Situ Detect and Prevent Urinary Catheter Blockage. *Advanced Materials Interfaces* **5**, (2018).
- 48 Hu, J. *et al.* A smart aminoglycoside hydrogel with tunable gel degradation, on-demand drug release, and high antibacterial activity. *Journal of Controlled Release* **247**, 145-152, (2017).
- 49 Dai, T. *et al.* A Nanocomposite Hydrogel with Potent and Broad-Spectrum Antibacterial Activity. *ACS Applied Materials & Interfaces* **10**, 15163-15173, (2018).
- 50 Bu, Y. *et al.* Synthesis and Properties of Hemostatic and Bacteria-Responsive in Situ Hydrogels for Emergency Treatment in Critical Situations. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**, 12674-12683, (2016).
- 51 Wang, P., Tan, K. L., Kang, E. T. & Neoh, K. G. Plasma-induced immobilization of poly(ethylene glycol) onto poly(vinylidene fluoride) microporous membrane. *Journal of Membrane Science* **195**, 103-114, (2002).
- 52 Hassan, A., Niazi, M. B. K., Hussain, A., Farrukh, S. & Ahmad, T. Development of Anti-bacterial PVA/Starch Based Hydrogel Membrane for Wound Dressing. *Journal of Polymers and the Environment* **26**, 235-243, (2018).
- 53 Villanueva, M. E., Cuestas, M. L., Perez, C. J., Dall'Orto, V. C. & Copello, G. J. Smart release of antimicrobial ZnO nanoplates from a pH-responsive keratin hydrogel. *Journal of Colloid and Interface Science* **536**, 372-380, (2019).
- 54 Zhu, J. *et al.* Biodegradable and pH Sensitive Peptide Based Hydrogel as Controlled Release System for Antibacterial Wound Dressing Application. *Molecules* **23**, 15, (2018).
- 55 Zhou, J. *et al.* Bacteria-responsive intelligent wound dressing: Simultaneous In situ detection and inhibition of bacterial infection for accelerated wound healing. *Biomaterials* **161**, 11-23, (2018).

- 56 Zeynabad, F. B. *et al.* The pH-controlled Multiple-drug delivery by A Novel Antibacterial Nanocomposite for combination therapy. *Rsc Advances* **5**, 105678-105691, (2015).
- 57 Montanari, E. *et al.* Hyaluronan/Tannic Acid Nanoparticles Via Catechol/Boronate Complexation as a Smart Antibacterial System. *Macromolecular Bioscience* **16**, 1815-1823, (2016).
- 58 Sims, K. R. *et al.* Enhanced design and formulation of nanoparticles for anti-biofilm drug delivery. *Nanoscale* **11**, 219-236, (2018).
- 59 Zhu, D. Y. *et al.* Dynamically crosslinked polymer nanocomposites to treat multidrug-resistant bacterial biofilms. *Nanoscale* **10**, 18651-18656, (2018).
- 60 Liu, Z., Zhu, Y., Liu, X., Yeung, K. W. K. & Wu, S. Construction of poly (vinyl alcohol)/poly (lactide-glycolide acid)/vancomycin nanoparticles on titanium for enhancing the surface self-antibacterial activity and cytocompatibility. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **151**, 165-177, (2017).
- 61 Pornpattananangkul, D. *et al.* Bacterial Toxin-Triggered Drug Release from Gold Nanoparticle-Stabilized Liposomes for the Treatment of Bacterial Infection. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 4132-4139, (2011).
- 62 Fraunholz, M. & Sinha, B. Intracellular Staphylococcus aureus: live-in and let die. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2**, (2012).
- 63 Yang, S. *et al.* Bacteria-Targeting Nanoparticles with Microenvironment-Responsive Antibiotic Release To Eliminate Intracellular Staphylococcus aureus and Associated Infection. *ACS Applied Materials & Interfaces* **10**, 14299-14311, (2018).
- 64 Xiong, M.-H. *et al.* Lipase-Sensitive Polymeric Triple-Layered Nanogel for “On-Demand” Drug Delivery. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 4355-4362, (2012).
- 65 Takahashi, N. & Nyvad, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *Journal of Dental Research* **90**, 294-303, (2011).
- 66 Stewart, C. A., Hong, J. H., Hatton, B. D. & Finer, Y. Responsive antimicrobial dental adhesive based on drug-silica co-assembled particles. *Acta Biomaterialia* **76**, 283-294, (2018).
- 67 Nalam, P. C. *et al.* Nanomechanics of pH-Responsive, Drug-Loaded, Bilayered Polymer Grafts. *ACS Applied Materials & Interfaces* **9**, 12936-12948, (2017).
- 68 Lee, H. S., Dastgheyb, S. S., Hickok, N. J., Eckmann, D. M. & Composto, R. J. Targeted release of tobramycin from a pH-responsive grafted bilayer challenged with S. aureus. *Biomacromolecules* **16**, 650-659, (2015).
- 69 Wang, B. *et al.* A self-defensive antibacterial coating acting through the bacteria-triggered release of a hydrophobic antibiotic from layer-by-layer films. *Journal of Materials Chemistry B* **5**, 1498-1506, (2017).

- 70 Chen, H. *et al.* Synthesis of chitosan-based micelles for pH responsive drug release and antibacterial application. *Carbohydrate Polymers* **189**, 65-71, (2018).
- 71 Sutrisno, L. *et al.* Construction of three-dimensional net-like polyelectrolyte multilayered nanostructures onto titanium substrates for combined antibacterial and antioxidant applications. *Journal of Materials Chemistry B* **6**, 5290-5302, (2018).
- 72 Yan, J. *et al.* Endowing polyetheretherketone with synergistic bactericidal effects and improved osteogenic ability. *Acta Biomaterialia* **79**, 216-229, (2018).
- 73 Yan, S. J. *et al.* Nonleaching Bacteria-Responsive Antibacterial Surface Based on a Unique Hierarchical. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**, 24471-24481, (2016).
- 74 Wang, X. H. *et al.* Bacterial adaptability of enzyme and pH dual-responsive surface for infection resistance. *Journal of Materials Chemistry B* **6**, 7710-7718, (2018).
- 75 Cado, G. *et al.* Self-Defensive Biomaterial Coating Against Bacteria and Yeasts: Polysaccharide Multilayer Film with Embedded Antimicrobial Peptide. *Advanced Functional Materials* **23**, 4801-4809, (2013).
- 76 Yao, Q. *et al.* Bacterial infection microenvironment-responsive enzymatically degradable multilayer films for multifunctional antibacterial properties. *Journal of Materials Chemistry B* **5**, 8532-8541, (2017).
- 77 Liu, P. *et al.* Fabrication of enzyme-responsive composite coating for the design of antibacterial surface. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **29**, 160, (2018).
- 78 Xu, Q. *et al.* Bacterial self-defense antibiotics release from organic-inorganic hybrid multilayer films for long-term anti-adhesion and biofilm inhibition properties. *Nanoscale* **9**, 19245-19254, (2017).
- 79 Wang, B. *et al.* Construction of High Drug Loading and Enzymatic Degradable Multilayer Films for Self-Defense Drug Release and Long-Term Biofilm Inhibition. *Biomacromolecules* **19**, 85-93, (2018).
- 80 Francesko, A. *et al.* Bacteria-responsive multilayer coatings comprising polycationic nanospheres for bacteria biofilm prevention on urinary catheters. *Acta Biomaterialia* **33**, 203-212, (2016).





# **Chapitre 2. Matériel et méthodes**



## SOMMAIRE

<b>Chapitre 2. Matériel et méthodes .....</b>	<b>59</b>
2.1. Matériel.....	63
2.1.1. Polyélectrolytes utilisés pour la construction des films.....	63
2.1.2. Composés pour la fabrication du polymère clivable.....	63
2.1.3. Solutions tampons.....	64
2.1.4. Oxydant.....	65
2.1.5. Enzyme.....	65
2.1.6. Agents fixateurs .....	65
2.2. Construction des films multicouches de polyélectrolytes.....	65
2.2.1. Nettoyage du substrat .....	65
2.2.2. Construction des films multicouches.....	66
2.2.3. Les solutions utilisées.....	67
2.3. Tests biologiques.....	67
2.3.1. Tests cellulaires.....	67
2.3.2. Tests microbiologiques.....	70
2.4. Microbalance à cristal de quartz (QCM).....	77
2.4.1. Principe de la technique .....	77
2.4.2. Principe de la microbalance à cristal de quartz avec dissipation (QCM-D) .....	80
2.4.3. Dispositif expérimental.....	81
2.5. Spectroscopie UV-visible .....	82
2.6. Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes.....	83
2.6.1. Principe.....	83
2.6.2. Conditions au transfert d'énergie.....	83
2.6.3. Matériel.....	85
2.6.4. Mesure du FRET.....	86

2.7. Microscopie à épifluorescence .....	88
2.7.1. Principe de la fluorescence .....	88
2.7.2. Principe de la technique .....	89
2.7.3. Utilisation.....	89
2.8. Microscopie confocale à balayage laser.....	90
2.8.1. Principe de la technique .....	90
2.8.2. Utilisation.....	92
2.9. Microscopie électronique à balayage .....	95
2.9.1. Principe de la technique .....	95
2.9.2. Utilisation.....	96
Bibliographie .....	97

## 2.1. Matériel

### 2.1.1. Polyélectrolytes utilisés pour la construction des films

Nom	Acronyme	Variantes	Poids moléculaire (g/mol)	Fournisseur
Poly(L-arginine)	PAR	PAR30 : 30 résidus arginine/chaîne	6 400	Alamanda Polymers, USA
		PAR200 : 200 résidus arginine/chaîne	38 500	
Acide Hyaluronique	HA		111 000	Lifecore Biomedical

Tableau 2.1 : Liste des polyélectrolytes utilisés pour la construction des films multicouches

### 2.1.2. Composés pour la fabrication du polymère clivable

Acronyme	Séquence	Poids moléculaire (g/mol)	Remarque	Fournisseur
PAR30-T-Mal	PAR30-TLRGGEK(Maleimide)	5 598	PAR + Séquence clivable	Pepmic, Chine
PAR10-FRET-Mal	PAR10-K(Dabcyl)TLRGGEE(EDANS)-K(Maleimide)	3 228	PAR + Quencher Dabcyl + Séquence clivable + fluorophore EDANS	
PAR10-FRET-PAR10	PAR10-K(Dabcyl)-TLRGGEK(5/6-FAM)-PAR10	4 620	PAR + Quencher Dabcyl + Séquence clivable + fluorophore 5/6 FAM + PAR	
PAR200SSTP	PAR200C-Thiopyridone	38 700	PAR avec un pont disulfure du côté C-terminal	Alamanda Polymers + modification
PAR30SSTP	PAR30C-Thiopyridone	6 600	PAR avec un pont disulfure du côté C-terminal	par B. Frisch

Tableau 2.2 : Liste des composés utilisés pour la fabrication des polymères clivables

L'acide 2-(pyridin-2-ylidisulfanyl) propionique (PDP) a été préparé conformément aux procédures précédemment publiées.<sup>1</sup> Le spectre <sup>1</sup>H-RMN a été enregistré sur un spectromètre de RMN Bruker Advance DPX400 verrouillé sur le signal principal de chaque solvant de RMN. 140 mg de PAR200 ont été dissous dans 3 ml de tampon Hepes 10 mM (pH 6,5) avec 50 mg d'EDC, 15 mg de sulfo-NHS et 26 mg de PDP. La réaction a été maintenue sous azote et sous agitation magnétique à température ambiante pendant 24 heures. Après élimination des sous-produits par dialyse (seuil de coupure de 3 500 Da) contre 4 x 1 L d'eau déminéralisée, le solvant a été éliminé par lyophilisation. Le poids final était de 135 mg. Le nombre moyen de chaînes pyridine-arginine a été déterminé par <sup>1</sup>H-RMN (spectromètres Bruker DPX 400 MHz) dans D<sub>2</sub>O, en comparant le signal d'intégration à 8,3-7,2 ppm (liaison aromatique de la pyridine) à celui de 4,26 (CH de l'acide aminé d'arginine). L'intégration des pics caractéristiques de la pyridine (liaison aromatique) a montré qu'entre 10 et 20% (en moles) étaient incorporés aux polymères.

### 2.1.3. Solutions tampons

Nom	Composition	Concentration	pH	Utilisation
<b>Tampon phosphate salin (PBS)</b>	Potassium Chloride	0,2 g.L <sup>-1</sup>	7,3	Diluant général
	Potassium Phosphate Monobasic Anhydrous	0,2 g.L <sup>-1</sup>		
	Sodium Chloride	8,0 g.L <sup>-1</sup>		
	Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous	1,15 g.L <sup>-1</sup>		
<b>Tampon TRIS/NaCl</b>	Chlorure de sodium (NaCl)	150 mM	7,4	Dissolution des polyélectrolytes
	TRIS-(hydroxyméthyl-aminométhane) (TRIS)	10 mM		
<b>Tampon NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	100 mM	8,3	Fonctionnalisation des polycations avec un composé fluorescent

Tableau 2.3 : Liste des solutions tampons utilisées

### 2.1.4. Oxydant

Nom	Utilisation	Fournisseur
<b>TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine)</b>	Coupure des ponts disulfures des polymères	Sigma-Aldrich

Tableau 2.4 : Oxydant utilisé pour la fabrication des polymères clivables

### 2.1.5. Enzyme

Nom	Acronyme	Fournisseur
<b>Endoprotéinase GLU-C (sequencing grade)</b>	GluC	Sigma-Aldrich, 11047817001

Tableau 2.5 : Enzyme spécifique de la séquence clivable (TLRGGE)

### 2.1.6. Agents fixateurs

Nom	Solution stock	Concentration finale	Fournisseur
<b>Paraformaldéhyde (PFA)</b>	16%	2% ou 4% en PBS	Electron Microscopy Sciences
<b>Glutaraldéhyde</b>	25%	2,5% en PBS	Electron Microscopy Sciences

Tableau 2.6: Liste des agents utilisés pour fixer les micro-organismes à la surface des revêtements

## 2.2. Construction des films multicouches de polyélectrolytes

### 2.2.1. Nettoyage du substrat

Les films multicouches sont construits sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre (de la marque Knittel Glass). La procédure de nettoyage comporte deux étapes :

- un nettoyage « chimique » : 15 minutes dans une solution de détergent alcalin, l'Hellmanex 2%, 15 minutes dans de l'eau distillée puis 15 minutes dans une

solution d'éthanol 100%, le tout dans un bain à ultrasons. Les lamelles sont ensuite séchées à l'air comprimé.

- un nettoyage « physique » : 15 minutes sous atmosphère à l'état de plasma avec une puissance du radiofréquenceur de 18 W à l'aide d'un appareil Plasma Cleaner PDC-32-G-2 (Harrick Plasma) et d'une pompe IDP-3 (Agilent Technologies).

Le plasma est défini comme un gaz ionisé et est créé en soumettant un gaz à un fort courant électrique. Dans notre cas, le traitement plasma va permettre de nettoyer la surface de notre substrat mais il peut également servir pour modifier la chimie de surface.

### 2.2.2. Construction des films multicouches

La construction des films de polyélectrolytes s'effectue à l'aide d'un bras automatisé (Dipping Robot, Riegler et Kirstein, GmbH Berlin, Allemagne) par trempage successif dans une solution de polycation et de polyanion.

Les lamelles sont disposées dans un portoir (**figure 2.1**), lui-même inséré dans le bras automatisé. Les lamelles vont dans un premier temps être trempées dans une solution tampon TRIS/NaCl puis successivement dans une solution de polycations et de polyanions avec une étape de rinçage entre chaque dépôt de polyélectrolytes. Ce cycle est répété  $n$  fois, où  $n$  correspond au nombre de bicouches déposées. Le temps de trempage dans les solutions de polyélectrolytes est de 5 min par couche. Après construction, les films sont séchés à l'air comprimé et stockés à 4°C à sec jusqu'à utilisation.

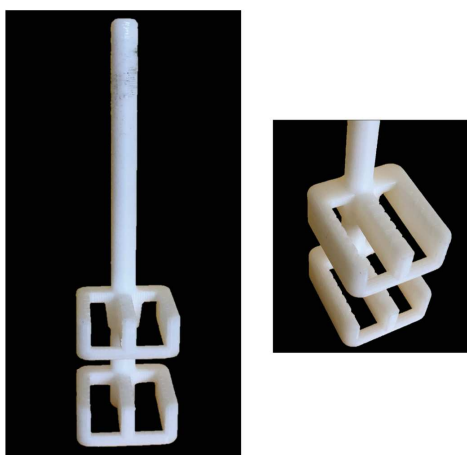


Figure 2.1 : Photographie d'un portoir construit au laboratoire par impression 3D (K. Benmlih) pouvant contenir 22 lamelles de verre de 12 mm.



### **2.2.3. Les solutions utilisées**

Pour la construction des films multicouches, les polycations et les polyanions ont été utilisés à une concentration de 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>. Ils sont dissouts dans une solution tampon de trishydroxyméthylaminométhane (TRIS)/Chlorure de sodium (NaCl) (10 mM/150 mM) dont le pH est ajusté à 7,4. Cette solution tampon est filtrée avec une membrane dont les pores ont un diamètre de 0,22 µm.

## **2.3. Tests biologiques**

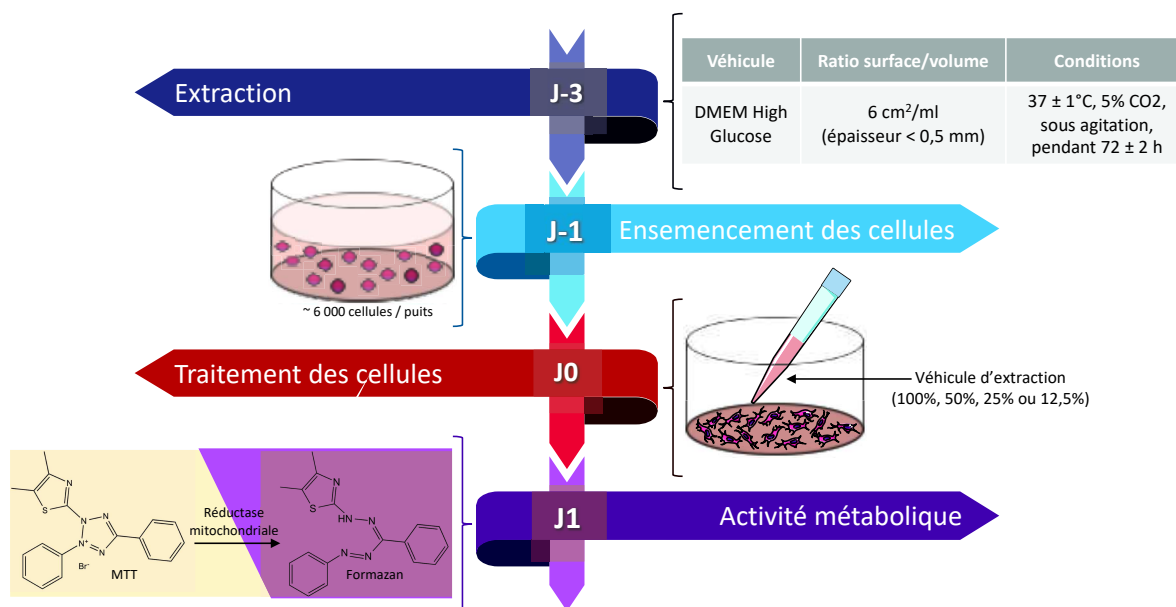
### **2.3.1. Tests cellulaires**

#### **2.3.1.1. Lignée et milieux utilisés**

Pour évaluer la cytotoxicité de nos revêtements, nous avons utilisé des fibroblastes de souris NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™). Elles sont cultivées dans le milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's medium High Glucose (DMEMHg, Dutscher) avec 4,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose, de la glutamine stable et du sodium pyruvate supplémenté de sérum de veau fœtal (SVF, Dutscher) 10% à 37 ± 1 °C avec 5 ± 1 % de CO<sub>2</sub>. Les antibiotiques pénicilline et streptomycine (100X, Dutscher) à 1% (v/v) sont ajoutés au milieu pour limiter le risque de contaminations bactériennes durant les expériences. L'incubateur utilisé pour la culture cellulaire est réglé à 37 °C et équipé d'une arrivée de CO<sub>2</sub> et d'un bac d'eau pour obtenir une atmosphère humide maintenue à 5% de CO<sub>2</sub>

#### **2.3.1.2. Tests de cytotoxicité à partir d'extraits**

Les protocoles suivis pour les tests de cytotoxicité à partir d'extraits ont été établis suivant les normes ISO 10993-5 et 10993-12. Cette méthode à partir d'extraits permet d'évaluer l'effet de la libération des éléments du revêtements sur la viabilité cellulaire. La cytotoxicité des échantillons a été évaluée par quantification de l'activité métabolique des cellules après 24h d'incubation avec le véhicule d'extraction (**figure 2.2**). Chaque condition est réalisée en triplicat.



**Figure 2.2** : Schéma des étapes de la réalisation du test de cytotoxicité à partir d'extraits. Les échantillons sont placés pendant 72 h dans du milieu de culture, à 37°C et sous agitation. Ce véhicule d'extraction sera ensuite dilué et mis au contact d'une monocouche cellulaire sous-confluente (J0). 24 heures plus tard, l'activité métabolique des cellules est quantifiée par un test MTT. Ce dernier est un test colorimétrique qui se traduit par la réduction de MTT en formazan par une enzyme mitochondriale. Après 3h d'incubation, la solution de MTT est éliminée et les cristaux de formazan sont dissous à l'aide d'une solution de DMSO. L'absorbance est alors lue à 556 nm.

### **J-3 – Extraction :**

Selon la norme ISO 10993-12, le ratio surface/volume doit être de 6 cm<sup>2</sup>.mL<sup>-1</sup> pour un échantillon dont l'épaisseur est inférieure à 0,5 mm. Nous avons utilisé comme véhicule d'extraction le milieu DMEMhg. La plaque contenant le véhicule d'extraction est mise sous agitation et incubée pendant 72 ± 2 h.

### **J-1 – Ensemencement des cellules :**

Pour réaliser l'ensemencement des cellules dans une plaque 96 puits, nous sommes partis d'une culture de NIH/3T3. Afin d'avoir une monocouche sous-confluente à J0, nous avons ensemencé 5 000 cellules/puits dans une plaque 96 puits avec un volume de 100 µL. Les cellules sont, à cette étape, cultivées dans un milieu DMEMhg supplémenté en SVF 10 % (v/v). La plaque ensemencée est incubée pendant 24 h.

### ***J0 – Traitement des cellules :***

Avant de faire le traitement, les cellules sont observées au microscope optique pour s'assurer de l'absence d'un éventuel problème de croissance ou de morphologie cellulaire. Les extraits réalisés sur les échantillons sont testés aux dilutions suivantes : 100%, 50%, 25% et 12,5% (v/v). Les 100 µL de milieu de culture de la plaque 96 puits sont éliminés et remplacés par 100 µL des différentes dilutions de l'extrait. Chaque dilution est testée en triplicat. Deux contrôles sont également réalisés :

- Contrôle de la croissance cellulaire (contrôle positif) : il nous permet d'avoir une référence de croissance pour le test MTT et pour les observations morphologiques. Ce sont des cellules non-traitées incubées dans du milieu de culture.
- Contrôle négatif de la viabilité cellulaire (contrôle négatif) : il nous permet d'avoir une référence de mortalité pour le test MTT et pour les observations morphologiques. Ce sont des cellules traitées avec 20% de dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich).

La plaque est incubée pendant  $24 \pm 1$  h.

### ***J1 – Mesure de l'activité métabolique :***

Les cellules sont de nouveau observées au microscope afin d'identifier les morphologies cellulaires et les corrélérer au test MTT. Le surnageant est éliminé des puits et est remplacé par 100 µL d'une solution de MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma Aldrich) à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . La plaque est alors incubée pendant au moins 2 h. Les cellules sont observées au microscope afin de vérifier la mortalité de toutes les cellules et la formation de cristaux dans le contrôle de croissance. La solution de MTT est éliminée et remplacée par 80 µL d'une solution de DMSO. Cette étape permet la dissolution des cristaux de formazan et l'obtention d'une solution colorée. L'absorbance des puits est mesurée par le lecteur de plaque / spectrofluorimètre Xenius XC (SAFAS, Monaco) à une longueur d'onde de 556 nm après agitation de la plaque. Nous procédons ensuite au calcul du pourcentage de viabilité cellulaire de chaque condition. Pour cela, nous utilisons la formule suivante :

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{DO \text{ échantillon} - DO \text{ blanc}}{DO \text{ contrôle positif} - DO \text{ blanc}} \times 100$$

Le zéro d'absorbance (DO blanc) correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance des puits contenant uniquement du DMSO.

## 2.3.2. Tests microbiologiques

### 2.3.2.1. Les milieux de culture

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires microscopiques et ont par conséquent des besoins nutritifs. Le milieu utilisé pour la culture bactérienne, qu'il soit solide ou liquide, doit permettre au micro-organisme de se multiplier. Pour cela, le milieu doit :

- couvrir les besoins nutritionnels (source de carbone, source d'énergie ...),
- avoir un pH proche du pH optimal de croissance,
- présenter une force ionique optimale.

On distingue généralement deux types de milieux de culture : les milieux dits synthétiques, dont la composition exacte est connue, qualitativement et quantitativement ; et les milieux complexes, nommés aussi bouillons, qui sont les plus utilisés aujourd'hui mais ont une composition approximative (extrait de viande, peptones, sucres ...).

Le milieu utilisé pour cultiver les différentes bactéries de cette étude est dénommé Mueller-Hinton Broth (MHB) non supplémenté, dont la composition est présentée dans le **tableau 2.7**. C'est un milieu relativement riche mais qui reste un milieu de base pour la culture des bactéries non exigeantes. Il est couramment utilisé pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques. Le choix des ingrédients de ce milieu est déterminé de façon à obtenir une très faible quantité de thymine, de thymidine, d'acide paraaminobenzoïque et de ses analogues de structure qui sont des antagonistes de certaines molécules antibactériennes. L'amidon présent dans le milieu va agir comme détoxifiant en absorbant les substances toxiques produites par les bactéries présentes dans le milieu.

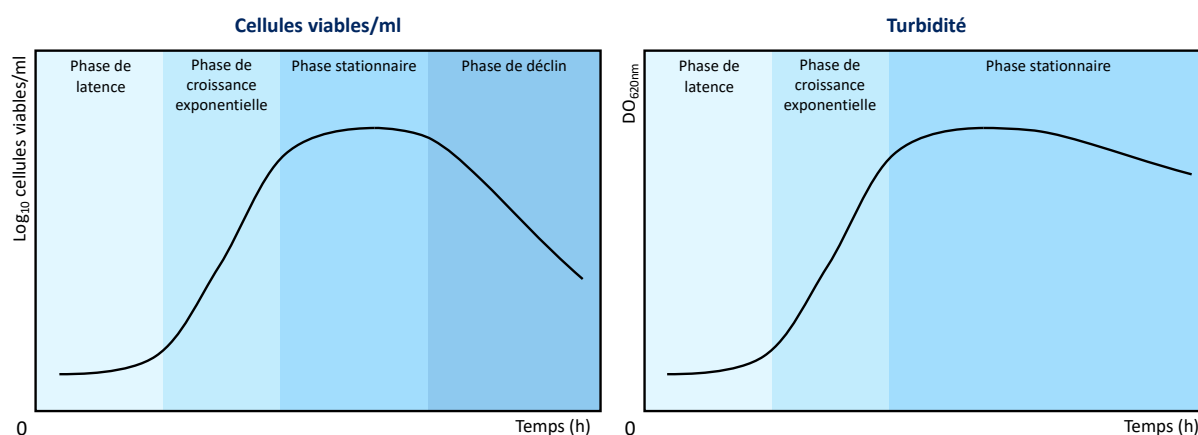
Composants	Concentration (g.L <sup>-1</sup> )
Caséine	17,5
Infusion solide de bœuf	2
Amidon	1,5

**Tableau 2.7 :** Composition du milieu Mueller-Hinton Broth (MHB).

En ajoutant de l'agar à la composition du milieu MHB, nous obtenons un milieu solide permettant de faire des isolements en boîte de Petri.

### 2.3.2.2. La croissance bactérienne

La courbe de croissance d'un micro-organisme dans un milieu fini peut être tracée grâce à la mesure directe de la concentration cellulaire par turbidimétrie ou par dénombrement de colonies sur milieu solide (**figure 2.3**). La turbidimétrie est une mesure spectroscopique de la diffusion de la lumière par la suspension étudiée. Cette méthode suppose cependant que le volume et la morphologie des cellules varient peu au cours de la croissance. Le dénombrement sur boîte de Pétri ne tient compte que des bactéries viables. En effet, après étalement de la suspension bactérienne, seules les bactéries viables formeront une colonie sur le milieu gélosé. Le dénombrement de ces colonies permet de faire une estimation de la concentration bactérienne.



**Figure 2.3 :** Courbe de croissance bactérienne représentée en coordonnées semi-logarithmiques

La courbe de croissance bactérienne peut être divisée en plusieurs phases :

- La phase de latence : la courbe est parallèle à l'axe des abscisses, on y retrouve une concentration constante. Elle correspond à une phase d'adaptation enzymatique.
- La phase de croissance exponentielle : la vitesse de croissance est maximale et constante durant cette phase.
- La phase stationnaire : les nutriments commencent à se faire rares, les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.
- La phase de déclin : les nutriments sont épuisés et les composés toxiques s'accumulent, il y a une forte lyse cellulaire.

Les isolements en boîte de Petri, vont permettre de réaliser les pré-cultures en prélevant une colonie isolée sur la gélose et en l'ensemencement dans le milieu MHB liquide. Le flacon est alors incubé à 37 °C sous agitation pour permettre l'oxygénation de la culture et d'obtenir, après une nuit, une culture de cellules « jeunes ». Cette étape permet la préparation de la pré-culture. Après 12 heures d'incubation, on procède à une dilution de cette pré-culture afin de redémarrer un cycle de croissance et de normaliser la concentration bactérienne à chaque début d'expérience.

### **2.3.2.3. Les souches bactériennes**

*Staphylococcus aureus* est une bactérie à coloration de Gram positive en forme de coque et aérobic facultative. Cette bactérie est retrouvée de façon commensale sur plus de la moitié des personnes adultes au niveau de la peau et des muqueuses<sup>2</sup> mais elle est également la deuxième espèce, derrière *Escherichia coli*, causant le plus d'infections nosocomiales<sup>3</sup>. C'est une espèce capable de former des biofilms sur différents tissus mais aussi sur la surface de matériaux implantés (cathéters, prothèses orthopédiques, défibrillateurs ...)<sup>4</sup>. C'est une des bactéries pathogènes les plus polyvalentes notamment dû au fait qu'elle a la faculté d'exprimer un grand nombre de facteurs de virulence. Parmi ces facteurs de virulence on peut compter les protéases extracellulaires. Elles sont au

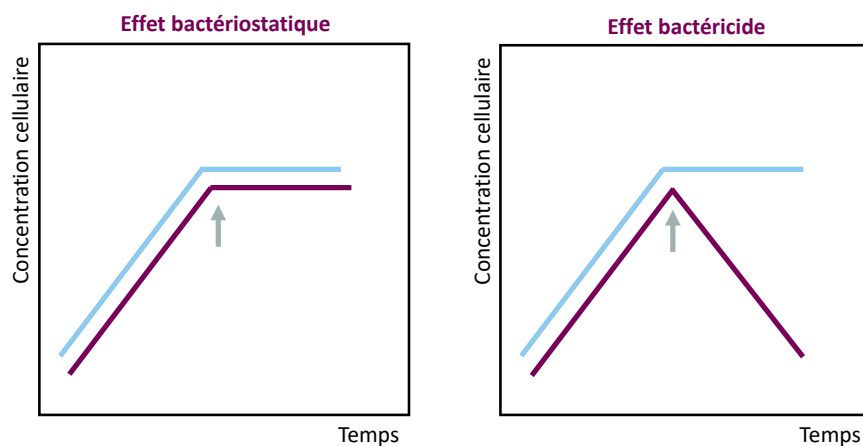
nombre de dix chez cette espèce et vont permettre une meilleure acquisition des nutriments et une protection contre les peptides antimicrobiens<sup>5</sup>.

Parmi ces protéases extracellulaires, une nous intéresse particulièrement : la glutamyl endopeptidase (GluC), également nommée protéase V8, qui est une protéase à sérine codée par le gène *sspA*. Elle est exprimée chez toutes les souches de *S. aureus* mais est surexprimée chez la souche *S. aureus* V8. Cette protéase est positivement régulée par *agr* (accessory gene regulator), qui est un régulateur global dépendant de la concentration cellulaire. En fin de phase exponentielle, il va réprimer les gènes de la synthèse de la paroi cellulaire et activer ceux des protéines extracellulaires<sup>6</sup>.

#### 2.3.2.4. Activité antibactérienne des peptides

L'activité des agents antimicrobiens peut se traduire par deux niveaux d'effets sur les cellules cibles (**figure 2.4**) :

- L'effet bactériostatique correspond à un blocage de la croissance bactérienne. Les cellules sont toujours viables mais elles ne se divisent plus.
- L'effet bactéricide provoque la mort cellulaire.



**Figure 2.4 :** Effet de l'ajout d'un agent antimicrobien (flèche grise) sur la croissance bactérienne (en bleu, le nombre total de cellules, en rouge, le nombre de cellules viables).

Afin d'évaluer la sensibilité d'une souche bactérienne à nos différents peptides, deux techniques classiques sont utilisées : la détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et la détermination de la CMB (Concentration Minimale Bactéricide). La détermination de ces deux valeurs va nous permettre de conclure sur l'effet bactériostatique ou bactéricide de notre molécule testée. En effet, on dit qu'une molécule est bactéricide si la CMB est au maximum 4 fois supérieure à la CMI de cette même molécule.<sup>7</sup>

### **2.3.2.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La CMI est par définition la quantité minimale qu'il faut pour inhiber la croissance bactérienne après 18 heures de culture à 37°C. La détermination de cette concentration va nous donner des informations sur le caractère bactériostatique d'un agent antimicrobien.

Afin de déterminer cette valeur, nous mettons au contact, dans une plaque 96 puits, une gamme de concentration de nos peptides avec une suspension bactérienne des souches à tester. Le volume total de chaque puits est de 100 µL et la concentration bactérienne au début de l'expérience correspond à une  $DO_{620nm}$  équivalente à 0,001. Au bout de 18h d'incubation à 37°C sous agitation, nous mesurons la  $DO_{620nm}$  et nous calculons le pourcentage de croissance bactérienne pour chaque concentration de la manière suivante :

$$croissance\ bactérienne\ (\%) = \left( \frac{DO_{620nm}\ échantillon - DO_{620nm}\ milieu}{DO_{620nm}\ contrôle\ négatif - DO_{620nm}\ milieu} \right) \times 100$$

Le contrôle positif est composé à 90% de suspension bactérienne et de 10% d'un mélange d'antibiotiques (tétracycline : 10 µg.mL<sup>-1</sup> et céfotaxime : 0.1 µg.mL<sup>-1</sup> en PBS). Le contrôle négatif est composé de 90% de la suspension bactérienne et de 10% de PBS et correspond à notre 100% de croissance.

La plus petite concentration pour laquelle la croissance bactérienne est de 0% correspond à la CMI du peptide testé. Afin de déterminer la CMB, les 3 plus grandes concentrations pour lesquelles il n'y a pas de croissance observée sont étalées sur milieu



MH gélosé et incubées pendant 24 h. Après 24 h, le nombre de colonies visibles sur la gélose sont comptées et la CMB correspond à la concentration pour laquelle aucune colonie n'est visible.

### **2.3.2.6. Évaluation de l'activité antibactérienne des films multicouches**

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne de nos surfaces, nous avons préalablement stérilisé aux UV pendant 15 min les lamelles de verre recouvertes des films multicouches ainsi que des lamelles de verre nues, celles-ci nous servant de contrôle pour la suite. Les lamelles de verre sont ensuite disposées dans des plaques 24 puits et immergées dans une suspension bactérienne de  $DO=0.001$ . Sur une plaque nous avons 4 conditions :

- Le contrôle de stérilité : une lamelle de verre nue incubée avec du milieu de culture stérile ;
- Le contrôle négatif : une lamelle de verre nue incubée avec 90% de la suspension bactérienne et 10% de milieu de culture ;
- Le contrôle positif : une lamelle de verre nue incubée avec 90% de la suspension bactérienne et 10% d'une solution d'antibiotiques (tétracycline :  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  et céfotaxime :  $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ;
- Les échantillons à tester : lamelle de verre recouverte du film multicouche et incubée avec 90% de suspension bactérienne et 10% de milieu de culture.

Chacune de ces conditions est réalisée en triplicat. La plaque est ensuite incubée à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation pendant 24 heures. A la fin de l'incubation deux paramètres sont évalués : la croissance bactérienne dans le surnageant et à la surface des lamelles.

#### **2.3.2.6.1. Croissance bactérienne dans le surnageant**

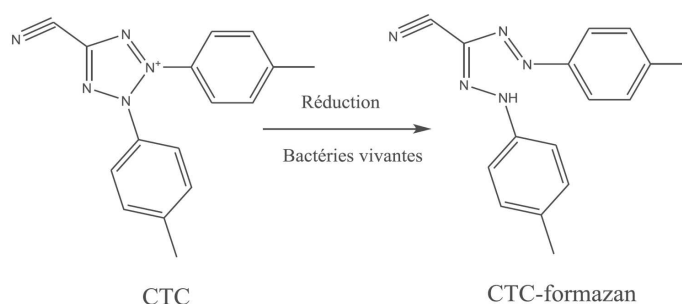
À la fin du temps d'incubation, le surnageant est transféré dans une plaque 96 puits. Pour un puits de la plaque 24 puits, nous transférons 3 fois  $90 \mu\text{L}$  dans 3 puits de la plaque 96 puits. Nous avons ainsi 9 puits de la plaque 96 puits par condition (3 expériences mesurées 3 fois chacune). La plaque 96 puits est insérée dans un lecteur de

plaque et l'absorbance à 620 nm est déterminée. Le pourcentage de croissance dans le surnageant des différentes conditions est calculé selon la même méthode que pour la détermination de la CMI expliquée ci-dessus.

### 2.3.2.6.2. Croissance bactérienne à la surface

Afin d'évaluer la viabilité des bactéries présentes à la surface des lamelles, nous avons utilisé le kit Baclight™ RedoxSensor CTC Viability Kit™ (Thermo Fischer Scientific, France). Ce kit contient deux composés :

- le SYTO 24™ : il pénètre les membranes bactériennes et va se fixer sur les acides nucléiques. Les longueurs d'ondes d'excitation / émission sont 490 / 515 nm (émission dans le vert) ;
- le 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) : il est réduit en précipité fluorescent, le CTC-formazan (**figure 2.5**), lorsque la bactérie est active métaboliquement. Les bactéries mortes ou avec une très faible activité respiratoire ne réduisent pas le CTC, et par conséquent ne produiront pas de précipité fluorescent. Il sert donc à évaluer l'activité respiratoire des bactéries présentes. Les longueurs d'ondes d'excitation / émission sont 450 / 630 nm (émission dans le rouge).



**Figure 2.5 :** Mécanisme de réduction du CTC par le pouvoir respiratoire bactérien.

Les lamelles de verre préalablement incubées avec la suspension bactérienne sont lavées 2 fois avec du PBS et incubées avec 10% du mélange SYTO 24™ / CTC (2 μM / 50 mM) et 90% de PBS pendant 30 min. Les lamelles sont de nouveau lavées au PBS et les

bactéries sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% en PBS pendant 15 min.

Les lamelles sont ensuite observées au microscope confocal avec un objectif x60 à huile. Les longueurs d'onde d'excitation/émission utilisées au microscope confocal sont 450/630 nm pour le CTC et 490/515 nm pour le SYTO 24™. Ainsi, une bactérie qui apparaît avec une coloration verte et une coloration rouge est une bactérie active métabolique, alors qu'une bactérie apparaissant uniquement en verte est une bactérie très peu active voire morte.

## 2.4. Microbalance à cristal de quartz (QCM)

### 2.4.1. Principe de la technique

La technique de microbalance à cristal de quartz (QCM) permet de transformer une variation de masse en une variation de fréquence facilement mesurable. Le principe de la QCM est basé sur la nature piézo-électrique du quartz. En effet, sous l'application d'une différence de potentiel électrique, le quartz va se déformer et inversement, une contrainte mécanique engendre l'apparition d'une polarisation à ses bords. Le cristal utilisé est composé d'un disque de quartz de 0,3 mm d'épaisseur (**figure 2.6**), entouré par deux électrodes en or, dont l'une d'entre elles est recouverte d'une couche de silice (air de dépôt).

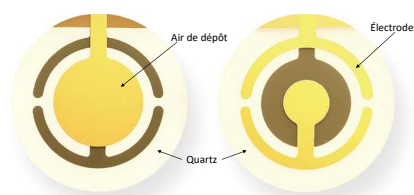


Figure 2.6 : Cristal de QCM

L'application d'une différence de potentiel entre les deux électrodes crée un champ électrique dans le quartz induisant un mouvement de cisaillement, les deux surfaces du cristal oscillant dans des directions opposées<sup>8</sup>. La longueur d'onde de cisaillement  $\lambda$  vaut

$2d$ , où  $d$  est l'épaisseur du cristal (**figure 2.7**). L'épaisseur du cristal définit donc la longueur d'onde de cisaillement du cristal de quartz.

La fréquence de résonance  $f_r$  est la fréquence d'excitation pour laquelle l'amplitude d'oscillation du cristal est maximale. Cette fréquence est un paramètre spécifique du cristal de quartz, c'est la valeur suivie au cours d'une expérience. La fréquence  $f_r$  d'un cristal nu est égale à :

$$f_r = \frac{c}{\lambda} \quad \text{où} \quad c = \sqrt{\frac{G}{\rho}}$$

avec  $c$  la vitesse de l'onde de cisaillement,  $G$  le module élastique de cisaillement du cristal de quartz et  $\rho$  la densité du quartz.

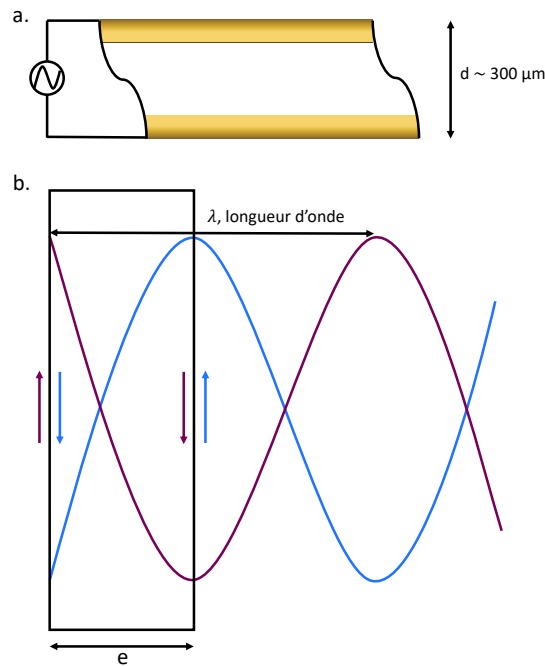


Figure 2.7 : a. Représentation schématique du cristal de quartz excité électriquement. Les deux faces bougent dans des sens opposés. b. Les deux faces du cristal oscillent dans des sens opposés de manière alternative. La longueur d'onde de cisaillement vaut  $2e$ .

Un cristal de quartz peut être excité à différentes harmoniques, c'est-à-dire à de multiples  $n$  de la fréquence de résonance. On a alors :

$$\lambda = \frac{2d}{n}$$

Pour que les faces du cristal se déplacent dans des sens opposés, il est impératif que  $n$  soit impair. Dans ce cas, la fréquence pour une harmonique de rang  $n$  ( $f_n$ ) vaut :

$$f_n = \frac{n}{2d} \sqrt{\frac{G}{\rho}}$$

Si un film d'épaisseur  $\Delta d$  se dépose sur une des surfaces du cristal, la longueur d'onde et la fréquence de résonance sont modifiées. La fréquence de résonance avec un dépôt d'épaisseur  $\Delta d$  est notée  $f_{\Delta d}$  et vaut :

$$f_{\Delta d} = \frac{n}{2(d + \Delta d)} \sqrt{\frac{G}{\rho}}$$

Si l'on suppose que  $\Delta d$  est négligeable par rapport à  $d$  et que la densité et le module de cisaillement du cristal ne sont pas modifiés par le dépôt, alors :

$$\frac{\Delta f}{f_n} = -\frac{\Delta d}{d}$$

avec  $\Delta f = f_{\Delta d} - f_n$ . Le dépôt d'une masse à la surface du cristal de quartz entraîne ainsi une diminution de la fréquence de résonance du quartz.

Pour pouvoir calculer la masse déposée à la surface du cristal de quartz, on multiplie cette équation par la densité et l'air du cristal et on obtient l'équation établie par Sauerbrey en 1959<sup>9</sup> :

$$\frac{\Delta f}{n} = -\frac{m_{film}}{C}$$

$m_{film}$  est la masse surfacique du film déposé à la surface du cristal de quartz et  $C$  la constante de Sauerbrey. Cette constante  $C$  vaut pour les cristaux ayant une fréquence de résonance de 5 MHz : 17.7 ng.cm<sup>2</sup>.Hz. La QCM mesure ainsi la variation de fréquence de résonance qu'engendre un dépôt de matériau à la surface du cristal de quartz. Elle permet de déduire la masse déposée par unité de surface avec une précision proche de 1 ng.cm<sup>-2</sup>.

## 2.4.2. Principe de la microbalance à cristal de quartz avec dissipation (QCM-D)

Dans la relation proposée par Sauerbrey, la couche déposée est présumée avoir les mêmes propriétés mécaniques que le substrat puisqu'on suppose que la densité et le module de cisaillement du cristal ne sont pas modifiés par le dépôt. Cette relation est donc valable uniquement pour des films fins, rigides et uniformes. A partir des années 1980, cette technique a été étendue à la mesure de l'épaisseur et des propriétés viscoélastiques d'un film dans un environnement liquide par ajout de la mesure d'un paramètre supplémentaire : la dissipation<sup>10</sup>. Elle permet de mesurer l'amortissement des vibrations dû à la dissipation de l'énergie dans le film déposé et le liquide environnant (**figure 2.8**).

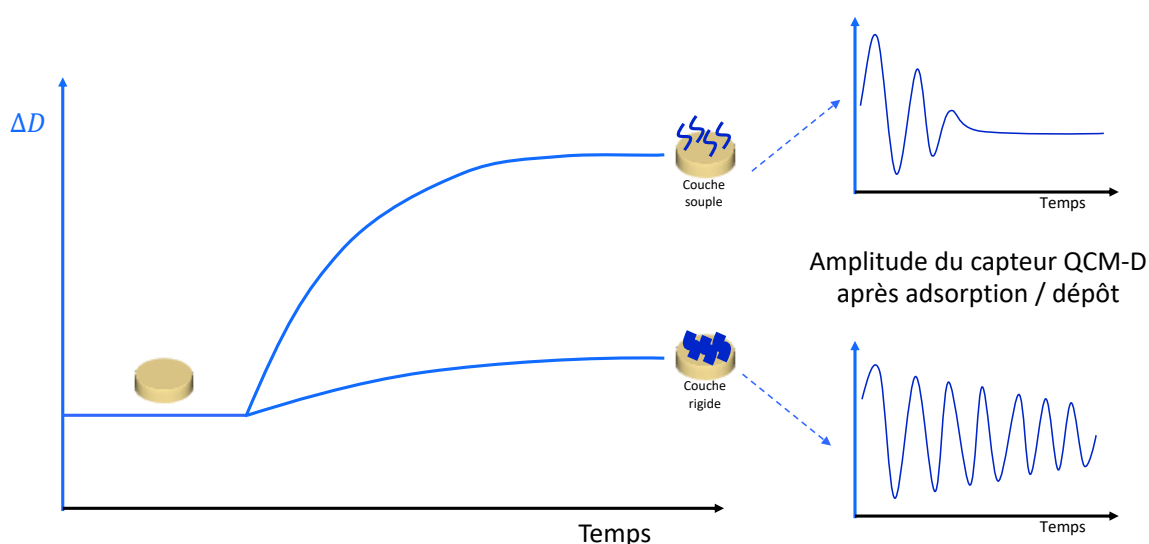


Figure 2.8 : Illustration des expériences de QCM-D. Si la substance déposée forme une couche rigide à la surface du cristal de QCM (partie inférieure de la figure), l'amplitude de l'oscillation du cristal va diminuer lentement. Dans le cas où la substance adsorbée forme une couche souple (partie supérieure de la figure), l'amplitude d'oscillation décroît rapidement en raison de la perte d'énergie élevée dans le film viscoélastique.

C'est seulement en 1999 que Voinova *et al.*<sup>11</sup> développent un modèle permettant de lier les caractéristiques physiques d'un film hydraté d'une part et les fréquences de résonance ainsi que les dissipations d'autre part.

### 2.4.3. Dispositif expérimental

L'appareil utilisé pour ces travaux de thèse de type QCM-D E1 provient de la société QSense (Göteborg, Suède). Il est composé d'une cellule contenant le cristal de quartz, une enceinte de mesure thermostatée, une pompe péristaltique permettant l'injection d'un liquide avec un débit contrôlé et une unité électronique interfacée avec un ordinateur (figure 2.9).

Les cristaux utilisés (QSX 301, QSense) sont des cristaux de quartz recouverts d'or et d'une couche de dioxyde de silicium ( $\text{SiO}_2$ ) de fréquence de résonance fondamentale approchant 5 MHz.

Un générateur électrique excite le cristal avec une tension de fréquence proche de la fréquence de résonance (et successivement des 3<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> harmoniques) pendant un temps bref, de l'ordre de la  $\mu\text{s}$ . Le générateur électrique est alors coupé et le cristal oscille ensuite librement. Les oscillations mécaniques engendrent alors des oscillations électriques aux bords du cristal qui sont analysées pour suivre le changement de fréquence de résonance ainsi que l'amortissement (dissipation).

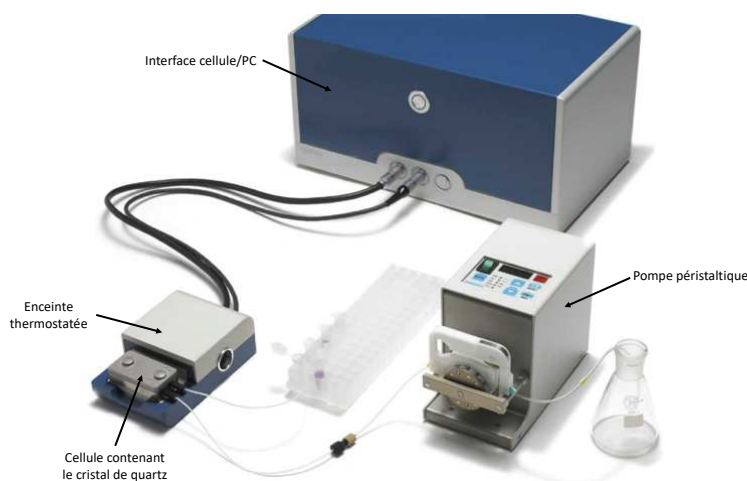


Figure 2.9 : Dispositif expérimental QCM-D

Avant chaque expérience, le cristal est nettoyé dans une solution d'Hellmanex (2% v/v), rincé à l'eau puis dans une solution d'éthanol 100% et enfin séché. Le cristal est ensuite nettoyé au plasma cleaner. Il est ensuite inséré dans la cellule. La construction *in*

*situ* des films multicouches se fait par injection de 400  $\mu\text{l}$  à un débit de 250  $\mu\text{l}/\text{min}$  du composé chimique. Entre chaque couche du film, un lavage avec le tampon TRIS/NaCl est réalisé pendant 5 min à débit constant.

## 2.5. Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie est l'étude du spectre électromagnétique d'un phénomène. Elle est largement utilisée et classée en différents types suivant la grandeur physique mesurée ou le processus de la mesure. C'est la longueur d'onde qui va définir le type de spectroscopie.

Le rayonnement magnétique est une forme d'énergie constituée d'ondes. Bien qu'il y ait une continuité totale dans les valeurs de longueurs d'onde, on distingue arbitrairement des domaines particuliers de rayonnements électromagnétiques (**figure 2.10**)

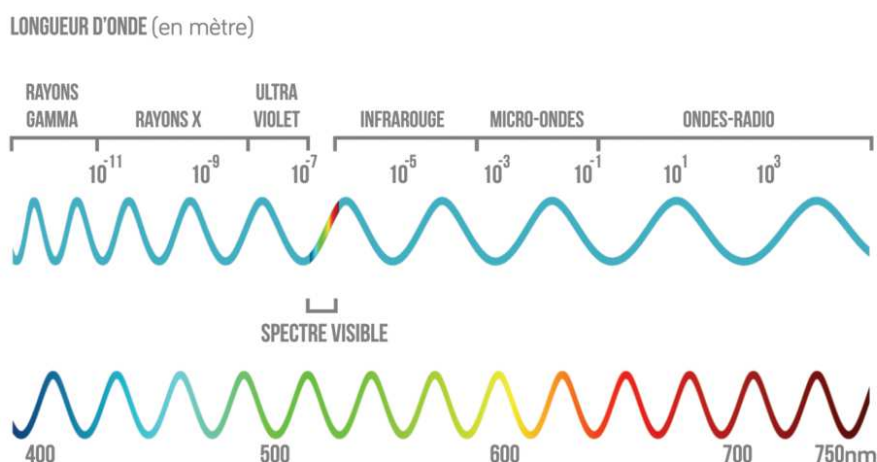


Figure 2.10 : Représentation schématique des différents domaines de rayonnements électromagnétiques ([www.schoolmove.fr](http://www.schoolmove.fr))

La spectroscopie UV-visible utilise des longueurs d'ondes dans le domaine proche ultra-violet (UV) entre 180 et 400 nm, dans le domaine du visible entre 400 et 750 nm et dans le domaine du très proche infra-rouge entre 750 et 900 nm.

Pour effectuer ces mesures, nous avons utilisé le spectrofluorimètre le Xenius XC (SAFAS, Monaco). Cet appareil permet de travailler sur une large plage spectrale à



l'excitation et à l'émission allant de 200 nm à 1000 nm. Il permet la lecture en plaque ou en cuve. L'utilisation de cet appareil apparait dans plusieurs expériences, notamment pour la mesure de l'absorbance du test MTT.

## **2.6. Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes**

### **2.6.1. Principe**

Le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), a été décrit pour la première fois par le scientifique allemand Theodor Förster en 1948 <sup>12</sup>. Il s'agit d'un phénomène de transfert d'énergie par interaction dipôle-dipôle entre deux molécules fluorescentes. Il nécessite une compatibilité énergétique des deux molécules.

Le principe est simple : une molécule appelée donneur, excitée par une certaine longueur d'onde, va se désexciter par fluorescence et transférer son énergie de façon non-radiative à une molécule : l'accepteur. Ce dernier passe à l'état excité et se désexcite à son tour par émission de fluorescence. Nous allons donc capter l'émission de fluorescence de l'accepteur et non du donneur. C'est le mécanisme principal de transfert d'énergie entre des émetteurs à distance nanométrique.

En raison de sa sensibilité à la distance entre le donneur et l'accepteur, le FRET est notamment utilisé pour étudier les phénomènes d'interactions moléculaires et trouve des applications dans de nombreux domaines comme celui de l'agroalimentaire <sup>13</sup> et de la pharmacutique <sup>14</sup>.

### **2.6.2. Conditions au transfert d'énergie**

#### **2.6.2.1. Distance entre les molécules**

La théorie de Förster montre que l'efficacité de FRET ( $E_{FRET}$ ) dépend de la distance séparant les deux molécules ( $r$ ) :

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

où  $R_0$  est le rayon de Förster. Ce dernier, correspond à la distance caractéristique pour laquelle l'efficacité de transfert est de 50%. Cela signifie que lorsque la distance donneur-accepteur est égale au rayon de Förster, la probabilité pour que le donneur se désexcite par transfert d'énergie non radiatif sur l'accepteur est de 50 %. Cette probabilité de désexcitation augmente en faveur du transfert d'énergie lorsque la distance entre les fluorophores donneur et accepteur diminue. Cette distance doit être comprise entre 10 et 60 Å<sup>15</sup>. Le rayon de Förster peut être calculé pour toute paire de molécules fluorescentes par l'équation suivante :

$$R_0 = [10^{-3} \kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)]^{\frac{1}{6}} * 9730$$

où  $\kappa^2$  représente l'angle entre les deux dipôles fluorophores,  $n$  l'indice de réfraction du milieu,  $Q_D$  le rendement quantique du donneur en absence d'accepteur et  $J$  l'intégrale de recouvrement.

### 2.6.2.2. Recouvrement spectral

La distance entre les deux molécules n'est pas la seule condition pour le transfert d'énergie. Les deux molécules doivent être compatibles d'un point de vue énergétique. Pour que l'énergie du donneur soit transférée à l'accepteur, il faut qu'il y ait un recouvrement entre le spectre d'absorption de l'accepteur et le spectre d'émission du donneur (**figure 2.11**). C'est-à-dire que l'énergie de fluorescence du donneur corresponde à l'énergie d'absorption de l'accepteur. Ce recouvrement est défini par une intégrale de recouvrement  $J(\lambda)$  directement proportionnelle à l'efficacité du FRET :

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

où  $F_D$  est l'intensité de fluorescence du donneur à une longueur d'onde donnée,  $\epsilon_a$  le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur.

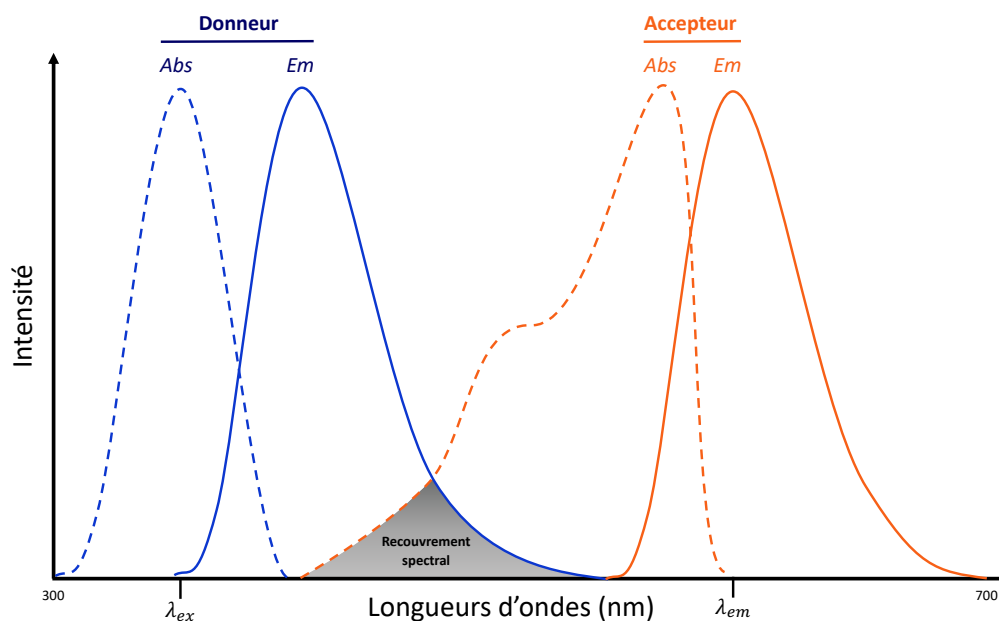


Figure 2.11 : Recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur (zone grisée). Ce recouvrement est défini par l'intégrale de recouvrement  $J$ .

### 2.6.3. Matériel

Pour l'étude du FRET nous avons utilisé 2 couples donneur/accepteur : EDANS/DABCYL et 5(6)-FAM/DABCYL.

- L'acide 5-((2-Aminoéthyl)amino)naphthalène-1-sulfonique (EDANS) est une molécule donneuse d'énergie. Les longueurs d'ondes d'excitation/émission au spectromètre sont :  $\lambda_{ex} = 360nm$  ;  $\lambda_{em} = 495 nm$ .
- La 5(6)-Carboxyfluorésceine (5(6)-FAM) est une molécule donneuse d'énergie. Les longueurs d'ondes d'excitation/émission au spectromètre sont :  $\lambda_{ex} = 495nm$  ;  $\lambda_{em} = 520 nm$ .
- L'acide 4-((4-(diméthylamino)phényl)azo)benzoïque (DABCYL) est l'accepteur d'énergie. Il absorbe les longueurs d'ondes situées entre 400 et 500 nm. L'avantage de cette molécule est qu'elle n'émet pas de fluorescence.

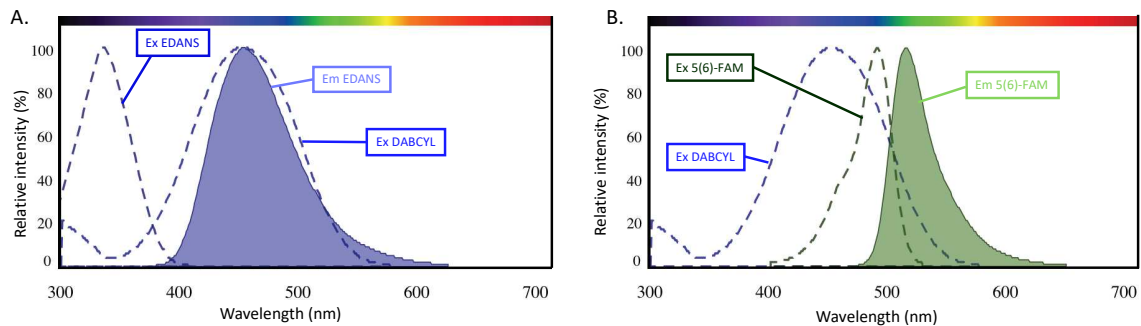


Figure 2.12 : Spectre d'excitation/émission des couples FRET. (A.) couple EDANS/DABCYL ; (B.) couple 5(6)-FAM/DABCYL. Image courtesy AAT Bioquest, Inc. (<https://www.aatbio.com>)

#### 2.6.4. Mesure du FRET

Pour mettre en évidence le FRET, nous avons utilisé deux méthodes différentes : la spectroscopie de fluorescence et la microscopie de fluorescence. La spectroscopie a été utilisée dans le cadre des mesures de FRET en solution alors que la microscopie a été préférée pour les mesures de FRET au sein de nos revêtements. Le principe reste le même, puisque dans les deux méthodes c'est l'intensité de fluorescence récupérée qui témoigne du transfert d'énergie.

Le but de ces expériences de FRET a été de montrer le clivage de la séquence clivable du peptide synthétisé par l'enzyme glutamyl endopeptidase V8 (GluC). Lorsque le peptide est sous forme « non clivé » nous ne détecterons aucune émission de fluorescence. En revanche, lorsque ce dernier est clivé, nous récupérons un fort signal de fluorescence (**figure 2.13**).

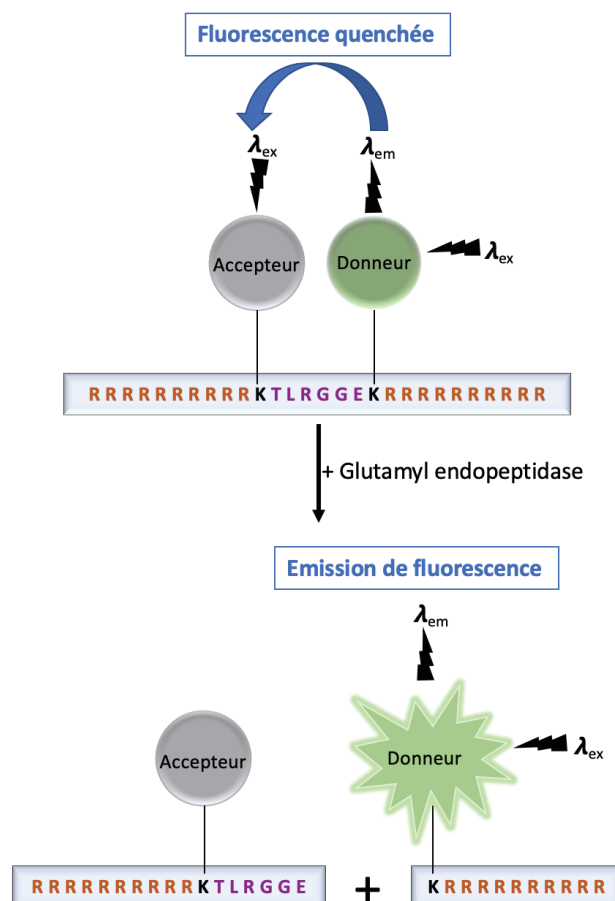


Figure 2.13 : Mécanisme de clivage du peptide PAR10-FRET-PAR10 par l'enzyme glutamyl endopeptidase.

### 2.6.4.1. Clivage en solution

Pour toutes les expériences de clivage en solution, les peptides et la GluC ont été dissous dans du PBS. Le peptide a été mis en contact avec la GluC à différents ratios peptide/enzyme mais à une concentration finale de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Le suivi du clivage s'est effectué à  $37^\circ\text{C}$  avec un intervalle de mesure régulier durant toute l'expérience.

### 2.6.4.2. Clivage en surface

Pour l'étude du clivage en surface, nous avons déposé à la surface d'un film (PAR200/HA)<sub>24</sub> une couche de peptide PAR10-FRET-PAR200. Après cela, nous avons incubé les lamelles à  $37^\circ\text{C}$  pendant 1h avec ou sans ajout de GluC. Les lamelles ont ensuite été observées au microscope à épifluorescence avec les conditions suivantes :  $\lambda_{\text{ex}} = 377 \pm$

25 et  $\lambda_{em} = 520 \pm 17,5$ . Les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ et les intensités de fluorescence entre les deux conditions (avec et sans GluC) ont été comparées.

## 2.7. Microscopie à épifluorescence

### 2.7.1. Principe de la fluorescence

La fluorescence est un phénomène faisant partie de la grande famille des processus luminescents. Ce phénomène est basé sur le principe d'absorption et d'émission d'un rayonnement électromagnétique par un composé chimique (**Figure 2.14**). Au départ, la molécule fluorescente, également appelée fluorophore, est dans l'état d'énergie fondamental  $gS_0$ . Lorsqu'elle est excitée par un photon de longueur d'onde précise et d'énergie  $E_i$ , elle atteint alors un état vibrationnel du niveau d'énergie  $eS_1$ . Rapidement, par relaxation vibrationnelle, elle va passer à un état excité vibratoire inférieur (flèche orange) et perd de ce fait de l'énergie. En retournant à l'état fondamental, elle dissipe l'énergie restante en émettant un photon avec une longueur d'onde plus longue que le photon initial et donc avec une énergie  $E_f$  plus faible que  $E_i$ .

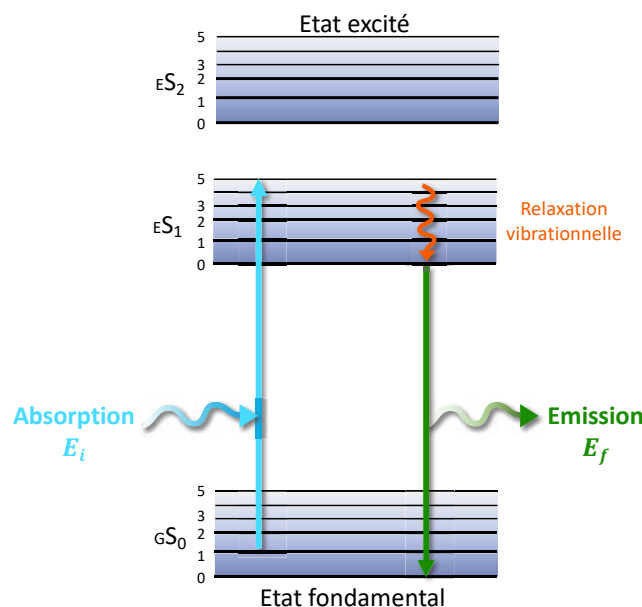


Figure 2.14 : Diagramme du phénomène de fluorescence

Le phénomène de relaxation vibrationnelle provoque un déplacement de l'énergie lumineuse émise par rapport à l'énergie absorbée. La relaxation rapide jusqu'au niveau vibratoire le plus bas de l'état excité rend les spectres d'émission indépendants de la longueur d'onde d'excitation. Cette règle est connue sous le nom de règle de Kasha<sup>16</sup>.

Les fluorophores sont généralement cycliques et leur structure permet de les lier de façon covalente à d'autres molécules sans perdre leur propriété de fluorescence. Ils vont permettre de marquer certains composants cellulaires mais aussi permettre la détection, la quantification de molécules au sein de films multicouches, par exemple.

### **2.7.2. Principe de la technique**

Le microscope à épifluorescence est un microscope optique permettant d'observer des objets de petite taille (résolution du microscope : 0,2  $\mu\text{m}$ ). Il est composé de 2 sources lumineuses :

- une lampe halogène, pour étudier les échantillons en transmission comme avec les microscopes de routine classiques.
- une lampe à arc, qui possède des raies caractéristiques dans son spectre et qui permet d'exciter les fluorochromes utilisés pour marquer l'échantillon.

Ce type de microscope permet de visualiser la fluorescence émise par des marqueurs introduits dans l'échantillon. Un tel microscope permet de visualiser uniquement la fluorescence émise par l'échantillon, par soustraction de la lumière excitatrice émise par la source lumineuse.

### **2.7.3. Utilisation**

Pour réaliser nos expériences, nous avons utilisé le microscope inversé Nikon Eclipse Ti-S. Il est équipé d'une lampe fluorescente Intensilight (Nikon) et de 3 blocs filtres (Semrock) :

- GFP ( $\lambda_{ex}$  472/30 nm ;  $\lambda_{em}$  520/35 nm) ;
- Texas Red ( $\lambda_{ex}$  562/40 nm ;  $\lambda_{em}$  624/40 nm) ;

- DAPI ( $\lambda_{ex}$  377/50 nm ;  $\lambda_{em}$  447/60 nm)

Les images sont capturées à l'aide d'une caméra numérique DS-Qi 1MC (Nikon) et sont ensuite analysées avec le logiciel ImageJ.

## **2.8. Microscopie confocale à balayage laser**

### **2.8.1. Principe de la technique**

La microscopie confocale a été inventée et brevetée par Marvin Minsky en 1957<sup>17</sup>. La particularité de ce microscope est de pouvoir réaliser des sections optiques d'un échantillon. En effet, le diaphragme (« pinhole ») est situé devant le collecteur, ce qui permet de laisser passer uniquement le flux lumineux émis au niveau du plan focal. Ce système permet l'élimination du signal lumineux provenant des autres plans et par conséquent l'amélioration du rapport signal/bruit.

Le microscope confocal nécessite une lumière d'excitation particulièrement intense et focalisée, c'est pourquoi la plupart des sources d'excitation sont des lasers. Le faisceau lumineux produit traverse le diaphragme (ou « pinhole ») d'excitation qui réduit la source à un point. Il est ensuite dirigé sur des miroirs galvanométriques (miroirs de balayage) qui, en pivotant sur leur axe, vont permettre le balayage rapide de l'ensemble du champ. La lumière d'émission est récupérée *via* l'objectif puis parvient au détecteur (tube photomultiplicateur) *via* successivement le miroir dichroïque, puis le pinhole d'émission. Le signal électrique émis par le photomultiplicateur est amplifié puis envoyé à l'ordinateur. Le logiciel d'acquisition permet de régler tous les paramètres d'acquisition et de visualiser directement les images.

L'épaisseur de la tranche optique récupérée va dépendre directement de l'ouverture du pinhole.



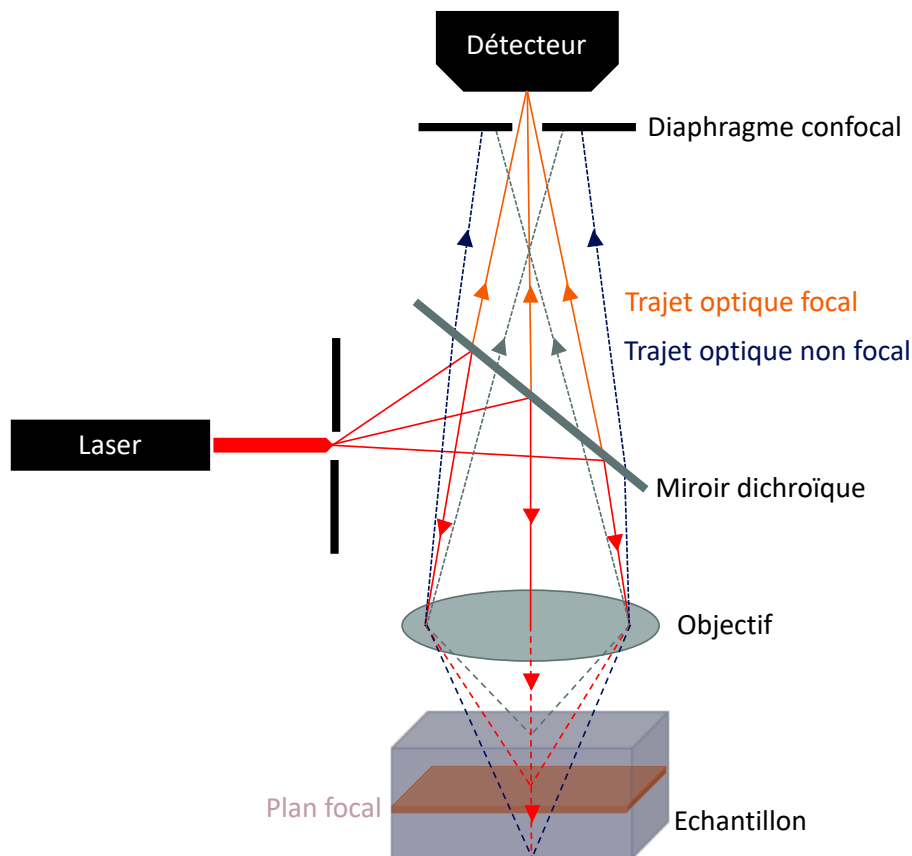


Figure 2.15 : Schéma de principe d'un microscope confocal

Nous avons utilisé le microscope confocal de la compagnie Zeiss et de type LSM 510 monté sur un microscope inverse AxioObserver Z1 (Zeiss). Les lasers associés sont : un laser argon (459 nm, 488 nm et 514 nm), un laser hélium néon I (543 nm) et un laser hélium néon II (633 nm). Le logiciel de contrôle du microscope et d'acquisition des images est le logiciel Zeiss LSM Image Browser.

L'utilisation simultanée de plusieurs sondes fluorescentes dans un échantillon requiert la détection du signal de chaque sonde séparément. Il est donc nécessaire d'avoir des spectres d'émission et d'excitation différents. Des miroirs dichroïques aux caractéristiques appropriées sont placés sur les trajets optiques, permettant la séparation des différentes longueurs d'ondes.

La microscopie confocale présente de nombreux avantages mais également quelques inconvénients (**tableau 2.8**).

Avantages	Inconvénients
Résolution en (x,y) améliorée ~30% par rapport à un microscope à épifluorescence conventionnel	Pénétration relativement réduite dans l'épaisseur de la préparation
Balayage en z, permettant de reconstituer des images 3D	Photo-dommage cellulaire dans toute l'épaisseur de la préparation
Mesure simultanée de différentes sondes fluorescentes	Photo-atténuation (« bleaching ») dans toute l'épaisseur de la préparation
Suivi en temps réel de phénomènes dynamiques	

Tableau 2.8 : Avantages et inconvénients de la microscopie confocale.

## 2.8.2. Utilisation

### 2.8.2.1. Recouvrement de fluorescence par photoblanchiment

Le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*) est une méthode utilisée en microscopie confocale pour mesurer la vitesse de diffusion moléculaire et qui a vu le jour dans les années 1970. A ses débuts, cette méthode était surtout utilisée pour mesurer la diffusion de protéines au sein de la membrane cellulaire<sup>18,19</sup>. Elle a ensuite été largement utilisée et sert maintenant à étudier la dynamique moléculaire dans presque tous les aspects de la biologie cellulaire. Hormis la biologie cellulaire, cette méthode est également applicable pour l'étude de la mobilité moléculaire dans des matériaux tels que les nôtres.

Lorsqu'une population de molécules fluorescentes est distribuée de manière homogène dans un échantillon, on peut inhiber de manière irréversible sa fluorescence dans une zone restreinte par photoblanchiment. Le photoblanchiment s'obtient par émission d'un flash lumineux par un laser sur la zone ciblée (ROI, *Region Of Interest*), généralement micrométrique. On crée ainsi deux populations de molécules : une fluorescente, l'autre pas, spatialement distinctes. Les molécules qui se trouvent en dehors de la zone blanchie vont venir recouvrir la zone. Les fluorochromes blanchis sont remplacés par les fluorochromes non blanchis. La fraction de molécules fluorescentes qui participe à cet échange est appelée la fraction mobile ( $M_f$ ) alors que la fraction qui n'y participe pas est appelée la fraction immobile ( $IM_f$ ).

Dans les expériences de FRAP, les images sont analysées et traitées pour générer un tracé cinétique de la fluorescence dans la zone blanchie (**figure 2.16**). A partir de ce graphique, il est possible de déterminer les fractions mobiles et immobiles en calculant le rapport entre l'intensité de fluorescence finale et initiale :

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

La courbe va également permettre de déterminer le coefficient de diffusion  $D$  par mesure du rapport de l'intensité lumineuse de la zone blanchie ( $c$ ) à celle éloignée de la zone blanchie de même aire ( $c_0$ ). Ce rapport correspond au rapport de concentrations de molécules fluorescentes dans les mêmes zones. Dans le cas idéal, le rapport s'exprime par :

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

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

où  $a$  est le rayon de la zone blanchie,  $\alpha$  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 1.<sup>20</sup>

La technique de FRAP a été utilisée pour comparer la mobilité des chaînes de PAR10 et de PAR200 marquées avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dans un film (PAR200/HA)<sub>24</sub>. Les lamelles de verre recouvertes du film sont introduites dans un porte-échantillon conçu au laboratoire et immergé dans 500  $\mu$ l de tampon TRIS/NaCl.

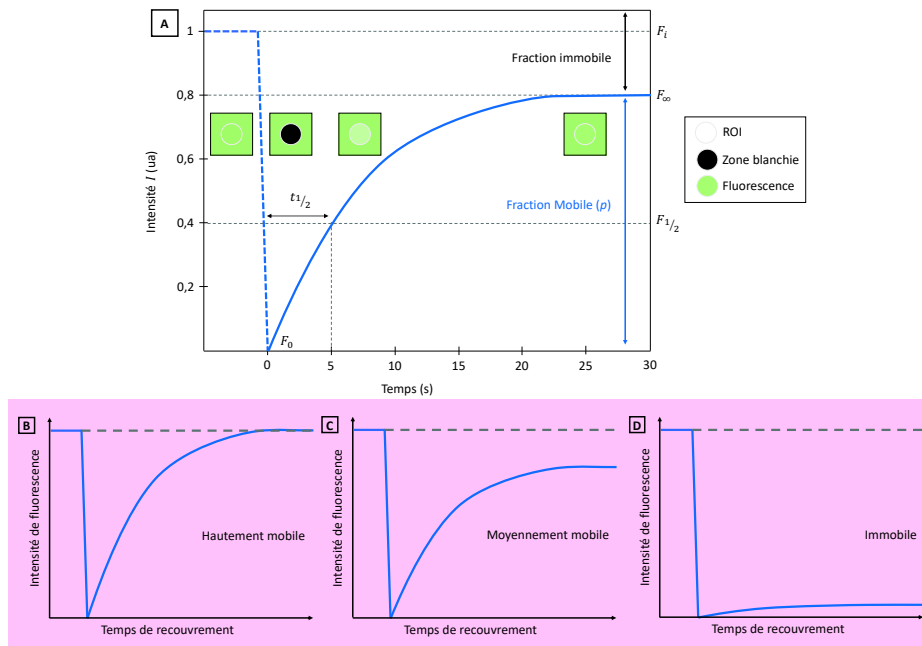


Figure 2.16 : Allure typique d'une courbe de FRAP (A). Le début de courbe représente la valeur  $I_i$ , intensité de fluorescence de l'échantillon avant photoblanchiment. La chute brutale de la courbe vers une valeur particulièrement basse ( $F_0$ ) est représentative du photoblanchiment des fluorochromes dans la région d'intérêt (ROI). Au cours du temps, on voit que l'intensité de fluorescence ré-augmente jusqu'à atteindre une valeur plateau  $F_\infty$ . Les informations de la courbe (de  $F$  à  $F$ ) peuvent être utilisées pour déterminer le coefficient de diffusion et ainsi classer la mobilité de la molécule selon 3 profils : hautement mobile (B), moyennement mobile (C) ou immobile (D).

### 2.8.2.2. Quantification des PAR dans les films

Le microscope confocal a été utilisé pour évaluer la quantité de PAR dans les films multicouches. Pour cela, nous avons utilisé des PAR marquées avec de la FITC. Une fois les films construits avec les PAR marquées, des images de microscopie confocale sont effectuées. Pour chaque condition, plusieurs zones du film sont imagées en coupe (x,y) (surface) et en coupe (x,z) (épaisseur). Afin d'établir une relation entre intensité de fluorescence et quantité de PAR, nous avons réalisé une courbe étalon. Pour cela, nous avons quantifié l'intensité de fluorescence d'une gamme de concentration de PAR marquées en solution. Nous avons tracé la courbe, effectué une régression linéaire et établi le coefficient de la droite qui correspond à notre relation entre intensité de fluorescence et concentration en PAR.

## 2.9. Microscopie électronique à balayage

### 2.9.1. Principe de la technique

Les premiers travaux sur la microscopie électronique à balayage (MEB) ont été initiés dans les années 1930 par Max Knoll et Ernst Ruska. Cette nouvelle technologie permet de réaliser des images de la surface d'objets en 3 dimensions avec une très haute résolution, de l'ordre du nanomètre. Ce qui la différencie de la microscopie photonique est qu'elle n'utilise pas la lumière pour créer une image mais un faisceau d'électrons, comme son nom le laisse suggérer. Le principe général d'un MEB est assez simple : un faisceau d'électrons, dont la tension est réglable (de 0,1 à 30 kilovolts) va balayer la surface de l'échantillon à observer et les électrons secondaires de très faible énergie produits suite au bombardement de l'échantillon vont être détectés (**figure 2.17**). Ces derniers vont être amplifiés puis interprétés pour reconstruire une image en fonction de l'intensité du courant électrique produit. On obtient donc une topographie de l'échantillon en noir et blanc où chaque nuance de gris est le résultat de l'intensité de courant détecté.

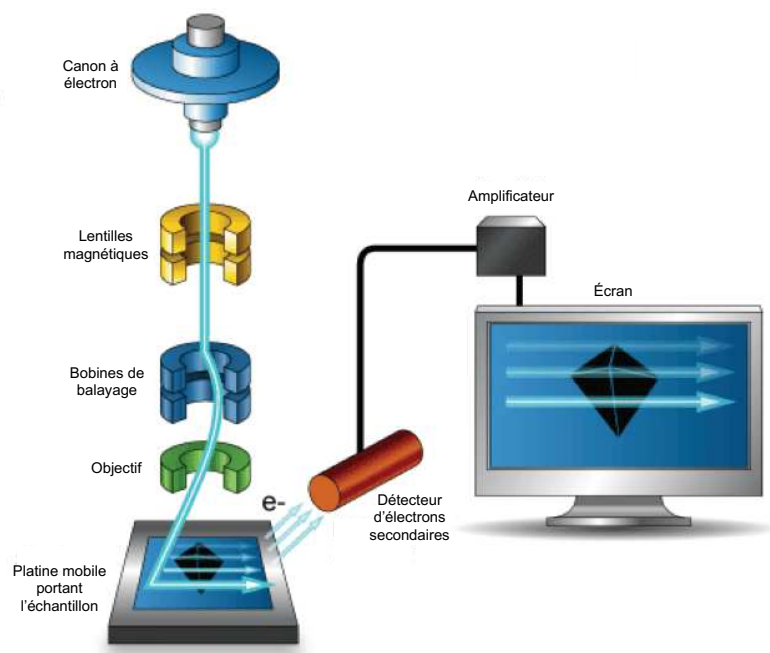


Figure 2.17 : Représentation schématiques des principaux composants d'un microscope électronique à balayage. Le canon à électron génère un faisceau d'électrons de haute énergie qui, traité par des lentilles magnétiques, va être focalisé sur l'échantillon. Le faisceau va balayer la surface de l'échantillon et l'intensité du signal provenant de l'interaction faisceau-échantillon est mesurée point par point. Les signaux générés à partir de l'échantillon sont collectés par un détecteur d'électrons, convertis en photons via un scintillateur, amplifiés dans un photomultiplicateur, puis convertis en signaux électriques et utilisés pour moduler l'intensité de l'image sur l'écran de visualisation. Copyright <https://myscope.training/>

### **2.9.2. Utilisation**

Le MEB a été utilisée pour visualiser la morphologie des bactéries sur nos différents revêtements. Les lamelles de verre utilisées pour les tests microbiologiques sont plongées dans une solution de PFA 2% et glutaraldéhyde 2,5% pendant 30 min à température ambiante et 2h à 4°C. Après la fixation, les bactéries sont déshydratées avec une série de lavage à l'éthanol (50%, 70%, 90%, 95%, v/v solution d'éthanol dans de l'eau distillée). Les échantillons sont ensuite immergés dans une solution d'hexamethyldisilazane (HMDS) qu'on laisse évaporer sous sorbonne pendant la nuit. Nous déposons ensuite une couche d'alliage or-palladium à la surface des lamelles de verre à l'aide d'un dispositif de pulvérisation Hummer Jr (Technics, USA).

Le microscope utilisé est le Quanta 250 ESEM (FEI Company, Netherlands). Les images ont été prises avec une tension de 25kV à différents grossissements.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Carlsson, J., Drevin, H. & Axén, R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *The Biochemical journal* **173**, 723-737, (1978).
- 2 Taylor, T. A. & Unakal, C. G. Staphylococcus Aureus in *StatPearls* (StatPearls Publishing LLC., 2018).
- 3 Daniau C, L. L., Blanchard H, Bernet C, Caillet-Vallet E et al. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2017. *12*, (2018).
- 4 Lister, J. L. & Horswill, A. R. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**, 178, (2014).
- 5 Mukherji, R., Patil, A. & Prabhune, A. Role of Extracellular Proteases in Biofilm Disruption of Gram Positive Bacteria with Special Emphasis on Staphylococcus aureus Biofilms. *Enzyme Engineering* **4**, (2015).
- 6 Shaw, L., Golonka, E., Potempa, J. & Foster, S. J. The role and regulation of the extracellular proteases of Staphylococcus aureus. *Microbiology* **150**, 217-228, (2004).
- 7 French, G. L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections—the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**, 1107-1117, (2006).
- 8 Reviakine, I., Johannsmann, D. & Richter, R. P. Hearing what you cannot see and visualizing what you hear: interpreting quartz crystal microbalance data from solvated interfaces. *Analytical chemistry* **83**, 8838-8848, (2011).
- 9 Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **155**, 206-222, (1959).
- 10 Chen, Q., Xu, S., Liu, Q., Masliyah, J. & Xu, Z. QCM-D study of nanoparticle interactions. *Advances in colloid and interface science* **233**, 94-114, (2016).
- 11 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* **59**, 391-396, (1999).
- 12 Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **437**, 55-75, (1948).
- 13 Karali, K. K., Sygellou, L. & Stalikas, C. D. Highly fluorescent N-doped carbon nanodots as an effective multi-probe quenching system for the determination of nitrite, nitrate and ferric ions in food matrices. *Talanta* **189**, 480-488, (2018).

- 14 Li, J., Yang, C., Wang, W. L. & Yan, X. P. Functionalized gold and persistent luminescence nanoparticle-based ratiometric absorption and TR-FRET nanoplatform for high-throughput sequential detection of l-cysteine and insulin. *Nanoscale* **10**, 14931-14937, (2018).
- 15 Stryer, L. & Haugland, R. P. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **58**, 719-726, (1967).
- 16 Kasha, M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society* **9**, 14-19, (1950).
- 17 Marvin, M. Microscopy apparatus. United States patent (1961).
- 18 Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. & Webb, W. W. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* **16**, 1055-1069, (1976).
- 19 Koppel, D. E., Axelrod, D., Schlessinger, J., Elson, E. L. & Webb, W. W. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. *Biophys J* **16**, 1315-1329, (1976).
- 20 Abramowitz, M., Stegun, I. A. & Romer, R. H. Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables. *American Journal of Physics* **56**, 958-958, (1988).



# **Chapitre 3. Films multicouches à base de poly(arginine) et d'acide hyaluronique**



## SOMMAIRE

<b>Chapitre 3. Films multicouches à base de poly(arginine) et d'acide hyaluronique .....</b>	<b>99</b>
3.1. Introduction.....	103
3.1.1. Les films multicouches.....	103
3.1.2. Choix des composants .....	104
3.2. Article .....	108
3.2.1. Abstract.....	108
3.2.2. Introduction.....	109
3.2.3. Materials and methods.....	111
3.2.4. Results and discussion .....	117
3.2.5. Conclusion .....	131
Bibliographie .....	132



## 3.1. Introduction

### 3.1.1. Les films multicouches

Les films multicouches, décrits pour la première fois par Decher *et al.*,<sup>1</sup> sont utilisés depuis plusieurs années au sein du laboratoire dans le cadre d'une application biomédicale.<sup>2-4</sup> Ces matériaux nanométriques sont construits à partir de la technique « couche-par-couche » ou « layer-by-layer » (LbL) et sont utilisés en tant que revêtements dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, notamment comme plateforme de fonctionnalisation pour favoriser l'adhésion cellulaire. Le principe de construction est simple puisqu'il repose sur les interactions électrostatiques entre les polyélectrolytes en alternant le dépôt d'une couche de polymères chargés positivement, appelés polycations, et de polymères chargés négativement, appelés polyanions. Les combinaisons de molécules pour former ces films multicouches sont multiples et rendent cette technique très versatile.

L'assemblage couche-par-couche peut se faire selon plusieurs méthodes :

- trempage (ou dipping) : consiste à immerger la surface à traiter dans des solutions de polyélectrolytes avec une étape de rinçage entre chaque dépôt. Le temps de trempage dans les solutions de polyélectrolytes peut varier et influencer sur les paramètres physico-chimiques du revêtement ;
- centrifugation (ou spin coating)<sup>5</sup> : consiste à déposer de façon uniforme un film fin sur une surface plane par la force centrifuge. Un faible volume de polyélectrolytes dans un solvant volatil est déposé à la surface d'un substrat que l'on fait tourner à grande vitesse. Le liquide se répand en raison des forces centrifuges et une couche de liquide uniforme se forme sur le substrat. L'évaporation du solvant donne un revêtement polymère solide uniforme ;
- pulvérisation (ou spraying) : consiste à déposer successivement ou simultanément des couches de polyélectrolytes sur une surface par un procédé de nébulisation.
- Peinture (ou « brushing »)<sup>6</sup> : consiste à déposer à l'aide d'un pinceau les solutions de polycations sur un substrat plat placée à la verticale. Les étapes de rinçage se font à l'aide d'une pipette en faisant couler la solution le long du substrat. Les concentrations nécessaires pour construire les films sont plus importantes que

pour la méthode par trempage. Cette méthode permet de contrôler la surface de dépôt, par modification du pinceau, mais également de choisir la zone que l'on va « peindre ».

### 3.1.2. Choix des composants

Le polyanion que nous avons choisi pour construire nos films multicouches est l'acide hyaluronique (HA). C'est un polymère que l'on retrouve de façon abondante dans les tissus conjonctifs, épithéliaux et dermiques.<sup>7</sup> Il est composé d'unités répétitives disaccharidiques d'acide glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine (**figure 3.1**) et est connu pour ses applications en cosmétique comme agent de comblement dermique.<sup>8</sup> C'est un composé très intéressant puisqu'il possède des propriétés anti-inflammatoires<sup>9,10</sup> et de biodégradabilité.<sup>11</sup> Il est également beaucoup étudié pour les thérapies ciblées puisque son récepteur cellulaire principal est le CD44, récepteur surexprimé dans un certain nombre de cellules cancéreuses<sup>12</sup> mais aussi par les cellules immunitaires activées, surtout par les macrophages. Les chercheurs se sont intéressés à créer de nouveaux traitements anti-cancéreux formulés à base de HA pour permettre de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses exprimant le récepteur CD44.<sup>13-16</sup> Sur le même principe, de nouvelles stratégies de lutte contre les bactéries intracellulaires ont été développées. Certaines bactéries, comme par exemple *Staphylococcus aureus*, sont capables de pénétrer dans les cellules hôtes, comme par exemple les macrophages ou les ostéoblastes, et ainsi d'échapper au système immunitaire.<sup>17</sup> Le problème de ces infections intracellulaires est que la plupart des agents antibactériens ont une capacité limitée à pénétrer dans les cellules et sont inefficaces contre ces bactéries intracellulaires. Ces dernières années, les chercheurs ont donc conçu de nouvelles plateformes de délivrance d'agents antibactériens capables de pénétrer dans les cellules grâce au mécanisme d'interaction entre le HA et le récepteur CD44 des macrophages dans lesquels les bactéries s'y logent.<sup>18-20</sup>

L'acide hyaluronique est ainsi dans notre cas un bon candidat puisqu'il est anionique, biocompatible et va permettre de conférer des éventuelles propriétés anti-inflammatoires à notre revêtement.

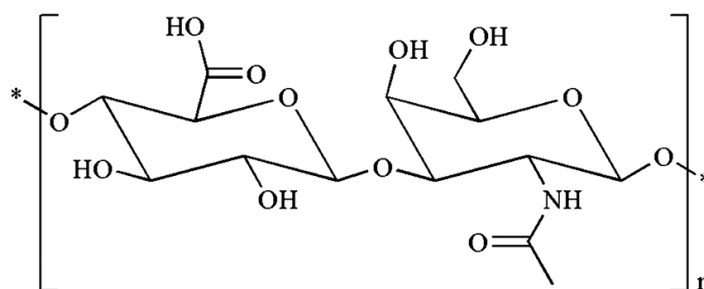


Figure 3.1 : Structure chimique de l'acide hyaluronique (HA), composé de répétitions disaccharidiques de N-acétyl-D-glucosamine et d'acide glucuronique.

Pour le polycation, nous avons choisi d'utiliser un homopolypeptide : la poly(L-arginine) (PAR, **figure 3.2**). Dans notre cas, la PAR va servir de brique à la construction de notre film mais va également conférer une activité antibactérienne à ce dernier.

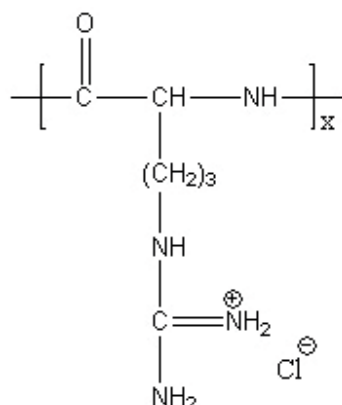


Figure 3.2 : Structure chimique de la poly(L-arginine hydrochloride) d'Alamanda Polymers.

Les polycations sont très utilisés pour les applications antimicrobiennes car leurs nombreuses charges positives permettent une interaction avec la membrane bactérienne chargée négativement. Le mécanisme antimicrobien de la PAR n'a pas encore été élucidé mais semble être similaire à celui des peptides pénétrant dans les cellules (*cell-penetrating peptides*, CPP). Les CPP sont des peptides capables de traverser les membranes cellulaires et de transporter des molécules (oligonucléotides, protéines, drogues ...) dans le cytoplasme.<sup>21</sup> Le mécanisme de pénétration des CPPs est lui-même controversé au sein de la communauté scientifique. Il semble cependant acquis que

plusieurs mécanismes existent et dépendent de la nature du CPP.<sup>22</sup> Dans notre cas, le modèle le plus probable est celui des peptides antimicrobiens.<sup>23-26</sup>

Trois modèles mécanistiques sont ainsi proposés (**figure 3.3**) :

- le modèle des douves de tonneaux (ou « barrel-stave pathway ») exige qu'une quantité suffisante de peptides adhère, par interactions électrostatiques à la membrane cellulaire. Une fois cette concentration atteinte, la formation de pores ioniques dans la membrane cellulaire va engendrer la fuite du contenu intracellulaire provoquant la lise de la bactérie.
- le modèle des pores toroïdaux (ou « toroidal pore pathway ») se base sur le fait que les forces moléculaires attractives entre les phospholipides et les peptides forcent les lipides à remonter et à créer des pores dont la surface est composée à la fois de peptides et de groupes hydrophiliques de phospholipides. Une fois le pore formé, le passage des peptides à travers la membrane est facilité.
- le modèle du tapis (ou « carpet model) consiste en une accumulation de peptides à la surface de la membrane par interactions électrostatiques entre les peptides et les phospholipides. Lorsque l'accumulation de peptides devient trop importante, la structure membranaire se déstabilise et conduit à la formation de micelles et engendrant progressivement la désintégration de la bicouche lipide, comme le ferait un détergent.

Mitchell *et al.*<sup>27</sup> ont montré que la PAR était capable de pénétrer à l'intérieur des cellules eucaryotes plus efficacement que d'autres homopolypeptides tels que la poly(L-lysine) ou la poly(L-histidine). Ils ont également montré que le nombre de résidus influence sur l'efficacité de pénétration des membranes cellulaires et que la PAR la plus efficace est celle composée 15 résidus arginines.



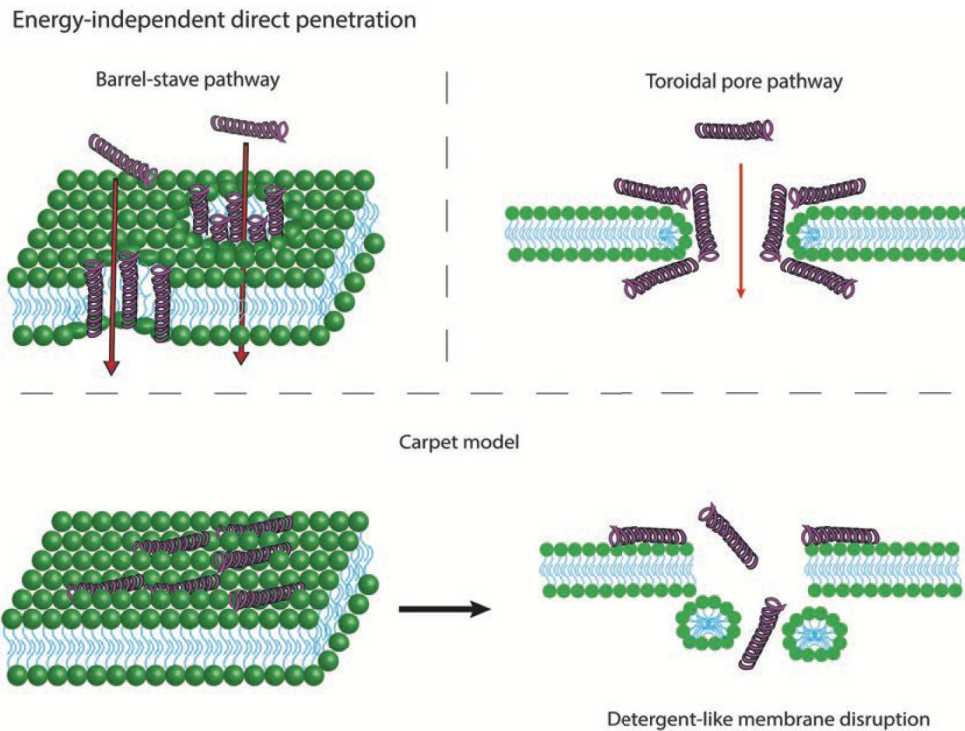


Figure 3.3 : Représentation schématique des voies de formation de pores. Copyright © 2017, Springer International Publishing AG <sup>22</sup>

Une étude menée au laboratoire a démontré que les films multicouches composés de PAR et de HA possédaient non seulement des propriétés antibactériennes vis-à-vis de *S. aureus* mais également des propriétés anti-inflammatoires.<sup>4</sup> C'est dans ce contexte que nous avons voulu voir l'influence de la taille des chaînes de PAR sur les propriétés antibactériennes des films.

L'article suivant décrit l'étude de quatre poly(L-arginine) monodisperses : PAR10, PAR30, PAR100 et PAR200 correspondant respectivement à des chaînes comportant 10, 30, 100 et 200 résidus arginine. Dans un premier temps, nous avons suivi la construction des films multicouches par microbalance à cristal de quartz (QCM) afin de s'assurer de la bonne construction de chacun des films. Nous avons également vérifié si le dépôt du film était homogène sur une surface en verre par marquage de la PAR avec un composé fluorescent et par observation au microscope confocal. Nous avons également étudié l'activité antibactérienne des PAR en solution mais également dans les films en les incubant au contact de diverses souches gram-positives et gram-négatives et en observant les surfaces en microscopie après 24 h d'incubation. Afin d'élucider le mécanisme d'action de tels films, nous avons quantifié la quantité de PAR libérée dans le surnageant, afin de la

comparer à la concentration minimale bactéricide (CMB), ainsi que la quantité de chaînes de PAR mobiles dans le film. Pour finir, nous avons réalisé des tests de biocompatibilité de nos revêtements sur des fibroblastes primaires humains.

## **3.2. Article**

Publié dans le journal *Chemistry of Materials*, le 31 octobre 2016. Reprinted with permission. Copyright 2016, American Chemical Society.

### **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 Lavallo.

#### **3.2.1. Abstract**

The number of nosocomial infections related to implants and medical devices increase alarmingly worldwide. New strategies based on the design of antimicrobial coatings are required to prevent such infections. Polyelectrolyte "multilayer" films constitute a powerful tool for nanoscale surface functionalization which allows to address this issue. By investigating films built up with poly(arginine) (PAR) of various chain lengths (10, 30, 100 and 200 residues) and hyaluronic acid (HA), we demonstrate that exclusively films constructed with poly(arginine) composed of 30 residues (PAR30) acquire a strong antimicrobial activity against gram positive and gram negative pathogenic bacteria associated with infections of medical devices. This chain-size effect is extremely striking and is the first example reported where the length of the polyelectrolytes played a key-role in the functionality of the films. Moreover, this unexpected functionality of nanolayered polypeptide/polysaccharide PAR30/HA films occurs without adding any specific antimicrobial agent like antibiotics or antimicrobial

peptides. PAR30/HA film inhibits bacteria through a contact-killing mechanism due to the presence of mobile PAR30 chains. These chains are assumed to diffuse toward the interface where they interact with the bacteria with the consequence of killing them. This new coating with unique properties based on the association of a homopolypeptide of 30 residues with a polysaccharide constitutes a simple system to prevent implant related infections with a reasonable production cost.

### 3.2.2. Introduction

Year after year, the number of prosthesis implantations and medical devices used 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.<sup>28</sup> The incidence of infections following implantations is increasing,<sup>29</sup> more particularly in cardiac implantable electronic device where local contamination during implantation is the main risk of infection. An infection implies a second implantation to replace the device with a high risk of mortality. It is known that half of all nosocomial infections worldwide involve a medical device.<sup>30,31</sup> Some key factors are at the origin of the increase in medical-device related infections like *i)* ageing of the population, *ii)* the worrying increase in obesity and diabete which leads to an increase of patients with high risks of infections, *iii)* multiple drug resistance of the bacteria, *iv)* 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.<sup>32</sup> 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 the 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 a possible overdose of delivered drugs with 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.<sup>33-35</sup> 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 has been shown for metal ions and also for 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.<sup>36,37</sup> The potential applications of these kinds of films are widespread ranging from energy storage devices to anti-fogging coatings and bioactive substrates.<sup>38-42</sup> In this latter area, antimicrobial coatings are receiving extensive attention due to their importance in the fight against nosocomial infections.<sup>43</sup> There exist two kinds of polyelectrolyte films, 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 at least as long as a given thickness is not exceeded.<sup>44</sup> The exponential growth is related to the diffusion, in and out of the whole film, of at least one of the constituting polyelectrolytes.<sup>45</sup> 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 film. This is probably one of the reasons 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(arginine)/hyaluronic acid (PAR/HA) multilayers are particularly interesting for biological applications because they possess powerful immunomodulatory properties and in addition they can be functionalized with antimicrobial peptides to confer them with antimicrobial properties against *S. aureus* and fungi.<sup>4</sup> (PAR/HA) multilayers is an exponentially growing film like their widespread studied poly(L-lysine)/HA.

In the present study, we have selected well-defined poly(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 shows a strong inhibition of bacterial growth only for films made of poly(arginine) containing 30 residues per chain (PAR30). Moreover, this unexpected functionality occurs without adding any specific antimicrobial agent like antibiotics or antimicrobial peptides. Absolutely no inhibition of *S. aureus* was observed for the films made of shorter or longer poly(arginine) chains. Physico-chemical properties of the films (growth regime, secondary structure, release and diffusion of chains) were investigated to establish some relationships with their inhibiting properties on bacterial growth and to consider a mechanism.

### **3.2.3. 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 proportionnal 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.*<sup>46</sup> 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  $0.5 \text{ mg.mL}^{-1}$  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)<sub>24</sub> films with a dipping robot***

For the construction of 24 bilayers of PAR/HA ((PAR30/HA)<sub>24</sub>) 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, H<sub>2</sub>O, and ethanol and dried with an air flow. Solutions 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 thicknesses of the obtained film were evaluated by deposition of 100  $\mu\text{L}$  of PAR-FITC  $0.5 \text{ mg.mL}^{-1}$  in NaCl-TRIS buffer (see below "Fluorescent labelling of PAR") 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 were 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 10<sup>5</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. Glass slides coated with (PAR/HA)<sub>24</sub>, 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*, A<sub>620</sub> = 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<sup>-1</sup>) and Cefotaxime (0.1 µg.mL<sup>-1</sup>) were added in the *S. aureus* solution in contact with uncoated glass slides. To quantify bacteria growth or inhibition after 24 h, 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 was incubated 30 min at 37°C, away from light. Each surface 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 24 h. Glass slides coated with (PAR/HA)<sub>24</sub> were incubated simultaneously in a 6 well-plates with 3 mL of medium. After 24 h, the medium of the wells containing cells was removed and replaced by the supernatant that was in contact with the films for 24 h. Human fibroblasts were incubated during 24 h 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)<sub>24</sub> were sterilized by using UV-light for 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<sub>620</sub> = 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. 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<sup>-1</sup> in NaCl-TRIS buffer. Spectra for each (PAR/HA)<sub>24</sub> 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<sup>-1</sup> in 100 mM NaHCO<sub>3</sub> 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<sup>-1</sup> in NaCl-TRIS buffer).

### ***Release Experiments***

For the first experiment, a (PAR30/HA)<sub>24</sub> 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 condition. For the second experiment, a (PAR30/HA)<sub>24</sub> 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 24 h 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)<sub>24</sub> films containing PAR-FITC by performing photobleaching experiments (FRAP). A glass slide coated with a PAR/HA film was introduced in a homemade sample holder and immersed in 200  $\mu$ L of NaCl-TRIS buffer. One circular region (either 4.4  $\mu$ m in radius in an image of 35  $\mu$ m  $\times$  35  $\mu$ m or 10.6  $\mu$ m in radius in an image of 85  $\mu$ m  $\times$  85  $\mu$ m) was bleached for 700 ms to laser beam set at its maximum power ( $\lambda = 488$  nm). Then, the recovery of fluorescence in the bleached area (mean value of measurements in circular region of 4.4  $\mu$ m and 10.6  $\mu$ m in radii) 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.<sup>47,48</sup> 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)<sub>24</sub> films***

Crosslinking was performed by immersing the (PAR30/HA)<sub>24</sub> 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.

### 3.2.4. Results and discussion

In order to test the buildup of the PAR/HA films, we first used quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D). **Figure 3.4a** corresponds to the layer-by-layer deposition monitored with QCM-D for various molecular weights of PAR (10, 30, 100 or 200 residues per chain corresponding to the notation PAR10 PAR30, PAR100 or PAR200 respectively). In a first approximation, it is known that the increase in the normalized frequency is proportional to an increase in the deposited mass or thickness.<sup>49</sup> An exponential growth of the normalized frequency ( $\frac{-\Delta f \nu}{\nu}$ ) with the number of deposition steps was observed for all the films even with the shorter PAR chains consisting of 10 residues (PAR10) (**figure 3.5**). We also estimated the thicknesses of the films by using the model of Voinova *et al.*<sup>46</sup> After 8 deposited pair of layers (or "bilayers") the thicknesses of the films built up with PAR10, PAR30, PAR100 or PAR200 as polycations equals 70, 130, 200 or 450 nm respectively (**figure 3.6**). Finally for a given number of deposition steps, the thickness increases as the molecular weight of PAR increases. A similar behavior was observed for HA/chitosan,<sup>50</sup> poly(lysine)/HA<sup>51</sup> or poly(sodium styrene sulfonate)/poly(diallyl dimethylammonium chloride)<sup>52</sup> multilayers. However an opposite behavior was previously reported for films built up with chitosan/HA with various molecular weights of chitosan.<sup>53</sup> Finally each study used different parameters like the number of bilayer, different ranges of molecular weights, polydispersity of chains, or systems that form vermiculate patterns during the first deposition steps. This makes quite difficult to draw some general laws and to explain our results in the light of previous experiments.

Then, films with 24 bilayers ((PAR/HA)<sub>24</sub>) 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 3.4b**). This indicates that the films were all homogeneously deposited on the surface in all conditions (*i.e.* for PAR with 10 to 200 residues per chain).

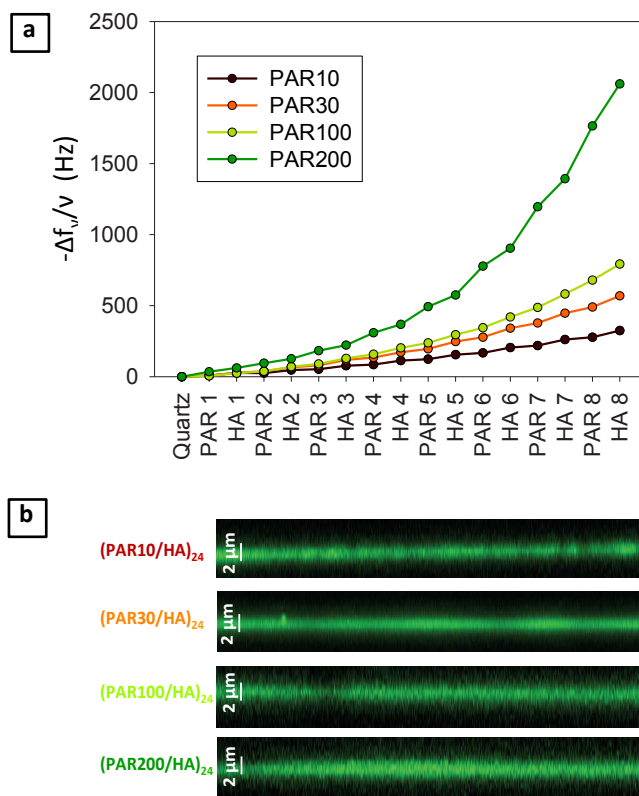


Figure 3.4: a) Buildup of (PAR/HA) multilayer film on a SiO<sub>2</sub> coated crystal followed by QCM-D. Various molecular weight of PAR (10, 30, 100 or 200 residues per chain corresponding to notation PAR10, PAR30, PAR100 or PAR200 respectively) are used in association with HA. The evolution of the normalized frequency  $-\Delta f_v/\nu$  (for  $\nu = 3$ ) as a function of the number of adsorbed layers is shown. b) Observation by confocal microscopy of PAR/HA film sections ( $x, z$ ) for film buildup with various molecular weight of PAR (10, 30, 100 or 200 residues corresponding to notation PAR10, PAR30, PAR100 or PAR200 respectively)

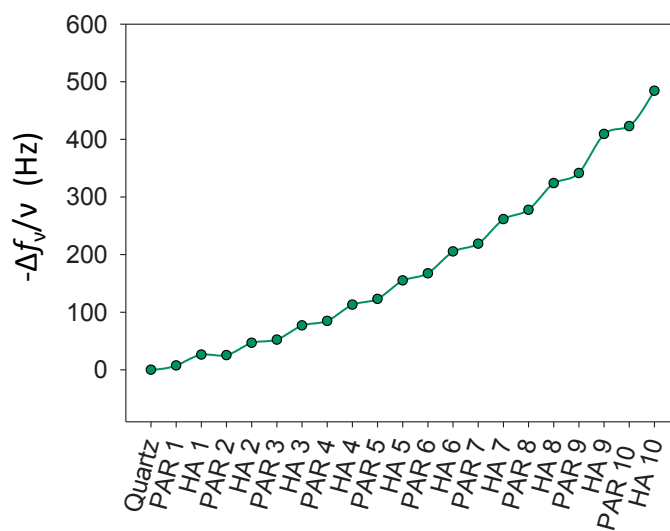


Figure 3.5: Buildup of (PAR10/HA)<sub>10</sub> multilayer film on a SiO<sub>2</sub> coated crystal followed by QCM-D. Evolution of the normalized frequency  $-\Delta f_v/\nu$  (for  $\nu = 3$ ) as a function of the number of layers adsorbed.

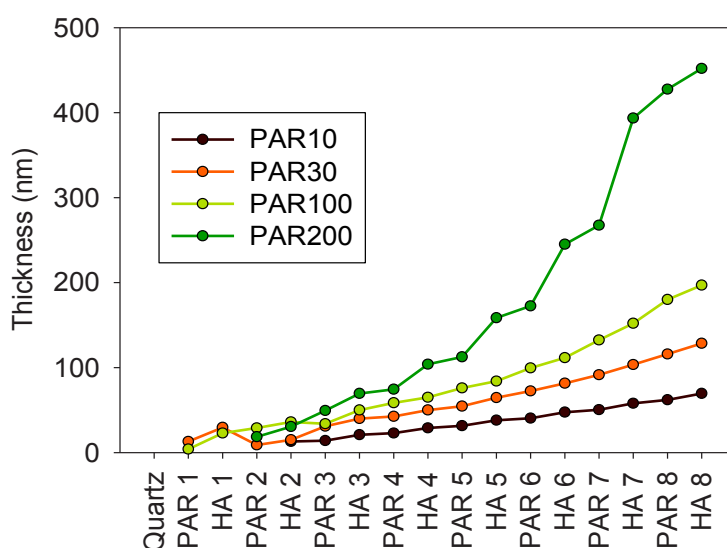


Figure 3.6: Buildup of (PAR/HA) multilayer film on a SiO<sub>2</sub> coated crystal followed by QCM-D. Various molecular weight of PAR (10, 30, 100 or 200 residues per chain corresponding to the notation PAR10 PAR30, PAR100 or PAR200 respectively) are used in association with HA. Evolution of the estimated thickness as a function of the number of adsorbed layers.

Next, the antimicrobial properties of (PAR/HA)<sub>24</sub> films for PAR of different numbers of residues was evaluated. The films were tested against a gram-positive bacteria, *S. 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.<sup>54</sup> *S. aureus* were incubated for 24 h at 37°C in the presence of MHB medium on the (PAR/HA)<sub>24</sub> coatings. The bacteria were incubated at 10<sup>5</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> 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 films and in presence of antibiotics in the medium) and the negative control (without films and in the absence of antibiotics in the medium) (**figure 3.7a**). No significant inhibition was observed for films built with PAR10, PAR100 and PAR200. However, for PAR30, 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 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-ditolylyl tetrazolium

chloride (CTC). Healthy bacteria will absorb CTC and reduce it 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 3.7b** shows images of the surfaces with labeled bacteria. We clearly observed a total inhibition of the bacteria growth on (PAR30/HA)<sub>24</sub> surfaces and it was extremely rare to find an area where at least a few bacteria were present (**figure 3.7b**, "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 the growth inhibition of bacteria in the supernatant described above where PAR30 was also the only strongly effective coating.

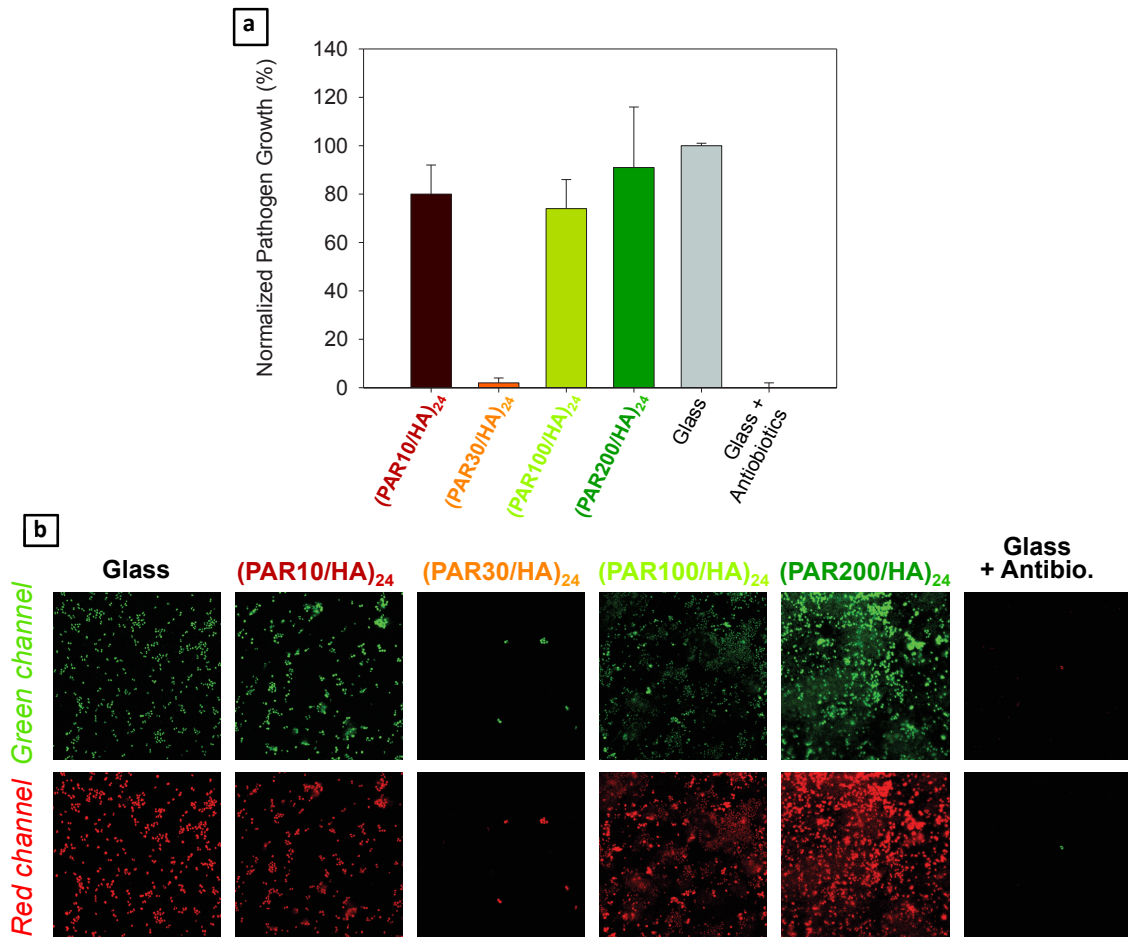


Figure 3.7: a) Normalized *S. aureus* growth in supernatant after 24 h in contact with (PAR/HA)<sub>24</sub> multilayers films composed of poly(arginine) with a variable number of residues per chain. Each value corresponds to the mean value of 3 individual experiments (3 samples per experiment and condition) and error bars correspond to standard deviations. b) Confocal images of *S. aureus* after 24 h of incubation on glass substrates, on (PAR/HA)<sub>24</sub> films built with PAR10, PAR30, PAR100 or PAR200 and on a 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-ditolyl tetrazolium chloride), into an insoluble, red fluorescent formazan. Image sizes are 67 × 67 μm<sup>2</sup>.

In an attempt to elucidate the underlying mechanism that confers to the PAR30/HA surfaces such a strong inhibitory power, we first determined the minimal inhibitory concentration (MIC) of PAR in solution using bacterial assay as described in Experimental Section. For concentrations up to 0.2 mg.mL<sup>-1</sup>, all PAR (PAR10, PAR30, PAR100 or PAR200) totally inhibited the *S. aureus* growth (**figure 3.8**). However when PAR concentrations were further decreased, a difference between the PAR efficiencies was observed: a quasi total inhibition of the *S. aureus* growth was observed for all PAR at concentrations of 0.02 mg.mL<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>, an inhibition of about 100% was shown only for PAR30. Longer or shorter PAR chains (PAR10, PAR100 or PAR200) inhibited only partially (less than 40%) the *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<sup>-1</sup>) which is directly related to the number of arginine monomers. However when the results are plotted as a function of the concentration expressed in  $\mu$ M, which means that the concentration is related to the number of peptidic chains in solution, a different interpretation can be made (**figure 3.9**). At low concentrations, the longer chains PAR100 and PAR200 are the most effective as 1  $\mu$ M totally inhibits about 90% of the bacterial growth whereas PAR30 or PAR10 need to be at about 10  $\mu$ M to obtain a similar inhibition.

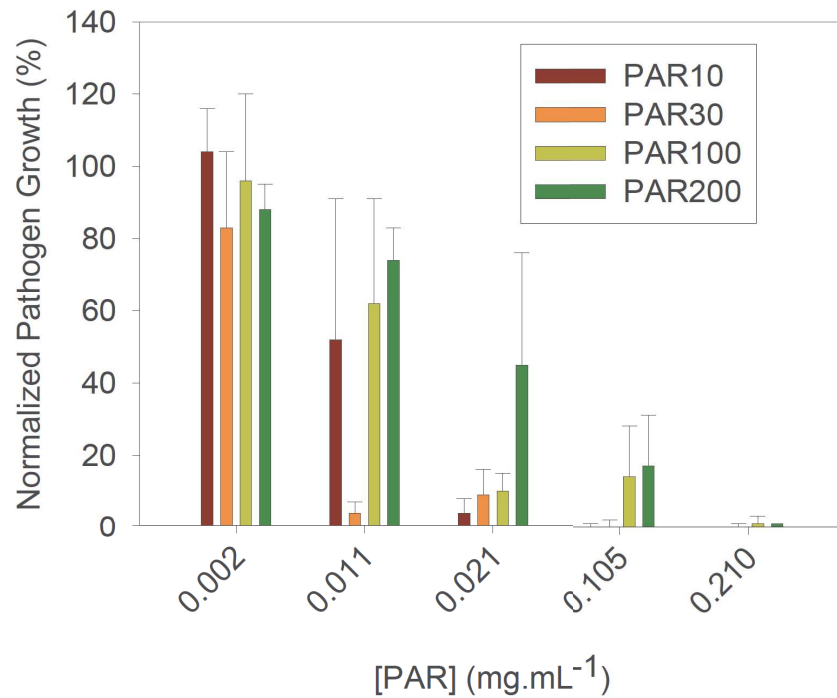


Figure 3.8: Normalized pathogen growth of *S. aureus* as a function of PAR concentration (mg.mL<sup>-1</sup>) measured in solution. PAR with 10, 30, 100 or 200 arginine residues were tested. Each PAR was incubated 24 h at 37 °C in 300  $\mu$ L of MHB medium with *S. aureus* (A620 = 0.001). Pathogen growth of 0% corresponds to medium with antibiotics (and without PAR) and 100% to medium without PAR. Each value corresponds to the mean value of 3 individual experiments (3 samples per experiment and condition) and error bars correspond to standard deviations.

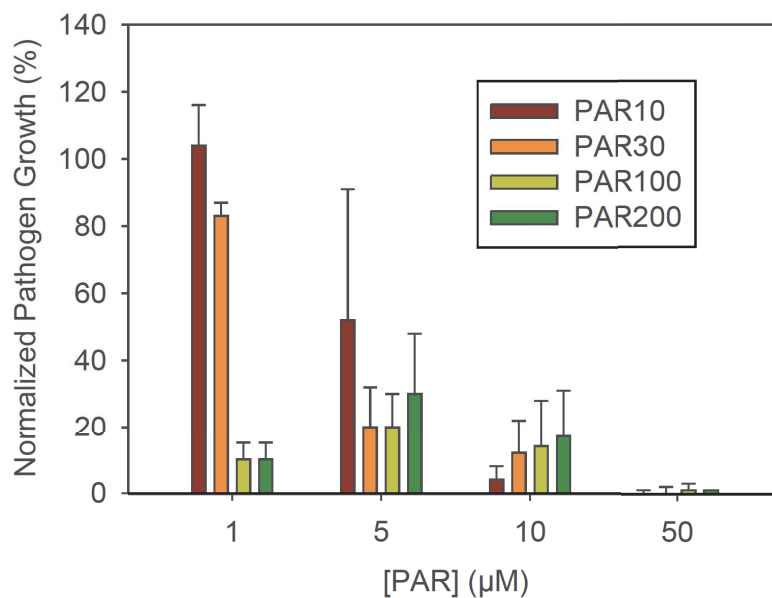


Figure 3.9: Normalized pathogen growth of *S. aureus* as a function of PAR concentration ( $\mu$ M) measured in solution. PAR with 10, 30, 100 or 200 arginine residues per chain were tested. Each PAR was incubated 24 h at 37°C in 100  $\mu$ L of MHB medium with *S. aureus* (A620 = 0.001). Pathogen growth of 0% corresponds to medium with antibiotics (and without PAR) and 100% to medium without PAR. 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 at concentration up to  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  for inhibiting *S. aureus* growth. For a given mass of PAR chains in the supernatant, PAR30 is the most effective. Moreover the  $\text{MIC}_{100}$  values of about  $50 \text{ }\mu\text{M}$  (**figure 3.9**) or  $200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (**figure 3.8**) obtained for PAR30, 100 or 200 are at very low. However, PAR chains of different number of residues were not markedly different in their activity in solution and thus the origin of the PAR30 activity observed with PAR30/HA films is not related to its higher activity in solution.

To address the eventual effect of the conformations of the PAR chains in the antimicrobial activity we checked if PAR30 chains have a specific secondary structure that could explain the activity of the PAR30/HA films compared to film built up with longer or shorter PAR chains. Circular dichroism (CD) experiments were performed and in a first step, secondary structures of PAR chains in NaCl-Tris buffer solution ( $150 \text{ mM NaCl}$ ,  $10 \text{ mM Tris}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ) were determined (**figure 3.10a**). All CD spectra of PAR chains (PAR10, PAR30, PAR100 and PAR 200) show a unique negative minimum at about  $200 \text{ nm}$  characteristic of a random coil conformation in solution.<sup>55</sup> In a second step, we monitored the PAR conformation in  $(\text{PAR}/\text{HA})_{24}$  films (**figure 3.10b**). Surprisingly, spectra of the films depict totally different shapes: one minimum at about  $208 \text{ nm}$  and another smaller one at about  $222 \text{ nm}$  were observed, except for  $(\text{PAR}10/\text{HA})_{24}$ , where a unique negative minimum was present at  $200 \text{ nm}$  (random coil). The spectra with two minima are typical of  $\alpha$ -helix conformations. They cannot be attributed to HA chains as it is known that in solution at  $\text{pH } 7.4$  HA has an unordered conformation.<sup>56</sup> This indicates that PAR chains should change from a coil conformation in solution to an  $\alpha$ -helix in the film. A similar behavior was previously observed for LbL built up with poly(lysine) and poly(glutamic acid).<sup>57</sup> Interestingly, unordered antimicrobial peptides are known to adopt an  $\alpha$ -helix conformation when they interact with the bacterial membrane and this structural change is a key point in their mechanism of action.<sup>58</sup> In the present case of polyelectrolyte multilayer films, long enough PAR chains already adopt an  $\alpha$ -helix conformation within the film which can be helpful to fight faster and in a more efficiency way against invading bacteria. Nonetheless, because the films built with different PAR chains of different 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.

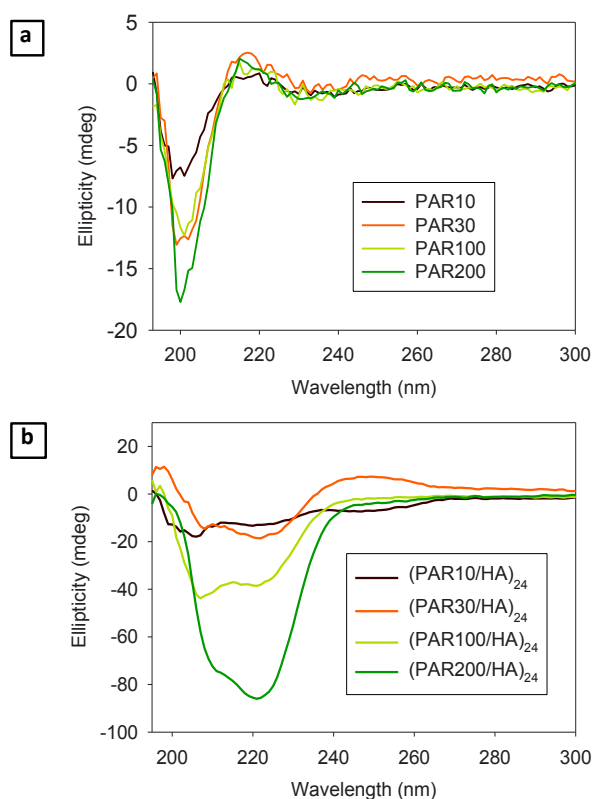


Figure 3.10: Circular dichroism spectra of a) PAR in NaCl-Tris buffer (150 mM NaCl, 10 mM TRIS, pH 7.4) and b) (PAR/HA)<sub>24</sub> multilayer film in NaCl-Tris buffer. PAR with 10, 30, 100 or 200 arginine residues were tested. Each spectra corresponds to the mean value of 3 spectra performed on 3 samples.

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 it 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 3.11a** 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 in the presence or absence of *S. aureus*: the concentration of released PAR30 is about 0.20-0.30  $\mu\text{M}$  after 24 h while MIC<sub>100</sub> is about 50  $\mu\text{M}$ . Moreover

when a bacterial suspension was seeded with these supernatants, absolutely no bacteria growth inhibition was observed (**figure 3.11b**). 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. Consequently, we may 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.

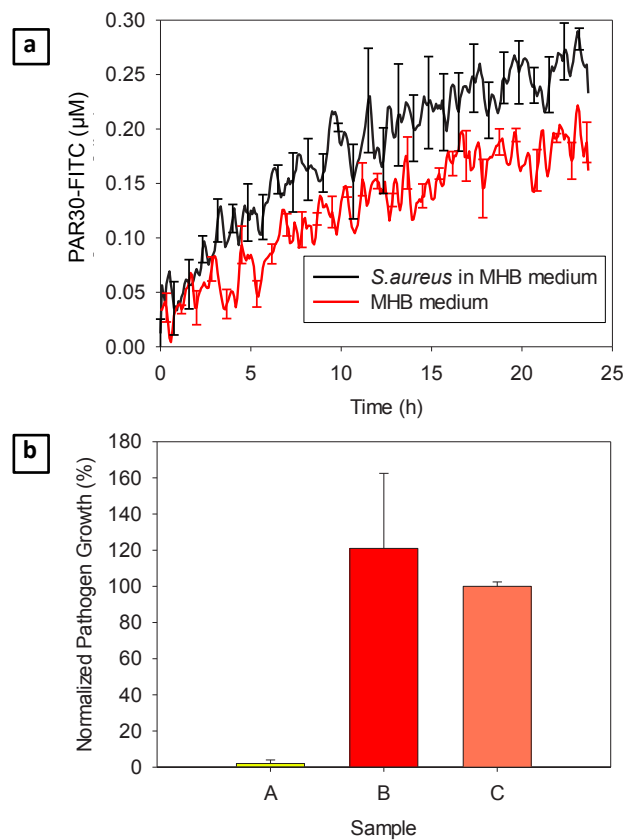


Figure 3.11 : a) Released of PAR30-FITC from (PAR30-FITC/HA)<sub>24</sub> films in MHB medium with (black line) or without (red line) presence of *S.aureus* (A<sub>620</sub> = 0.001). Release experiments were performed at 37°C during 24 h by the measurements of PAR-FITC with a fluorimeter. b) Normalized growth of *S. aureus* after 24 h in contact with a (PAR30/HA)<sub>24</sub> film (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<sub>620</sub> = 0.001 (sample B). Finally, sample C corresponds to a control where a fresh *S. aureus* (A<sub>620</sub> = 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.

Then we investigated if the bactericidal activity of the PAR30/HA multilayer is related to the mobility of PAR30 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.<sup>41</sup> We first determined the mobility of the different chains, PAR10, PAR30, PAR100 and PAR200 in the (PAR/HA)<sub>24</sub> film by using the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) method. **Figure 3.12a** shows the evolution of the normalized fluorescence in the bleached area as a function of the square root of time. Recovery of fluorescence appears very fast for PAR10 and PAR30 compare to PAR100 or PAR200. 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 3.12b**).

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 method<sup>59</sup> 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 film to 20% for the cross-linked one (**figure 3.12c**). 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 3.12d**). 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.

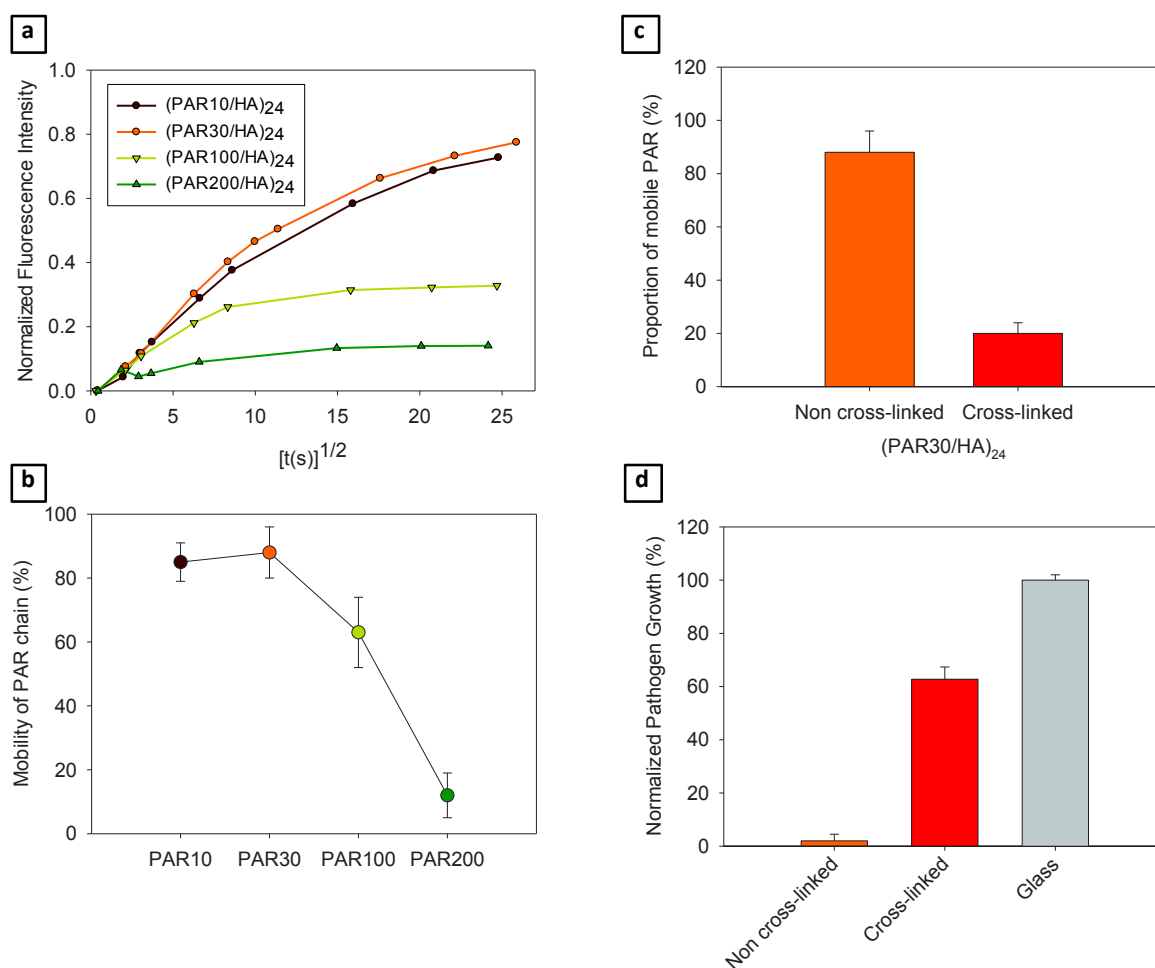


Figure 3.12: a) Normalized fluorescence intensity of a photobleached area according to  $[t(s)]^{1/2}$  for each film : (PAR10-FITC/HA)<sub>24</sub>, (PAR30-FITC/HA)<sub>24</sub>, (PAR100-FITC/HA)<sub>24</sub> and (PAR20-FITC/HA)<sub>24</sub>.  $t=0$  corresponds to the end of the photobleaching step. b) Proportion of mobile PAR (%) estimated from data in a) for (PAR10-FITC/HA)<sub>24</sub>, (PAR30-FITC/HA)<sub>24</sub>, (PAR100-FITC/HA)<sub>24</sub> and (PAR200-FITC/HA)<sub>24</sub> films. c) Proportion of mobile PAR (%) estimated for (PAR30-FITC/HA)<sub>24</sub> compared to (PAR30-FITC/HA)<sub>24</sub> that has been cross-linked with EDC-NHS. d) Normalized *S. aureus* growth in the supernatant after 24 h in contact with non-crosslinked (PAR30/HA)<sub>24</sub> multilayers films in comparison with (PAR30/HA)<sub>24</sub> crosslinked 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 devices<sup>30</sup> (**figure 3.13**). At least 90% of inhibition of *S. aureus methicilin 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 gram-negative bacteria.

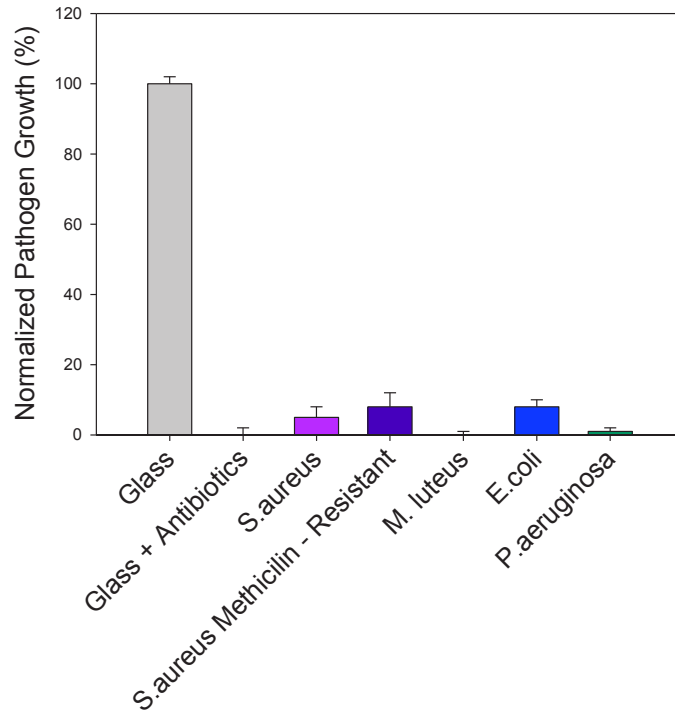


Figure 3.13: Normalized growth (%) of *S. aureus*, *S. aureus* Methicillin Resistant (MRSA), *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* in supernatant after 24 h in contact with (PAR30/HA)<sub>24</sub> multilayers films composed of poly(arginine) with various number of residues. Each value corresponds to 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)<sub>24</sub> 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 3.14**). 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. This is a

positive point in the perspective of the application of PAR/HA films as coatings of implanted medical devices.

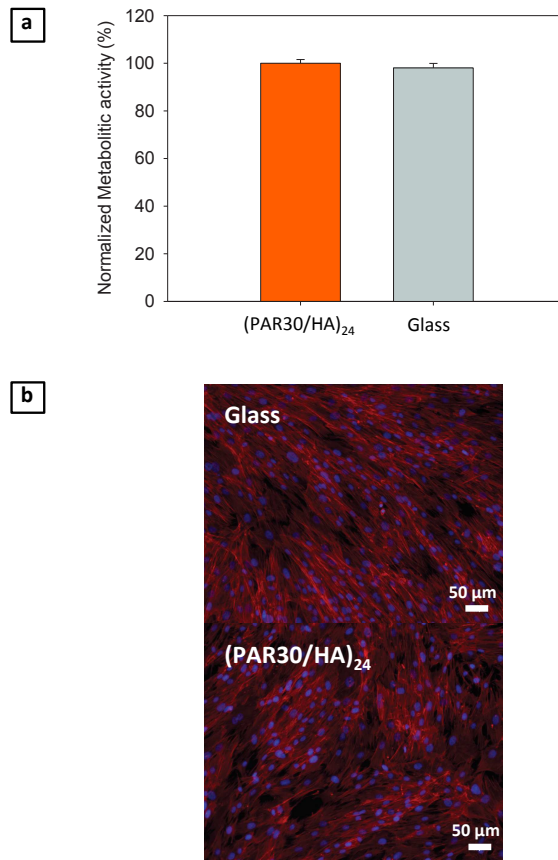


Figure 3.14: a) Metabolic activity (%) of human primary fibroblasts incubated with medium in contact with (PAR30/HA)<sub>24</sub> multilayers films for 24 h. Glass surface was used as a control. b) Actin filaments (phalloidin labeling, red) and nucleus (DAPI labeling, blue) were also observed in cells growing on the surfaces. Each value corresponds to the mean value of 3 individual samples per condition and error bars correspond to standard deviations.

Finally, we clearly demonstrate that the 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 per chain is not active in (PAR/HA) films despite its high mobility in the films and its MIC which is close to that of PAR30. This can be attributed to the film buildup which is about two times thinner with PAR10 compared to PAR30. After 24 bilayers, the amount of free PAR10 chains able to inhibit for 24 h bacterial growth could be too low. To verify this hypothesis, we performed additional experiments with PAR10/HA films containing a higher number of bilayer (48 instead of 24) (**figure 3.15**). PAR10/HA films

containing 48 bilayers become antimicrobial, however PAR100/HA or PAR200/HA remain inactive with 48 bilayers. This indicates that a sufficient number of free PAR chains should be available to confer antimicrobial properties to the films. For PAR10 or PAR30, this number is reached with 48 or 24 bilayers respectively.

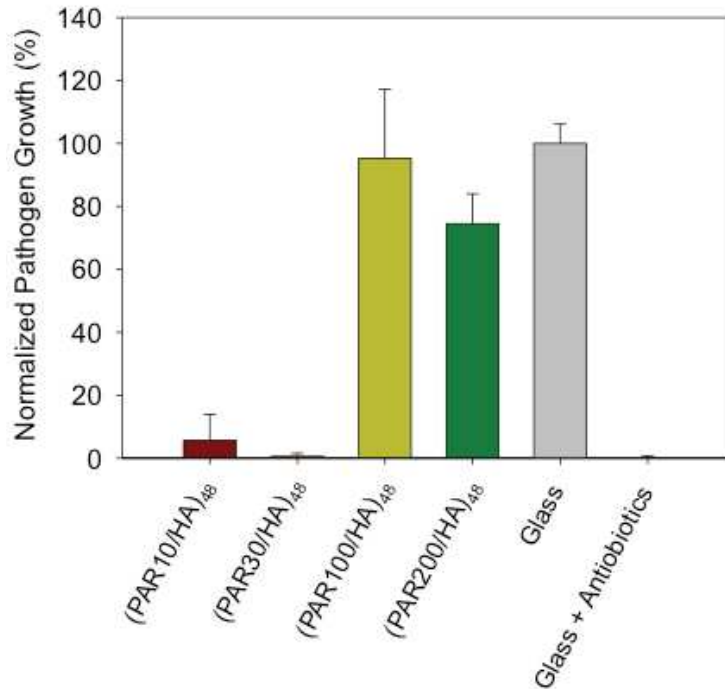


Figure 3.15: Normalized *S. aureus* growth in supernatant after 24 h in contact with (PAR/HA)<sub>48</sub> multilayers films composed of poly(arginine) with a variable number of residues per chain. Each value corresponds to the mean value of 3 individual experiments (3 samples per experiment and condition) and error bars correspond to standard deviations.

Concerning the mechanism of action of PAR30 (or PAR10 for thicker films), it should be related to diffusion of PAR30 chains out of the film enhanced by the attractive electrostatic interactions between the positively charged PAR and the negatively charged bacterial membrane. This interaction should occur as soon as the bacteria come in contact with the PAR/HA film. Time-lapse microscopy experiments have clearly shown that the bacteria are killed when they touch the PAR30/HA surface (**figure 3.16**). 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.<sup>25,60</sup> 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.<sup>24</sup>



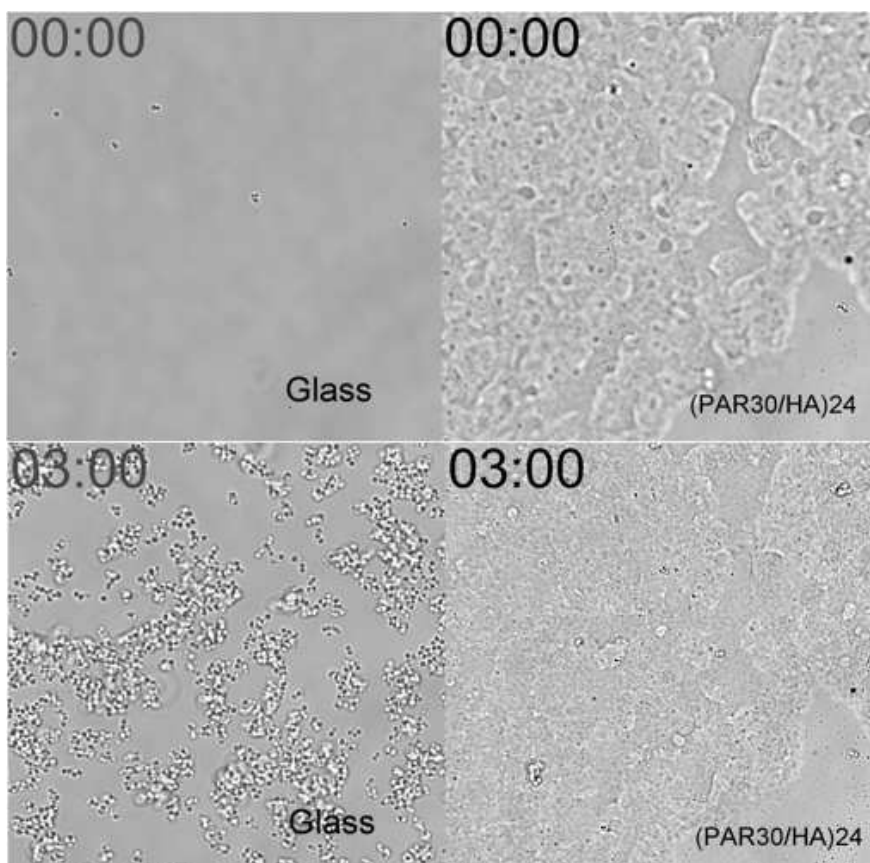


Figure 3.16: Time-lapse images of *S. aureus* solution incubated on a control surface and a surface coated with (PAR30/HA)<sub>24</sub> film. Time is indicated in hours.

### 3.2.5. Conclusion

Effective contact-killing antimicrobial coatings is a potential remedy for some nosocomial infections. Herein, we demonstrated that (PAR/HA) films present a strong antimicrobial activity against bacteria known to be 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.).

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Decher, G. & Hong, J. D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process .1. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia* **46**, 321-327, (1991).
- 2 Richert, L. *et al.* Improvement of Stability and Cell Adhesion Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films by Chemical Cross-Linking. *Biomacromolecules* **5**, 284-294, (2004).
- 3 Chluba, J. *et al.* Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules* **2**, 800-805, (2001).
- 4 Ozcelik, H. *et al.* Harnessing the multifunctionality in nature: a bioactive agent release system with self-antimicrobial and immunomodulatory properties. *Advanced Healthcare Materials* **4**, 2026-2036, (2015).
- 5 Buonomenna, M. G. 14 - Smart composite membranes for advanced wastewater treatments in *Smart Composite Coatings and Membranes* (ed M. F. Montemor) 371-419 (Woodhead Publishing, 2016).
- 6 Park, K., Choi, D. & Hong, J. Nanostructured Polymer Thin Films Fabricated with Brush-based Layer-by-Layer Self-assembly for Site-selective Construction and Drug release. *Scientific Reports* **8**, 3365, (2018).
- 7 Zhu, Y., Crewe, C. & Scherer, P. E. Hyaluronan in adipose tissue: Beyond dermal filler and therapeutic carrier. *Science Translational Medicine* **8**, 323ps324, (2016).
- 8 Glogau, R. G. Fillers: From the Past to the Future. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* **31**, 78-87, (2012).
- 9 Ruppert, S. M., Hawn, T. R., Arrigoni, A., Wight, T. N. & Bollyky, P. L. Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. *Immunologic research* **58**, 186-192, (2014).
- 10 Altman, R. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Intra-Articular Hyaluronic Acid: A Systematic Review. *Cartilage* **10**, 43-52, (2019).
- 11 Stern, R. & Jedrzejewski, M. J. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chemical reviews* **106**, 818-839, (2006).
- 12 Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 33-45, (2003).
- 13 Zhang, X. J. *et al.* Dual-responsive nanoparticles based on chitosan for enhanced breast cancer therapy. *Carbohydrate Polymers* **221**, 84-93, (2019).

- 14 Yang, H., Liu, Y., Qiu, Y., Ding, M. & Zhang, Y. MiRNA-204-5p and oxaliplatin-loaded silica nanoparticles for enhanced tumor suppression effect in CD44-overexpressed colon adenocarcinoma. *International journal of pharmaceutics* **566**, 585-593, (2019).
- 15 Zhang, Y. *et al.* Redox-Responsive and Dual-Targeting Hyaluronic Acid-Methotrexate Prodrug Self-Assembling Nanoparticles for Enhancing Intracellular Drug Self-Delivery. *Molecular pharmaceutics* **16**, 3133-3144, (2019).
- 16 Wu, P. Y. *et al.* Enhanced anti-tumor efficacy of hyaluronic acid modified nanocomposites combined with sonotherapy against subcutaneous and metastatic breast tumors. *Nanoscale* **11**, 11470-11483, (2019).
- 17 Fraunholz, M. & Sinha, B. Intracellular Staphylococcus aureus: live-in and let die. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2**, (2012).
- 18 Zhang, X. *et al.* The highly efficient elimination of intracellular bacteria via a metal organic framework (MOF)-based three-in-one delivery system. *Nanoscale* **11**, 9468-9477, (2019).
- 19 Montanari, E. *et al.* Hyaluronan-Based Nanohydrogels for Targeting Intracellular S-Aureus in Human Keratinocytes. *Advanced Healthcare Materials* **7**, 12, (2018).
- 20 Montanari, E. *et al.* Hyaluronan/Tannic Acid Nanoparticles Via Catechol/Boronate Complexation as a Smart Antibacterial System. *Macromolecular Bioscience* **16**, 1815-1823, (2016).
- 21 Kristensen, M. & Nielsen, H. M. Cell-penetrating peptides as tools to enhance non-injectable delivery of biopharmaceuticals. *Tissue Barriers* **4**, e1178369, (2016).
- 22 Gestin, M., Dowaidar, M. & Langel, U. Uptake Mechanism of Cell-Penetrating Peptides. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1030**, 255-264, (2017).
- 23 Murray, B., Pearson, C. S., Arango, A., Cherupalla, D. & Belfort, G. Mechanism of Four de Novo Designed Antimicrobial Peptides. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 25706-25715, (2016).
- 24 Wimley, W. C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chemical Biology* **5**, 905-917, (2010).
- 25 Malmsten, M. Antimicrobial peptides. *Upsala journal of medical sciences* **119**, 199-204, (2014).
- 26 Costa, F., Carvalho, I. F., Montelaro, R. C., Gomes, P. & Martins, M. C. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomaterialia* **7**, 1431-1440, (2011).
- 27 Mitchell, D. J., Steinman, L., Kim, D., Fathman, C. & Rothbard, J. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *Chemical Biology & Drug Design* **56**, 318-325, (2000).

- 28 Huynh-Ba, G. Peri-implantitis: “tsunami” or marginal problem? *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **28**, 333-337, (2013).
- 29 Tarakji, K. G., Ellis, C. R., Defaye, P. & Kennergren, C. Cardiac Implantable Electronic Device Infection in Patients at Risk. *Arrhythmia & electrophysiology review* **5**, 65-71, (2016).
- 30 Sampedro, M. F. & Patel, R. Infections associated with long-term prosthetic devices. *Infectious disease clinics of North America* **21**, 785-819, (2007).
- 31 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* **6**, Doc18, (2011).
- 32 Seon, L., Lavalle, P., Schaaf, P. & Boulmedais, F. Polyelectrolyte Multilayers: A Versatile Tool for Preparing Antimicrobial Coatings. *Langmuir* **31**, 12856-12872, (2015).
- 33 Pavlukhina, S. V. *et al.* Noneluting enzymatic antibiofilm coatings. *ACS Applied Materials & Interfaces* **4**, 4708-4716, (2012).
- 34 Cado, G. *et al.* Self-Defensive Biomaterial Coating Against Bacteria and Yeasts: Polysaccharide Multilayer Film with Embedded Antimicrobial Peptide. *Advanced Functional Materials* **23**, 4801-4809, (2013).
- 35 Zhuk, I. *et al.* Self-defensive layer-by-layer films with bacteria-triggered antibiotic release. *ACS Nano* **8**, 7733-7745, (2014).
- 36 Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **277**, 1232-1237, (1997).
- 37 Silva, J. M., Reis, R. L. & Mano, J. F. Biomimetic Extracellular Environment Based on Natural Origin Polyelectrolyte Multilayers. *Small*, 4308-4342, (2016).
- 38 Tang, Z. Y., Wang, Y., Podsiadlo, P. & Kotov, N. A. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering. *Advanced Materials* **18**, 3203-3224, (2006).
- 39 Stuart, M. A. *et al.* Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nature Materials* **9**, 101-113, (2010).
- 40 Boudou, T., Crouzier, T., Ren, K. F., Blin, G. & Picart, C. Multiple Functionalities of Polyelectrolyte Multilayer Films: New Biomedical Applications. *Advanced Materials* **22**, 441-467, (2010).
- 41 Lavalle, P. *et al.* Dynamic aspects of films prepared by a sequential deposition of species: perspectives for smart and responsive materials. *Advanced Materials* **23**, 1191-1221, (2011).
- 42 Hammond, P. T. Building biomedical materials layer-by-layer. *Materials Today* **15**, 196-206, (2012).

- 43 Guyomard, A. *et al.* Incorporation of a hydrophobic antibacterial peptide into amphiphilic polyelectrolyte multilayers: A bioinspired approach to prepare biocidal thin coatings. *Advanced Functional Materials* **18**, 758-765, (2008).
- 44 Porcel, C. *et al.* From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **22**, 4376-4383, (2006).
- 45 Picart, C. *et al.* 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* **99**, 12531-12535, (2002).
- 46 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* **59**, 391-396, (1999).
- 47 Soumpasis, D. M. Theoretical-Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Experiments. *Biophysical Journal* **41**, 95-97, (1983).
- 48 Picart, C. *et al.* Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film. *Microscopy Research and Technique* **66**, 43-57, (2005).
- 49 McNamara, T. P. & Blanford, C. F. A sensitivity metric and software to guide the analysis of soft films measured by a quartz crystal microbalance. *Analyst* **141**, 2911-2919, (2016).
- 50 Kujawa, P., Moraille, P., Sanchez, J., Badia, A. & Winnik, F. M. Effect of molecular weight on the exponential growth and morphology of hyaluronan/chitosan multilayers: a surface plasmon resonance spectroscopy and atomic force microscopy investigation. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 9224-9234, (2005).
- 51 Porcel, C. *et al.* Influence of the polyelectrolyte molecular weight on exponentially growing multilayer films in the linear regime. *Langmuir* **23**, 1898-1904, (2007).
- 52 Micciulla, S., Dodoo, S., Chevigny, C., Laschewsky, A. & von Klitzing, R. Short versus long chain polyelectrolyte multilayers: a direct comparison of self-assembly and structural properties. *Physical Chemistry Chemical Physics* **16**, 21988-21998, (2014).
- 53 Richert, L. *et al.* Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir* **20**, 448-458, (2004).
- 54 Raphel, J., Holodniy, M., Goodman, S. B. & Heilshorn, S. C. Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. *Biomaterials* **84**, 301-314, (2016).
- 55 Greenfield, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols* **1**, 2876-2890, (2006).
- 56 Zahouani, S. *et al.* Stretch-Induced Helical Conformations in Poly(L-lysine)/Hyaluronic Acid Multilayers. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**, 14958-14965, (2016).

- 57 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* **18**, 4523-4525, (2002).
- 58 Lugardon, K. *et al.* Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 35875-35882, (2001).
- 59 Schneider, A. *et al.* Polyelectrolyte Multilayers with a Tunable Young's Modulus: Influence of Film Stiffness on Cell Adhesion. *Langmuir* **22**, 1193-1200, (2005).
- 60 Wang, G. *et al.* Antimicrobial peptides in 2014. *Pharmaceuticals* **8**, 123-150, (2015).

**Chapitre 4. Revêtement  
antibactérien intelligent avec  
système de clivage auto-induit  
par les pathogènes**





# SOMMAIRE

<b>Chapitre 4. Revêtement antibactérien intelligent avec système de clivage auto-induit par les pathogènes.....</b>	<b>137</b>
4.1. Introduction.....	141
4.1.1. La protéase V8 .....	142
4.1.2. La séquence clivable.....	143
4.2. Smart antimicrobial enzyme responsive surfaces: towards theranostic antimicrobial coatings .....	145
4.2.1. Abstract.....	145
4.2.2. Introduction.....	145
4.2.3. Experimental Section.....	150
4.2.4. Results .....	155
4.2.5. Conclusion .....	168
4.3. Résultats complémentaires .....	169
4.3.1. Étude du clivage en solution.....	170
4.3.2. Autres constructions du polymère tribloc.....	176
4.4. Conclusion .....	180
Bibliographie .....	182



## 4.1. Introduction

*Staphylococcus aureus* est une bactérie commensale qui colonise de façon asymptomatique la peau et les voies respiratoires supérieures d'environ 20% et 30%, respectivement, de la population saine.<sup>1</sup> Cependant, il s'agit également d'une des principales causes d'infections nosocomiales.<sup>2</sup> Les infections induites par *S. aureus* peuvent aller de l'infection cutanée légère à des infections systémiques plus graves telles que la pneumonie, l'endocardite ou encore l'arthrite septique. La raison de cette grande diversité de maladie est la capacité de *S. aureus* à produire une grande variété de facteurs de virulence.

De façon générale, les bactéries préfèrent vivre associées à une surface plutôt que de manière libre dans le milieu.<sup>3</sup> La première raison à cela est qu'attachée à une surface, la bactérie va pouvoir initier la formation d'un biofilm et se protéger de l'environnement extérieur. Dans le biofilm, la bactérie est intégrée au sein d'une matrice extracellulaire dans laquelle elle est protégée contre les agressions externes telles que les agents antimicrobiens ou encore le système immunitaire de l'hôte. Comparé à une bactérie planctonique, une bactérie associée à un biofilm peut être jusqu'à 1000 fois plus résistante aux agents antimicrobiens.<sup>4</sup> L'expression de ses gènes va être fortement modifiée entre un état planctonique et un état sessile y compris celle des facteurs de virulence. Ces derniers sont régulés de façon coordonnée avec le cycle de croissance de la bactérie. La production de protéines extracellulaires va se faire lorsque la densité cellulaire sera importante, à la fin de la phase exponentielle et durant la phase stationnaire, en même temps que la répression de la synthèse des protéines de surface. Les deux principaux régulateurs des gènes de virulence chez *S. aureus* sont *agr* (accessory gene regulator) et *sarA* (Staphylococcal accessory regulator A). Le locus *sarA* code pour une protéine de liaison à l'ADN qui va modifier la transcription de certains éléments dont le régulateur *agr*.<sup>5</sup> Le locus *agr* est un régulateur dépendant du quorum-sensing (QS) qui réprime la synthèse des protéines associées à la paroi cellulaire et active la synthèse des protéines extracellulaires en phase post-exponentielle.<sup>4</sup> Quatre protéases extracellulaires majeures sont régulées par *agr* : une métalloprotéase (auréolysine), une sérine protéase (protéase V8) ainsi que deux cystéine protéases (staphopaine A et staphopaine B).<sup>6,7</sup>

### 4.1.1. La protéase V8

Les protéases constituent une grande classe de molécules enzymatiques qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques. Elles peuvent être intra- ou extracellulaires et sont présentes dans tous les organismes vivants, dans lesquels elles exercent de nombreuses fonctions physiologiques essentielles, allant de la dégradation des protéines à une activité de régulation plus spécifique. Les protéases extracellulaires ont montré un rôle important dans la virulence des bactéries puisqu'elles sont capables de cliver les peptides antimicrobiens et de les rendre inefficaces<sup>8</sup> mais également d'inhiber toutes les voies du complément.<sup>9</sup> La protéase V8 est une glutamyle endopeptidase et sera abrégée GluC dans ce manuscrit de thèse. Elle a été la première enzyme protéolytique de *S. aureus* purifiée et caractérisée.<sup>10</sup> C'est une des protéases extracellulaires qui jouent un rôle important dans l'esquive des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte.<sup>11</sup> Elle coupe préférentiellement les liaisons peptidiques du côté C-terminal de l'acide glutamique mais peut, dans certaines conditions cliver du côté C-terminal de l'acide aspartique.<sup>10</sup> C'est une enzyme qui appartient à la famille des chymotrypsines (chymotrypsin-like protease, CLP) lesquelles partagent leur principe d'organisation spatiale.<sup>12</sup> Le site actif de la GluC consiste en trois résidus : His51, Asp93 et Ser169 comme le montre la **figure 4.1**.<sup>13</sup> Elle a une spécificité de substrat très étroite ce qui la rend intéressante pour la caractérisation de protéines, à l'instar de la trypsine, qui elle clive spécifiquement les résidus arginine et lysine.<sup>14</sup>

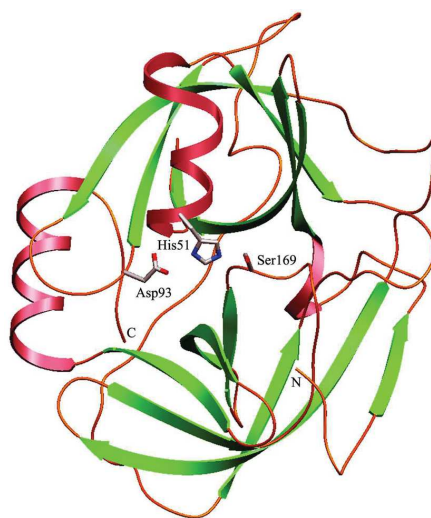


Figure 4.1 : Structure tridimensionnelle de la protéase V8. Les résidus de la triade catalytique sont représentés par des bâtons. Reproduced with permission of the International Union of Crystallography.<sup>13</sup> Copyright 2004.

*S. aureus* n'est pas la seule bactérie à produire une glutamyle endopeptidase. Cette protéase est retrouvée dans de nombreuses bactéries gram-positives comme *Enterococcus faecalis* et *Streptomyces griseus* mais on en retrouve également chez les virus à ARN de polarité positive.<sup>15</sup> La souche *S. aureus* V8 est une souche connue pour fortement exprimer la GluC. La GluC est codée par le gène *SspA* chez *S. aureus* et régulée par le régulateur général *agr*. Ce régulateur est dépendant de la concentration bactérienne environnante et va être activée lorsque cette dernière est élevée. Au début de l'infection, les bactéries planctoniques produisent des composants à la surface de leur paroi pour permettre l'adhésion aux tissus ou matériaux environnants. A ce stade, l'expression d'*agr* est très faible. Une fois que l'infection est installée, la densité cellulaire devient plus élevée, et les bactéries ont besoin de ressources et de se protéger contre les défenses mises en place par l'hôte. C'est à ce moment qu'intervient *agr*, en activant la production d'enzymes extracellulaires, notamment la GluC ; et de toxines.<sup>16</sup> Des études *in vitro* ont montrées qu'une souche délétée du locus *agr* forme des biofilms plus robustes qu'une souche sauvage.<sup>7</sup> *In vivo*, il a été démontré qu'une souche *agr*-déficiente est beaucoup moins virulente dans un modèle murin d'abcès comparé à une souche sauvage.<sup>17</sup> Cette capacité accrue de former un biofilm est le résultat de la diminution de la production de protéases extracellulaires empêchant le passage de la forme adhésive à la forme invasive.

#### 4.1.2. La séquence clivable

Dans le but de créer un revêtement dont l'activité antibactérienne est déclenchée par le pathogène, un site clivable par la GluC a été incorporée dans le revêtement. Ce site, conçu au laboratoire, a pour séquence TLRGGE. La GluC est capable de cliver la liaison du côté C-terminal de l'acide glutamique (E) présent dans la séquence. Afin d'étudier le clivage de cette séquence, des sondes fluorescentes ont été ajoutées aux extrémités de la séquence TLRGGE. Cela va permettre de détecter le clivage par émission de fluorescence comme décrit dans la partie 2.6 de ce manuscrit. Des séquences similaires à celle-ci ont été mises au point par d'autres chercheurs. Récemment, Wang *et al.*,<sup>6</sup> ont conçu des sondes fluorescentes mettant en évidence l'activité des protéases extracellulaires dans le microenvironnement de *S. aureus*. Pour cela, une séquence, clivable par la GluC, a été synthétisée et deux sondes fluorescentes ont été ajoutées à ses extrémités. Li *et al.*<sup>18</sup> ont

créé un système FRET capable de mettre en évidence l'activité de la Sortase A, une cystéine transpeptidase liée à la membrane de *S. aureus* et qui catalyse l'attachement covalent à la paroi cellulaire de protéines contenant un motif spécifique. Ils ont conçu deux peptides avec chacun une sonde fluorescente, qui lorsqu'ils sont attachés par la Sortase A émettent un signal de fluorescence différent que lorsqu'ils sont seuls.

Ce chapitre de thèse décrit les résultats obtenus pour la conception d'un revêtement de surface permettant à la fois le diagnostic et le traitement d'infections liées à des dispositifs médicaux. La première génération de revêtement PAR/HA présentée dans le chapitre 3 a servi de base à la création de cette nouvelle génération plus innovante et plus spécifique des pathogènes. Un aspect novateur majeur a été ajouté ici : la conception de longues chaînes de PAR contenant la séquence peptidique TLRGGE spécifique pouvant être hydrolysée par la GluC en chaînes de PAR courtes. Les films PAR/HA sont construits avec ces longues chaînes PAR. Lorsque des enzymes spécifiques produites par des bactéries seront proches de la surface, les longues chaînes de PAR contenant la séquence peptidique seront clivées par ces enzymes et des chaînes de PAR plus courtes seront alors produites. La présence de ces courtes chaînes de PAR permettra ensuite de rétablir une activité antimicrobienne sur le film. Ce revêtement à base de polypeptides portant des séquences spécifiques sensibles aux enzymes est une stratégie innovante et prometteuse pour les applications biomédicales.

## **4.2. Smart antimicrobial enzyme responsive surfaces: towards theranostic antimicrobial coatings**

Partie rédigée sous forme d'article.

### **4.2.1. Abstract**

About half of medical devices are involved in hospital-acquired infections (HAIs). Implantable but also non-implantable devices are ideal surfaces for bacterial growth and biofilm development. Moreover, the emergence of antibiotic resistant bacteria is fearing a significant increase in these device-related infections in the coming years. New strategies to fight against pathogens involved in these need to target new molecules. In the present study, a smart antimicrobial enzyme responsive coating was designed. This coating is based on polyarginine associated with hyaluronic acid in a layer-by-layer form. Long and inactive PAR chains will contain a peptide sequence that will be cleaved by a specific enzyme produced by bacteria *S. aureus*. Bacteria will trigger the antimicrobial activity of the coating. Moreover, by adding FRET dyes in the polyarginine chain, the presence of bacteria on the surface can be detect by fluorescence signal. Finally, this smart coating is also theranostic as specific bacteria can be simultaneously detected but also killed.

### **4.2.2. Introduction**

The use of implantable medical devices either for temporary or permanent applications has become a common practice in almost all fields of medicine. However, foreign bodies are associated with a substantial risk of bacterial infections. Device-associated infections are responsible for about half of nosocomial infections or hospital-acquired infections (HAIs). They represent a serious problem in society from both an economical and health perspective. Medical devices as implants, catheters, cannulas... are ideal support for bacteria proliferation and then for the formation of biofilms that become hard to treat because often antibiotics are no more efficient towards such slimy layers of microorganisms.

Key factors at the origin of the recent increase in medical-device related infections could be attributed to *i)* emergence of multiple drug resistant bacteria; *ii)* ageing population; *iii)* lack of new antibiotic molecules; *iv)* panel of people with implants is enlarged: for example, in the case of dental implants, diabetics and smokers are now considered. It is therefore acknowledged that medical device related infections account for a substantial morbidity as well as causing a sharp increase in health-care costs.<sup>19-22</sup> Although the rate of infection is relatively low (about 3 to 10%), the sheer volume of medical devices accounts for a large number of infections. For instance in the case of orthopedic implants, it has been reported that from the approximately 800 000 annually implanted devices in Europe, 12 000 peri-prosthetic infections, occurred each year.<sup>19</sup> Moreover, the steadily increasing number of revision operations of orthopedic implants is associated with a much higher real infection rate.

New strategies to fight against pathogens involve in HAIs and implant associated infections (IAls) has become urgent and more particularly by targeting the design of new molecules able to be use as an effective agent towards ESKAPE pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species). One potential way of solving these complications, which is added to the risk management related to medical devices, is the development of coatings on the surfaces of these devices.

Classical silver coating or antibiotic grafting strategies have probably no longer future in the field of medical devices for respectively toxicity risk and emergency of antibiotic resistant bacteria.

Many strategies developing such coatings have emerged and most of the time, they consist in the buildup of a polymeric matrix, in which an active ingredient, like an antibiotic or an antimicrobial peptide, is added to confer the activity.<sup>23,24</sup> This requires to optimize several parameters: the loading rate of the active agent should be precisely controlled and chemical grafting can be necessary, while avoiding any degradation in the activity of the agent. Moreover, they consist in a delivery in a passive way of the active agent, i.e. with or without the presence of the pathogen. This can lead to the release of the antimicrobial molecule in an unnecessary manner in the absence of bacteria. Most of the antibacterial agent concentrated at high doses are toxic for mammalian cells, so the control of their release is essential to design an antibacterial coating limiting the side-effects.



The most common stimuli used with coatings claiming smart properties have been the pH, temperature and light. Temperature and light correspond to “external” stimuli and they may be difficult to apply to medical implants.<sup>25,26</sup> They will not correspond to responsive stimuli as they will not induce an activity or a release following an infection, an external trigger should be at the origin of the stimulus. Concerning the pH, the strategies are based on bacterial acidification that locally induce a pH decrease and then a change in the coating properties and finally release of antibiotics.<sup>23,27</sup> These systems show no selectivity for a bacterial strain, they are also effective towards non-pathogenic bacteria. Moreover, as antibiotics are the bioactive agent, they will not show any antimicrobial properties towards antibiotic resistant bacteria.

Here, we aim to design intelligent bacterial-responsive coatings with some unique multi-properties: i) it should be efficient towards some specific bacteria; ii) the antimicrobial ingredient should not be based on an antibiotic but on molecules that will not induce resistance; iii) the stimuli will be based on metabolites secreted from bacteria; iv) the coating should be simple to produce, standard for all kind of surfaces and not based on complex chemical grafting processes (**figure 4.2a**).

Recently we developed polyarginine/hyaluronic (PAR/HA) acid coatings as an innovative, bioactive coating which is based on the alternate deposition of a bioderived polycation, polyarginine, and a natural polyanion, hyaluronic acid.<sup>28</sup> The layer-by-layer (LbL) deposition of these polyelectrolyte multilayers constitutes a powerful tool for surface functionalization of medical devices and more particularly implants as it is simple to process and the deposition is “universal”, *i.e.* it is almost the same on any kind of surfaces. Polyarginine, as a component of the multilayer films can provide some anti-inflammatory properties to the coating through the presence of arginine which has a major role in macrophage metabolism. HA is also known for its anti-inflammatory properties. Moreover, the films show strong antimicrobial properties due to the presence of the polycation PAR which can induce lysis of bacterial membrane as soon as the bacteria come in contact with the coating. By investigating PAR/HA films with polyarginine of various chain length (10, 30, 50, 100 and 200 arginine residues), we demonstrated that exclusively films constructed with short PAR chains composed of 10 or 30 residues (noted as PAR10 or PAR30) show an antimicrobial property. This property is due to the ability of short positively charged PAR chains in PAR10/HA or PAR30/HA

films to diffuse freely inside the film and then to bind to the negatively charged bacterial membrane. This will result in bacterial lysis and death. PAR chains shorter than 10 residues did not show antimicrobial properties and PAR chains longer than 30 residues can no more diffuse and trapped in the film. This system has shown a strong efficiency on both gram positive and gram-negative strains.

This first generation of polyarginine coating is now well established and in the context of this new study, our aim is to design the next generation that should be smart and responsive and that should combine a diagnostic tool, *i.e.* provide an indicator of the bacterial presence. This requires to define new specifications to reach: *i)* to release PAR only “on demand”, *i.e.* when the pathogens are near the surface. This could guarantee a longer efficiency as there will be no unnecessary release and thus a limitation of side effects due to the absence of high doses of antimicrobial agents; *ii)* to confer a specificity of the coating towards pathogenic bacteria. Human microbiota contains almost 2 kilograms of bacteria and at least 1 000 species, most of them being essential for our health, so targeting pathogenic bacteria is crucial; *iii)* and last but not least, ability of the coating to send an alert when some specific bacteria are close to the surface.

Thus, in the context of the present study, PAR/HA films is used as the main platform. However a major innovative aspect added here is related to the design of long PAR chains containing a specific peptide sequence able to be enzymatically hydrolyzed into short PAR chains (**figure 4.2b**). PAR/HA films made with these long PAR chains will be initially. When specific enzymes produce from bacteria will be close to the surface, the long PAR chains containing the peptide sequence will be cleaved by these enzymes, and short PAR chains will then be produced (**figure 4.2a**). The presence of these short PAR chains will then allow to restore an antimicrobial activity to the film. This coating based on polypeptides bearing a specific enzyme-responsive sequences is an innovative and promising strategy for biomedical applications.

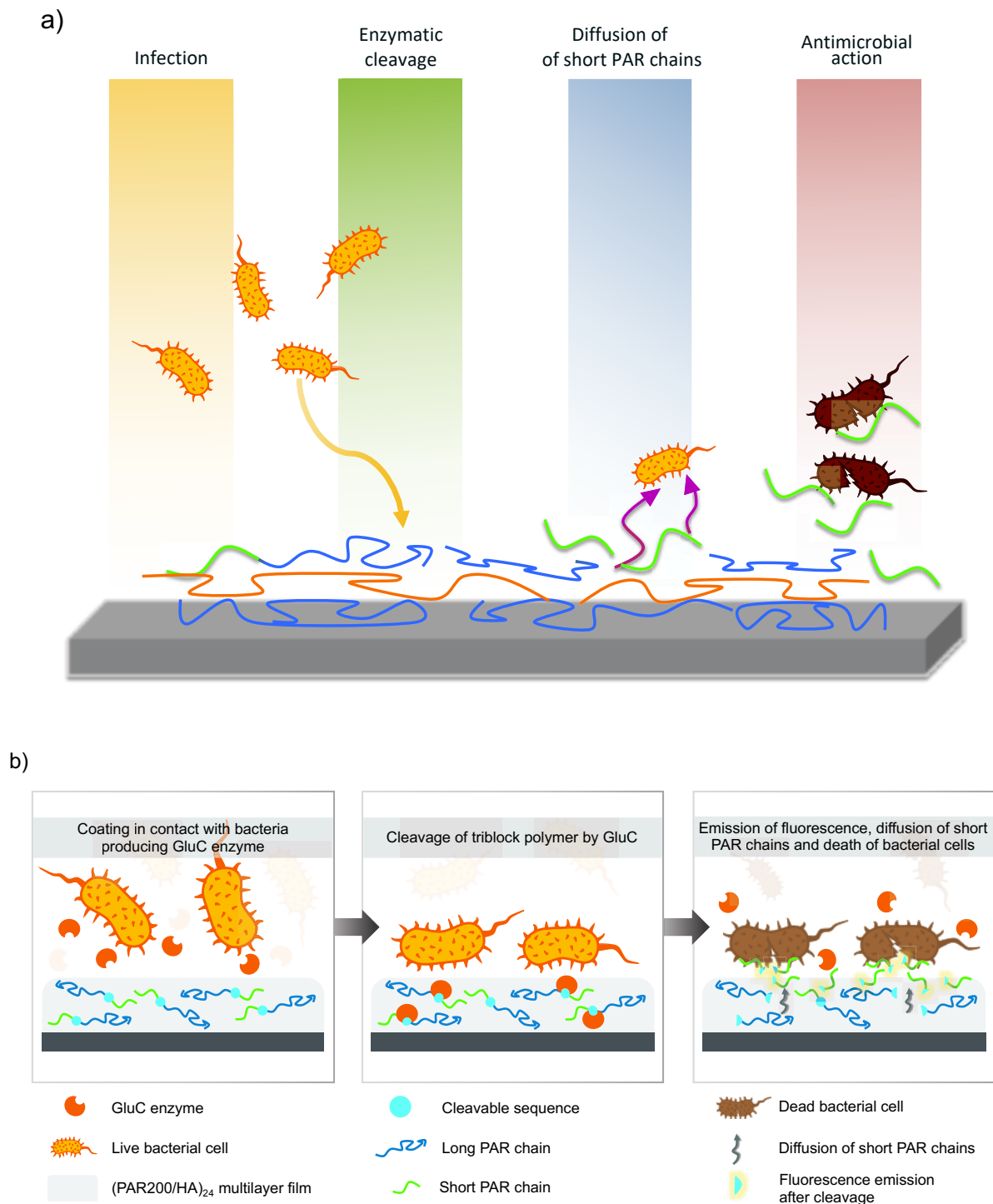


Figure 4.2: a) Schematic representation of the general strategy used: a coating made by layer-by-layer deposition will be sensitive to bacteria that will induce the release of active polyarginine chains and finally their destruction. b) details of the mechanism of antimicrobial activity of the coating.

### 4.2.3. 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 of 10 or 200 residues (PAR10, Mw = 1,9 kDa ; PAR200, Mw = 38.5 kDa) and was purchased from Alamanda Polymers (USA). Hyaluronic acid (HA, Mw = 111 kDa) used as a polyanion was produced by Lifecore Biomed (USA). The peptide used for FRET experiments has the following sequence: RRRRRRRRRR-K(DABCYL)-TLRGGE-E(EDANS)-K(Maleimide) noted as PAR10-FRET-Mal, with Mal corresponding to maleimide moieties in C-terminus and was purchased from Pepmic Co. (China). Endopeptidase Glu-C Sequencing Grade (GluC) was purchased from Sigma-Aldrich. Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) and Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxysulfosuccinimide (SulfoNHS) were purchased from Sigma-Aldrich.

#### *Synthesis of PAR200 (10%) Thiopyridone Conjugates*

2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)propionic acid (PDP) was prepared according to previously published procedures.<sup>29</sup> <sup>1</sup>H NMR was recorded on a Bruker Advance DPX400 NMR spectrometer locked to the major signal of each NMR solvent. 140 mg of PAR200 was dissolved in 3 mL of 10 mM (pH 6.5) Hepes Buffer with 50 mg of EDC, 15 mg of sulfo-NHS and 26 mg of PDP. The reaction was kept under nitrogen and magnetic stirring at room temperature for 24 hours. After elimination of by-products by dialysis (cut-off 3500 Da) against 4 x 1 L of deionized water, the solvent was eliminated by lyophilisation. The final weight was 135 mg. The average number of pyridine to arginine chain was determined by <sup>1</sup>H-NMR (Bruker DPX 400 MHz spectrometers) in D<sub>2</sub>O, comparing the integration signal at 8.3-7.2 ppm (aromatic bond of pyridine) with that at 4.26 (CH of arginine aminoacid). The integration of the pyridine characteristic peaks (aromatic bond) showed that between 10 and 20 % (in mol) were incorporated in the polymers.

### ***Monitoring the film buildup***

Film buildup was followed using an in situ quartz crystal microbalance (QCM, E1, Q-Sense, Sweden). The quartz crystal coated with a 100 nm thick gold layer 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). PAR and HA 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. The polyelectrolyte solutions were successively injected into the QCM sensor containing the quartz crystal and PAR was the first deposited polyelectrolyte. Each polyelectrolyte was adsorbed for 5 min and then, a rinsing step of 5 min with NaCl-TRIS buffer was performed.

### ***Buildup of PAR/HA films with dipping robot***

For the construction of 24 bilayers of PAR/HA ((PAR200/HA)<sub>24</sub>) an automated dipping robot was used (Riegler & Kirstein GmbH, Germany). Glass slides (12 mm in diameter) were first washed in an ultrasonic unit with Hellmanex® II solution at 2%, H<sub>2</sub>O, then with ethanol and finally they were dried with an air flow. Solutions 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 stored at 4°C before use.

### ***Antibacterial assay***

*S. aureus* V8 and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) were used to assess the antibacterial properties of the samples. The bacterial strains were 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  $5 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>.

To determine the minimum inhibitory concentration (CMI), 90% of this culture were incubated with 10% of the test compound at different concentrations. The positive control is composed of 90% bacterial suspension and 10% of a mixture of antibiotics (tetracycline: 10 µg.mL<sup>-1</sup> and cefotaxime: 0.1 µg.mL<sup>-1</sup> in PBS). The negative control is composed of 90% of the bacterial suspension and 10% of PBS and corresponds to our 100% growth. After 24 hours of incubation at 37 °C with shaking, the optical density at 620 nm of each well was measured. The smallest concentration for which bacterial growth is 0% corresponds to the MIC of the tested compound.

Glass slides coated with films were deposited in 24-well plates with 300 µL of bacteria suspension, to a density of  $5 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>, and incubated during 4 h at 37 °C with shaking. For negative control, uncoated glass slides were directly incubated with bacteria suspension using a similar method. For positive control, tetracycline (10 µg.mL<sup>-1</sup>) and Cefotaxime (0.1 µg.mL<sup>-1</sup>) were added in the *S. aureus* or *P. aeruginosa* solutions in contact with uncoated glass slides. To quantify bacteria growth or inhibition after 4h, the absorbance of the supernatant at 620 nm was measured. Then, all glass slides were rinsed with PBS and incubated with a solution of paraformaldehyde and glutaraldehyde, respectively at 2% and 2.5% (v/v), for 30 min at room temperature and 2 h at 4°C.

### ***SEM observation of S. aureus***

Glass slides fixed with paraformaldehyde and glutaraldehyde were washed thrice with PBS. Cells were dehydrated through a series of ethanol washes (50%, 70%, 90%, 95%, and 100% v/v solution of ethanol in distilled water). After, the samples were submerged in HMDS and evaporated in a chemical hood overnight. The samples were coated with a gold-palladium alloy using a Hummer Jr sputtering device (Technics, USA). Scanning electron microscopy assessments were performed using a Quanta 250 ESEM (FEI Company, Netherlands) operating with an accelerating voltage of electrons of 25 kV.

### ***Fluorescence Resonance Energy Transfer experiments***

FRET experiments were carried out in solution and in films. In solution, the PAR10-FRET-PAR200 peptide were used at 30  $\mu\text{M}$  in 150 mM NaCl and 10 mM of TRIS at pH 7.4. The enzyme was added with a peptide/enzyme ratio of 4/1. We performed the tests in a 96-well plate with a final volume of 100  $\mu\text{L}$ . We measured the fluorescence over time with a spectrofluorimeter (SAFAS Genius XC spectrofluorimeter, Monaco) with excitation/emission wavelength of 360/495 nm at 37°C.

For film analysis, a top layer of PAR10-FRET-PAR200 at 0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  was deposited on a (PAR200/HA)<sub>24</sub> film and we added GluC enzyme at 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for 1 h at 37°C. Then fluorescence of the film was measured with a with 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. The excitation/emission wavelength were 352-402 / 502-537 nm.

### ***Fluorescence recovery after photobleaching experiments: FRAP experiments***

Glass slides coated with PAR/HA films were introduced in a homemade sample holder and immersed in 200  $\mu\text{L}$  of NaCl-TRIS buffer. One circular region (either 4.65  $\mu\text{m}$  in radius in an image of 35  $\mu\text{m}$  × 35  $\mu\text{m}$ ) was bleached for 700 ms with laser beam set at its maximum power ( $\lambda = 488$  nm). Then, the recovery of fluorescence in the bleached area (mean value of measurements in circular region of 4.65  $\mu\text{m}$ ) 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 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.

### ***Time-Lapse Microscopy***

Glass slides coated with (PAR200/HA)<sub>24</sub>-PAR10-FRET-PAR200 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× Plan 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 10 min for 10 h. Images were processed with ImageJ.

### ***Biocompatibility tests***

The protocols followed for cytotoxicity tests from extracts were established according to ISO 10993-5 and 10993-12. Glass slides coated with (PAR200/HA)<sub>24</sub> or (PAR200/HA)<sub>24</sub> / (PAR10-FRET-PAR200/HA) / PAR10-FRET-PAR200 were incubated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM, Dutscher, France) without FBS. This solution is called extraction vehicle. Murine fibroblasts of the NIH / 3T3 cell line (ATCC® CRL-1658™) were cultured at 37 °C in DMEM with 10% of fetal bovine serum (FBS, Dutscher, France) and 1% of penicillin streptomycin (Pen Strep, Dutscher, France). 5 000 cells were incubated in each well of a 96-well plate during 24h. Then, the medium of the wells containing cells was removed and replaced by the extraction vehicle at different dilutions and cells were incubated again for 24 h at 37 °C. Each dilution was tested in triplicate and two controls were also carried out: the positive control corresponds to untreated cells incubated in culture medium; the negative control of cell viability corresponds to cells treated with 20% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich, France). After 24 hours, the supernatant was removed from the wells and was replaced by 100 µL of a solution of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma Aldrich, France) at 1 mg.mL<sup>-1</sup>. The 96-well plate was incubated for 2h at 37 °C, the MTT solution is then removed and replaced with 80 µL of DMSO. The absorbance of the wells is measured with the Xenius XC plate reader / spectrofluorometer (SAFAS, Monaco) at a wavelength of 556 nm after stirring the plate.



#### 4.2.4. Results

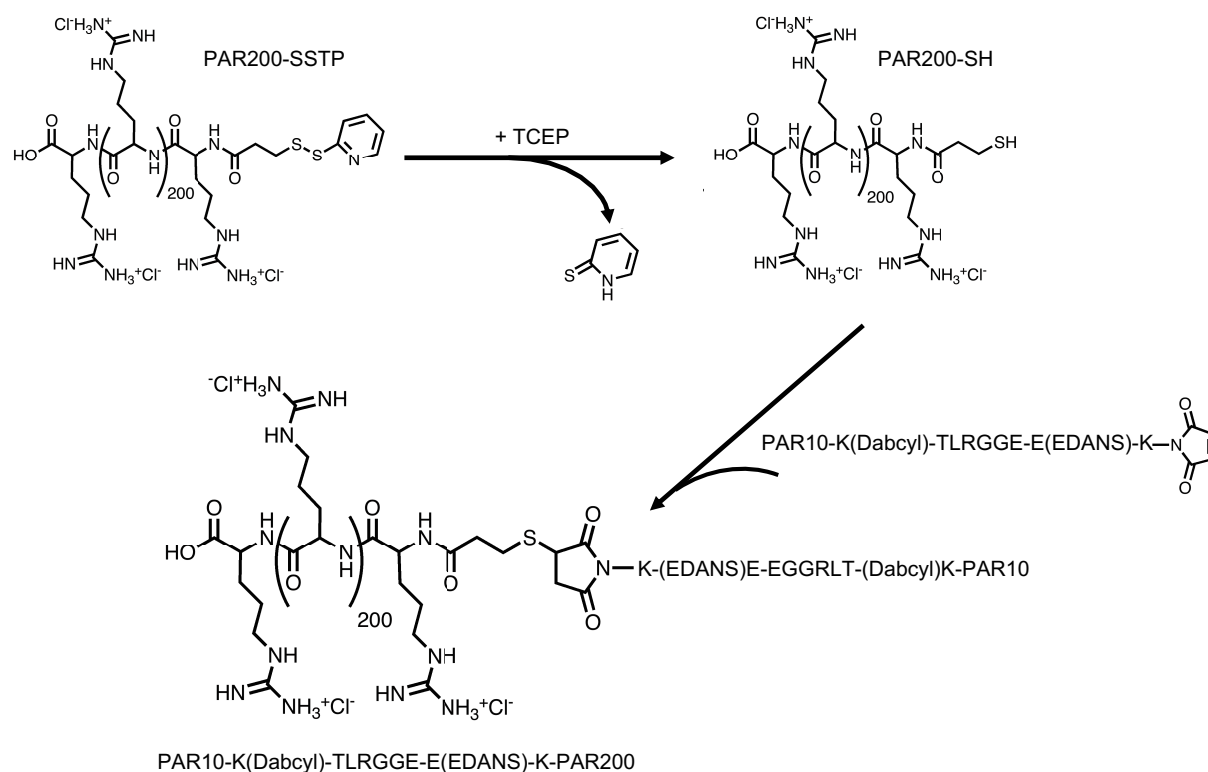
##### *Design and buildup of an enzyme-responsive polyarginine chain*

One of the technological issues of the innovative strategy selected is the design of the adequate peptide sequence that will be inserted in PAR. Indeed, it should be a sequence sensitive to an enzyme produced by bacteria of interest and not by mammalian cells. This way, when the bacteria will come close to the film initially inactive, enzymes produced by bacteria will induce hydrolysis of long PAR chains, production of short one, and finally activation of the antimicrobial activity. The film will thus act as a self-killing system.

The sequence was defined using previous studies from literature and also from peptide database (<https://www.ebi.ac.uk/merops>). Chromogranins are proteins distributed in endocrine cells, peripheral and central neurons. One of this protein, chromogranin A, is known to generate some bioactive peptides and in particular antimicrobial peptides, through proteolytic mechanisms by bacterial enzymes. After several sequences tested, a selection of 6 amino acids was finally defined that originates from the sequence of bovine Chromogranin A 41-46 (UniprotKB P05059), TLRGDE. Amino acid D was changed to G, in order to avoid a second enzymatic cleavage and to obtain finally the TLRGGE sequence. The enzyme endoprotease GluC produced by the bacteria *S. aureus*, one of the main pathogens involved in hospital acquired infections, is known to cleave the C-terminal link after a E (glutamic acid) residue in peptide sequence.<sup>10</sup> In this study, a short PAR sequence of 10 arginine residues (PAR10) will be separated from a long PAR sequence of 200 arginine residues (PAR200) by the cleavable sequence, TLRGGE, leading to a PAR10-TLRGGE-PAR200 chain.

Moreover, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) dyes were added to the designed peptide to follow, by fluorescence spectroscopy, the cleavage of the sequence. EDANS is a fluorescence donor and DABCYL is a quencher which means that when these two FRET dyes are close (i.e. in the same molecule), no fluorescence is produced because DABCYL quenches Edans emission. As soon as they are separated (i.e. during the enzymatic hydrolysis of the peptide), there is no more quenching and a fluorescence signal by EDANS is produced. The first peptide produced containing the cleavable sequence and a short PAR chain with 10 arginine residues was thus RRRRRRRRRR-

K(DABCYL)-TLRGGE-E(EDANS)-K(Mal) noted as PAR10-FRET-Mal, with Mal corresponding to maleimide moieties in C-terminus (**figure 4.3**).



*Figure 4.3: Design of a responsive polyarginine chain: a first PAR200-SSTP (polymer with 200 arginine residues with a protective thiopyridone group (TP) protecting the thiol moiety at the C-terminal) was produced and then linked to PAR10 sequence bearing a cleavable peptide sequence TLRGGE and the FRET dyes (DABCYL and EDANS).*

The second part of the enzyme-responsive polyarginine chain was designed with a long PAR chain containing 200 arginine residues with SH (thiol) moieties in the C-terminus (PAR200-SH). However, to avoid formation of disulfide bridges between these molecules, a protective thiopyridone group (TP) was added to PAR200-SH leading to PAR200-SSTP. Then this PAR200-SSTP molecule was mixed with PAR10-FRET-Mal in the presence of Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP). TCEP will deprotect PAR200-SSTP to generate PAR200-SH that will react with PAR10-FRET-Mal through thiol-maleimide addition. Finally, the PAR10-FRET-PAR200 was produced.  $^1\text{H}$  NMR, which showed a shift referenced to the residual signal of non-fully deuterated NMR solvents, was recorded on a Bruker Advance DPX400 NMR spectrometer locked to the major signal of each NMR solvent. After coupling thiol (SH moiety) of PAR200-SH, the signal of the maleimide (singlet at 6) completely disappears.

Evaluation of this enzyme-responsive polyarginine chain with planktonic pathogens was performed by incubation of this PAR10-FRET-PAR200 chain with two strains. *S. aureus* V8 and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) were used to assess the antibacterial properties of the samples (**table 4.1**).

Peptide	<i>S. aureus</i> V8	<i>P. aeruginosa</i>
PAR10-FRET-Mal	$11.87 \pm 0.55 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$121.15 \pm 26.14 \mu\text{g.mL}^{-1}$
	$3.68 \pm 0.17 \mu\text{M}$	$37.53 \pm 8.10 \mu\text{M}$
PAR10-FRET-PAR200	$21.95 \pm 6.21 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$48.98 \pm 1.60 \mu\text{g.mL}^{-1}$
	$0.52 \pm 0.15 \mu\text{M}$	$1.17 \pm 0.04 \mu\text{M}$

Table 4.1: Evaluation of Minimal inhibitory concentrations (MICs) of PAR10-K(DabcyI)TLRGEE(EDANS)-K-PAR200 (also noted as PAR10-FRET-PAR200) towards *S. aureus* V8 and *P. aeruginosa*. MICs of PAR10-FRET-Mal was also tested. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and in  $\mu\text{M}$ . Each PAR was incubated 24h at 37°C in 100  $\mu\text{L}$  of MHB medium with *S. aureus* V8 or *P. aeruginosa* ( $A_{620} = 0.001$ ). Each value corresponds to the mean value of 3 individual experiments (3 samples per experiment and condition) and error bars correspond to standard deviations.

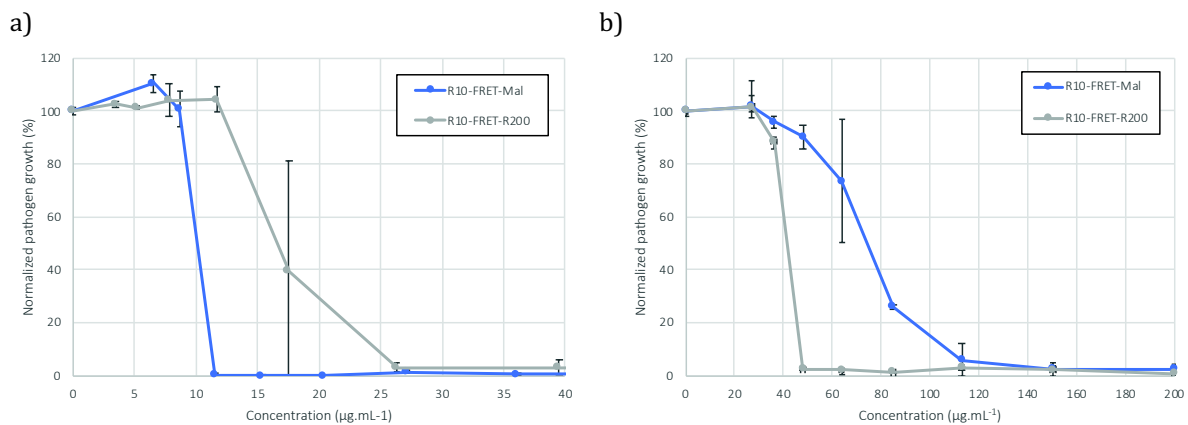


Figure 4.4: Evaluation of Minimal inhibitory concentrations (MICs) of PAR10-K(DabcyI)TLRGEE(EDANS)-K-PAR200 (also noted as PAR10-FRET-PAR200, grey line) and PAR10-FRET-Mal (blue line) towards *S. aureus* V8 a) and *P. aeruginosa* b). Concentrations are expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Each PAR was incubated 24h at 37°C in 100  $\mu\text{L}$  of MHB medium with *S. aureus* V8 or *P. aeruginosa* ( $A_{620} = 0.001$ ). Each value corresponds to the mean value of 3 individual experiments (3 samples per experiment and condition) and error bars correspond to standard deviations.

MICs values determined indicate that PAR chains are active in solution towards bacteria. However, the responsive PAR10-FRET-PAR200 in solution shows a strong antimicrobial

activity for planktonic bacteria with low MICs values as shown in **figure 4.4** (about 0.5 and 1.2  $\mu\text{M}$  towards *S. aureus* V8 and *P. aeruginosa* respectively).

Then, the responsive PAR10-FRET-PAR200 were evaluated in term of capacity to be cleaved enzymatically. For this purpose, GluC enzymes were incubated with the PAR10-FRET-PAR200 (**figure 4.5**). FRET dyes should allow to follow the hydrolysis of the sensitive sequence TLRGGE. Immediately after mixing the two components in PBS buffer, GluC enzymes and PAR10-FRET-PAR200, a strong signal of fluorescence was produced and indicating that GluC enzymes were able to cleave the PAR chains through the sensitive sequence and to induce separation of the two FRET dyes and EDANS emission. As control, the fluorescence of responsive PAR10-FRET-PAR200 without enzyme was monitored and absolutely no increase in fluorescence was observed. Similar results were obtained when MHB medium (conventional medium in antimicrobial tests) was used instead of PBS (**figure 4.6**). Finally, these first results indicate that the designed cleaveable peptide sequence is sensitive to enzymes GluC from *S. aureus* and that PAR10-FRET-PAR200 could be a good candidate to design a responsive coatings.

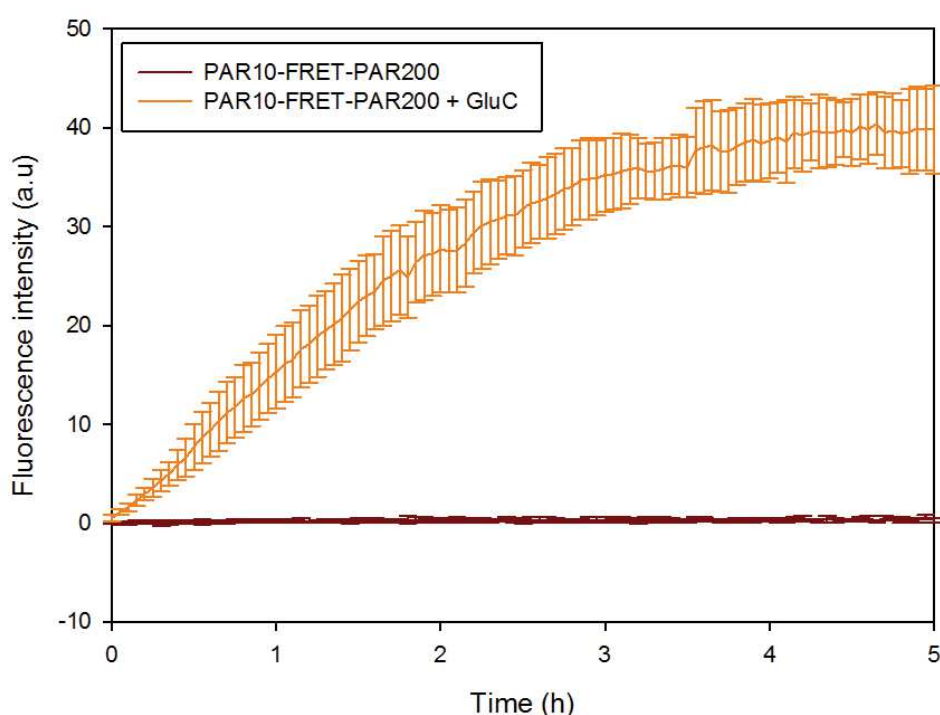


Figure 4.5: Evaluation of the cleavage of the PAR10-FRET-PAR200 during incubation in PBS in the presence of GluC enzymes (orange line) or without GluC enzymes (red line). Fluorescence intensity of EDANS emission (495 nm) was followed with time over 5 hours. Each value corresponds to the mean value of two individual experiments (three samples per experiment and condition) and error bars correspond to standard deviations.

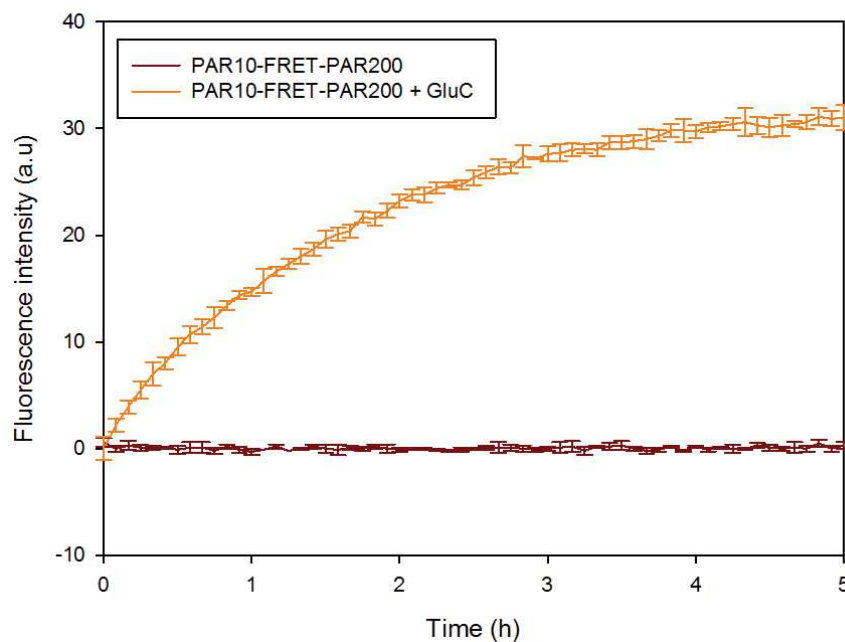


Figure 4.6: Evaluation of the cleavage of the PAR10-FRET-PAR200 during incubation in MHB medium in the presence of GluC enzymes (orange line) or without GluC enzymes (red line). Fluorescence intensity of EDANS emission (495 nm) was followed with time over 4 hours. Each value corresponds to the mean value of three samples per condition and error bars correspond to standard deviations.

### **Buildup of the responsive coating**

Then we designed a polyelectrolyte film made with PAR containing 200 residues (PAR200) and HA. For the construction of the film, the layer-by-layer method was used. First, film buildup was followed using an in-situ quartz crystal microbalance (QCM). An increase of the normalized frequency  $-\Delta f_v/\nu$  is often associated to a proportional increase of the mass coupled with the quartz (Sauerbrey's approximation). Eight polyarginine/hyaluronic acid bilayers were alternatively deposited in the QCM sensor and as expected, the growth follow an exponential regime (**figure 4.7**). The first 6 bilayers were made with PAR200 and HA leading to (PAR200/HA)<sub>6</sub>. Then, PAR10-FRET-PAR200 was deposited, followed by HA, PAR10-FRET-PAR200 and HA again. Each polyelectrolyte injection led to an increase in  $-\Delta f_v/\nu$ , suggesting that after each step, some polymers were deposited and the film buildup went on. It is also interesting to observe that the final amount of PAR10-FRET-PAR200 that the film will contain can be precisely tuned by adjusting the number of deposited PAR10-FRET-PAR200 layers. However, as producing the PAR10-FRET-PAR200 chains is time consuming, we only deposited 2 layers (layer 7 and 8 in the present case). As polyarginine/hyaluronic layers are known to have an

exponential growth with diffusion processes,<sup>28</sup> deposition of only two layers can however correspond to a significant loading in the film (**figure 4.8**).

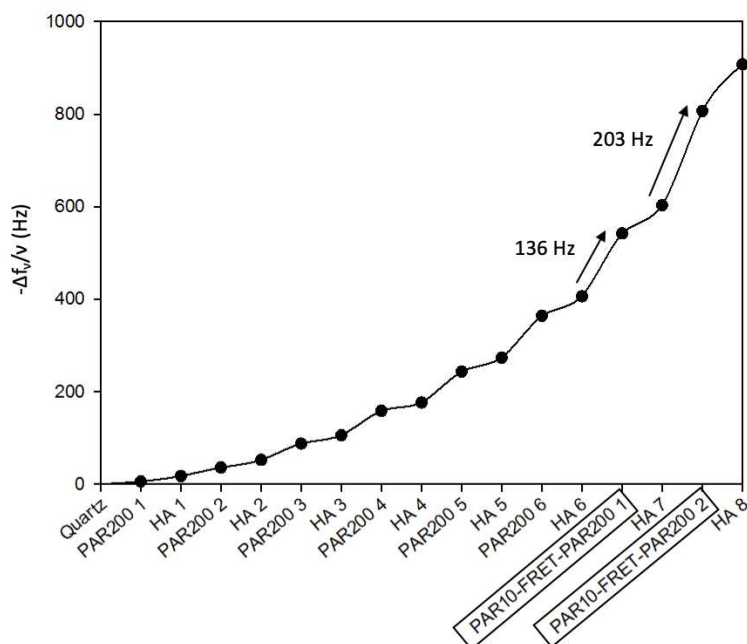


Figure 4.7: QCM monitoring of the film buildup (only  $\nu=3$  is plotted here). Change in normalized frequency ( $-\Delta f_v/v$ ) is monitored and an increase in  $-\Delta f_v/v$  can be in a first approximation associated with an increase in mass deposited.

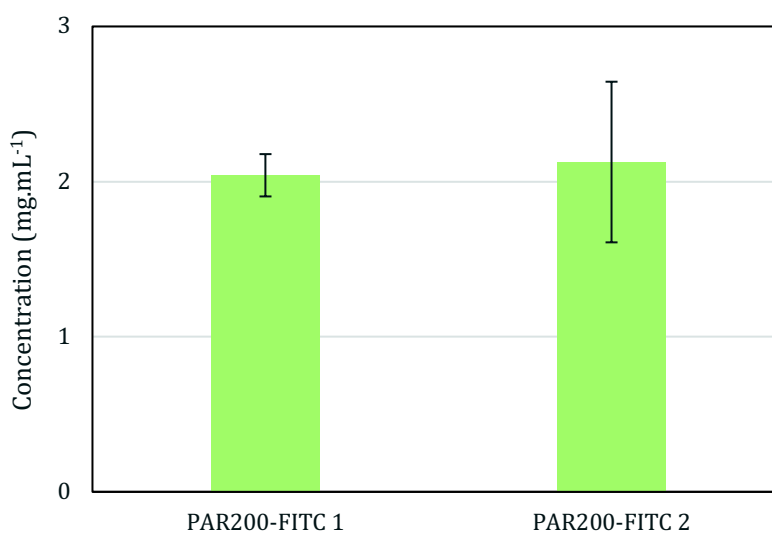


Figure 4.8: Evaluation of the concentration of the last layers of PAR200-FITC in a  $(\text{PAR200}/\text{HA})_{24}$  film. PAR200-FITC 1 correspond to a  $(\text{PAR200}/\text{HA})_{24}/\text{PAR200-FITC}$  film and PAR20-FITC 2 correspond to a  $(\text{PAR200}/\text{HA})_{24}/(\text{PAR200-FITC}/\text{HA})_{1.5}$ . Each value corresponds to the mean value of three individual experiments (three images per condition) and error bars correspond to standard deviations.

Then 24 bilayers of PAR200/HA ((PAR200/HA)<sub>24</sub>) were deposited with an automated dipping robot on glass slides to produce a high number of surfaces for the physico-chemical characterization and antimicrobial activity evaluation. A PAR10-FRET-PAR200 layer was added on top of the film to obtain (PAR200/HA)<sub>24</sub> / PAR10-FRET-PAR200. This PAR10-FRET-PAR200 layer should be cleaved by the GluC enzymes from *S. aureus* and PAR10 will be released in the film. To confirm that these “free” PAR10 chains will acquire a higher mobility compared to their mobility in a configuration linked to PAR200, FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) experiments were performed starting from a (PAR200/HA)<sub>24</sub> film and by adding fluorescently short or long PAR chains, *i.e.* either PAR10-FITC or PAR200-FITC respectively. Recovery of fluorescence after photobleaching was monitored as a function of time and clearly higher mobility of PAR10-FITC chains was observed compare to PAR200-FITC (**figure 4.9**). This confirms that the mobile PAR10 chains antimicrobial activity will be probably effective when PAR10 chains will be released in the film by GluC enzyme and will become mobile, so prone to interact with negatively charged bacteria membranes to induce lysis.

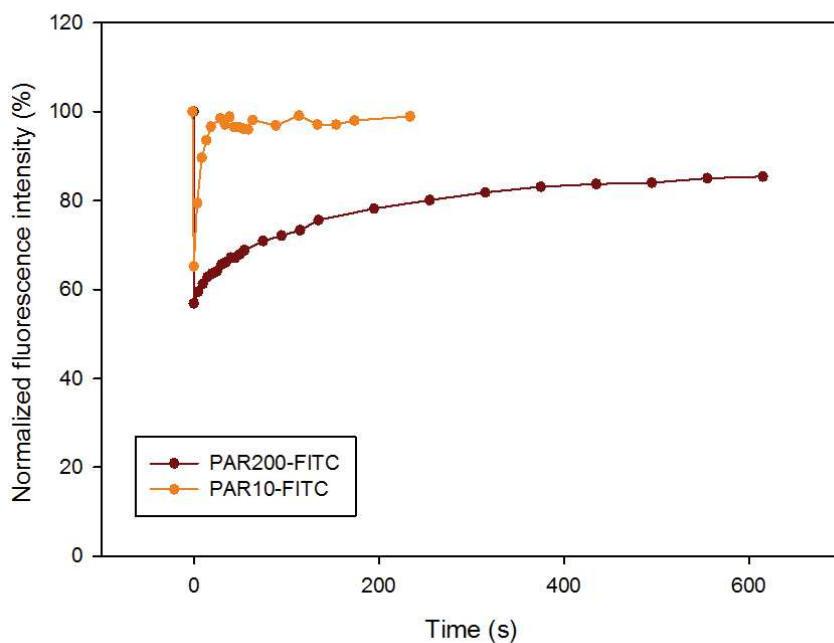
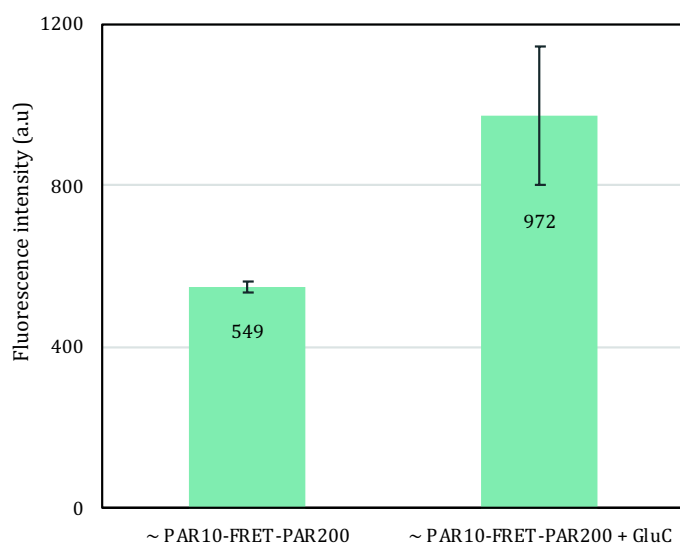


Figure 4.9: FRAP experiment with monitoring by confocal microscope the normalized fluorescent intensity of a photobleached area. Two (PAR200/HA)<sub>24</sub> films were monitored by adding short or long fluorescently labelled PAR chains, *i.e.* either PAR10-FITC (orange) or PAR200-FITC (red) respectively.  $t = 0$  corresponds to the end of the photobleaching step.

### ***Evaluation of the activity of the responsive coating***

To evaluate the efficiency of the responsive PAR10-FRET-PAR200 in the coating, a first experiment was performed to quantify through confocal microscopy fluorescence of the coating in the film when some GluC enzyme is added (**figure 4.10**). Cleavage of the sensitive peptide sequence in the PAR10-FRET-PAR200 seems to occur on the surface as a strong fluorescence signal was produced in the presence of the GluC enzyme. Then, similar experiments using time lapse microscopy were completed to follow the fluorescence of the surface over time in the presence of *S. aureus* bacteria (**figure 4.11**).



*Figure 4.10: Evaluation of the fluorescence of the (PAR200/HA)<sub>24</sub> / PAR10-FRET-PAR200 coating on surfaces from confocal microscope images and fluorescence intensity measurements of EDANS emission (495 nm) without GluC enzyme or after 2 h of incubation at 37 °C with GluC enzyme. Each value corresponds to the mean value of two individual experiments (one coating per experiment and condition; three images per coating) and error bars correspond to standard deviations.*



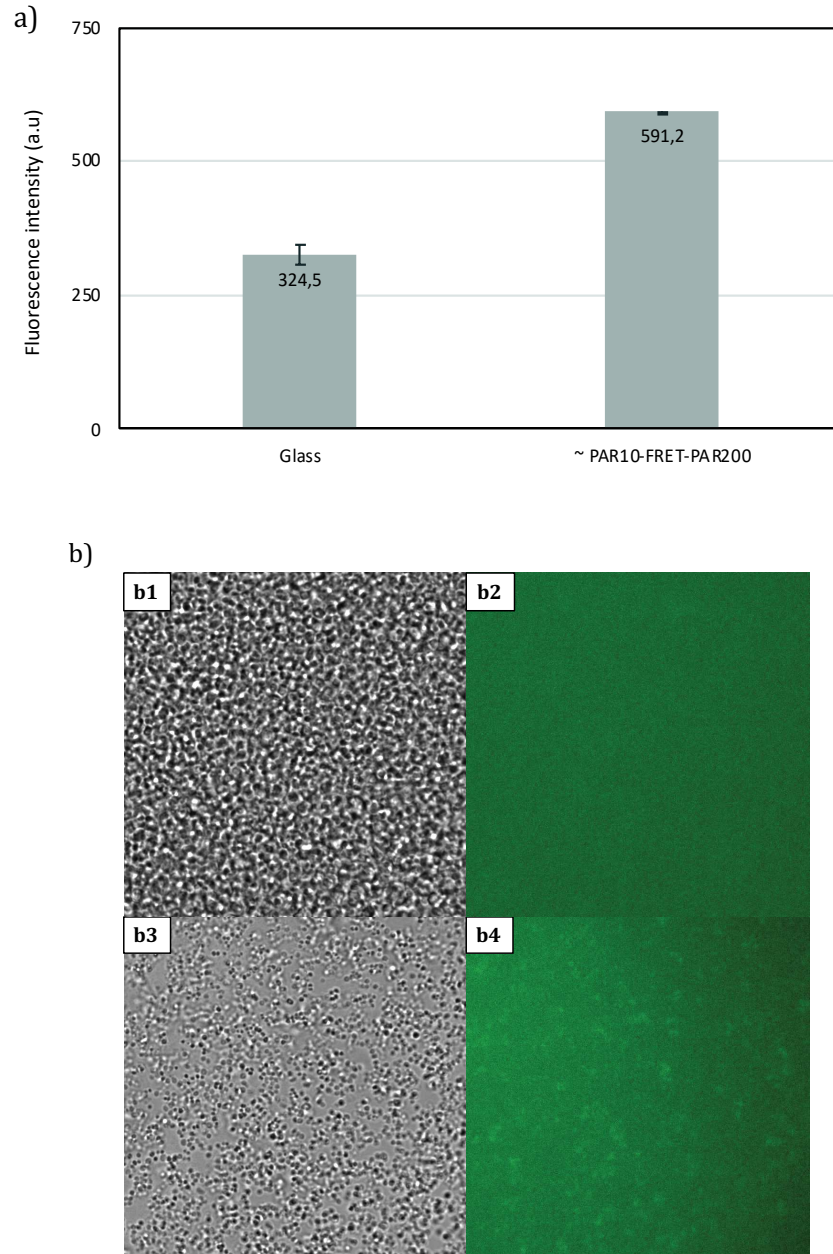


Figure 4 11: a) Evaluation of the fluorescence of the  $(PAR200/HA)_{24} / PAR10-FRET-PAR200$  coating on surfaces from time lapse microscope images and fluorescence intensity measurements of EDANS emission (495 nm) after 10h of incubation of *S. aureus* either on bare glass surface or on glass with the  $(PAR200/HA)_{24} / PAR10-FRET-PAR200$  coating. Each value corresponds to the mean value of three zones in one sample and error bars correspond to standard deviations. b) Example of images obtained from time lapse experiments after 6h of incubation of *S. aureus* on bare glass (b1, b2) or on glass with the  $(PAR200/HA)_{24} / PAR10-FRET-PAR200$  coating (b3, b4). Bacteria were observed through bright field images (left) and fluorescence produced by EDANS emission was observed by fluorescence images (right).

This is a first indication that the system designed is efficient in the presence of the enzyme, however the next step was to check if bacteria produce GluC enzymes, cleave the responsive peptide, and finally activate the antimicrobial properties of the coating.

*S. aureus* suspension were incubated at a density of  $1,5 \times 10^5$  CFU at 37 °C on the coating and then after 4 h, concentrations on surfaces were evaluated (**Figure 4.12a**). Starting from (PAR200/HA)<sub>24</sub> platform, four different films were built: (PAR200/HA)<sub>24</sub> / PAR10-FRET-PAR200 as described before, but also similar film with one more HA layer (*i.e.* (PAR200/HA)<sub>24</sub> / PAR10-FRET-PAR200 / HA), or one more HA / PAR10-FRET-PAR200 bilayer (*i.e.* (PAR200/HA)<sub>24</sub> / PAR10-FRET-PAR200 / HA / PAR10-FRET-PAR200) or one more HA / PAR10-FRET-PAR200 bilayer plus one HA layer, (*i.e.* (PAR200/HA)<sub>24</sub> / PAR10-FRET-PAR200 / HA / PAR10-FRET-PAR200 / HA). For sake of clarity, these films will be noted thereafter as ~PAR10-FRET-PAR200, ~PAR10-FRET-PAR200/HA, ~PAR10-FRET-PAR200)<sub>1.5</sub> and ~(PAR10-FRET-PAR200/HA)<sub>2</sub> respectively where ~ stands for (PAR200/HA)<sub>24</sub>.

As expected and described previously, no antimicrobial activity was observed for simple (PAR200/HA)<sub>24</sub> films, PAR200 chains being too long, no diffusion of these chains was possible in the film and thus no interaction of these PAR chains with bacterial membrane occurred. When a PAR10-FRET-PAR200 layer was added on these films (~PAR10-FRET-PAR200), a significant antibacterial activity was observed. These films showed a decrease of a little bit more of 1 log unit of the density of bacteria on the surface. This result is of particular importance as it suggests that *S. aureus* V8 bacteria produce GluC enzymes that will cleave PAR10-FRET-PAR200, releasing PAR10 from PAR200. Then PAR10 chains will diffuse freely in the film as they are short chains and they will interact with bacteria membranes to induce cell lysis.

Similar film with one more HA layer on the top demonstrates lower antimicrobial activity. This indicates that the HA as ending layer screens the activity of PAR10-FRET-PAR200 and should probably prevent GluC cleavage of the peptide sequence through steric hindrance. Indeed, from previous experiments with PAR30/HA multilayers, it was shown that ending with PAR30 or HA do not change antimicrobial activity of the film.<sup>28</sup> If one more PAR10-FRET-PAR200 layer was added (leading to (PAR200/HA)<sub>24</sub> / PAR10-FRET-PAR200/HA/ PAR10-FRET-PAR200), a strong antimicrobial activity was monitored with a decrease of more than 1.5 log units in the density of bacteria, almost more efficient than antibiotics in the bulk. This suggests that increasing number of PAR10-FRET-PAR200 layers will improve the antimicrobial efficiency of the coating.

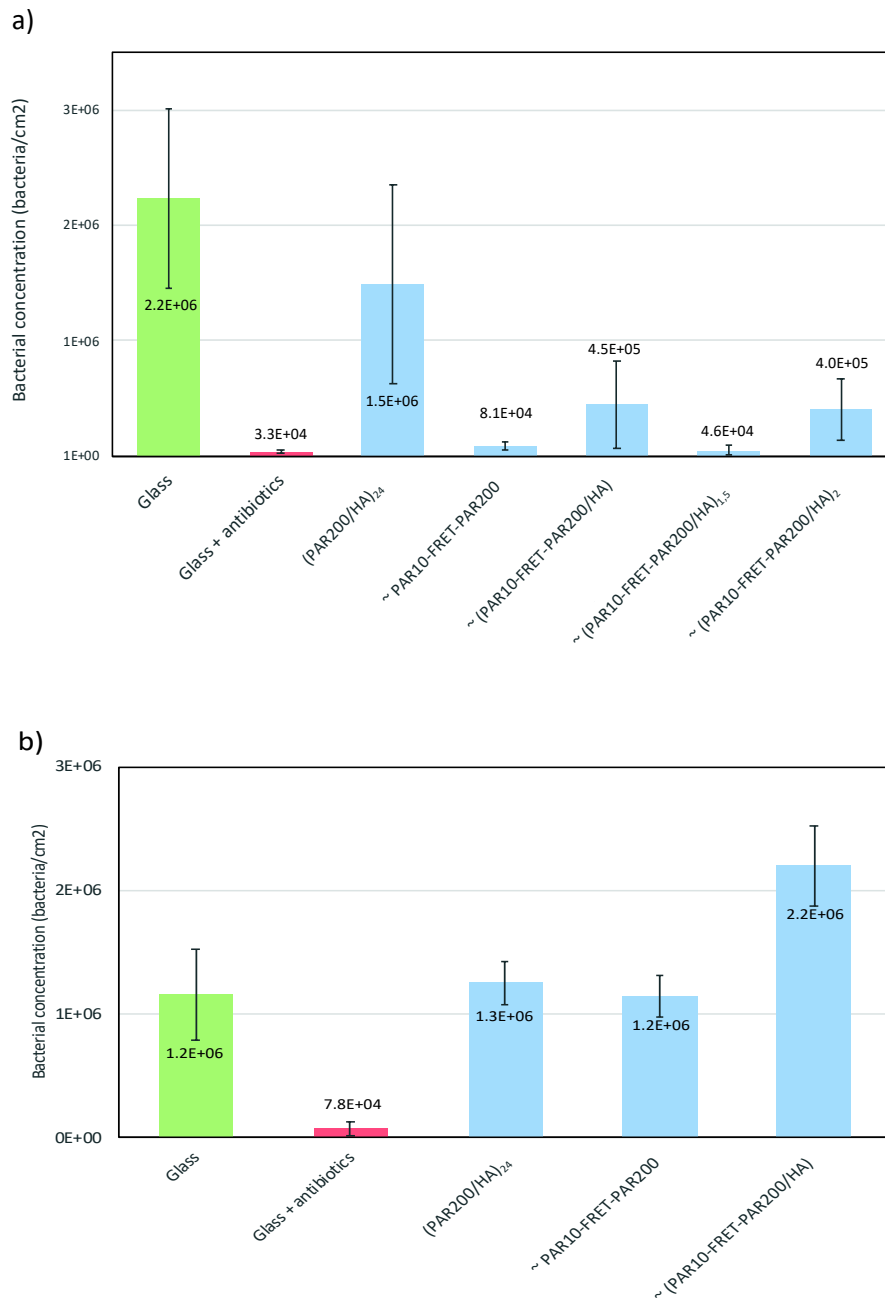


Figure 4.12: a) Evaluation of antimicrobial activity of the different polyarginine coatings towards *S. aureus* V8 and b) towards *P. aeruginosa*. For sake of clarity, films are noted as ~PAR10-FRET-PAR200, ~PAR10-FRET-PAR200/HA, ~PAR10-FRET-PAR200)<sub>1.5</sub> and ~(PAR10-FRET-PAR200/HA)<sub>2</sub> where ~stands for (PAR200/HA)<sub>24</sub>. Glass slides without coating were used as a negative control and glass slides with antibiotics in the supernatant were used as a positive control. Each value corresponds to the mean value of three individual experiments (three samples per experiment and condition) and error bars correspond to standard deviations.

As observed before, adding to this film a HA layer (leading to (PAR200/HA)<sub>24</sub> / (PAR10-FRET-PAR200/HA)<sub>2</sub>) again screens the activity. To better understand the mechanism,

amount of PAR200 chains in the film was estimated by building a (PAR200/HA)<sub>24</sub> film and adding one layer of PAR200 chains labelled with a fluorescent dye, FITC (fluorescein isothiocyanate) (**figure 4.13**). By confocal microscopy, the fluorescence intensity in the (PAR200/HA)<sub>24</sub> / PAR200-FITC film was measured (40 a.u.). When one HA layer was added on the top ((PAR200/HA)<sub>24</sub> / PAR200-FITC / HA), it doesn't evolve significantly (36 a.u.). Then, adding a second PAR10-FRET-PAR200 leads to an increase in fluorescence (from 36 to 49) related to new PAR10-FRET-PAR200 chains adsorption on the film. Ending the film with a new HA layer did not change significantly the fluorescence intensity. Finally, from these measurements, one can conclude that amount of PAR10-FRET-PAR200 was not strongly different in the distinctive film configurations and finally the changes in the antimicrobial activity was probably related to difficulty in the cleavage of the sensitive peptide sequence when a HA layer was added.

Morphologies of the bacteria on the responsive coating were observed by scanning electronic microscopy (SEM) (**figure 4.14**). *S. aureus* remaining on the surface form aggregates of about ten cells and most of them have their membranes with many vesicles and cracks. In comparison, bacteria on control bare glass surfaces show homogenous and smooth membranes. Most of these bacteria were clusters of two with some morphologies indicating that they were in division, called binary fission, which is an indication of their normal metabolism.

To validate these results, a similar experiment was done with the bacteria *P. aeruginosa*. These bacteria, to the contrary of *S. aureus* V8, are unable to produce the GluC enzymes. When antimicrobial activity of the coatings was evaluated with *P. aeruginosa*, absolutely no coating was effective and the bacterial growth was similar to non-treated surfaces (**Figure 4.12b**). This result confirms that GluC enzymes are needed to activate the antimicrobial properties of the coating. The coating designed is thus specific of some well-defined bacteria strains. A first proof of concept was done for *S. aureus*; however, the concept can be extended to other peptide sequence responding to enzymes from specific pathogens.

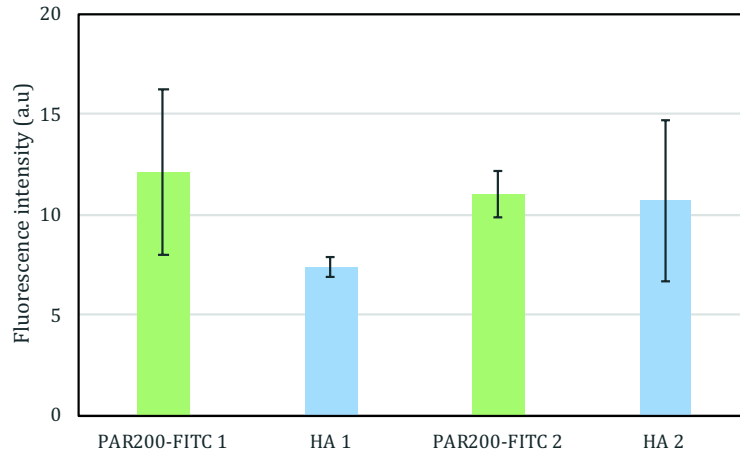


Figure 4.13: Evaluation of the fluorescence of the  $(\text{PAR200}/\text{HA})_{24}$  / PAR200-FITC film. Each value corresponds to the mean value of three individual experiments (three images per condition) and error bars correspond to standard deviations.

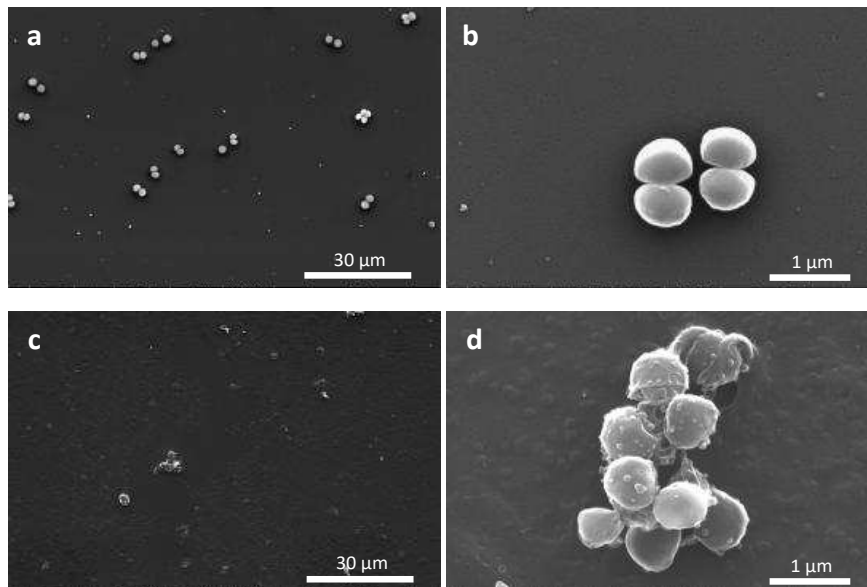
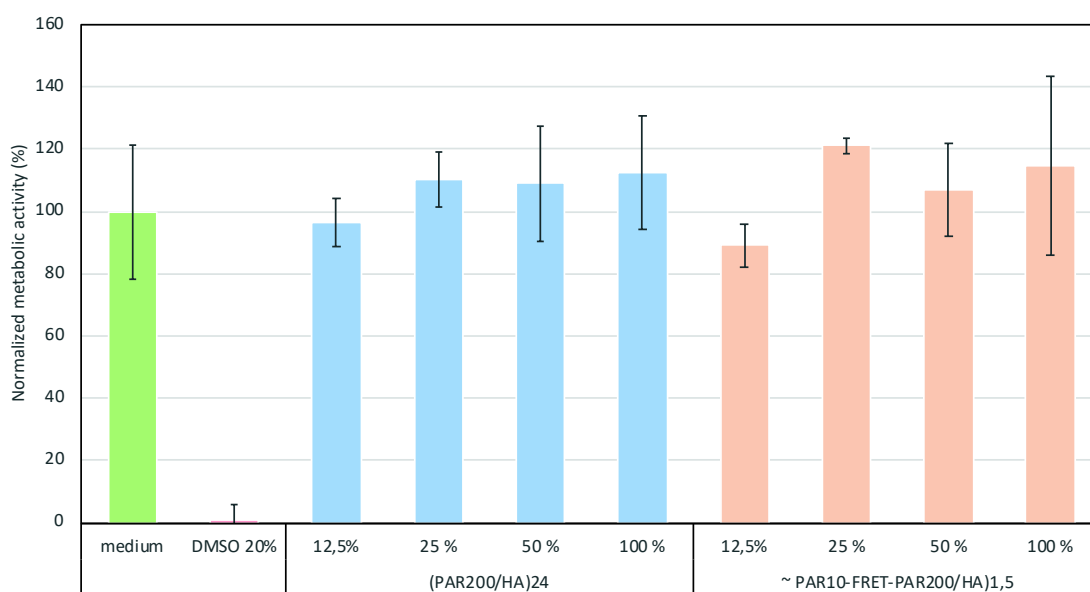


Figure 4.14: Morphologies of the bacteria on the responsive coating were observed by scanning electronic microscopy (SEM). **a)** and **b)** *S. aureus* incubated 4 h on control surfaces without coatings (glass slides); **c)** and **d)** *S. aureus* incubated 4 h on  $(\text{PAR200}/\text{HA})_{24}$  / PAR10-FRET-PAR200 coatings.

### ***Biocompatibility of the responsive coating***

A last validation concerns the evaluation of the toxicity of the coatings towards eucaryotic cells. The protocols for cytotoxicity tests were established according to ISO 10993-5 and 10993-12. In summary, glass slides coated with  $(\text{PAR200}/\text{HA})_{24}$  or  $(\text{PAR200}/\text{HA})_{24}$  /  $(\text{PAR10-FRET-PAR200}/\text{HA})_{1,5}$  were incubated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium

High Glucose (DMEM) for 72h. Then, these extracts were incubated on a NIH / 3T3 cell monolayer at different dilutions (100% to 12.5%) and cells were grown again for 24 h. Metabolic activity was then estimated with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. **Figure 4.15** shows that (PAR200/HA)<sub>24</sub> coating extracts in all dilution conditions display a metabolic activity ranging from about 80% to 110%. When using extracts from (PAR200/HA)<sub>24</sub> / (PAR10-FRET-PAR200/HA)<sub>1,5</sub>, metabolic activity reaches 80 to 120% for all dilutions. According to the ISO standard, the coatings can be considered as non-toxic as cell viability in all dilutions are higher than 70%.



*Figure 4.15: Evaluation of metabolic activity of NIH-3T3 cells incubated in contact with polyelectrolyte multilayer films (PAR200 / HA)<sub>24</sub> / (PAR10-FRET-PAR200/HA)<sub>1,5</sub> extracts for 24h. Each dilution is tested in triplicate and two controls are carried out: the positive control corresponds to untreated cells incubated in culture medium; the negative control corresponds to cells treated with 20% DMSO (dimethyl sulfoxide). For sake of clarity, films are noted as ~ (PAR10-FRET-PAR200/HA)<sub>1,5</sub> where ~ stands for (PAR200/HA)<sub>24</sub>.*

#### 4.2.5. Conclusion

For the first time and by combining peptide design, polymer chemistry, biochemical analyses, material design, microbiology and cell biology, a smart antimicrobial enzyme responsive was designed. This coating is responsive to a specific enzyme produced by bacteria *S. aureus*, that will trigger the antimicrobial activity. This is a first proof of concept; however, this strategy can be easily extended to other bacteria and enzymes systems just by choosing the adequate cleavable peptide sequence. Finally, this coating,

simple to produce and able to cover all kind of materials, can be designed to be efficient towards some specific bacteria with antimicrobial ingredient that are not based on antibiotics. The stimulus is only based on metabolites secreted from bacteria which allows to release PAR only when the pathogens are close to the surfaces. Moreover, through FRET dyes, a major characteristic has been added to the system with the possibility to have a detection method of the presence of specific bacteria on the surface. Further experiments will be needed to check the sensitivity of this detection tool.

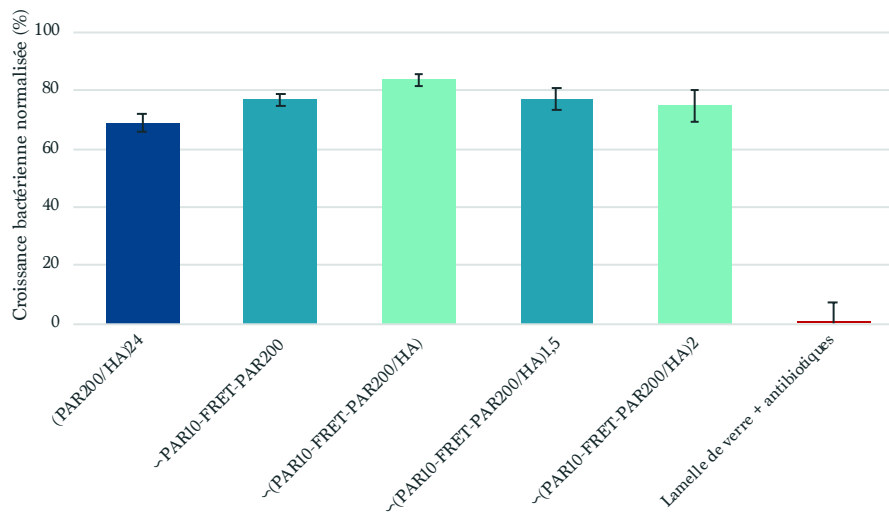
## 4.3. Résultats complémentaires

### 4.3.1. Activité antibactérienne sur 24h

L'évaluation de l'activité antibactérienne du revêtement a également été réalisée au bout de 24 h d'incubation avec une suspension de *S. aureus* V8 à une densité optique de 0,001. A la fin du temps d'incubation, la densité optique à 620 nm du surnageant a été mesurée et les surfaces ont été observées au microscope à épifluorescence. Les résultats, présentés dans la **figure 4.16a**, montrent une croissance bactérienne dans chacune des conditions testées (hormis la condition lamelle de verre + antibiotiques). Ces résultats nous indiquent qu'au bout de 24h d'incubation, les revêtements n'ont plus d'activité antibactérienne. Pour vérifier ces observations, les surfaces des échantillons ont été observées en microscopie. La **figure 4.16b**, révèle une forte concentration bactérienne à la surface des films et ce, peu importe le nombre de couches de polymères triblocs ajoutées. Ceci nous permet de confirmer les résultats obtenus dans le surnageant. La concentration en polymère tribloc dans le film n'est pas suffisante pour avoir une activité antibactérienne prolongée sur 24 h. En revanche, les expériences présentées précédemment (figure 4.12a), montre qu'au bout de 4h les revêtements sont antibactériens vis-à-vis de la bactérie qui produit la GluC, *S. aureus* V8. L'activité antibactérienne de ces revêtements, construits de cette façon, possède une activité antibactérienne limitée dans le temps. La construction d'un film épais contenant uniquement la polyarginine clivable associée à l'acide hyaluronique pourrait constituer une solution pour obtenir un effet antimicrobien sur un temps plus long.



a)



b)

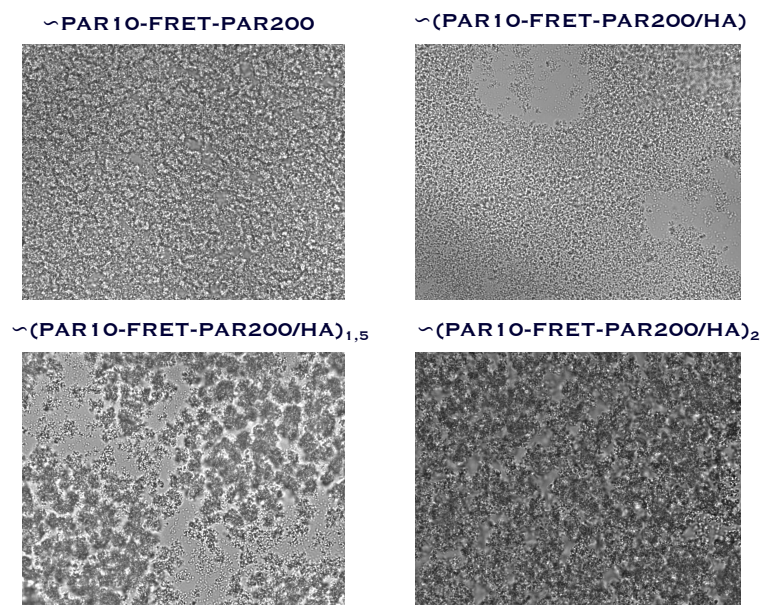


Figure 4.16 : a) Évaluation de l'activité antibactérienne des différents revêtements vis-à-vis de *S. aureus* V8 après 24 h d'incubation. La densité optique à 620 nm du surnageant a été mesurée afin de calculer la croissance normalisée à partir des contrôles. Chaque valeur correspond à la valeur moyenne de trois échantillons et les barres d'erreur correspondent aux écarts types. b) Image de microscopie en lumière transmise des films incubés avec une suspension de *S. aureus* V8 pendant 24 h.

### 4.3.2. Étude du clivage en solution

La séquence TLRGGE a été conçue au laboratoire et utilisée dans un autre projet de revêtement antimicrobien.<sup>30</sup> La coupure par la GluC au niveau du côté C-terminal de



l'acide glutamique (E) a été démontrée par HPLC puis spectroscopie de masse. Le clivage de cette séquence a été étudié avec des peptides autres que des PAR à ses extrémités. Pour être sûr que les deux chaînes de PAR n'interfèrent pas dans cette coupure, un peptide FRET de séquence RRRRRRRRRR-K(DabcyI)-TLRGGEK(5/6-FAM)-RRRRRRRRRR et noté PAR10-FRET-PAR10 a permis l'étude de ce clivage dans plusieurs conditions. La première condition testée a été de mettre au contact la GluC avec le peptide PAR10-FRET-PAR10 dans un tampon phosphate (PBS). Le peptide est dissout à une concentration de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  et l'enzyme à une concentration de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  dans le PBS. Ces concentrations seront conservées pour la suite des résultats. Au cours de l'acquisition dans le spectrofluorimètre (SAFAS, Monaco), la température de l'enceinte est réglée à une valeur de 37 °C. Comme le montre la **figure 4.17**, une forte augmentation du signal est détectée lorsque le peptide FRET et l'enzyme GluC sont mis en contact (courbe jaune). Au bout d'une heure et demie, le signal atteint un plateau, signifiant que tous les peptides ont été clivés. La courbe rouge nous confirme que la GluC est responsable de ce clivage puisqu'en son absence aucun signal de fluorescence n'est détecté.

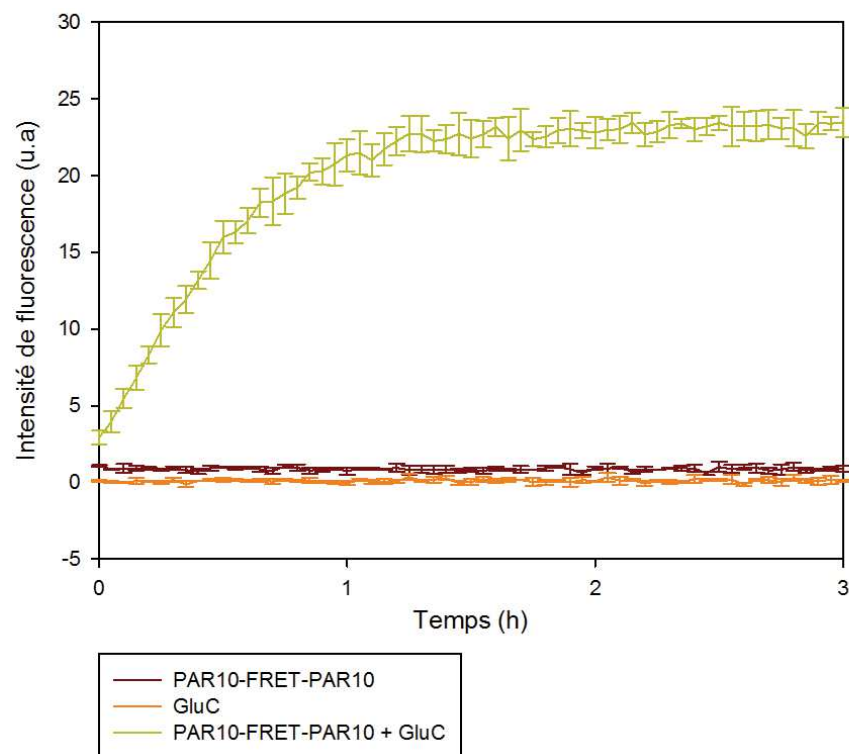


Figure 4.17 : Suivi du clivage du peptide PAR10-FRET-PAR10 lors de l'incubation dans du PBS en présence d'enzymes GluC (courbe jaune) ou sans enzymes GluC (courbe rouge). L'enzyme GluC a également été incubé seule dans du PBS (courbe orange). L'intensité de fluorescence de l'émission de la sonde 5/6-FAM (520 nm) a été suivie au cours du temps sur 3 heures. Chaque valeur correspond à la valeur moyenne de deux expériences individuelles (trois échantillons par expérience et condition) et les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

Par la suite, l'étude du clivage de ce peptide a été réalisée dans des milieux de cultures bactériens et cellulaires afin de voir si les composants de ces milieux ne peuvent pas influencer positivement ou négativement l'activité de la GluC. Le milieu de culture bactérien sélectionné est le milieu le plus utilisé pour les tests antimicrobiens : le milieu Mueller Hinton Broth (MHB, Merck). Deux conditions expérimentales avec des milieux de culture cellulaire ont été ajoutées : le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Dutscher) et le milieu RPMI (Dutscher). Les cinétiques de clivage présentées dans la **figure 4.18** montrent que les milieux n'influencent pas sur le clivage du peptide par la GluC. En effet, les quatre courbes se superposent presque totalement et atteignent de la même façon le plateau au bout d'une heure et demie.

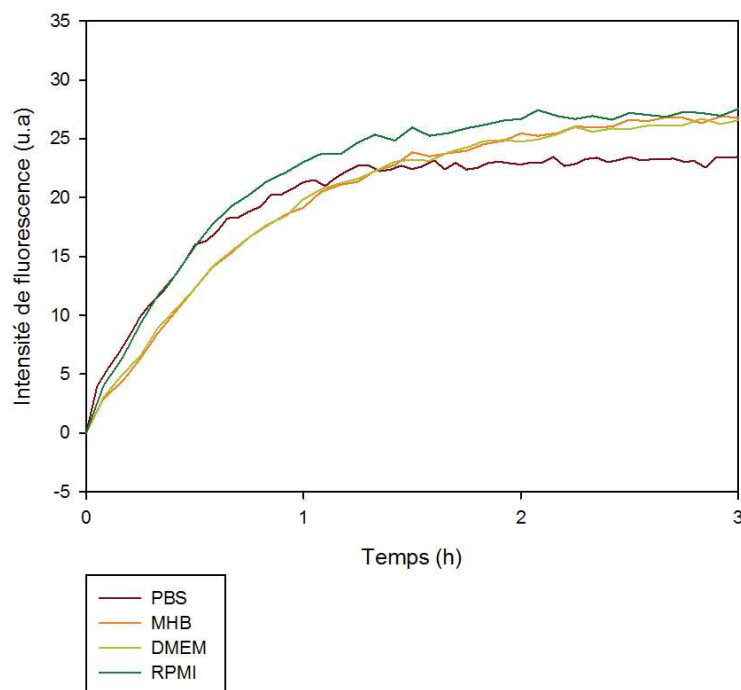


Figure 4.18 : Suivi du clivage du peptide PAR10-FRET-PAR10 lors de l'incubation dans du PBS (courbe rouge), MHB (courbe orange), du DMEM (courbe jaune) et du RPMI (courbe verte) en présence d'enzymes GluC (courbe jaune). L'intensité de fluorescence de l'émission de la sonde 5/6-FAM (520 nm) a été suivie au cours du temps sur 3 heures. Chaque valeur correspond à la valeur moyenne de deux expériences individuelles (trois échantillons par expérience et condition).

Ces résultats confirment la possibilité de clivage par l'enzyme GluC de la séquence TLRGGE intégrée entre deux séquences PAR10. Sachant que la GluC est une protéase extracellulaire produite par *S. aureus* V8, elle devrait être retrouvée dans le surnageant d'une culture. Pour confirmer cette présence, le surnageant bactérien a été extrait au bout de plusieurs temps d'incubation d'une culture bactérienne à 37 °C sous agitation dans un milieu MHB. Une pré-culture bactérienne d'une nuit a été centrifugée afin de culoter les

bactéries et d'éliminer le surnageant. Au temps  $t=0$ , les bactéries ont été resuspendues dans du milieu liquide MHB avec une densité optique à 620 nm équivalente à 0,001. Ensuite le surnageant bactérien a été extrait par centrifugation à différents temps d'incubation. Le peptide PAR10-FRET-PAR10 a ensuite été incubé avec les différents extraits et l'intensité de fluorescence a été enregistrée au cours du temps. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la **figure 4.19**. La courbe orange indique qu'au moment de la mise en culture de la bactérie ( $t = 0$  h), aucune enzyme GluC n'est présente dans le surnageant. Après une heure d'incubation des bactéries, la courbe jaune indique une augmentation de l'intensité de fluorescence indiquant la présence de GluC dans cet extrait. Cependant, le plateau n'atteint pas la valeur seuil du contrôle avec la GluC commerciale (courbe rouge), pouvant traduire d'une plus faible concentration en GluC. Pour les extraits prélevés à  $t = 2$  h ; 3 h et 4 h, la courbe montre une rapide augmentation de l'intensité de fluorescence et un plateau atteignant la même valeur seuil que le contrôle. Ce résultat nous montre que la GluC est produite dès le début de la culture bactérienne, puisqu'au bout d'une heure la quantité de GluC est suffisante pour obtenir un signal de fluorescence. Les courbes ne permettent pas d'estimer la concentration en enzyme GluC dans le surnageant, mais si l'on part du principe que seule la GluC clive le peptide PAR10-FRET-PAR10, nous pouvons émettre l'hypothèse que la concentration est au moins égale à  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , concentration à laquelle la GluC commerciale est utilisée.

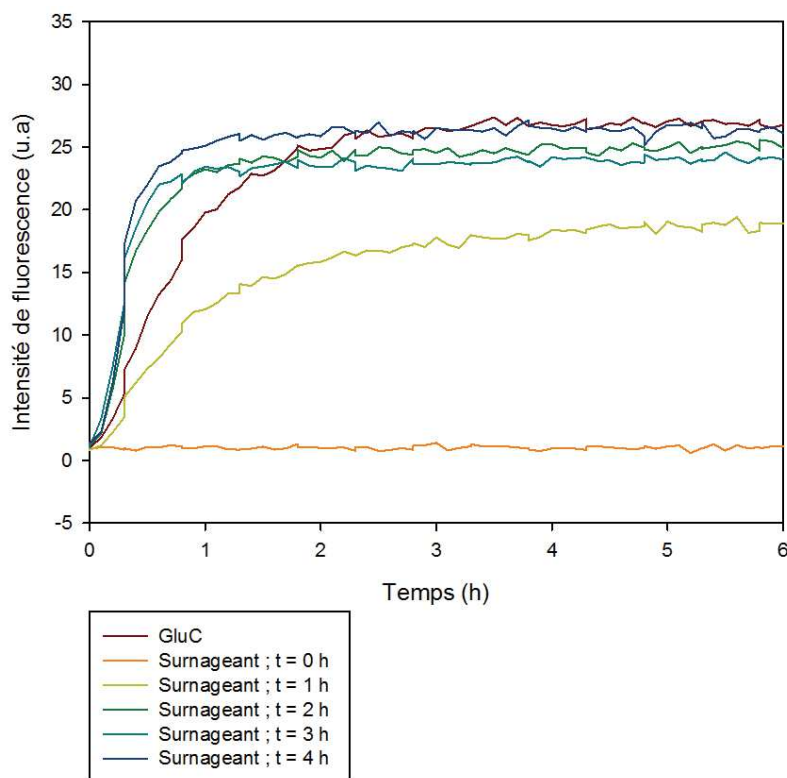


Figure 4.19 : Suivi du clivage du peptide PAR10-FRET-PAR10 lors de l'incubation avec la GluC dans du milieu MHB (courbe rouge), avec le surnageant d'une culture de *S. aureus* V8 dans du MHB à  $t = 0$  h (courbe orange), à  $t = 1$  h (courbe jaune), à  $t = 2$  h (courbe verte), à  $t = 3$  h (courbe bleu claire) et à  $t = 4$  h (courbe bleu foncée). L'intensité de fluorescence de l'émission de la sonde 5/6-FAM (520 nm) a été suivie au cours du temps sur 6 heures. Chaque valeur correspond à la valeur moyenne de deux expériences individuelles (trois échantillons par expérience et condition).

Afin de vérifier l'hypothèse que la GluC est responsable de ce clivage, la même expérience a été réalisée mais avec le surnageant d'une bactérie qui ne produit pas cette enzyme : *P. aeruginosa*. De la même façon que pour *S. aureus*, la culture bactérienne de *P. aeruginosa* a été faite à partir d'une pré-culture centrifugée. Au temps  $t = 0$  h, le culot contenant les bactéries a été resuspendu dans du milieu MHB à une densité optique à 620 nm équivalente à 0,001 et incubé à 37 °C sous agitation. Cette fois-ci, le surnageant bactérien a été extrait au bout de 24 h d'incubation en milieu liquide. Après avoir été extrait, il est mis au contact du peptide PAR10-FRET-PAR10 et l'intensité de fluorescence ne montre aucune variation avec 6h d'incubation (**figure 4.20**, courbe orange). Ce résultat confirme que la GluC est essentielle au clivage du peptide.

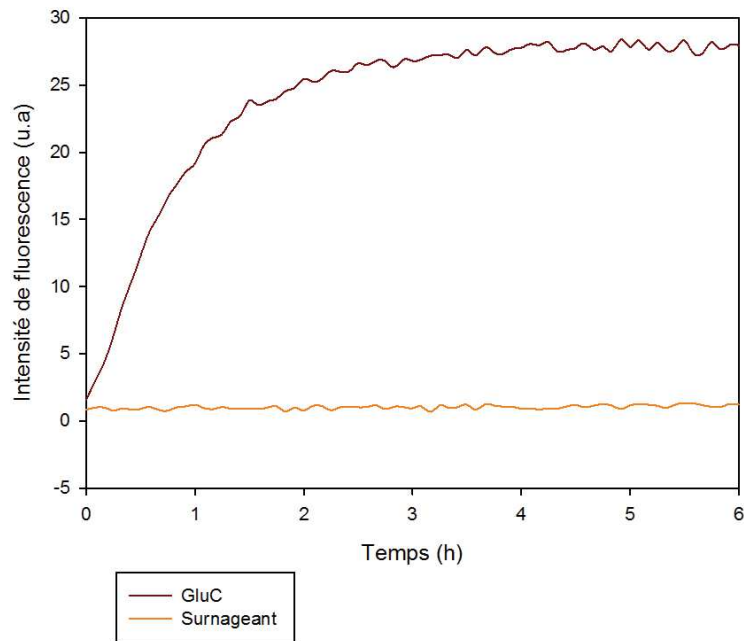


Figure 4.20 : Suivi du clivage du peptide PAR10-FRET-PAR10 lors de l'incubation avec la GluC dans du milieu MHB (courbe rouge) et avec le surnageant d'une culture de *P. aeruginosa* dans du MHB (courbe orange). L'intensité de fluorescence de l'émission de la sonde 5/6-FAM (520 nm) a été suivie au cours du temps sur 6 heures. Chaque valeur correspond à la valeur moyenne de deux expériences individuelles (trois échantillons par expérience et condition).

Enfin, la dernière condition testée a été l'incubation du peptide PAR10-FRET-PAR10 avec les bactéries en solution. Pour cela, nous avons réalisé une pré-culture bactérienne d'une nuit pour ensuite ajuster la densité optique à 620 nm à une valeur de 0,1. Au temps  $t = 0$  h, la culture bactérienne et le peptide PAR10-FRET-PAR10 sont mis en contact (courbe orange, **figure 4.21**). Le signal de fluorescence augmente au cours du temps indiquant un clivage du peptide FRET par les bactéries. L'intensité de fluorescence est moins importante que celle du contrôle peptide + GluC, sûrement à cause de l'activité antibactérienne du peptide FRET (**figure 4.22**) réduisant la croissance des bactéries et donc la production de GluC.

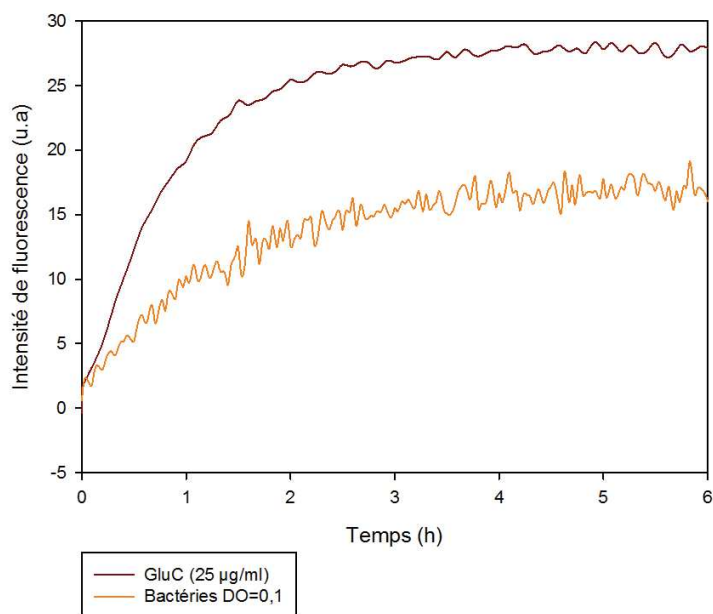


Figure 4.21 : Suivi du clivage du peptide PAR10-FRET-PAR10 lors de l'incubation avec la GluC dans du milieu MHB (courbe rouge) et avec une culture de *S. aureus* V8 dans du MHB (courbe orange). L'intensité de fluorescence de l'émission de la sonde 5/6-FAM (520 nm) a été suivie au cours du temps sur 6 heures. Chaque valeur correspond à la valeur moyenne de deux expériences individuelles (trois échantillons par expérience et condition).

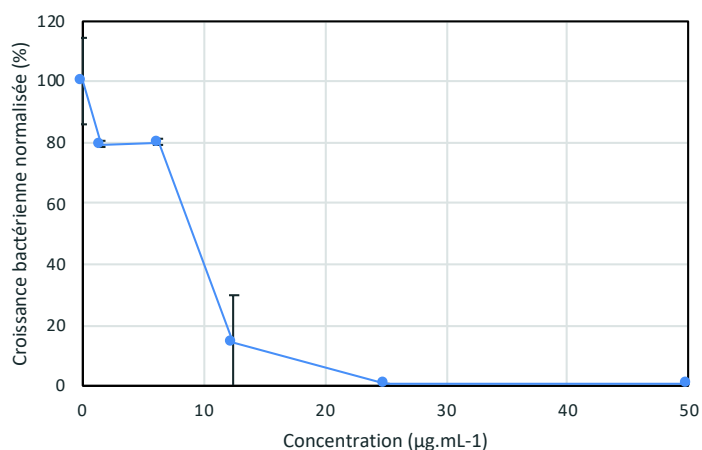


Figure 4.22 : Évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de PAR10-FRET-PAR10 envers *S. aureus* V8. Les concentrations sont exprimées en µg.mL<sup>-1</sup>. Chaque concentration de PAR a été incubée 24 h à 37 °C dans 100 µL de milieu MHB avec *S. aureus* V8 ( $A_{620} = 0,001$ ). Chaque valeur correspond à la valeur moyenne de 3 échantillons et les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

### 4.3.3. Autres constructions du polymère tribloc

Avant d'arriver à la stratégie du peptide tribloc PAR10-FRET-PAR200, plusieurs constructions ont été réalisées. Dans un premier temps, l'idée était de faire un peptide tribloc composé d'une PAR30 de chaque côté de la séquence clivable : PAR30-TLRGGEK-PAR30. Avant d'insérer la séquence clivable entre deux PAR30, des PAR30 avec une

extrémité -SH ont été dimérisées afin d'obtenir le polymère suivant : PAR30-SS-PAR30. Ce polymère permet de reproduire ce qui pourrait se passer avec le polymère PAR30-TLRGGEK-PAR30 sauf qu'à la place d'une séquence clivable par une enzyme, il y a une liaison sensible au réducteur tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). Cela nous permet, par ajout de TCEP ou non d'avoir une PAR30 dimérisée ou non.

#### 4.3.3.1. Toxicité du TCEP

Le TCEP va servir à cliver le pont disulfure entre les deux PAR30 dans les films multicouches et en solution. La toxicité du TCEP vis-à-vis des bactéries a été évaluée pour éviter qu'il influence sur l'activité antibactérienne de nos échantillons. Jusqu'à une concentration de 0,5 mM, aucune toxicité n'est détectée (**figure 4.23**). Lors des expériences, le TCEP n'est pas utilisé à une concentration au-delà de 0,1 mM. Il ne va donc pas influencer l'activité antibactérienne des échantillons.

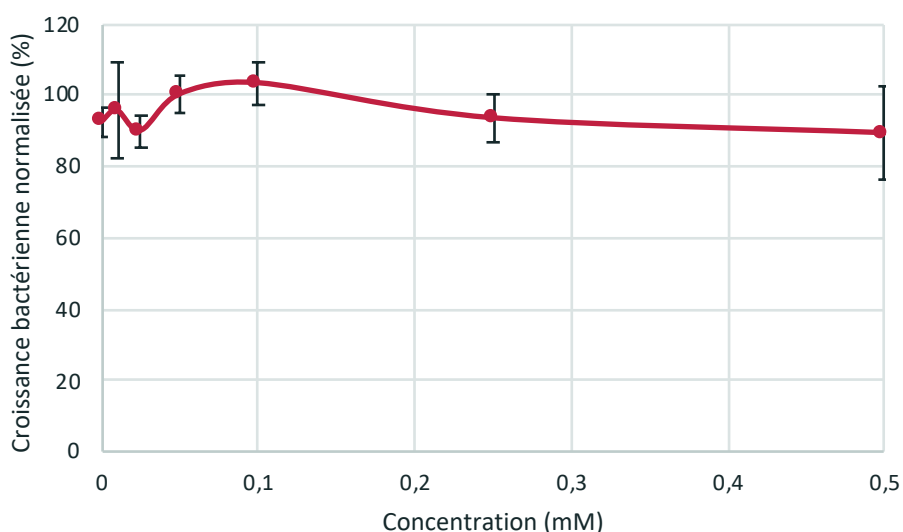


Figure 4.23 : Évaluation de la toxicité du TCEP au contact de *S. aureus* V8 pendant 24 h.

#### 4.3.3.2. Influence de la taille de la chaîne de PAR

Dans l'objectif de la conception d'un revêtement antibactérien, le polymère PAR30-SS-PAR30 a été déposé sur un film (PAR200/HA)<sub>24</sub>. La construction du film a été suivie *in situ* à l'aide d'une microbalance à cristal de quartz (QCM). La QCM est un appareil qui

permet de suivre le dépôt de molécules sur une surface par changement de résonance du cristal. Une augmentation de la fréquence normalisée  $-\Delta f\nu / \nu$  est souvent associée à une augmentation proportionnelle de la masse couplée au quartz. Dans l'hypothèse que le dépôt n'engendre pas de dissipation d'énergie, le modèle de Sauerbrey permet de déterminer la masse absorbée.

Tout d'abord, quatre bicouches de PAR200/HA ont été successivement déposées sur un cristal de QCM. Ensuite, une couche de PAR30 (**figure 4.24**, courbe rouge) ou de PAR30-SS-PAR30 (**figure 4.24**, courbe orange) a été déposée. Le suivi de la construction par QCM montre qu'il y a un dépôt de PAR30 et PAR30-SS-PAR30 sur un film  $(\text{PAR200/HA})_4$  puisqu'on obtient une augmentation de la fréquence normalisée de 3,5 Hz et de 4 Hz pour la PAR30 et la PAR30-SS-PAR30 respectivement.

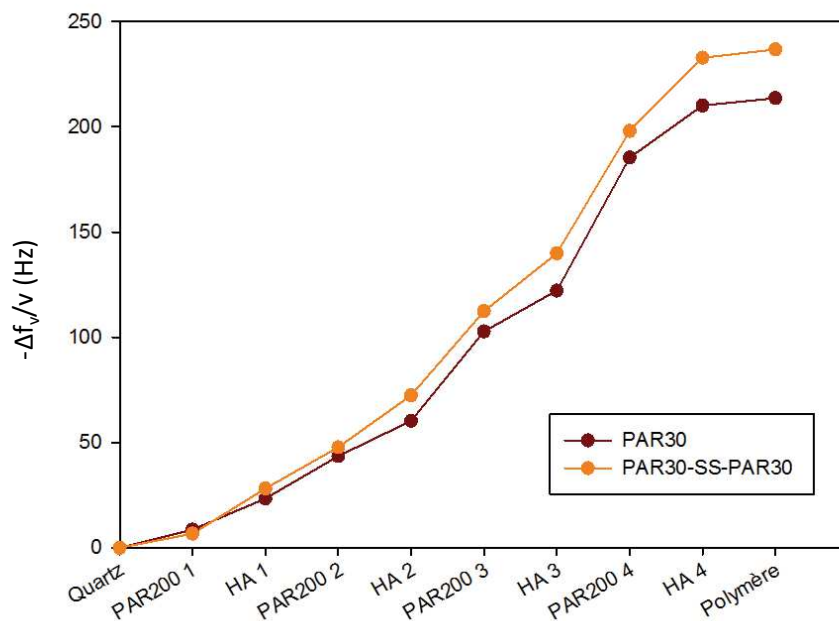


Figure 4.24 : Suivi de la construction du film par QCM (seul  $\nu = 3$  est tracé ici). Le changement de la fréquence normalisée ( $-\Delta f\nu / \nu$ ) est suivi et une augmentation de  $-\Delta f\nu / \nu$  peut être en première approximation associée à une augmentation de la masse déposée. La dernière couche polymère correspond au dépôt d'une couche de PAR30 (en rouge) ou de PAR30-SS-PAR30 (en orange).

Sachant qu'il est possible de déposer une couche de PAR30 sur un film PAR200/HA, des tests d'activité antibactérienne ont été réalisés sur des films  $(\text{PAR200/HA})_{24}$  / PAR30-SS-PAR30. Afin de voir l'influence de la longueur du polymère composant la dernière couche du film, les bactéries ont été incubées en présence ou en absence de TCEP. En absence de



TCEP la dernière couche est sous la forme PAR30-SS-PAR30 alors qu'en présence de TCEP elle est sous la forme PAR30-SH. L'activité antibactérienne de ces films est incertaine. En effet, la moyenne des 9 lamelles testées donne 30 % et 10 % de croissance pour le film ~ PAR30-SS-PAR30 et ~ PAR30-SH respectivement (**figure 4.25**). Les écarts types sont grands et s'expliquent par le fait que les expériences ne sont pas reproductibles. Si l'on regarde le détail des différents échantillons pour une même condition, on peut voir que le film est soit totalement antibactérien soit pas du tout, il n'y a pas d'entre deux. Cependant, la non-reproductibilité des résultats nous fait penser que la différence de taille de chaîne entre le polymère PAR30-SS-PAR30 et PAR30-SH n'est pas assez grande pour réduire drastiquement la mobilité des chaînes dans le film et ne plus avoir d'activité antibactérienne lorsque le polymère est sous la forme longue (PAR30-SS-PAR30).

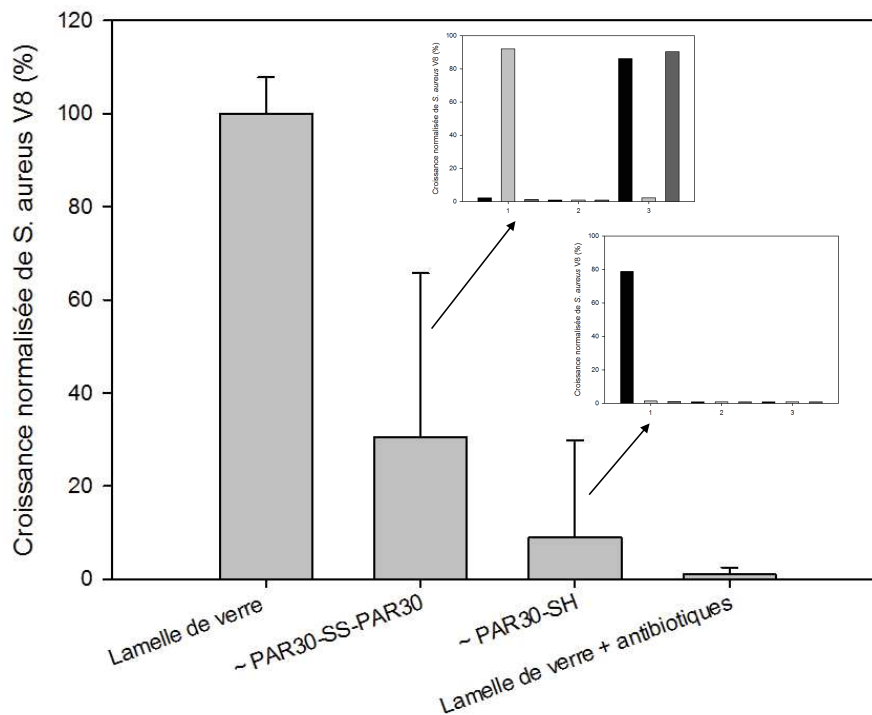


Figure 4.25 : Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents revêtements de polyarginine vis-à-vis de *S. aureus* V8. Par souci de clarté, les films sont notés ~ PAR30-SS-PAR30 et ~ PAR30-SH où ~ signifie (PAR200/HA)<sub>24</sub>. Des lames de verre sans revêtement ont été utilisées comme contrôle négatif et des lames de verre avec des antibiotiques dans le surnageant ont été utilisées comme contrôle positif. Chaque valeur correspond à la valeur moyenne de trois expériences individuelles (trois échantillons par expérience et condition) et les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

Au vu de ces résultats, la stratégie du polymère tribloc PAR30-TLRGGEK-PAR30 a été abandonnée au profit d'une autre construction dont la variation de taille de chaînes

entre le polymère long et le polymère court est plus importante : PAR10-TLRGGEK-PAR200. Ainsi la différence de mobilité des chaînes PAR200 et PAR10 dans un film multicouche sera beaucoup plus importante et permettra de ne pas avoir d'activité antibactérienne lorsque la forme longue du polymère est dans le film (résultats présentés dans la partie 4.2).

## 4.4. Conclusion

De par ces travaux de thèse, nous avons pu concevoir un revêtement antibactérien très innovant dont l'activité antibactérienne est auto-induite par le pathogène. Ce revêtement est basé sur la première génération de revêtement PAR/HA présentée dans le chapitre 3. La nouveauté apportée à ce revêtement est la conception d'un polymère tribloc composé de chaînes de PAR et d'une séquence peptidique TLRGGE pouvant être hydrolysée par une protéase extracellulaire produite par *S. aureus* (la GluC) en chaîne de PAR plus courtes.

L'étude du clivage de cette séquence spécifique conçu au laboratoire s'est faite par ajout de sondes fluorescences à ses extrémités. Dans un premier temps, l'étude du clivage a été réalisée sur le polymère RRRRRRRRRR-K(Dabcyl)-TLRGGEK(5/6-FAM)-RRRRRRRRRR ( PAR10-FRET-PAR10). Lorsque ce polymère est sous cette forme, aucune émission de fluorescence n'est détectable. En revanche, lorsque ce dernier est clivé, l'intensité de fluorescence détectée (520 nm) augmente. Les résultats ont montré que le clivage du peptide PAR10-FRET-PAR10 a lieu en présence d'une GluC commerciale dans différents milieux : un tampon phosphate (PBS), un milieu de culture bactérienne (MHB) mais également dans deux milieux de culture cellulaire (RPMI et DMEM). La GluC étant une protéase extracellulaire, le surnageant bactérien d'une culture de *S. aureus* a été extrait et mis au contact du peptide FRET. Cette expérience a validé la présence de GluC dans le surnageant puisqu'un signal de fluorescence a été détecté. La dernière expérience réalisée en solution a été l'incubation du peptide avec *S. aureus* V8 et là encore un signal de fluorescence a été détecté.

La première construction du polymère tribloc que nous avons imaginé est composée de deux PAR30 séparées par la séquence clivable : PAR30-TLRGGEK-PAR30. Le manque de

reproductibilité des résultats vis-à-vis de cette construction nous a fait changer de stratégie et conçu une deuxième construction. Cette fois-ci, nous avons choisi deux tailles de PAR différentes mais surtout un polymère tribloc beaucoup plus long pour diminuer la mobilité de ce dernier dans les films. Ainsi, un film construit avec les longues chaînes de PAR (PAR10- K(Dabcyl)TLRGEE(EDANS)-K-PAR200) n'est pas antibactérien pour les souches ne produisant pas la GluC (par exemple, *P. aeruginosa*). En revanche, lorsque des bactéries produisant la GluC sont proches de la surface, les longues chaînes de PAR contenant la séquence peptidique sont clivées par ces enzymes et des chaînes de PAR plus courtes sont alors produites. Les différentes expériences ont montré que le clivage du polymère tribloc est possible dans un film multicouche en présence de bactéries *S. aureus*. De plus, les tests d'activité antibactérienne montrent que *S. aureus* V8 est sensible à ce revêtement, contrairement à *P. aeruginosa*. Des tests de cytotoxicité cellulaire sur des fibroblastes de souris ont montré que les films n'engendrent aucune toxicité cellulaire.

La mise au point de ce système a été d'une grande complexité et a nécessité de travailler sur les aspects de chimie des polymères et des peptides, biochimie, matériaux, microbiologie et biologie cellulaire. Nous avons donc conçu un nouveau revêtement intelligent dont l'activité antibactérienne est spécifique d'une souche donnée et induite par un mécanisme de sécrétion enzymatique de la bactérie. De plus, grâce aux sondes FRET, une caractéristique majeure a été ajoutée au système avec la possibilité de disposer d'une méthode de détection de la présence de bactéries spécifiques à la surface. D'autres expériences seront nécessaires pour vérifier la sensibilité de cet outil de détection.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Brush, L. M. & Perez, M. T. *Staphylococcal infections*, <<https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/gram-positive-cocci/staphylococcal-infections>> (2017).
- 2 Raisin. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012. *Institut de veille sanitaire* (2012).
- 3 Filloux, A. & Vallet, I. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *médecine/sciences (Paris)* **19**, 77-83, (2003).
- 4 Mukherji, R., Patil, A. & Prabhune, A. Role of Extracellular Proteases in Biofilm Disruption of Gram Positive Bacteria with Special Emphasis on Staphylococcus aureus Biofilms. *Enzyme Engineering* **4**, (2015).
- 5 Zielinska, A. K. *et al.* sarA-mediated repression of protease production plays a key role in the pathogenesis of Staphylococcus aureus USA300 isolates. *Molecular Microbiology* **86**, 1183-1196, (2012).
- 6 Min, K. H. *et al.* pH-Responsive mineralized nanoparticles for bacteria-triggered topical release of antibiotics. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **71**, 210-219, (2019).
- 7 Marti, M. *et al.* Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in Staphylococcus aureus. *Microbes and Infection* **12**, 55-64, (2010).
- 8 Nesuta, O. *et al.* How proteases from Enterococcus faecalis contribute to its resistance to short alpha-helical antimicrobial peptides. *Pathogens and Disease* **75**, 12, (2017).
- 9 Jusko, M. *et al.* Staphylococcal Proteases Aid in Evasion of the Human Complement System. *Journal of Innate Immunity* **6**, 31-46, (2014).
- 10 Yoshikawa, K. *et al.* Purification, characterization and gene cloning of a novel glutamic acid-specific endopeptidase from Staphylococcus aureus ATCC 12600. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1121**, 221-228, (1992).
- 11 Burchacka, E., Skoreński, M., Sieńczyk, M. & Oleksyszyn, J. Phosphonic analogues of glutamic acid as irreversible inhibitors of Staphylococcus aureus endoproteinase GluC: An efficient synthesis and inhibition of the human IgG degradation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **23**, 1412-1415, (2013).
- 12 Demidyuk, I. V., Chukhontseva, K. N. & Kostrov, S. V. Glutamyl Endopeptidases: The Puzzle of Substrate Specificity. *Acta Naturae* **9**, 17-33, (2017).
- 13 Prasad, L., Leduc, Y., Hayakawa, K. & Delbaere, L. T. J. The structure of a universally employed enzyme: V8 protease from Staphylococcus aureus. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology* **60**, 256-259, (2004).

- 14 Hansen, K. *et al.* Glu-C, an alternative digestive enzyme for the quantitative LC-MS/MS analysis of an IgG-based antibody biotherapeutic. *Bioanalysis* **10**, 997-1007, (2018).
- 15 Worsztynowicz, P., Schmidt, A. O., Bialas, W. & Grajek, W. Identification and partial characterization of proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* relevant to their application in dairy industry. *Acta biochimica Polonica* **66**, 61-69, (2019).
- 16 Le, K. Y. & Otto, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Frontiers in microbiology* **6**, 1174-1174, (2015).
- 17 Coulter, S. N. *et al.* Staphylococcus aureus genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Molecular Microbiology* **30**, 393-404, (1998).
- 18 Li, Y., Yang, Y. & Zhang, C.-y. Visualization and Quantification of Sortase Activity at the Single-Molecule Level via Transpeptidation-Directed Intramolecular Förster Resonance Energy Transfer. *Analytical Chemistry* **90**, 13007-13012, (2018).
- 19 Gradinger, R., Graf, R., Grifka, J. & Löhner, J. Das infizierte Implantat. *Der Orthopäde* **3**, 257-269, (2008).
- 20 Hellmann, M., Mehta, S. D., Bishai, D. M., Mears, S. C. & Zenilman, J. M. The estimated magnitude and direct hospital costs of prosthetic joint infections in the United States, 1997 to 2004. *Journal of Arthroplasty* **25**, 766-771.e761, (2010).
- 21 Sampedro, M. F. & Patel, R. Infections associated with long-term prosthetic devices. *Infectious disease clinics of North America* **21**, 785-819, (2007).
- 22 Tokarczyk, A. J., Greenberg, S. B. & Vender, J. S. Death, dollars, and diligence: prevention of catheter-related bloodstream infections must persist! *Critical Care Medicine* **37**, 2320-2321, (2009).
- 23 Pavlukhina, S. *et al.* Small-molecule-hosting nanocomposite films with multiple bacteria-triggered responses. *Npg Asia Materials* **6**, e121, (2014).
- 24 Min, J. *et al.* Designer Dual Therapy Nanolayered Implant Coatings Eradicate Biofilms and Accelerate Bone Tissue Repair. *ACS Nano* **10**, 4441-4450, (2016).
- 25 Arafa, M. G., El-Kased, R. F. & Elmazar, M. M. Thermo-responsive gels containing gold nanoparticles as smart antibacterial and wound healing agents. *Scientific reports* **8**, 13674, (2018).
- 26 Zhang, L. *et al.* A Photon-Responsive Antibacterial Nanoplatform for Synergistic Photothermal-/Pharmaco- Therapy of Skin Infection. *ACS Applied Materials & Interfaces*, (2018).
- 27 Zhuk, I. *et al.* Self-defensive layer-by-layer films with bacteria-triggered antibiotic release. *ACS Nano* **8**, 7733-7745, (2014).
- 28 Mutschler, A. *et al.* Unexpected bactericidal activity of poly (arginine)/hyaluronan nanolayered coatings. *Chemistry of Materials* **28**, 8700-8709, (2016).

29 Carlsson, J., Drevin, H. & Axén, R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *The Biochemical journal* **173**, 723-737, (1978).

30 Thèse de Doctorat, Mutschler, A. *Nouveaux concepts de revêtements antimicrobiens à base de peptides naturels et de polypeptides appliqués aux dispositifs médicaux*, Université de Strasbourg, (2017).

# **Chapitre 5. Conception de foldamères antimicrobiens et antifongiques**





# SOMMAIRE

## Chapitre 5. Conception de foldamères antimicrobiens et antifongiques

.....	<b>185</b>
5.1. Introduction.....	189
5.2. Design of potent antimicrobial and antifungal oligourea-based foldamers.....	190
5.2.1. Introduction.....	190
5.2.2. Materials and methods.....	191
5.2.3. Results and Discussion.....	194
5.3. Conclusion .....	205
Bibliographie .....	206



## 5.1. Introduction

L'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques est devenu un problème de santé publique majeur.<sup>1</sup> En effet, plus de deux millions de patients souffrent d'une infection due à des bactéries résistantes aux antibiotiques chaque année.<sup>2</sup> Le développement de nouveaux antibiotiques quant à lui est en déclin.<sup>3</sup> Afin de lutter contre cette tendance, plusieurs stratégies ont vu le jour : la recherche de molécules antimicrobiennes dans des sources naturelles, la modification d'antibiotiques connus et le développement de peptides antimicrobiens (PAMs). Au fil des années, de nombreux peptides antimicrobiens ont été découverts chez les mammifères mais également dans les plantes ou les insectes.<sup>4,5</sup> Ces peptides sont des composants du système immunitaire inné des organismes multicellulaires et sont définis comme des peptides de défense de l'hôte (PDH). D'abord extraits de composés naturels, ils ont été par la suite produits par voie de synthèse.<sup>6</sup> La plupart du temps, ils présentent une charge nette totale positive due à la présence d'acides aminés (AA) chargés positivement tels que la lysine ou l'arginine et un nombre important d'AA hydrophobes,<sup>7</sup> ce qui leur confère un caractère amphipathique. Leur longueur varie généralement entre 10 et 50 résidus d'AA.

Malgré le potentiel élevé des PAM en tant qu'agents thérapeutiques, leur développement en application clinique a été jusqu'à présent assez limité. Une première explication vient du fait que les PAM naturels souffrent d'une efficacité *in vivo* réduite. En effet, ils ont une faible stabilité vis-à-vis des peptidases et des protéases. Pour surmonter ces problèmes, la solution est de créer des molécules synthétiques inspirées de ces PAM mais ayant une meilleure efficacité *in vivo*.

Ce chapitre de thèse retrace les travaux réalisés en collaboration avec l'équipe d'Antoine Kichler (Equipe 3Bio, CAMB 7199 CNRS) et avec Céline Douat (Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets (CBMN), UMR 5248). L'objectif de ces travaux est de découvrir de nouvelles molécules antimicrobiennes que l'on pourrait par la suite intégrer dans les revêtements antimicrobiens du laboratoire.

## 5.2. Design of potent antimicrobial and antifungal oligourea-based foldamers

Partie rédigée sous forme d'article

### 5.2.1. Introduction

The emergence of multi-drug-resistant (MDR) bacteria has become an important issue of public health and society. There is therefore an urgent need for new antibacterial compounds effective against bacterial pathogens resistant to current drugs. For example, a challenge in the treatment of *Staphylococcus aureus* infections is the high prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains. Different strategies are currently investigated, including seeking new antimicrobial molecules from natural product sources, modification of known antibiotic molecules, and the development of antimicrobial peptides (AMPs). Over the years, hundreds of AMPs, such as magainins and defensins, have been discovered in mammals.<sup>8</sup> These peptides are component of the innate immunity system of multicellular organisms and are defined as host defence peptides (HDPs). Despite their diversity in sequence and structure, most of the time HDPs possess an overall positive charge and have a substantial number of hydrophobic amino acids conferring them an amphipathic nature. Their length usually varies between 10–50 amino acid residues. The two major abundant families of naturally occurring HDPs preferentially adopt  $\beta$ -sheet (defensins) or  $\alpha$ -helix (cathelicidins) secondary structures for most of them upon interacting with the bacterial membranes.<sup>8</sup> Despite the high potential of AMPs as therapeutic agents, their development for clinical application has been up to now quite limited. One first explanation comes from the fact that natural AMPs suffer from reduced *in vivo* efficiency, in particular due to their poor stability against peptidases and proteases. To overcome these issues, over the last two decades intense effort of research has devoted to develop a new class of synthetic oligomers exhibiting a high propensity to adopt well-defined and predictable folding patterns, referred to as “foldamers”. The field of research in foldamer has produced a variety of artificial backbones equipped with biotic side-chains with enhanced stability in biological fluids thus paving the way to address the question of function of these synthetic architectures.

Compared to other peptidomimetic foldamers, aliphatic urea-based foldamers possess several features that make them promising candidates for biological applications as therapeutics: *i*-short chain *N,N'*-linked oligoureas adopt stable helical conformation in water environment thanks to intramolecular three-centered H-bond network between the two NH of the urea moiety at *i* position and the carbonyl of the urea located at the *i*+2 position; *ii*-the canonical helical structure of oligoureas features 2.5 residues per turn and a pitch of 5.1Å; *iii*- a major breakthrough have been recently done by the Guichard and collab. with the first X-ray crystal structures of oligoureas in water environment unveiling the presence of 2.5-helix conformation through the formation of novel supramolecular assemblies; *iv*- urea-based foldamers are resistant to the action of proteases and are poorly immunogenic.

Subsequently, the finding that while displaying increased stability some oligomers retain their folding in water has opened avenues on the use of these artificial architectures in biological and therapeutic contexts. One of the promising applications include the design of lysine-rich host-defense peptide mimics.<sup>9,10</sup>

Although they display identical charge, several publications have reported that arginine residues confer higher antibacterial activities to peptides than lysines.<sup>11,12</sup> We recently designed oligourea-based foldamers containing arginine and histidine residues that are efficient vectors for plasmid DNA (Deoxyribonucleic acid) delivery into mammalian cells.<sup>13</sup> In particular CND1-81 (**figure 5.1**), and even more its disulfide bridge version, proved to be very efficient in transfecting nucleic acids in various cell lines. As cell penetrating peptides and AMPs share many common chemical and physical features,<sup>14</sup> we asked in the present work whether CND1-81 and related oligoureas thereof could display promising antibacterial and antifungal properties.

## 5.2.2. Materials and methods

### *Synthesis of the foldamers*

The foldamers reported herein were synthesized following a solid phase synthesis strategy according to recently reported procedures and were isolated after semi-

preparative purification with purity above 95%. All the foldamers were dissolved in water and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### ***Cell culture***

We used the human breast cancer cell line MDA-MB-231. The cells were cultured using RPMI that was supplemented with  $100\text{ units}\cdot\text{mL}^{-1}$  penicillin,  $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  streptomycin and 10% of fetal calf serum (FCS; HyClone). The MDA-MB-231 cells were plated in 48-well plates one day before the experiment were conducted. The cell confluence was around 60% the day of the assay.

### ***Cell viability assays***

#### **MTS**

The cell viability was determined on MDA-MB-231 cells by performing the MTS assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt) (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega). This assay was performed using biological triplicates (same amount of foldamer were added to 3 different wells). Increasing amounts of foldamer diluted in  $250\text{ }\mu\text{L}$ /well of RPMI 10% FCS were added to the cells. After 24h of incubation, the culture medium was removed and replaced with  $300\text{ }\mu\text{L}$ /well of RPMI 10% FCS containing the MTS reagent ( $50\text{ }\mu\text{L}$ /well). After incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1h10,  $200\text{ }\mu\text{L}$  of medium were withdrawn and used to measure the absorbance at 490 nm (and 680 nm for background). Untreated cells were used as control (100% of cell viability).

### ***Lactate dehydrogenase assay***

The membrane permeabilization activity was measured as the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) from the cells. Notably, the LDH assay was performed using the same plates than those used for the MTS assay (with  $n=3$ ). Thereby, foldamers were incubated with MDA-MB-231 cells and after incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1h20, an aliquot (50

μL) of the supernatant of each well was used for the measurement of the LDH activity. The experiment was allowed to proceed in order to perform one day later the MTS assay. The LDH release was measured using a commercially available kit (CytoTox- ONE membrane integrity assay from Promega). Untreated cells were used as control. The value of 100% LDH release was obtained by using cells treated with a lysis buffer. Absorbance was measured at 490 nm (and at 680 nm for background).

### ***Antibacterial Assay***

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* S1 Methicillin Resistant (MRSA, G. Prevost Laboratory), *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  $5 \cdot 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>. 90% of this culture were incubated with 10% of the test compound at different concentrations. The positive control is composed of 90% bacterial suspension and 10% of a mixture of antibiotics (tetracycline: 10 μg.mL<sup>-1</sup> and cefotaxime: 0.1 μg.mL<sup>-1</sup> in PBS). The negative control is composed of 90% of the bacterial suspension and 10% of PBS and corresponds to our 100% growth.

In order to test the influence of serum on the minimal inhibitory concentration (MIC), we added 10% decomplexed fetal bovine serum or 50% non-decomplexed fetal bovine serum in MHB medium. After 24 hours of incubation at 37 °C with shaking, the optical density at 620 nm of each well was measured. The smallest concentration for which bacterial growth is 0% corresponds to the MIC of the tested compound.

### ***Antifungal Assay***

*Candida albicans* (*C. albicans*, ATCC 18804) strain were used to assess the antifungal properties of the samples. *C. albicans* was cultured aerobically at 30 °C in a Sabouraud Dextrose Broth (SAB) medium (BD, USA). One colony was transferred to 10 mL of SAB medium and incubated at 30 °C for 20 h. The absorbance at 620 nm of overnight culture was adjusted to 0.001 and the test were performed under the same conditions as for bacteria, with the exception of the temperature (30 °C instead of 37 °C) and the culture medium (SAB instead of MHB).

*Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*, ASPFU098 from Dynamique des interactions hôte pathogène (DIHP) laboratory - EA 7292, Strasbourg) strain were tested to evaluate the antifungal properties of foldamers. Spores were resuspended at a concentration of  $10^4$  spores.mL<sup>-1</sup> in SAB. Test samples were incubated with 90 µL of fungal spores. The suspension was incubated at 37 °C for 24 h without agitation. Fungal growth was monitored microscopically after 24 h. Media alone was used as negative control and corresponds to 100% fungal growth and voriconazole (50 µg mL<sup>-1</sup>) was used as a positive control and corresponds to 100% growth inhibition.

## **5.2.3. Results and Discussion**

### ***Design and synthesis of the foldamers***

Considering the DNA transfection properties of CND1-81 compound,<sup>13</sup> we asked whether such eukaryotic cell penetrating foldamers could display antibacterial and/or antifungal properties. We therefore decided to investigate five urea-based sequences presenting different patterns of side chain distribution, N-terminal capping and chain lengths (**figure 5.1**). With the exception of PC-163, all the other cationic amphiphilic oligoureas are characterized by the presence of His- and Arg-type residues (His<sup>u</sup>, Arg<sup>u</sup>) located on the same face of the 2.5-helical oligourea (**figure 5.1**). All compounds were synthesized on solid support using a Boc strategy as previously described<sup>15</sup> and were obtained in satisfactory yield and high purity after RP-HPLC purification.



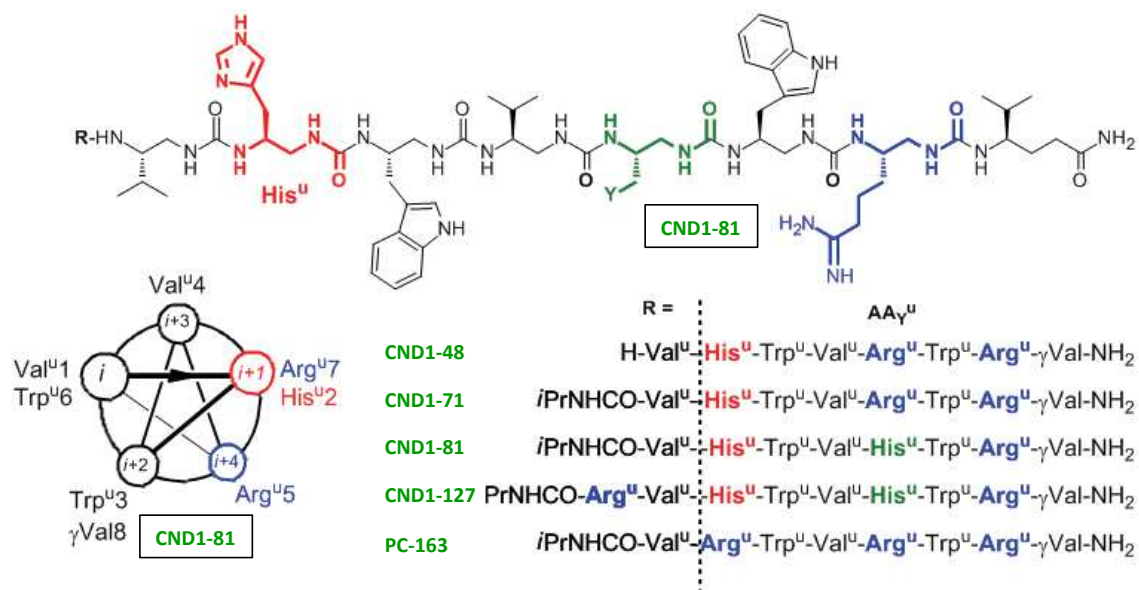


Figure 5.1: Structure of the five urea-based CPFs.

### Evaluation of the antibacterial activity of the foldamers

The five peptidomimetic foldamers were tested on two gram-negative bacterial strains namely *P. aeruginosa* and *E. coli* and two gram-positive bacterial strains (*S. aureus* and Methicillin resistant *S. aureus*, MRSA). The results showed that all foldamers had good to very good antibacterial properties (table 5.1 and figures 5.2-5.5).

Peptide	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
	25923		27853	25922
<b>CND 1-48</b>	12.5	50	12.5	12.5
<b>CND 1-71</b>	6.25	12.5	25	6.25
<b>CND 1-81</b>	12.5	12.5	50	12.5
<b>CND 1-127</b>	6.25	6.25	50	6.25
<b>PC-163</b>	12.5	6.25	12.5	6.25

Table 5.1: Antibacterial activity of the foldamers (MIC in  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

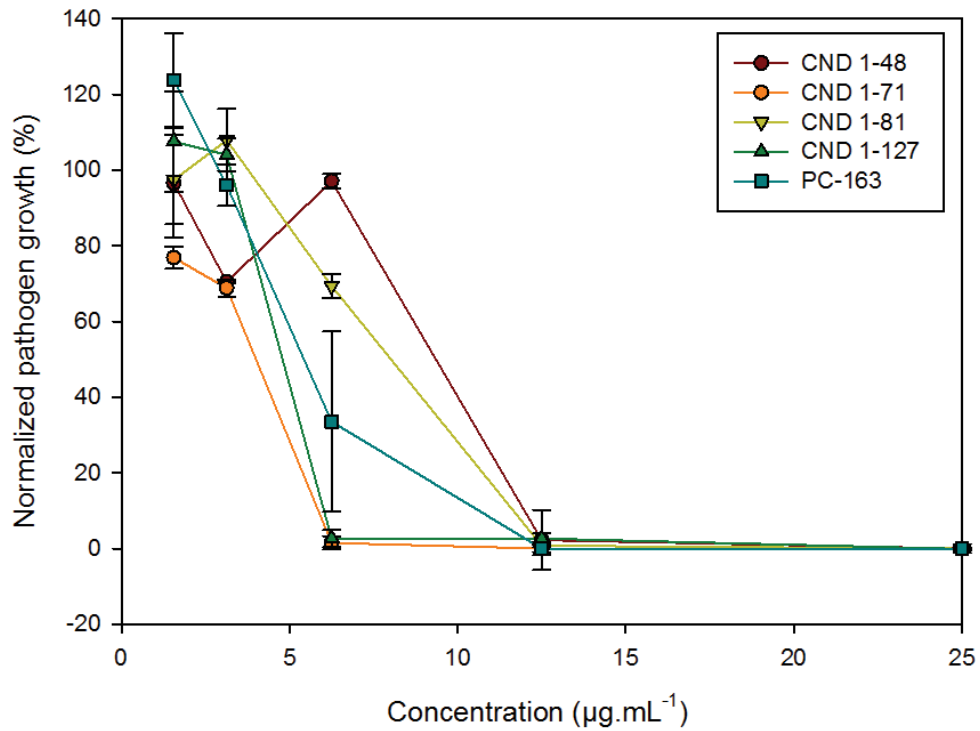


Figure 5.2: Evaluation of Minimal inhibitory concentrations (MICs) of five foldamers towards *S. aureus* 25923. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Each foldamers was incubated 24 h at 37 °C in 100  $\mu\text{L}$  of MHB medium with *S. aureus* 25923 ( $A_{620} = 0.001$ ). Each value corresponds to the mean value of 3 samples and error bars correspond to standard deviations.

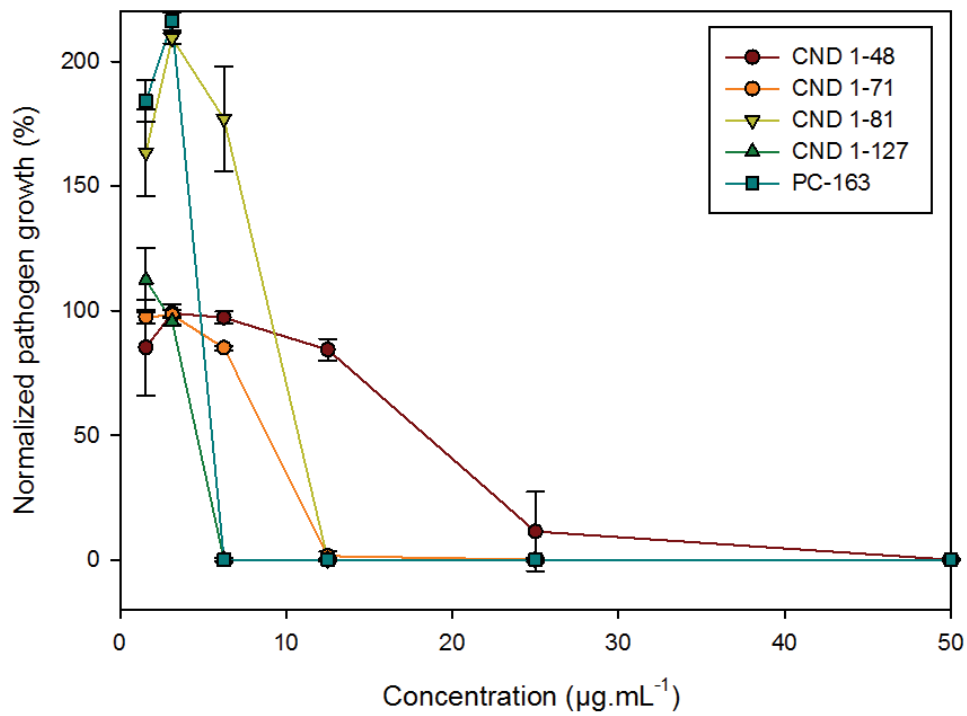


Figure 5.3: Evaluation of Minimal inhibitory concentrations (MICs) of five foldamers towards MRSA. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Each foldamers was incubated 24 h at 37 °C in 100  $\mu\text{L}$  of MHB medium with MRSA ( $A_{620} = 0.001$ ). Each value corresponds to the mean value of 3 samples and error bars correspond to standard deviations.

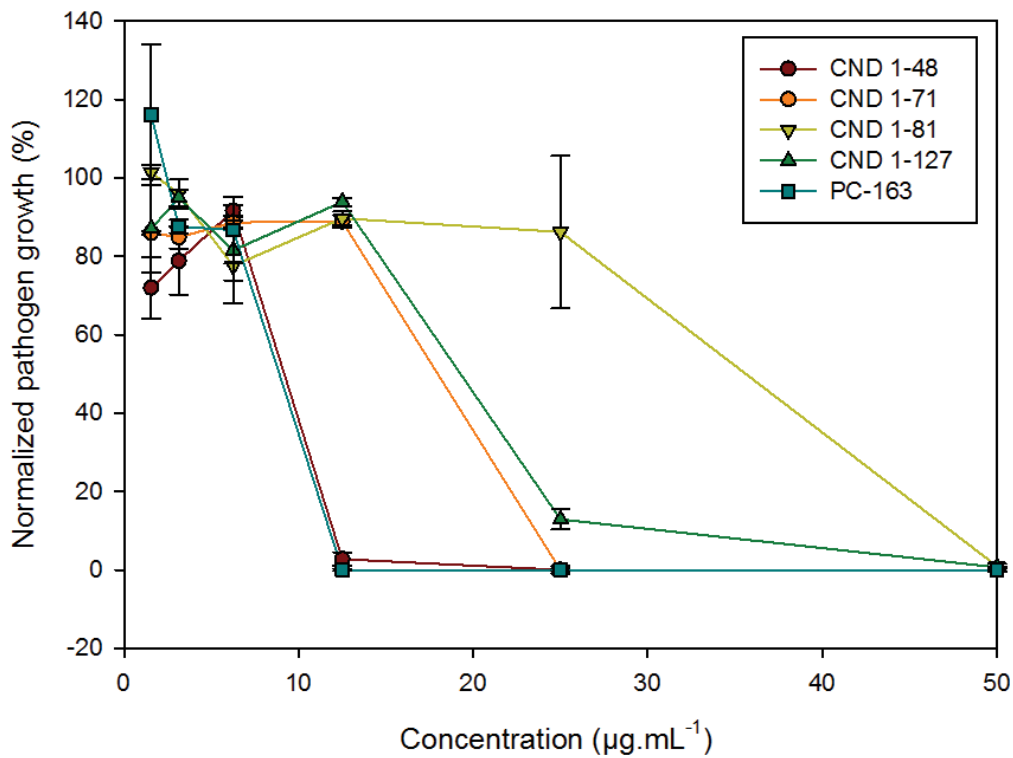


Figure 5.4: Evaluation of Minimal inhibitory concentrations (MICs) of five foldamers towards *P. aeruginosa*. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Each foldamers was incubated 24 h at 37 °C in 100  $\mu\text{L}$  of MHB medium with *P. aeruginosa* ( $A_{620} = 0.001$ ). Each value corresponds to the mean value of 3 samples and error bars correspond to standard deviations.

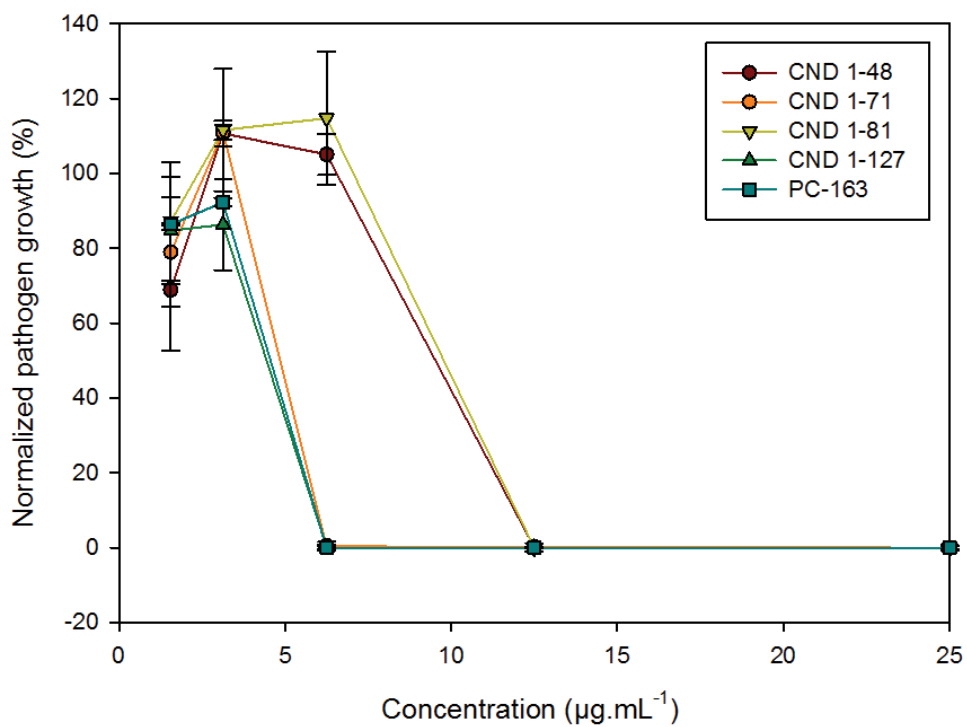


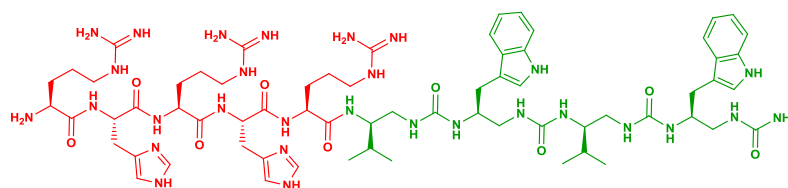
Figure 5.5: Evaluation of Minimal inhibitory concentrations (MICs) of five foldamers towards *E. coli*. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Each foldamers was incubated 24 h at 37 °C in 100  $\mu\text{L}$  of MHB medium with *E. coli* ( $A_{620} = 0.001$ ). Each value corresponds to the mean value of 3 samples and error bars correspond to standard deviations.

Several conclusions can be drawn from these results: *i*- in agreement with previous results, the addition of an isopropyl isocyanate at the N-terminus of the oligoureas increases the antibacterial activity.<sup>10</sup> Indeed, except on *P. aeruginosa*, CND1-71 performed better than CND1-48; *ii*- substituting one His<sup>u</sup> residue in CND1-81 by an Arg<sup>u</sup> has a positive impact on the antibacterial activity (CND1-71 ≥ CND1-81). Consistent with the latter observation is the fact that the insertion of one additional arginine at the N-terminal part of CND1-81 also increases the activity (CND1-127 ≥ CND1-81). In other words, increasing the number of charges on the surface of 2.5-helix improves the bacterial cell killing capabilities of the resulting foldamers. This trend was confirmed with the arginine-rich PC-163 compound which displayed the highest antibacterial responses on the different bacteria lines screened (**table 5.1**). These results are in agreement with previous findings that have underlined the role of positively charged residues in AMPs for initial electrostatic attraction of the peptides to the negatively charged phospholipid membranes of bacteria.<sup>8</sup>

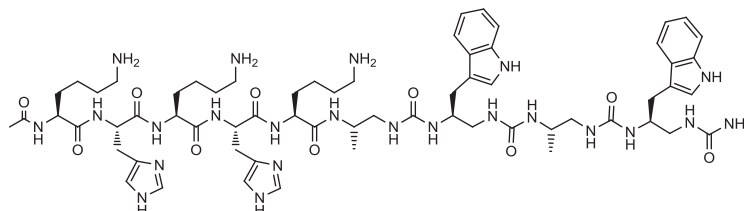
However, this chemical composition-antimicrobial activity relationship is not always valid. During our initial screening of CPFs as antimicrobial agents, we have found that compounds LA08, LA34 and CND1-114 which were designed to display even more charge at the helix surface did not exhibit any apparent antimicrobial activity (**figure 5.6**) on *S. aureus* 25923 with MIC ≥ 100 (data not shown). Thus, as found also by others<sup>14</sup> cationicity is not the unique parameter that matters in the design of potent AMPs mimics.

The DNA gene transfer capabilities of CND1-81 were boosted in the presence of 0,135 mM of ZnCl<sub>2</sub>.<sup>13</sup> We asked whether the presence of this divalent ion could also increase the antibacterial properties of this series of oligoureas. Several urea-based foldamers were tested in the presence of increasing concentration of ZnCl<sub>2</sub> (0.1; 0.175 and 0.25 mM). Unexpectedly, no significant increase of activity was observed (not shown).

**LA08 :**



**LA34** Ac-Lys-His-Lys-His-Lys-Ala<sup>U</sup>-Trp<sup>U</sup>-Ala<sup>U</sup>-Trp<sup>U</sup>-NH<sub>2</sub>



**cnd1-114**

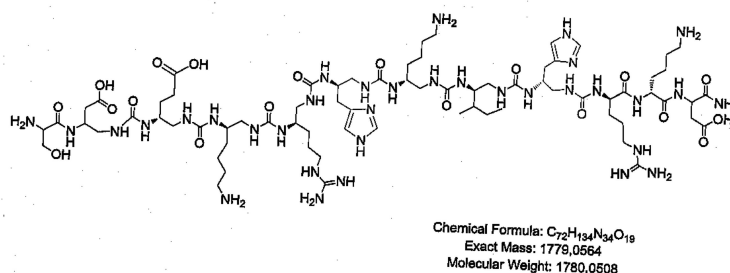


Figure 5.6: Structure of the oligoureas LA08, LA34 and CND1-114.

As mentioned above, dimerization of CND1-81 sequence via the formation of bioreducible disulfide bridge strongly enhanced the DNA transfection property of the resulting CPF.<sup>13</sup> Interestingly, disulfide-dimerization of a magainin analogue also resulted in higher antibacterial activities.<sup>16</sup> We therefore tested the dimeric version of CND1-81 in our assays. Unfortunately, the resulting dimer lost its antimicrobial activity suggesting here a different mode of interaction of the dimer alone compared to when it is assembled with nucleic acids.

The cytotoxicity of the four most active oligoureas on mammalian cells was determined by performing a cell viability assay (MTS). The results showed that exposure of the cells to these foldamers leads to a decrease in the cell viability (**figure 5.7**). The least cytotoxic oligourea was CND1-81 with an IC<sub>50</sub> = 50 µg.mL<sup>-1</sup> while the IC<sub>50</sub> for the three other

compounds was comparable and was around 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (**figure 5.7**). In order to determine whether the peptidomimetic foldamers disturb the plasma membrane of the cells, a membrane leakage assay was performed and consisted in monitoring the leakage of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) from the cell cytoplasm into the surrounding culture medium. The results showed a good correlation between the cell viability and the alteration of the membrane (**figure 5.7**).

Together, these results are in agreement with previous findings showing that a higher number of Arg residues can enhance the antibacterial properties of AMPs but unfortunately at the expense of low cytotoxicity.<sup>14</sup>

As CND1-81 proved to exhibit the lowest mammalian membrane permeabilizing activity, we focused on this foldamer.

- En Rouge : Dosage LDH (altération membranaire)
- En Bleu : Test MTS (viabilité cellulaire)

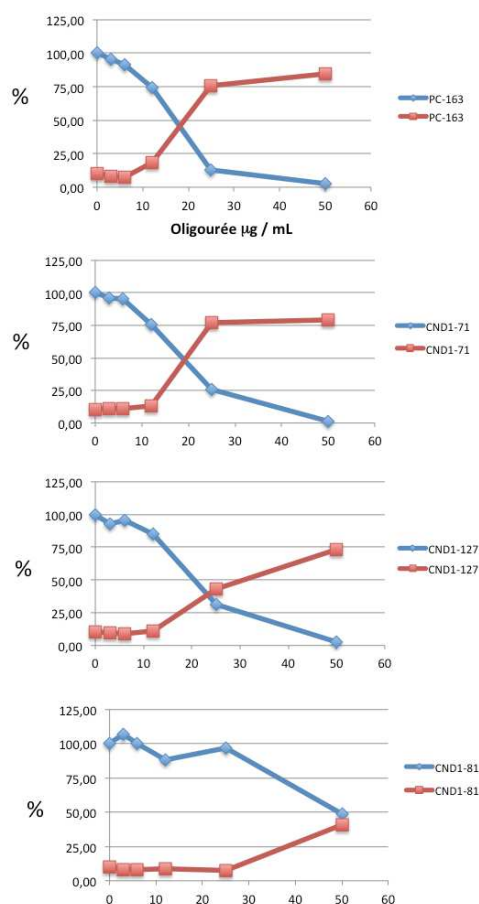
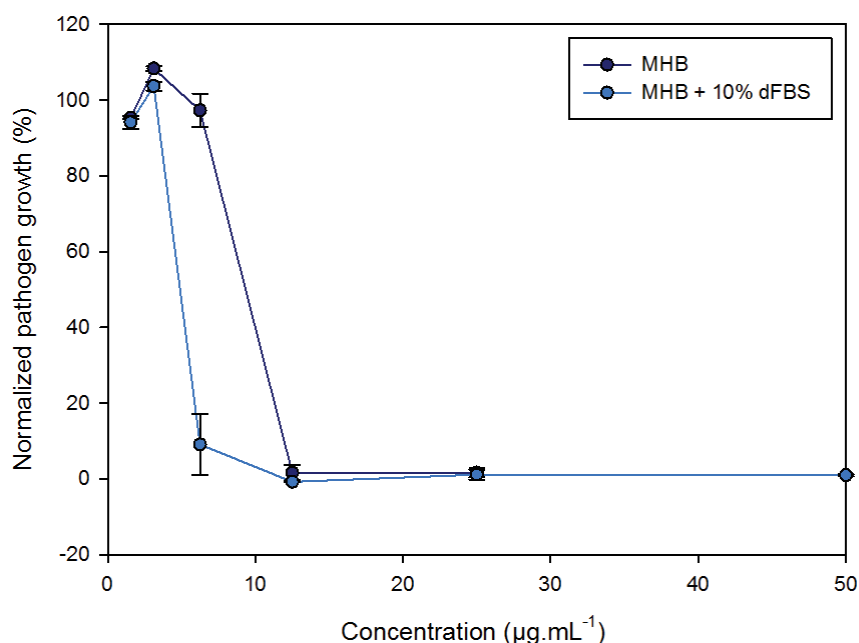


Figure 5.7: LDH and MTS assays performed on the human cell line MDA-MB-231.

### ***Antibacterial activity in the presence of serum***

It was recently shown that the activity of different AMPs including peptides such as LL-37 and peptides that are in (pre-)clinical phases is strongly reduced in the presence of 50% human plasma.<sup>17</sup> In agreement with this result, it was reported that Pexiganan, a 22-residue in length antimicrobial peptide approved by the federal drug administration (FDA) as antibiotic for topical treatment of infection, has a 32-fold decrease in activity when tested on *Staphylococcus aureus* 25923 in the presence of 50% bovine serum.<sup>18</sup> With the aim to determine whether oligoureia CND1-81 is serum sensitive, we first performed an assay using *S. aureus* S1 in the presence of 10% fetal bovine serum. As reported in the **figure 5.8**, its MIC remained unaffected. To further strengthen the experimental conditions, we repeated this assay this time in the presence of 50% non-depleted fetal bovine serum. Remarkably, under these harsh conditions, the results showed that the MIC was only reduced two to four-fold (**figure 5.9** and data not shown).



*Figure 5.8: Evaluation of Minimal inhibitory concentrations (MICs) of CND1-81 towards MRSA. Concentrations are expressed in µg.mL<sup>-1</sup>. CND1-81 was incubated 24 h at 37 °C in 100 µL of MHB medium supplemented or not with 10% fetal bovine serum with MRSA ( $A_{620} = 0.001$ ). Each value corresponds to the mean value of 3 samples and error bars correspond to standard deviations.*

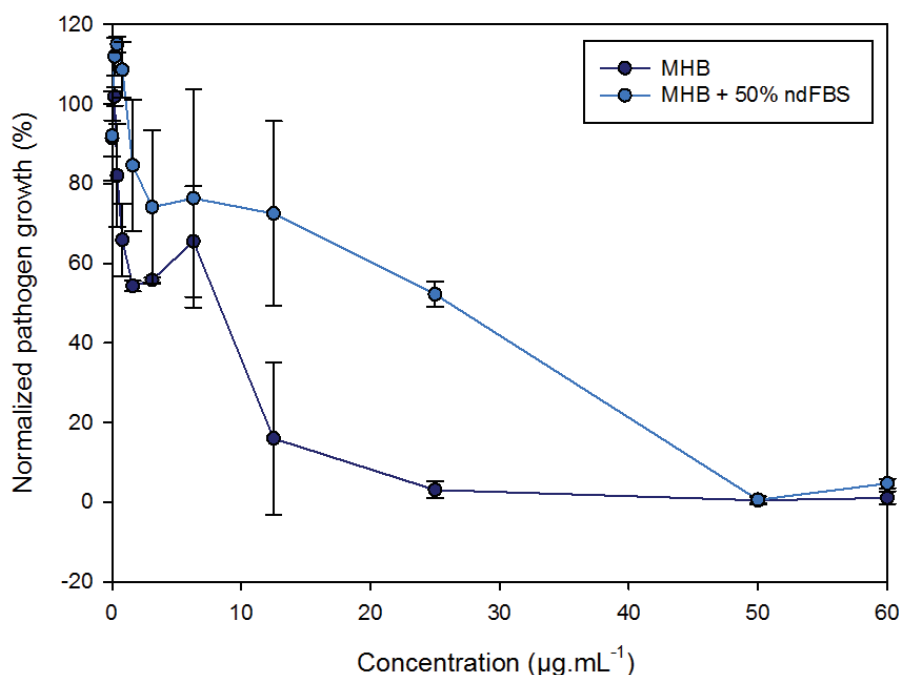


Figure 5.9: Evaluation of Minimal inhibitory concentrations (MICs) of CND1-81 towards MRSA. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . CND1-81 was incubated 24 h at 37 °C in 100  $\mu\text{L}$  of MHB medium supplemented or not with 50% non-depleted fetal bovine serum with MRSA ( $A_{620} = 0.001$ ). Each value corresponds to the mean value of 3 samples and error bars correspond to standard deviations.

### Evaluation of the antifungal activity

To the best of our knowledge, urea-based foldamers have never been tested for their antifungal activity. In a first assay, we have evaluated the different sequence on *C. albicans*. The results reported in the **table 5.2** showed that all the foldamers had good activity with a MIC at 12.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  or even below (**table 5.2** and **figure 5.10**).

Peptide	<i>C. albicans</i> 18804
CND 1-48	12.5
CND 1-71	12.5
CND 1-81	12.5
CND 1-127	12.5
PC-163	6.25

Table 5.2: Antifungal activity of the foldamers (MIC in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )



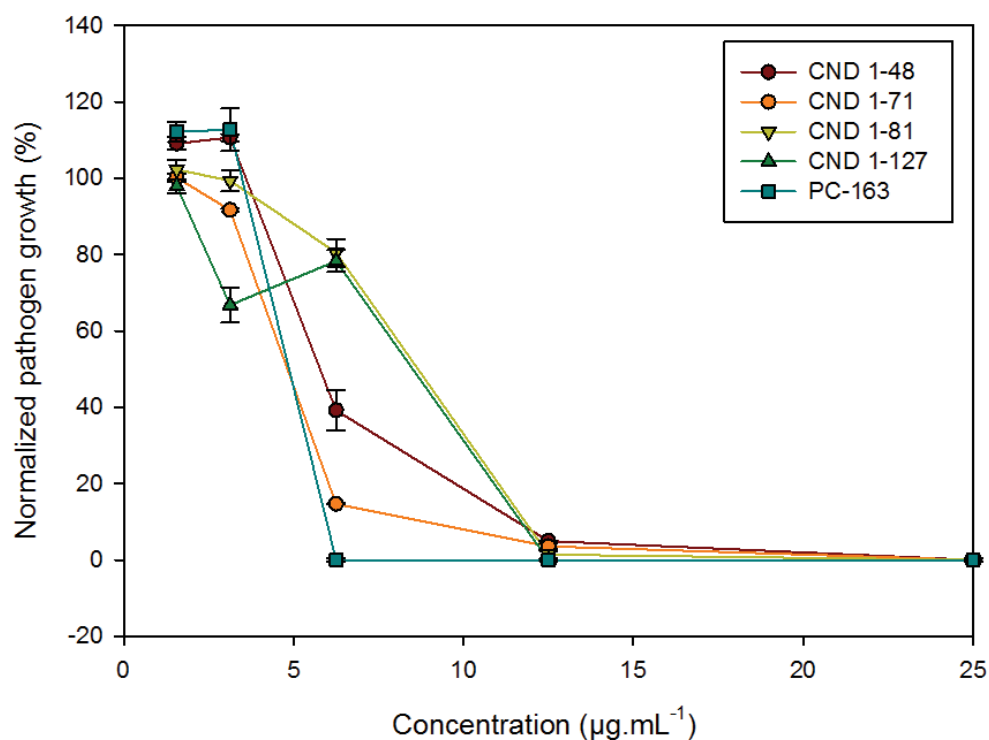


Figure 5.10: Evaluation of Minimal inhibitory concentrations (MICs) of five foldamers towards *C. albicans*. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Each foldamers was incubated 24 h at 37 °C in 100  $\mu\text{L}$  of MHB medium with *C. albicans* ( $A_{620} = 0.001$ ). Each value corresponds to the mean value of 3 samples and error bars correspond to standard deviations *C. albicans*

In order to investigate the extent of activity of CND1-81, its antifungal property was screened on *Aspergillus fumigatus* 098. As shown in **figure 5.11** the MIC was below 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The commercially available antifungal compound Voriconazole (MIC of 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) was used as a control in this experiment (**figure 5.12**).

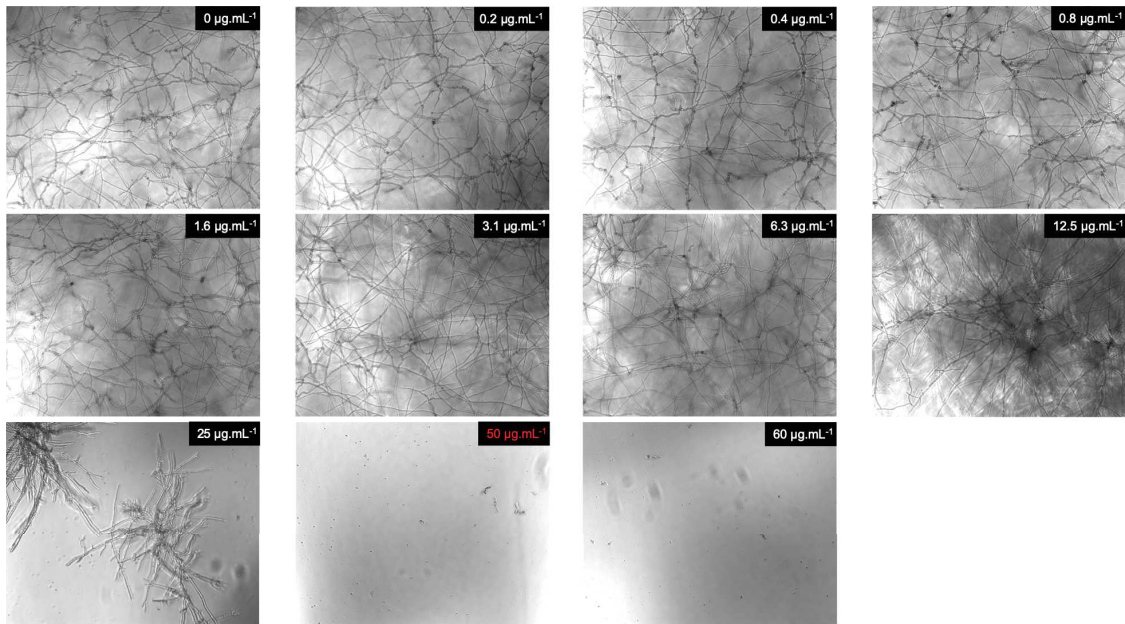


Figure 5.11: Antifungal activity of CND1-81 on *Aspergillus fumigatus* 098.

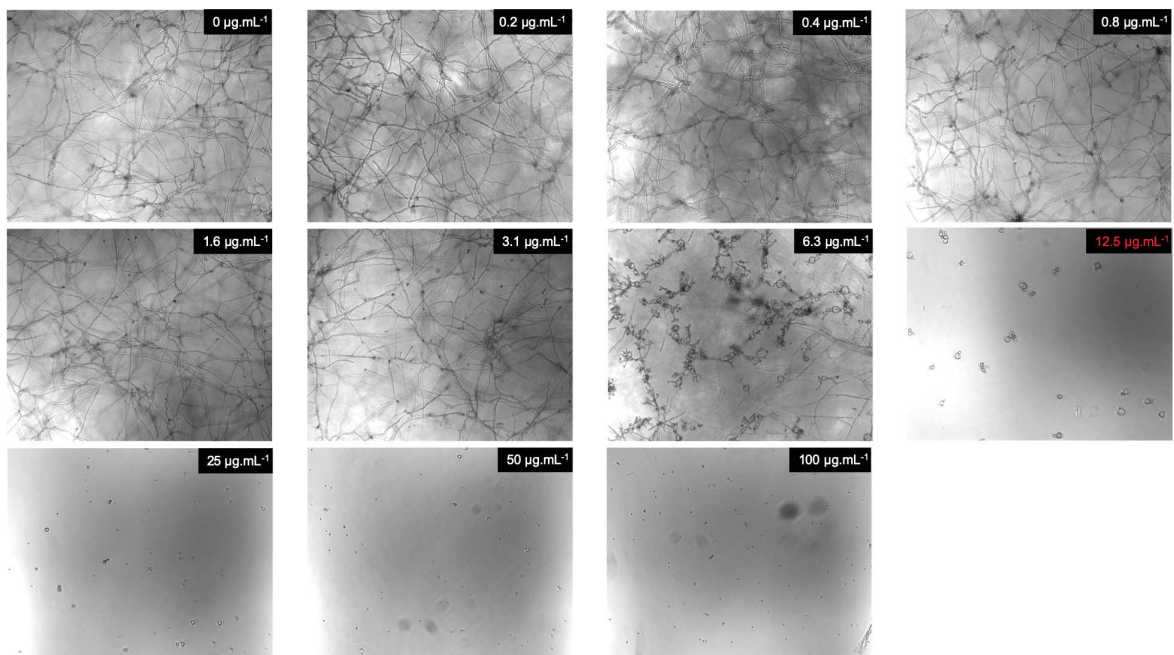


Figure 5.12: Antifungal activity of Voriconazole on *Aspergillus fumigatus* 098.

### 5.3. Conclusion

In the present work, we evaluated the antibacterial activity of oligourea used for DNA transfection. The results show that tested foldamers have a strong antibacterial activity in solution even in the presence of 50% serum. In addition, we have reported for the first time that urea-based foldamers such as CND1-81 possess promising antifungal properties. Membrane leakage assay results show that these peptides permeabilize cell membranes and cause low cell viability. However, CND1-81 is the foldamer for which the cytotoxic concentration towards cells is the lowest and is higher than the MIC for *S. aureus*. The results also show that the side-chain composition of the foldamer has to be finely tuned for optimal antimicrobial properties and low cytotoxicity towards mammalian cells.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Annual report of the European Antimicrobial Resistance - Surveillance Network (EARS-Net) 2017. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).
- 2 *Antibiotic Resistance Threats in the United States 2013*, <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>> (2016).
- 3 WHO. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*, <<https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>> (April 2014).
- 4 Lemaitre, B. & Hoffmann, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* **25**, 697-743, (2007).
- 5 Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395, (2002).
- 6 Haney, E. F. & Hancock, R. E. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Biopolymers* **100**, 572-583, (2013).
- 7 Hancock, R. E. & Sahl, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* **24**, 1551-1557, (2006).
- 8 Yeaman, M. R. & Yount, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews* **55**, 27-55, (2003).
- 9 Claudon, P. *et al.* Consequences of Isostructural Main-Chain Modifications for the Design of Antimicrobial Foldamers: Helical Mimics of Host-Defense Peptides Based on a Heterogeneous Amide/Urea Backbone. *Angewandte Chemie-International Edition* **49**, 333-336, (2010).
- 10 Violette, A. *et al.* Mimicking helical antibacterial peptides with nonpeptidic folding oligomers. *Chemistry & Biology* **13**, 531-538, (2006).
- 11 Cutrona, K. J., Kaufman, B. A., Figueroa, D. M. & Elmore, D. E. Role of arginine and lysine in the antimicrobial mechanism of histone-derived antimicrobial peptides. *FEBS letters* **589**, 3915-3920, (2015).
- 12 Deslouches, B., Hasek, M. L., Craigo, J. K., Steckbeck, J. D. & Montelaro, R. C. Comparative functional properties of engineered cationic antimicrobial peptides consisting exclusively of tryptophan and either lysine or arginine. *Journal of medical microbiology* **65**, 554-565, (2016).
- 13 Douat, C. *et al.* A Cell-Penetrating Foldamer with a Bio-reducible Linkage for Intracellular Delivery of DNA. *Angewandte Chemie International Edition* **54**, 11133-11137, (2015).

- 14 Bahnsen, J. S., Franzyk, H., Sandberg-Schaal, A. & Nielsen, H. M. Antimicrobial and cell-penetrating properties of penetratin analogs: Effect of sequence and secondary structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1828**, 223-232, (2013).
- 15 Nelli, Y.-R. *et al.* An activated building block for the introduction of the histidine side chain in aliphatic oligourea foldamers. *Tetrahedron* **68**, 4492-4500, (2012).
- 16 Dempsey, C. E., Ueno, S. & Avison, M. B. Enhanced membrane permeabilization and antibacterial activity of a disulfide-dimerized magainin analogue. *Biochemistry* **42**, 402-409, (2003).
- 17 de Breij, A. *et al.* The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms. *Science Translational Medicine* **10**, ean4044, (2018).
- 18 Ge, Y. *et al.* In Vitro Antibacterial Properties of Pexiganan, an Analog of Magainin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 782-788, (1999).



# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'utilisation de dispositifs médicaux implantables pour des applications temporaires ou permanentes est en pleine expansion. Cependant, l'introduction d'un corps étranger n'est pas sans risque. Les infections associées aux dispositifs médicaux sont responsables d'environ la moitié des infections nosocomiales. L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques, le vieillissement de la population et le manque des nouvelles molécules antibiotiques rendent urgent de développer de nouvelles stratégies de lutte antimicrobienne.

Une des stratégies mise en place a été l'administration locale d'antibiotiques *via* la conception de revêtements, pour limiter les injections systémiques d'antibiotiques et ainsi limiter les dégâts de ces molécules sur les flores commensales de l'organisme. Ces revêtements, qualifié de « realease-killing » relarguent en continu l'agent biocide au niveau du site d'implantation et permettent ainsi de tuer les bactéries uniquement présentes sur ce site. Cependant, ces revêtements induisent une forte concentration locale d'antibiotiques pouvant induire l'apparition de bactéries résistantes mais également une toxicité sur les cellules environnantes.

Le développement de revêtements « anti-adhésifs » est une autre stratégie de lutte antimicrobienne. Ces revêtements permettent d'inhiber la première phase de la création d'un biofilm : la phase d'adhésion. Ainsi ils permettent de fortement limiter l'apparition de biofilm sur le dispositif médical et donc diminuer la résistance des bactéries aux agents biocides. Cependant, cette stratégie ne permet pas d'éliminer les bactéries, à moins d'administrer des antibiotiques par voie orale ou intraveineuse.

Une des dernières stratégies à avoir été développée, est la création d'un revêtement dit de « contact-killing ». L'agent antimicrobien est retenu dans le revêtement et l'action antibactérienne se fait lorsque la bactérie vient au contact de la surface. Ainsi, les bactéries essayant de se fixer à la surface pour initier la formation d'un biofilm sont tuées.

Dans le chapitre 3 de cette thèse, nous avons conçu un film de polyélectrolytes construit par la méthode de dépôt « couche par couche » et présentant la capacité de « contact-killing ». Des études précédentes au laboratoire ont montré qu'un film composé de poly(L-

arginine) (PAR) et d'acide hyaluronique (HA) possédait un effet antibactérien contre *S. aureus*. L'avantage de ce film est qu'aucun ajout de molécule biocide n'est nécessaire. En effet, la PAR est responsable de l'activité antibactérienne du film. Nous avons donc voulu élucider le mécanisme d'action de ces films en changeant la taille des chaînes de PAR qui constituent le film. Nous avons donc testé quatre PAR différentes : PAR10, PAR30, PAR100 et PAR200 composées respectivement de 10, 30, 100 et 200 résidus arginine.

L'effet antibactérien des films multicouches (PAR10/HA)<sub>24</sub>, (PAR30/HA)<sub>24</sub>, (PAR100/HA)<sub>24</sub> et (PAR200/HA)<sub>24</sub> a été étudié. A notre grande surprise, seul le film (PAR30/HA)<sub>24</sub> possède une activité antibactérienne contre des bactéries à gram positif et à gram négatif. Afin d'élucider le mécanisme d'action d'un tel film, nous avons tout d'abord quantifié la libération des chaînes de PAR depuis le film vers le surnageant. Les résultats ont montré que la quantité de PAR dans le surnageant est inférieure à la concentration minimale inhibitrice de la PAR en solution, rendant l'hypothèse d'un effet « release-killing » impossible. Nous avons donc continué par quantifier la mobilité des chaînes de PAR dans les films multicouches. Nous nous sommes rendu compte que la PAR30 est beaucoup plus mobile dans les films que ces homologues PAR100 et PAR200. Nous avons alors supposé que la mobilité des chaînes de PAR30 dans un film PAR30/HA permet de renouveler continuellement la surface en polycations et de tuer les bactéries venant adhérer à cette surface. Cette hypothèse a été vérifiée en réticulant les films PAR30/HA et en montrant qu'ils n'exerçaient plus aucune activité antibactérienne.

Au vu de ces résultats, nous avons voulu nous servir des caractéristiques de ces films multicouches PAR/HA pour créer un revêtement dont l'activité antibactérienne est spécifique d'une souche bactérienne. La conception de cette nouvelle génération de film PAR/HA est présentée dans le chapitre 4. La nouveauté apportée à ce revêtement est la conception d'un polymère tribloc composé de chaînes de PAR et d'une séquence peptidique TLRGGE pouvant être hydrolysée par une protéase extracellulaire (la GluC) produite par *S. aureus* en chaîne de PAR plus courtes. L'étude du clivage de cette séquence spécifique conçu au laboratoire s'est faite par ajout de sondes fluorescences à ses extrémités. L'étude du clivage de la séquence peptidique a d'abord été réalisée en solution et a montré que la bactérie *S. aureus* V8 est capable de cliver cette séquence. En revanche, la bactérie *P. aeruginosa*, ne produisant pas la GluC, est incapable de cliver cette séquence. Le polymère tribloc a ensuite été déposé sur un film (PAR200/HA)<sub>24</sub> afin d'étudier le



clivage en surface. Les différentes expériences ont montré que le clivage du polymère tribloc est possible dans un film multicouche en présence de bactéries *S. aureus*. De plus, les tests d'activité antibactérienne montrent que *S. aureus* V8 est sensible à ce revêtement, contrairement à *P. aeruginosa*.

La mise au point de ce système a été d'une grande complexité mais a permis la conception d'un nouveau revêtement intelligent dont l'activité antibactérienne est spécifique d'une souche donnée et induite par un mécanisme de sécrétion enzymatique de la bactérie. De plus, grâce aux sondes FRET, une caractéristique majeure a été ajoutée au système avec la possibilité de disposer d'une méthode de détection de la présence de bactéries spécifiques à la surface.

Ceci est une première preuve de concept. Cependant, cette stratégie peut être facilement étendue à d'autres systèmes de bactéries et d'enzymes simplement en choisissant la séquence peptidique clivable adéquate. Ce revêtement est simple à produire et capable de couvrir tout type de matériaux, il peut donc être conçu pour être efficace vis-à-vis de certaines bactéries avec un agent antimicrobien qui ne soit pas basé sur des antibiotiques.

Pour poursuivre ce projet il faudra améliorer le système pour pouvoir avoir une activité antibactérienne prolongée dans le temps. Les résultats montrent qu'au bout de 24 h d'incubation, les films ne sont plus antibactériens. Ces derniers sont construits avec une base de 24 bicouches de PAR200/HA dans laquelle une ou deux couches de polymère clivable sont chargées. La quantité en polymère clivable est sûrement insuffisante pour avoir une activité antibactérienne prolongée. Nous envisageons donc de construire tout le film avec le polymère tribloc, pas seulement les deux dernières bicouches, pour avoir une plus grande quantité de polymère tribloc au sein du film et ainsi pouvoir avoir une activité antibactérienne à plus long terme. Une autre solution serait de repenser le polymère clivable en créant une longue chaîne composée de PAR30 séparées les unes des autres par les séquences clivables. La conception de cette chaîne est beaucoup plus complexe que notre chaîne actuelle (PAR10-séquence clivable-PAR200), puisqu'il faudrait pour contrôler la longueur de la chaîne et le nombre d'unité PAR30. Cependant, elle serait plus intéressante puisqu'au lieu d'avoir une seule chaîne mobile lors du clivage (PAR10 dans notre cas), on aurait plusieurs PAR30 mobiles après clivage.

Dans un second temps il faudra déterminer la sensibilité de notre système de fluorescence pour pouvoir en faire non seulement un outil thérapeutique mais également un outil de diagnostic.

Nous avons également pensé à utiliser d'autres formulations pour viser d'autres applications biomédicales. Pour le moment, nous avons intégré ce polymère tribloc uniquement dans des films multicouches pouvant être déposé sur des surfaces telles que des implants orthopédiques ou dentaires. Pour la suite, nous aimerions intégrer le polymère tribloc dans des films multicouches construits sur des nanoparticules. Cela permettrait de créer une suspension injectable et de venir lutter contre des infections localisées. Le polymère tribloc pourrait également être intégré dans des hydrogels d'acide hyaluronique, déjà étudiés au laboratoire, pour ajouter la notion de spécificité antibactérienne à ce type de système. La formulation en hydrogel permettrait de viser d'autres applications telles que le traitement des plaies cutanées ou dans les lentilles de contact.

Le chapitre 5 présente les recherches qui ont été réalisées afin d'identifier de nouvelles molécules antibactériennes pouvant être intégrées dans les films multicouches conçu au laboratoire. Les peptides antimicrobiens sont présents dans tous les organismes pluricellulaires comme les plantes, les mammifères ou encore les insectes. Cependant leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques est limitée puisqu'ils souffrent d'une efficacité *in vivo* réduite à cause de leur sensibilité aux peptidases et protéases. Pour surmonter ces problèmes, la solution est de s'inspirer de ces peptides naturels en créant des molécules synthétiques ayant une meilleure efficacité *in vivo*. C'est ainsi que nous avons étudié l'activité antibactérienne de foldamères synthétiques. Une des molécules testées a retenu notre attention : CND1-81. En effet, ce foldamère possède une forte activité antibactérienne mais également une activité antifongique prometteuse. Les résultats montrent également que la composition des chaînes latérales du foldamère doit être réglée avec précision pour obtenir des propriétés antimicrobiennes optimales et une faible cytotoxicité envers les cellules de mammifère.

La recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes est nécessaire si l'on veut limiter l'utilisation des antibiotiques. La conception de nouvelles molécules basées sur des molécules naturelles est un domaine riche et intéressant permettant de comprendre

l'influence de la structure mais également de la charge d'une molécule sur l'activité antimicrobienne.





Lorène TALLET

## Revêtement antibactérien intelligent à base de polyarginine et d'acide hyaluronique pour des applications biomédicales

### Résumé

Environ la moitié des dispositifs médicaux sont impliqués dans les infections nosocomiales. Les dispositifs médicaux sont des surfaces idéales pour la croissance bactérienne et le développement de biofilms. Dans ce contexte, un revêtement antibactérien dont l'activité antibactérienne est induite par les pathogènes a été conçu. Ce revêtement, à base de polyarginine (PAR) et d'acide hyaluronique, est construit avec des longues chaînes de PAR inactives contenant une séquence peptidique clivable par des protéases extracellulaires bactériennes. Lorsque ces enzymes spécifiques produites par des bactéries sont proches de la surface, les longues chaînes de PAR sont clivées par ces enzymes et des chaînes de PAR plus courtes sont alors produites. La présence de ces courtes chaînes de PAR permet ensuite d'induire une activité antimicrobienne sur le film. De plus, en ajoutant des sondes FRET aux chaînes de PAR clivables, cela permet de détecter la présence de bactéries à la surface par un signal de fluorescence. Ce revêtement à base de polypeptides portant des séquences spécifiques sensibles aux enzymes est une stratégie innovante et prometteuse pour les applications biomédicales.

**Mots clés** : infections, revêt

ement, antimicrobien, théranostique, surfaces intelligentes, multicouches de polyélectrolytes

### Résumé en anglais

About half of medical devices are involved in hospital-acquired infections. Medical devices are ideal surfaces for bacterial growth and biofilm development. In this context, an antibacterial coating whose antibacterial activity is induced by pathogens has been designed. This coating, based on polyarginine (PAR) and hyaluronic acid, is constructed with long inactive PAR chains containing a peptide sequence cleavable by bacterial extracellular proteases. When these specific enzymes produced by bacteria are close to the surface, the long PAR chains are cleaved by these enzymes and shorter PAR chains are then produced. The presence of these short chains of PAR can then induce an antimicrobial activity on the film. In addition, by adding FRET probes to cleavable PAR chains, the presence of bacteria on the surface can be detected by fluorescence signal. This polypeptide-based coating with specific enzyme-sensitive sequences is an innovative and promising strategy for biomedical applications.

**Keywords**: infection, coatings, antimicrobials, theranostic, smart surfaces, polyelectrolyte multilayers