



**HAL**  
open science

# Modification des propriétés de surface d'un polypropylène en vue de l'immobilisation de biomolécules aux propriétés antibactériennes

Simon Léoment

► **To cite this version:**

Simon Léoment. Modification des propriétés de surface d'un polypropylène en vue de l'immobilisation de biomolécules aux propriétés antibactériennes. Chimie. UPMC, 2015. Français. NNT : . tel-02927137

**HAL Id: tel-02927137**

**<https://theses.hal.science/tel-02927137>**

Submitted on 1 Sep 2020

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

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

# Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

Spécialité

Génie des Procédés et Technologies Avancées (ED 390)

Chimie-Physique et Chimie Analytique (ED 388)

*Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques*

## **Modification des propriétés de surface d'un polypropylène en vue de l'immobilisation de biomolécules aux propriétés antibactériennes**

*Thèse CIFRE financée par Aptar France SAS*

Par Simon LEOMENT

Co-dirigée par

Mme Farzaneh AREFI-KHONSARI (Professeur), et Mme Claude JOLIVALT (Professeur)

Présentée et soutenue publiquement le 13 mai 2015

Devant un jury composé de :

<b>Philippe SUPIOT</b>	Professeur	Université de Lille 1	Rapporteur
<b>Luc VELLUTINI</b>	Maître de Conférence	Université de Bordeaux	Rapporteur
<b>Véronique MIGONNEY</b>	Professeur	Université de Paris 13	
<b>Michèle SALMAIN</b>	Directeur de Recherche	UPMC	
<b>Claude JOLIVALT</b>	Professeur	UPMC	Co-directrice
<b>Farzaneh AREFI-KHONSARI</b>	Professeur	UPMC	Co-directrice
<b>Christophe PIERRE</b>		APTAR France SAS	Invité

# Table des matières

Liste des abréviations .....	5
<b>Introduction</b> .....	6
<b>Références</b> .....	9
<b>CHAPITRE I : ÉTAT DE L'ART SUR L'ATTRIBUTION DE PROPRIÉTÉS</b>	
<b>ANTIBACTÉRIENNES À UNE SURFACE POLYMÈRE.....</b>	<b>10</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>11</b>
<b>1 Les bactéries</b> .....	<b>12</b>
1.1 Composition interne des bactéries .....	12
1.2 Structure de la paroi des bactéries .....	13
<b>2 Les agents antibactériens</b> .....	<b>16</b>
2.1 Bactériostatique ou bactéricide ? .....	16
2.2 Les agents antibactériens inorganiques.....	17
2.3 Les ammoniums quaternaires .....	21
2.4 Les biopolymères antibactériens.....	22
2.5 Les peptides antibactériens .....	22
<b>3 Immobilisation de biomolécules à la surface d'échantillons en polypropylène</b> .....	<b>31</b>
3.1 Quelle méthode d'immobilisation pour les peptides ?.....	31
3.2 Traitement de surface du polypropylène par plasma .....	33
3.3 Immobilisation covalente des biomolécules sur la surface de polymères traités par plasma	
44	
<b>4 Stratégie de recherche</b> .....	<b>48</b>
4.1 Choix de l'agent antibactérien .....	48
4.2 Choix de la méthode de fonctionnalisation.....	49
4.3 Choix de la méthode d'immobilisation des peptides .....	49
4.4 Choix de la méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	50
<b>Références</b> .....	<b>52</b>
<b>CHAPITRE II : INTRODUCTION DE GROUPEMENTS FONCTIONNELS EN</b>	
<b>SURFACE DU POLYPROPYLENE PAR DES PROCÉDÉS PLASMA À PRESSION</b>	
<b>ATMOSPHÉRIQUE.....</b>	<b>62</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>63</b>
<b>1 Activation par torche plasma à pression atmosphérique : Protocole expérimental</b> .....	<b>64</b>
1.1 Montage expérimental .....	64
1.2 Contrôle des conditions de traitement.....	65

1.3	Dépôt d'acide acrylique par jet de plasma de type DBD.....	67
<b>2</b>	<b>Caractérisation d'une surface traitée par torche plasma à la pression atmosphérique.....</b>	<b>69</b>
2.1	Méthodes de caractérisation.....	69
2.2	Choix du gaz plasmagène .....	71
2.3	Diagnostic plasma.....	76
2.4	Influence du traitement sur l'énergie de surface du matériau.....	80
2.5	Caractérisations de surface d'échantillons traités par plasma par spectroscopie.....	83
2.6	Mise en évidence de groupements aldéhyde de surface .....	99
2.7	Dépôt d'acide acrylique .....	104
<b>3</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>109</b>
	<b>Références.....</b>	<b>111</b>

**CHAPITRE III : IMMOBILISATION DE PEPTIDES SUR LA SURFACE D'UN POLYPROPYLENE TRAITÉ PAR PLASMA À LA PRESSION ATMOSPHÉRIQUE .....**

	<b>Introduction .....</b>	<b>116</b>
<b>1</b>	<b>Protocole d'immobilisation des peptides par réaction chimique sur la surface du PP.....</b>	<b>118</b>
1.1	Description du protocole.....	118
1.2	Paramètres influençant l'immobilisation .....	120
1.3	Immobilisation des biomolécules sur un dépôt d'acide acrylique .....	123
<b>2</b>	<b>Caractérisation des surfaces après immobilisation des biomolécules .....</b>	<b>124</b>
2.1	Importance des conditions du traitement par plasma.....	124
2.2	Contrôle des paramètres du greffage .....	129
2.3	Contribution des groupements aldéhydes à l'immobilisation du lysozyme .....	143
2.4	Vieillessement des matériaux fonctionnalisés.....	146
2.5	Étude de l'immobilisation.....	149
2.6	Immobilisation des biomolécules sur la couche d'acide acrylique déposée par torche DBD	158
<b>3</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>162</b>
	<b>Références.....</b>	<b>164</b>

**CHAPITRE IV : ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES ÉCHANTILLONS DE POLYPROPYLENE FONCTIONNALISÉS AVEC LES BIOMOLÉCULES AUX PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES .....**

	<b>Introduction .....</b>	<b>168</b>
<b>1</b>	<b>Protocole expérimental .....</b>	<b>169</b>
1.1	Description du protocole.....	169
1.2	Critères de validité du test.....	172

<b>2</b>	<b>Évaluation de l'activité antibactérienne de polypropylène fonctionnalisé .....</b>	<b>174</b>
2.1	Choix de la souche bactérienne.....	174
2.2	Activité des échantillons fonctionnalisés par le protocole standard .....	174
2.3	Stabilité de l'activité antibactérienne des échantillons fonctionnalisés .....	176
2.4	Activité des échantillons fonctionnalisés avec un dépôt d'acide acrylique.....	182
<b>3</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>185</b>
	<b>Références.....</b>	<b>187</b>
	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>188</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>197</b>
	<b>Méthodes de caractérisation de surface.....</b>	<b>198</b>
	Spectroscopie d'émission optique.....	198
	Méthode d'évaluation de l'énergie de surface d'un matériau .....	201
	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) .....	203
	Spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS) .....	205
	<b>Purification de la nisine par chromatographie liquide haute pression/performance (HPLC)</b>	<b>208</b>
	<b>Dépôt de couches minces d'argent par procédé de sputtering magnétron.....</b>	<b>210</b>
	<b>Références.....</b>	<b>212</b>

## Liste des abréviations

**AMP** : Antimicrobial Peptide

**APPJ** : Atmospheric Pressure Plasma Jet

**ATR-FTIR** : Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared spectroscopy

**CFU** : Colony Forming Unit

**DBD** : Décharge à Barrière Diélectrique

**EDC** : N-ethyl-N'-(3-(diméthylamino)propyl)carbodiimide hydrochloride

**EDX** : Energy Dispersive X-ray analysis

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography

**LPS** : Lipopolysaccharides

**LTE** : Local Thermodynamic Equilibrium

**MEB** : Microscopie Électronique à Balayage

**NHS** : N-Hydroxysuccinimide

**OES** : Optical Emission Spectroscopy

**PCT** : Plasma Cycle Time

**PEG** : Polyéthylène Glycol

**PP** : Polypropylène

**PVD** : Physical Vapor Deposition

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate

**SDS-PAGE** : SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

**TSA** : Tryptocasein Soya Agar

**TSB** : Tryptocasein Soya Broth

**UV** : Ultraviolet

**VUV** : Vacuum Ultraviolet (200 à 100 nm)

**XPS** : X-ray Photoelectron Spectroscopy

# Introduction

Depuis la nuit des temps, l'homme a fabriqué et utilisé des produits cosmétiques. De la Gaule à l'Égypte, en passant par l'Empire Romain et la Grèce antique, les hommes et les femmes s'appliquaient sur le visage et le corps des produits naturels ou transformés (huiles, poudres, mixtures, laits, etc.) afin de s'embellir, de se soigner ou de se laver [1]. Ce rituel, aujourd'hui quotidien, représente un marché de 425 milliards d'euros, où la France se positionne en leader, en détenant environ 25% de parts de marché [2]. Si le geste existe toujours, les produits ont beaucoup changé, leurs formulations et leurs actions ont su s'adapter à la demande des consommateurs. Cette demande s'oriente actuellement vers une diminution de l'utilisation des additifs, notamment lorsque leur innocuité est remise en cause. La loi Lachaud, adoptée en 2011 à l'Assemblée Nationale, en est le parfait exemple, en proposant l'interdiction d'utiliser les phtalates, parabènes et alkyphénols dans les produits cosmétiques, généralement utilisés comme conservateurs dans les formulations, pour limiter la prolifération microbienne (bactéries, champignons, etc.) [3]. Dans ce contexte, et en dépit de la liste de conservateurs autorisés dans les produits cosmétiques établie par la Commission Européenne, où l'on retrouve par exemple le Triclosan ou le Zinc Pyrithione [4], la fabrication de produits sans conservateurs est actuellement une tendance forte dans l'industrie cosmétique, en réponse à une demande forte du marché.

Dans ce cadre, la protection du produit n'étant plus assurée par la formule elle-même, c'est au contenant de jouer ce rôle. Il existe aujourd'hui plusieurs solutions pour réduire le risque de contamination, comme la stérilisation des produits avant ou après remplissage du pack, ou la fabrication d'emballages hermétiques tels que Irresistible, produit par Aptar, pour la protection de la formule à l'intérieur du flacon. Toutefois, ces solutions, bien qu'efficaces dans leur rôle, n'offrent pas une réponse suffisante à la contamination de la formule lors de l'utilisation. En effet, des tests internes ont mis en évidence le fait que, lors de la distribution d'une dose, une quantité de produit était étalée sur la surface extérieure du flacon. Celle-ci est alors contaminée par l'environnement extérieur ou même la flore cutanée, et contamine la dose suivante. Il est alors primordial de réussir à limiter voir annihiler totalement la prolifération de microorganismes à la surface du flacon.

Il existe de nombreuses solutions pour attribuer des propriétés antibactériennes à des surfaces[5]–[8], mais celles-ci ne sont pas compatibles avec les contraintes commerciales et industrielles auxquelles ce projet est soumis :

- Utilisation du Polypropylène comme matériau de base
- Pas d'altération des propriétés mécaniques et esthétiques du matériau
- Procédé rapide
- Peu d'étapes
- Conditions opératoires douces

De plus, les solutions à base d'ions argent (zéolites, nanoparticules) ou d'oxydes minéraux n'ont pas fait leurs preuves lors de tests réalisés en interne au sein de la société Aptar.

Dans ce contexte, les travaux présentés ici se sont orientés vers un traitement de surface par la technologie des plasmas hors équilibre à pression atmosphérique, suivi d'une immobilisation de biomolécules à propriété antibactérienne, afin de conférer au polypropylène l'activité biologique des biomolécules ciblées au cours d'un procédé rapide et peu contraignant.

Les plasmas à pression atmosphériques sont des procédés physico-chimiques, secs et rapides, largement utilisés pour l'activation et le traitement de surface des polymères ou matériaux inorganiques. La composition chimique des plasmas (électrons, ions, atomes excités, UV) permet de faire réagir la surface à traiter avec des espèces hautement énergétiques et réactives. Dans le cadre de cette thèse, une torche plasma à arc soufflé est utilisée, ce qui permet de coupler la chimie des espèces réactives avec l'effet thermique de ce plasma à la pression atmosphérique. Le procédé peut être paramétré pour optimiser le rapport activation-dégradation, ce qui permet de l'utiliser également sur des matériaux thermosensibles. Ce type de technologie permet de réduire considérablement le nombre d'étapes pour la fonctionnalisation de surface, et permet également d'envisager un procédé dont la mise en œuvre ne nécessite pas de système sous vide ou de bains chimiques pour la préparation de la surface. L'intégration d'une étape de traitement par torche plasma à la pression atmosphérique sur une ligne de production est possible. L'industrie automobile, entre autres, utilise déjà cette technologie pour renforcer l'adhésion des peintures sur la carrosserie par exemple.

Dans un premier temps, un état de l'art a été réalisé sur les agents antibactériens et leurs propriétés, ainsi que sur les méthodes d'immobilisation de ces produits sur des matériaux

polymères. Ainsi, il a été possible d'établir une stratégie de recherche en cohésion avec les contraintes liées à ce projet. Les peptides antibactériens ont été sélectionnés pour conférer au polypropylène les propriétés biologiques recherchées. Les procédés plasma à la pression atmosphérique, en particulier les torches à plasma, apparaissent comme un bon moyen d'introduire des groupements chimiques en surface du matériau dans le but d'immobiliser de façon covalente les biomolécules sélectionnées.

Le chapitre II aborde en détail l'introduction de fonctions chimiques en surface du polypropylène à l'aide d'un traitement par torche à plasma à la pression atmosphérique. Les techniques de caractérisation de surface telles que la spectroscopie infrarouge (FTIR-ATR) et la spectroscopie photoélectronique à rayons X, ainsi que le calcul de l'énergie de surface, ont permis d'analyser le traitement et identifier les fonctions chimiques introduites lors de l'activation, et déterminer les conditions optimales d'activation en vue de l'immobilisation de peptides. L'introduction de fonctions chimiques réactives par dépôt de polymères par plasma a également été étudiée.

L'immobilisation des biomolécules sur le polypropylène activé par plasma est traitée dans le chapitre III. Les conditions d'immobilisation ont été optimisées grâce à la caractérisation de la surface par FTIR-ATR et XPS. Le vieillissement de la fonctionnalisation a également été étudié, et l'état de surface après immobilisation a été observé par microscopie électronique à balayage (MEB). Cette fonctionnalisation a été comparée à l'immobilisation des biomolécules sur un dépôt de polymère par plasma.

Enfin, l'évaluation de l'activité antibactérienne des échantillons fonctionnalisés est réalisée dans le chapitre IV, permettant ainsi de valider le procédé d'attribution de propriétés antibactériennes à du polypropylène. La stabilité de l'activité a été étudiée selon le vieillissement des échantillons, mais également après une première utilisation des échantillons.

## Références

- [1] Y. de Roeck-Holtzhauer, “La cosmétologie à travers les âges,” *Rev. Hist. Pharm.*, vol. 76, no. 279, pp. 397–399, 1988.
- [2] “Chiffres clés de la Cosmetic Valley,” *Cosmetic Valley*, 31-Sep-2013. [Online]. Available: <http://www.cosmetic-valley.com/page/presentation/chiffres-cles/>.
- [3] Y. Lachaud, *PROPOSITION DE LOI visant à interdire l’utilisation des phtalates, des parabènes et des alkylphénols*. 2011.
- [4] “Cosmetic Directive,” *Journal Officiel de l’Union Européenne*, Dec. 2009.
- [5] E.-R. Kenawy, S. D. Worley, and R. Broughton, “The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review,” *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 5, pp. 1359–1384, May 2007.
- [6] D. R. Monteiro, L. F. Gorup, A. S. Takamiya, A. C. Ruvollo-Filho, E. R. de Camargo, and D. B. Barbosa, “The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 34, no. 2, pp. 103–110, Aug. 2009.
- [7] T. V. Duncan, “Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 363, no. 1, pp. 1–24, Nov. 2011.
- [8] A. Munoz-Bonilla and M. Fernandez-Garcia, “Polymeric materials with antimicrobial activity,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 281–339, 2012.

**CHAPITRE I : ÉTAT DE L'ART SUR L'ATTRIBUTION  
DE PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES À UNE  
SURFACE POLYMÈRE**

## **Introduction**

L'objectif de ce chapitre est de donner les informations nécessaires à la bonne compréhension du projet de recherche faisant l'objet de cette thèse de doctorat et dont l'objectif est d'attribuer des propriétés antibactériennes à la surface d'échantillons en polypropylène, à l'aide d'un traitement par plasma hors équilibre à la pression atmosphérique, suivi de l'immobilisation de biomolécules antibactériennes par liaisons covalentes.

Après un retour sur les bactéries, leur structure et les différents types de souches que l'on peut rencontrer, les produits et molécules aux propriétés antibactériennes seront présentés, ainsi que leurs modes d'action et utilisations connues. La fonctionnalisation de surfaces de matériaux polymères sera ensuite abordée, en deux temps. Une première partie sera consacrée au traitement de surfaces par plasma, l'immobilisation de biomolécules sera étudiée dans un second temps. Ces différents domaines seront analysés au regard des travaux et résultats existants, décrits dans la littérature.

Pour terminer, le choix des technologies et des méthodes sera explicité et justifié, concernant la technologie plasma, les méthodes d'immobilisation, les molécules, ainsi que les souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité des surfaces après traitement.

# 1 Les bactéries

Lorsque l'on cherche à lutter contre un ennemi, la connaissance de ce dernier est un point clé du succès. L'élaboration de matériaux aux propriétés antibactériennes passe par la compréhension de la structure et du mode de fonctionnement des bactéries.

Le monde microbien a été découvert entre 1674 et 1687 par le hollandais Anton Van Leeuwenhoek, grâce à l'utilisation d'instruments optiques dont il était amateur. Il faudra attendre le 19<sup>ème</sup> siècle et les travaux de Louis Pasteur pour que cette catégorie du monde vivant ne soit réellement reconnue. Les « microbes », parmi lesquels on retrouve les bactéries proprement dites, sont quant à eux définis en 1878 par Sédillot.

## 1.1 Composition interne des bactéries

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires procaryotes, c'est-à-dire qu'elles ne possèdent pas de noyau, de taille micrométrique (Figure I.1). Elles possèdent un patrimoine génétique contenu dans leur ADN (acide désoxyribonucléique) regroupé pour former l'unique chromosome de leur structure. On retrouve également dans le cytoplasme des bactéries d'autres types d'ADN, dits « extra-chromosomique », de petite taille, appelés plasmides. Ceux-ci ne sont pas support de l'hérédité mais peuvent apporter à la bactérie de nouvelles propriétés comme la résistance aux antibiotiques par production d'enzymes qui les inactivent. Le cytoplasme est également riche en ribosomes qui peuvent être la cible de nombreux antibiotiques. Les ribosomes participent à la synthèse des protéines, assistés par les ARN messagers et de transfert.

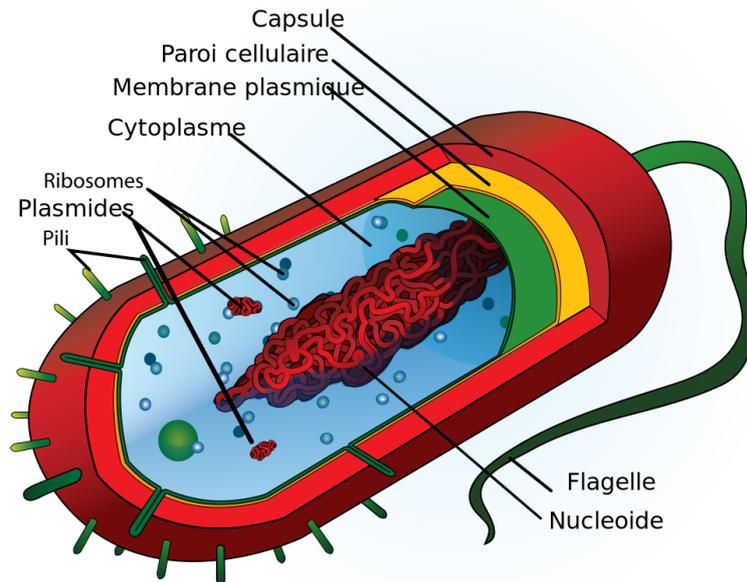


Figure I.1 - Représentation générale d'une bactérie [9]

## 1.2 Structure de la paroi des bactéries

La bactérie est délimitée par une double paroi :

- A l'intérieur : la membrane cytoplasmique, qui délimite le cytoplasme, joue un rôle de filtre dans la respiration bactérienne et de barrière osmotique. Elle est constituée de phospholipides et de protéines, dont certaines sont impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. Elle peut être la cible d'action de certains agents antibactériens.
- A l'extérieur : la paroi bactérienne, à l'extérieur, est principalement composée de peptidoglycane. Celui-ci est un polymère constitué de chaînes composées de N-acétylglucosamide (NAG) et N-acétylmuramique (NAM) liées entre elles par des ponts peptidiques formés entre les chaînes latérales du motif NAM (Figure I.2). La nature de la chaîne latérale varie en fonction de la souche. La rigidité de cette structure permet à la bactérie de maintenir la pression osmotique en son sein, et détermine ainsi sa morphologie.

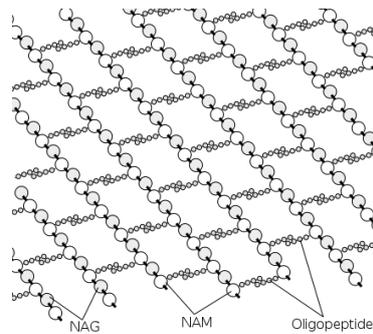


Figure I.2 - Agencement du peptidoglycane dans la paroi bactérienne

On distingue deux grands types de bactéries à partir de la nature de la paroi bactérienne : les Gram positif (Gram +) et les Gram négatif (Gram -), du nom du médecin Danois, Christian GRAM, qui les classa selon leur réponse à une coloration spécifique qui restait violet foncé pour les Gram positives, et qui virait au rose pour les Gram négatives.

Les bactéries à Gram + possèdent une paroi bactérienne très riche en peptidoglycane, et pauvre en protéines. Le peptidoglycane peut représenter jusqu'à 90% des constituants de la paroi. Des acides téichoïques (polymères du glycerol ou ribitol phosphate), appelés lipotéichoïques lorsqu'ils sont liés aux lipides de la membrane cytoplasmique, permettent l'association du peptidoglycane avec la membrane cytoplasmique. Une coupe schématique de la membrane d'une bactérie Gram + est représentée dans la Figure I.3.

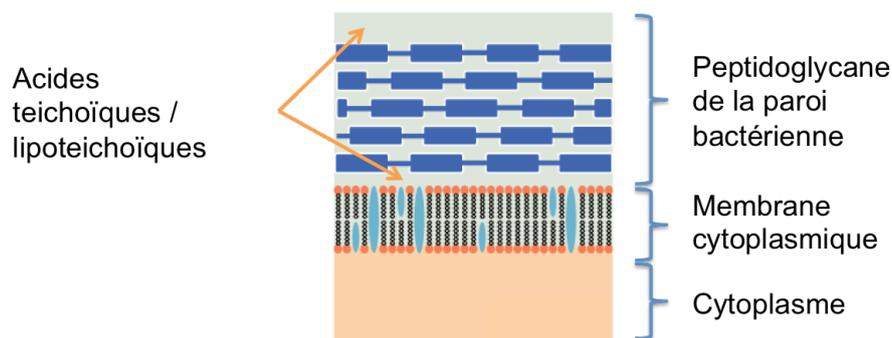


Figure I.3 - Coupe de la membrane d'une bactérie Gram +

La forte teneur en peptidoglycane est responsable du maintien de la coloration lors du test de GRAM. De plus, les acides téichoïques et lipotéichoïques sont responsables de la charge électrostatique négative de la paroi bactérienne [10]. On retrouve dans cette catégorie *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*.

Chez les bactéries à Gram -, la paroi ne possède qu'une seule couche de peptidoglycane, 2 tout au plus. La membrane est alors complétée par des lipoprotéines et une membrane externe constituée de phospholipides, et de lipopolysaccharides (LPS) pour la partie la plus externe. Les lipoprotéines font le lien entre le peptidoglycane et la membrane externe (Figure I.4).

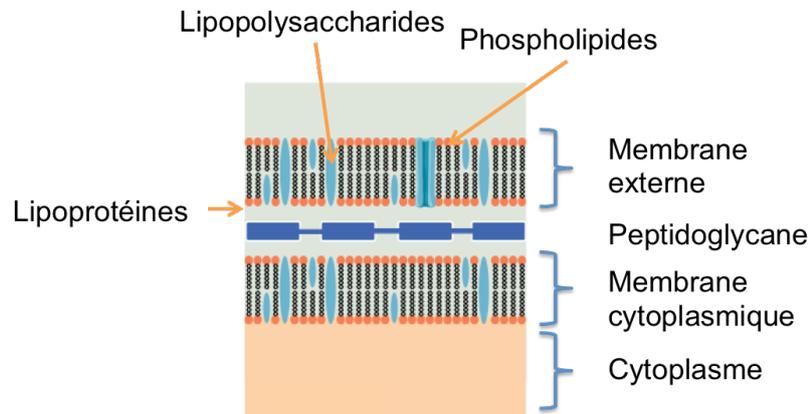


Figure I.4 - Coupe de la membrane d'une bactérie Gram -

De même que les bactéries Gram +, les Gram - possèdent une charge électrostatique négative sur leur paroi, conférée cette fois par les LPS [10]. Parmi les bactéries à Gram - se trouvent les entérobactéries (*Salmonella*, *Escherichia coli*), *Pseudomonas*, *Acinetobacter*.

## **2 Les agents antibactériens**

Conférer des propriétés antibactériennes à un matériau, et plus particulièrement une surface, passe nécessairement par l'utilisation de substances possédant les propriétés escomptées si le matériau ne les possède pas intrinsèquement. Ces substances peuvent être de nature très variée (organique, inorganique, métallique, etc.), et leur mode d'action diffère selon les propriétés physico-chimiques de l'agent. Le grand nombre de composés connus à ce jour possédant la capacité de réduire les contaminations par des bactéries offre à l'utilisateur un large choix au moment de sélectionner un agent, en fonction de la cible microbiologique. Dans cette partie, nous allons présenter une liste non exhaustive des agents antimicrobiens les plus couramment utilisés ainsi que leur mode d'action et leurs mises en œuvre.

### **2.1 Bactériostatique ou bactéricide ?**

À l'heure de choisir un agent antibactérien, on se retrouve souvent confronté à cette question : souhaite-t-on un effet bactériostatique ou un effet bactéricide ? Il convient donc, avant de faire un choix, de rappeler le sens de ces deux termes généralement utilisés pour qualifier les antibiotiques.

Un agent bactériostatique possède la propriété d'inhiber la multiplication des bactéries sans les tuer. Il agit généralement sur la synthèse des protéines, la réplication de l'ADN bactérien ou encore sur le métabolisme du microorganisme.

Un agent bactéricide est capable de détruire les bactéries, les propriétés varient d'un produit à l'autre en terme de mécanisme, durée et spectre d'action.

Sur une durée suffisante, ou à concentration suffisante, un agent qualifié de bactériostatique peut présenter des propriétés bactéricides, avec une réduction du nombre de bactéries. L'objectif est donc d'obtenir, en surface des matériaux à fonctionnaliser, une diminution du nombre de bactéries, donc des propriétés bactéricides.

## 2.2 Les agents antibactériens inorganiques

### 2.2.1 Les ions métalliques, l'exemple de l'argent

L'action antibactérienne des ions métalliques tels que l'argent, le cuivre ou même le zinc est reconnue depuis plusieurs siècles pour ses utilisations en médecine [11]–[13]. Aujourd'hui, les ions métalliques, notamment l'argent, sont des substances antibactériennes très répandues et leur forme d'utilisation est très variée. On les retrouve dans des produits de grande consommation les utilisant même comme argument commercial (chaussettes, pansements, carrelages, équipements publics urbains, etc.). Pourtant, les mécanismes responsables de leur activité sur les bactéries sont encore très discutés par la communauté scientifique. L'argent, très étudié dans la littérature, est choisi comme exemple pour l'étude des interactions entre les ions et les bactéries.

#### 2.2.1.1 Mode d'action

La libération d'ions  $\text{Ag}^+$  est nécessaire au bon fonctionnement du processus antibactérien de l'argent. Son action sur les bactéries pourrait avoir plusieurs mécanismes, sur plusieurs cibles au sein d'une cellule. Les observations par microscopie électronique à transmission réalisées par Feng *et al.* (2000) [14] ou encore Jung *et al.* (2008) [15] ont montré qu'en présence d'argent sous forme ionique ( $\text{Ag}^+$ ), la structure des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) présentait des anomalies. On remarque, sur la Figure I.5, qu'après traitement une large zone de faible densité électronique s'est formée. La présence d'argent autour et à l'intérieur de la bactérie représente une agression extérieure pour le microorganisme, provoquant la production de protéines qui ont pour effet de faire passer l'ADN de la bactérie dans une forme condensée, créant ainsi la zone de faible densité électronique observée. Dans cet état, la réplication de l'ADN est bloquée, ce qui empêche la reproduction des cellules. Cela a également été reporté par Pal *et al.* en 2007 [16].

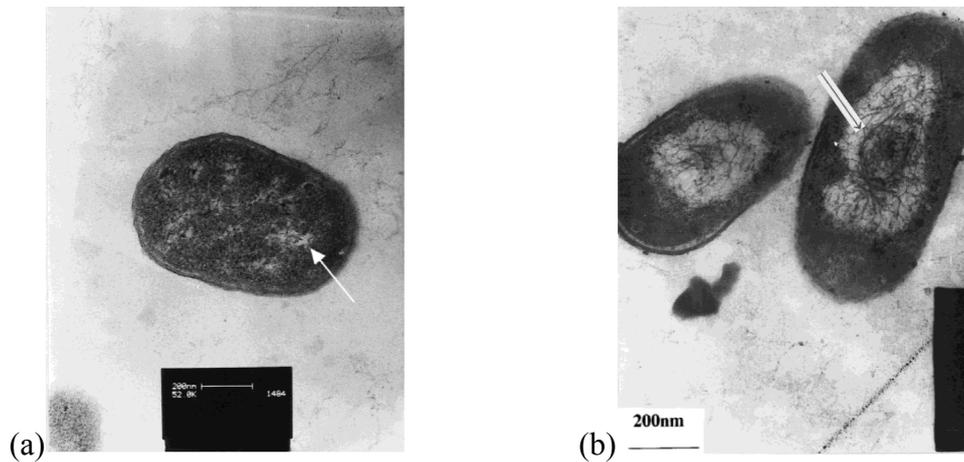


Figure I.5 - (a) Structure d'une cellule de *Escherichia coli* non traitée. On remarque une petite zone de faible densité électronique (flèche blanche). (b) Structure de cellules de *Escherichia coli* traitées par des ions argent. Ici, une zone de forte densité électronique au centre est entourée d'une large zone de faible densité électronique (flèche noire) [14].

D'un point de vue structural, il a également été observé que la paroi bactérienne de *E. coli* subissait des dommages en présence d'argent [17]. Ces creux dans la membrane sont les conséquences de l'interaction entre les ions argent et les lipopolysaccharides (LPS) qui constituent la paroi cellulaire, provoquant ainsi une modification de la perméabilité aboutissant sur la mort de la bactérie.

Les interactions  $\text{Ag}^+$ -LPS auraient pour origine l'affinité des ions argent pour les thiols [18]. Alors que certaines protéines permettent d'annihiler l'activité antibactérienne de l'argent via cette interaction, de nombreuses enzymes se retrouvent dénaturées [17] et perdent leur activité biologique. Le processus de respiration des bactéries serait alors bloqué après interaction avec les protéines de la paroi [16], [19]–[21].

Lorsque l'argent est sous forme de nanoparticules, la surface de celles-ci, en plus de libérer des ions argent qui agiront comme décrit plus haut, génère des espèces oxygénées réactives (ROS :  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$ , et  $\text{O}$ ) en surface qui peuvent également être responsables des dégénérescences observées dans les bactéries soumises à un traitement à l'argent [22], [23]. On retrouve également l'argent sous forme de sel ou de complexes, ou bien sous forme ionique insérée dans des zéolites [24]. La Figure I.6 représente les différentes voies par lesquelles les ions argent agissent sur une bactérie. Ce métal possède l'avantage d'avoir un spectre d'activité très large puisque les bactéries Gram + (*S. aureus*) ou Gram – (*E. coli*) en sont la cible de façon non spécifique [7].

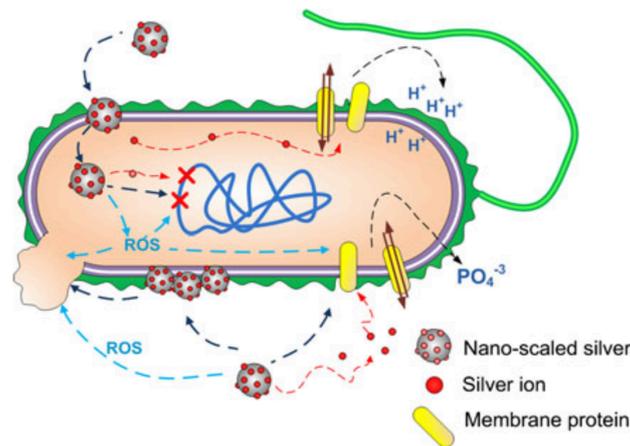


Figure I.6 - Représentation résumant l'action des nanoparticules d'argent sur une bactérie [24]

### 2.2.1.2 Les matériaux antibactériens à base d'argent

Afin d'attribuer des propriétés antibactériennes à la surface d'un matériau polymère en utilisant de l'argent, il est nécessaire de l'inclure dans la structure même du polymère. De nombreuses méthodes existent et ont montré de bonnes activités contre la prolifération de bactéries telles que *S. aureus* et *E. coli* grâce à la libération d'ions  $Ag^+$ . Les technologies les plus communes sont présentées ci-dessous.

#### 1.1.1.1.1 Insertion d'argent directement dans une matrice

De nombreuses solutions commerciales actuellement disponibles reposent sur cette méthode qui présente l'avantage d'une grande simplicité de mise en œuvre lors de la production de pièces en polymère chargées à l'argent puisqu'il suffit d'ajouter l'additif antibactérien (sous forme de granulés ou de poudre) au matériau de base (également en granulés) avant moulage. BASF avec Irguard®, ou encore Sanitized AG avec Sanitized®, proposent des additifs plastiques sous forme de granulés dont la matrice de base est adaptée au polymère cible. C'est également le cas d'AgION Technologies avec AgION® [25]. Au sein de ces granulés, on retrouve généralement l'argent sous forme ionique inséré dans des zéolites ou sous forme de sels.

#### 1.1.1.1.2 Dépôt d'argent sur une surface

Sachant que l'activité biologique recherchée doit être effective en surface, ne traiter que la surface peut s'avérer être un moyen économique d'attribuer les propriétés recherchées à un matériau sans risquer de modifier son comportement général, et également travailler sur des

produits finis. Dans cette optique, on peut réaliser des dépôts d'argent par divers procédés de métallisation tels que le dépôt physique en phase gazeuse par faisceau d'électron (Electron Beem Physical Vapor Deposition – EBPVD) illustré sur la Figure I.7 [26]. D'autres méthodes de PVD telles que le sputtering magnétron permettent de déposer des films d'argent sur des surfaces [27].

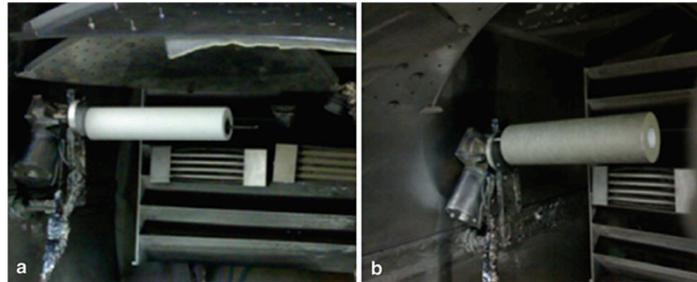


Figure I.7 - (a) Filtre de PP non traité. (b) Filtre de PP après dépôt d'argent par EBPVD [26]

L'argent peut également être immobilisé directement à la surface d'un matériau polymère par chimisorption des ions argent, issus d'une solution de  $\text{AgNO}_3$ , avec un Polypropylène (PP) préalablement traité par un plasma à décharge à barrière diélectrique dans l'air et à la pression atmosphérique, aboutissant à une activité antibactérienne non nulle, observée par mesure du diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne observée sur boîte de Petri [28].

### 1.1.1.1.3 Inclusion d'argent dans des traitements de surface

Afin d'insérer de l'argent sur une surface d'un matériau, on peut réaliser un dépôt sur la surface, l'argent sous forme métallique ou ionique est alors encapsulé dans ce dépôt.

Cette méthode a été appliquée par Kumar et al (2013), avec un dépôt d'acide acrylique par plasma basse pression, suivi par une réduction des ions  $\text{Ag}^+$  en Ag métallique par  $\text{NaBH}_4$  et son encapsulation dans la couche mince de polymère plasma via les fonctions acide carboxylique [29]. Ce procédé a également été utilisé pour doper à l'argent un dépôt d'acide acrylique et de chitosan [30].

On peut également inclure de l'argent dans des revêtements de type peinture ou dépôt organique par dispersion de particules ou de zéolites lors de la préparation de la matrice, pour des résultats qui varient en fonction de la technologie utilisée [31], [32].

## 2.2.2 Le dioxyde de titane

Le dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) est un oxyde métallique aux propriétés photocatalytiques. Sous l'effet d'un rayonnement lumineux dans l'UV ( $\lambda < 387 \text{ nm}$ ), un électron de la bande de

valence est excité et est promu sur la bande de conduction. Le « trou » laissé dans la bande de valence est à l'origine de la formation de radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\bullet$ ) qui pourront ensuite avoir différents effets selon leur environnement, et notamment un effet destructeur sur la paroi des bactéries et la membrane cytoplasmique [33]–[35].

### 2.3 Les ammoniums quaternaires

Les ammoniums quaternaires sont des molécules organiques de formule  $\text{NR}_4^+$ , avec R une chaîne carbonée de type alkyle (ou aryle). Ils ont la particularité d'être chargés positivement quelque soit le pH (Figure I.8). Ces composés sont depuis longtemps reconnus comme désinfectants et antimicrobiens, et largement utilisés à cet effet [5], [20].

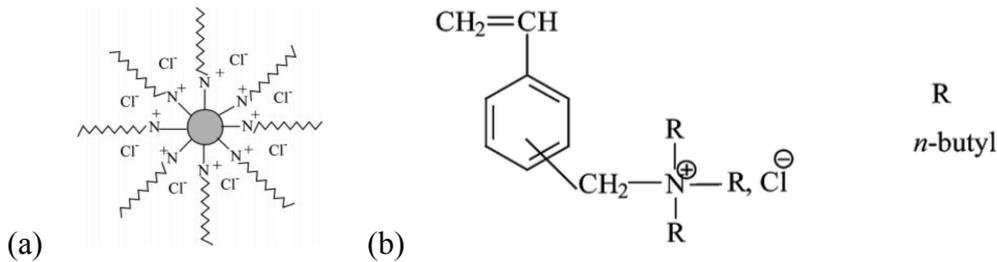


Figure I.8 - Exemples d'ammoniums quaternaires. (a) un dendrimère de poly(propylèneimine). (b) un composé contenant un cycle aromatique [5]

Les ammoniums quaternaires sont une large famille, et peuvent se retrouver sous de nombreuses formes très variées, et notamment sous forme de polymères (Figure I.9). Parmi ceux-là, on retrouve souvent les dérivés de méthacrylates par exemple. Le nombre de polymères pouvant contenir des ammoniums quaternaires est très important, ce qui fait de cette famille une source inépuisable de polymères antibactériens potentiels [8].

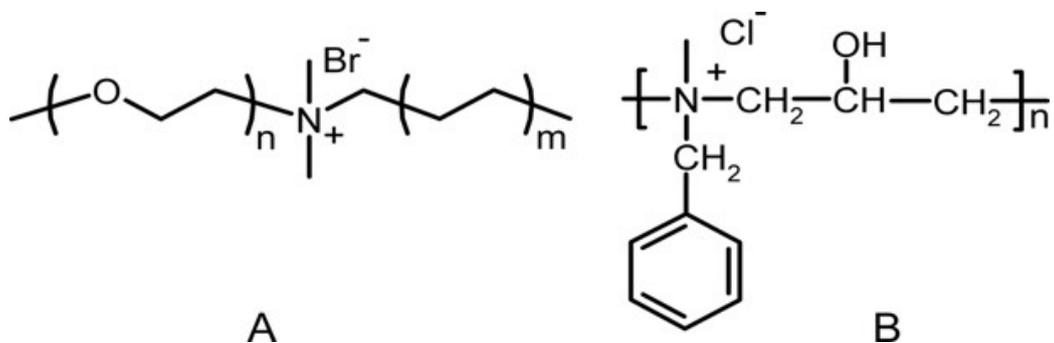


Figure I.9 - Exemple de polymères possédant un ammonium quaternaire. (A) Polymère synthétique amphiphile (B) Polymère issu de la polycondensation d'épichlorohydrine et d'une amine benzoïque [8]

Des ammoniums quaternaires peuvent être immobilisés sur des surfaces par voie chimique, sur de la cellulose par exemple [36], ou sur des matériaux polymères [37].

### **2.3.1 Mode d'action**

La paroi des bactéries possède le plus souvent une charge électrostatique négative. Les ammoniums quaternaires ont donc tendance à interagir avec la paroi bactérienne, ce qui constitue la première étape de leur action. Les molécules pénètrent ensuite la paroi bactérienne et viennent se fixer à la membrane cytoplasmique. Cette interaction désorganise la membrane qui, ne jouant plus son rôle barrière, va laisser s'échapper les composés intracellulaires de faible poids moléculaire, avant la dégradation des protéines et de l'ADN. Le processus se termine par l'action des enzymes protéolytiques qui provoquent la mort du microorganisme [8], [20]. Contrairement à l'argent, l'action des ammoniums quaternaires ne nécessite pas obligatoirement un relargage des substances.

## **2.4 Les biopolymères antibactériens**

Certains biopolymères possèdent intrinsèquement des propriétés bactéricides. C'est le cas, par exemple, du chitosan ou de la poly-L-lysine, dont la charge électrostatique positive leur permet d'interagir avec la paroi bactérienne [25].

Le mode d'action de ces polymères dépend majoritairement du principe actif inclus au sein de leurs chaînes. Ces derniers, peuvent représenter d'excellents candidats pour la préparation de matériaux et surfaces aux propriétés antibactériennes.

## **2.5 Les peptides antibactériens**

Les peptides sont des molécules d'origine naturelle ou synthétique, composés d'acides aminés, reliés entre eux par des liaisons peptidiques (amide secondaire). La gamme des peptides s'étend jusqu'aux assemblages de 100 acides aminés, on parle ensuite de protéines.

Les peptides antibactériens (AMPs pour AntiMicrobial Peptides) sont produits par des organismes vivants, y compris les Hommes, et font partie intégrante de leur système de défense [38], [39]. Il est toutefois possible de les synthétiser [40].

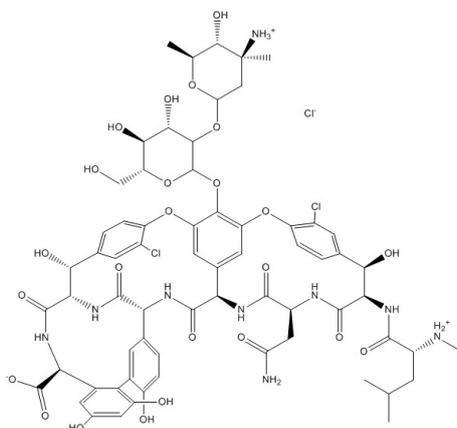


Figure I.10 - Exemple de peptide antibactérien : la Vancomycine

Plus de 5000 AMPs ont été recensés à ce jour, qui présentent des activités biologiques variées : antiparasitaires, antivirales, antifongiques, anticancéreuses, antibactériennes [40], [41]. Cette dernière catégorie est développée plus particulièrement dans la suite de cette thèse.

Les AMPs produits par les bactéries sont appelés bactériocines. Environ cinquante peptides sont produits par des bactéries Gram +, plus particulièrement par les organismes producteurs d'acide lactique.

Synthétisés par les insectes, environ 150 cécropines ont été recensés, et démontrent une activité antiparasitaire et antifongique en plus de leur activité antibactérienne. Les amphibiens produisent également des AMPs qui sont généralement localisés sur la peau, comme la magainine.

Plus de 500 peptides issus de la peau d'amphibiens sont actuellement recensés. Enfin, les mammifères produisent également des AMPs, principalement les défensines et cathélicidines, synthétisés notamment par les phagocytes afin de jouer un rôle dans le système immunitaire [40], [42], [43].

Ces biomolécules font l'objet d'un intérêt grandissant dans la communauté scientifique, comme le montre la Figure I.11.

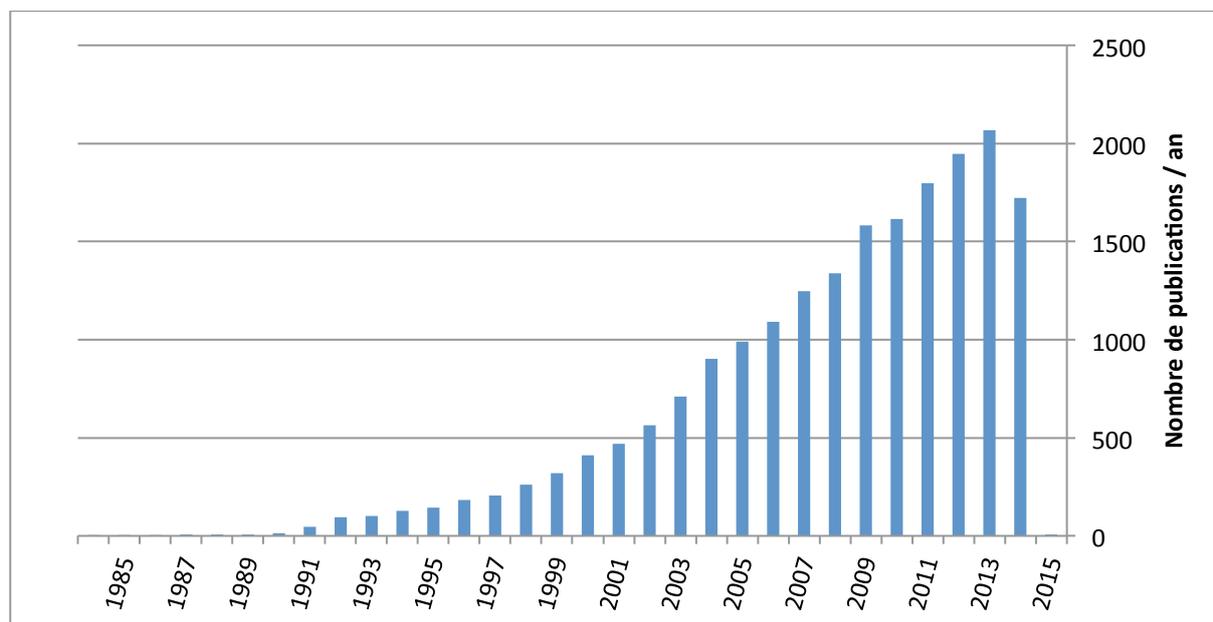


Figure I.11 - Nombre de publications scientifiques parues chaque année en réalisant une recherche avec les mots clés « Antimicrobial peptide ». Données obtenues depuis [www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com), Décembre 2014.

## 2.5.1 Structure des AMPs

### 2.5.1.1 Peptides anioniques ou cationiques

Les AMPs sont généralement cationiques, dû à un excès des acides aminés basiques (lysine, arginine, et histidine) par rapport aux résidus acides. Cette charge nette favorise l'interaction avec les membranes des bactéries, chargées négativement. Les peptides présentent également un caractère amphipathique, c'est-à-dire qu'ils possèdent une région hydrophobe, en plus de la charge positive, ce qui leur permet d'interagir avec les lipides de la membrane bactérienne [40], [42]–[44]. Leurs mécanismes d'action seront détaillés par la suite.

Il existe également des peptides anioniques qui présentent la particularité d'avoir une taille plus réduite que les peptides cationiques (< 1kDa). Ces peptides ont besoin de zinc comme co-facteur pour présenter une activité antibactérienne, et leur mécanisme d'action est pour le moment méconnu [40], [43].

### 2.5.1.2 Conformation

La structure secondaire des peptides répond principalement à quatre conformation particulières : les hélices  $\alpha$ , les feuilletts  $\beta$ , les boucles et les formes étendues (Figure I.12). Les structure en hélices sont les plus répandues et les plus étudiées [40], [42]–[45].

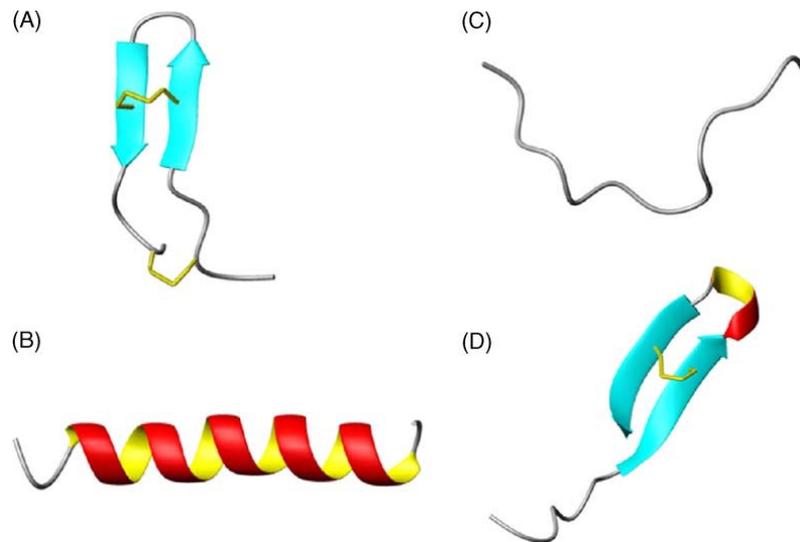


Figure I.12 - Exemples de peptides présentant des conformations différentes. (A) Structure en feuillets  $\beta$  de la tachyplésine 1, (B) Structure en hélice  $\alpha$  de la magainine-2, (C) Structure étendue de l'indolicidine, (D) Structure en boucle de la thanatine. Les ponts disulfures sont représentés en jaune [46].

Il a été prouvé que l'activité biologique des peptides est liée à leur conformation, notamment en montrant que des analogues d'AMPs non structurés ne présentaient pas d'activité antibactérienne [46]. De plus, certains peptides peuvent présenter des structures mixtes comme la  $\beta$ -défensine-2 humaine qui possède une région en feuillets  $\beta$  et une autre en hélice  $\alpha$  avec de nombreux ponts disulfures.

## 2.5.2 Mode d'action des peptides antibactériens

L'action des peptides sur les bactéries peut se dérouler selon deux modes d'actions différents : la perméabilisation de la membrane, et une action intracellulaire.

### 2.5.2.1 Perméabilisation de la membrane

Ce mode d'action a longtemps été considéré comme le seul possible pour les AMPs. Il repose principalement sur les propriétés physico-chimiques des peptides, à savoir la charge électrostatique et le caractère amphipathique de certaines de leurs régions. Dans un premier temps, les interactions électrostatiques permettent aux peptides cationiques de se lier à la paroi bactérienne chargée négativement, puis les forces hydrophobes leur permettent, par le biais de leur conformation, de déstabiliser la couche lipidique selon différents modèles présentés ci-dessous [40], [43]–[45], [47]–[49] :

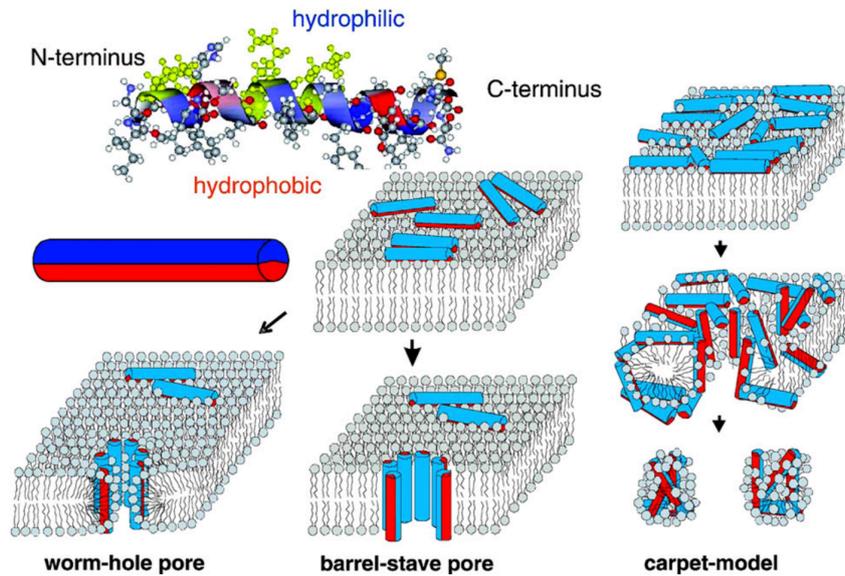


Figure I.13 - Description des modèles d'interaction peptide-membrane bactérienne [49].

- a) Le modèle « barrel-stave » : les peptides s'insèrent perpendiculairement à la membrane, la région hydrophobe se plaçant en contact des phospholipides de la membrane. Le pore, hydrophile, ainsi créé provoque la fuite des constituants internes de la bactérie, conduisant ainsi à sa mort. Ce modèle est suivi principalement par les peptides présentant une conformation de type hélice  $\alpha$  et feuillets  $\beta$ .
- b) Le modèle « worm-hole » ou « toroidal pore » : ce modèle ressemble au barrel-stave, sauf que l'insertion des peptides dans la membrane est accompagné d'une distorsion de la membrane de façon à ce que les parois du pore créé soient constitués des régions hydrophiles des peptides, mais également des groupements lipidiques des phospholipides de la membrane. Ce modèle concerne principalement les peptides ayant une conformation de type hélice  $\alpha$ .
- c) Le « carpet-model » : ce modèle d'interaction non spécifique peut être suivi par n'importe quel type de peptide. Ici, c'est une accumulation de peptides sur la surface de la bactérie qui aboutit à une dénaturation de la membrane et la formation de trous qui provoquent la mort de la bactérie.
- d) Le modèle de formation de canaux ioniques (« ion channel formation ») : ce modèle est moins référencé que les autres et ne concerne que les peptides cationiques linéaires en hélice. Il s'agit de la création de canaux ioniques qui modifie la conductance de la membrane.

### 2.5.2.2 Action intracellulaire

Certains peptides peuvent également avoir une action à l'intérieur de la bactérie lorsqu'ils parviennent à s'y introduire. Leurs actions sont variées, du blocage de la réplication de l'ADN, au blocage de la synthèse de la paroi. Les différentes actions possibles d'AMPs sur les constituants internes de la souche *Escherichia coli* sont présentées dans la Figure I.14.

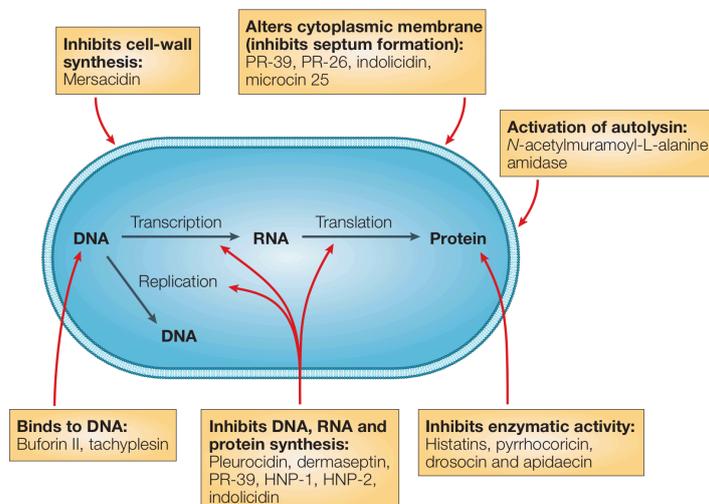


Figure I.14 – Action intracellulaire d'AMPs sur une cellule de *Escherichia coli* [48].

### 2.5.3 Efficacité des AMPs

Les AMPs possèdent des propriétés antibactériennes intéressantes, même comparés aux « antibiotiques », ces molécules organiques possédant une activité antibactérienne commercialisées à but thérapeutique, comme le montre le Tableau I.1.

Tableau I.1 - Comparaison des MIC (Minimum Inhibitory Concentration) d'antibiotiques communs et de peptides antibactériens sur *Staphylococcus Aureus*.

Molécule	Type	MIC (mg/L)	Source
Vancomycine	Antibiotique	2	[50]
Erythromycine	Antibiotique	2	
Gentamicine	Antibiotique	2,5	
Pénicilline	Antibiotique	8	[51]
Magainine 2	AMP	111	[52]
Indolicidine	AMP	17	
Cecropine P1	AMP	29	

De plus, les peptides antibactériens expriment leur activité de façon rapide, parfois en quelques secondes seulement après le premier contact avec la bactérie. Les AMPs qui ciblent

la membrane sont également de bons candidats pour lutter contre les biofilms puisque leur action est possible sur les organismes végétatifs comme peuvent l'être les bactéries au sein de biofilms [40].

### **2.5.4 Modifications chimiques des AMPs**

Au cours des processus dans lesquels sont impliqués les peptides, des modifications chimiques peuvent intervenir, volontairement ou non, et modifier leur composition chimique ou leur structure secondaire par la formation de nouvelles liaisons chimiques, de ponts disulfures ou la modification de certaines fonctions chimiques comme les acides carboxyliques.

Alors que la formation de nouvelles liaisons disulfures peut aboutir à la disparition de l'activité antibactérienne d'un peptide, les autres modifications risquent tout au plus de réduire l'activité. Il arrive que ces modifications réduisent la toxicité, augmentent la stabilité du peptide ou introduisent une nouvelle activité biologique, par exemple antifongique [40].

### **2.5.5 Phénomènes de résistance**

Les microorganismes sont capables de s'adapter à leur environnement et, comme c'est le cas pour de nombreux antibiotiques, développer des résistances contre les modes d'action des agents antibactériens. C'est pourquoi, certaines souches peuvent être résistantes aux peptides antibactériens.

On peut distinguer 2 sortes de résistances : constitutive et induite.

La résistance constitutive est une propriété inhérente à une souche, sa composition lui permet de résister aux agressions. On parle également de résistance passive. Les origines de ces résistances ne sont pas toujours parfaitement décrites, mais on suppose que la composition de la paroi bactérienne ou qu'une charge électrostatique anormale peut aboutir à une telle résistance. La résistance induite provient d'une adaptation du microorganisme à la présence de peptides dans son environnement. Cela peut intervenir au niveau de la membrane par une modification de sa composition afin de limiter les phénomènes de perméabilisation, mais aussi au niveau du métabolisme avec la production de protéines inhibitrices des peptides [40], [44], [48].

### 2.5.6 Exemple 1 : La nisine

La nisine est un petit peptide de 3,4 kDa composé de 34 acides aminés. Elle fait partie de la famille des bactériocines, c'est-à-dire qu'elle est synthétisée par une bactérie, en l'occurrence *Lactococcus lactis*. Il existe plusieurs types de nisine dépendant un gène responsable de sa synthèse. Il existe différents types de nisine, présentant une activité antibactérienne contre des souches bactériennes Gram +, encodées par différents gènes de *Lactococcus lactis* (Nisine A, F, Q, U, Z). La nisine A, qui possède un résidu histidine en position 27, et la nisine Z qui possède un résidu asparagine (Figure I.15) sont actuellement les seules trouvées naturellement et possèdent une activité antibactérienne identique [53]–[55].

Ces peptides possèdent une très forte activité contre les bactéries Gram-positives, en revanche les bactéries Gram-négatives ne sont sensibles à l'action de la nisine que si elles ont été fragilisées ou perturbées au préalable [55]–[57]. Il est reconnu que la nisine, une fois liée à la membrane d'une bactérie, crée des pores par les mécanismes explicités précédemment, principalement le « barrel-stave model » [43], [53], [55].

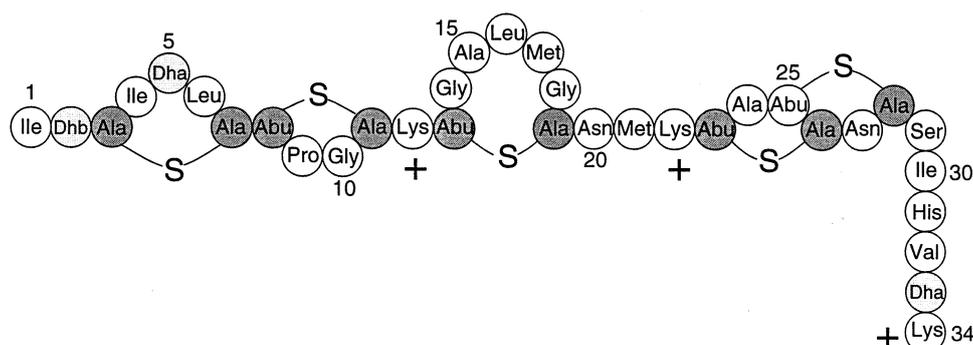


Figure I.15 - Structure primaire de la Nisine Z. Dhb : Déhydrobutyrine, Dha : Déhydroalanine, Ala-S-Ala : Lanthionine, Abu-S-Ala :  $\beta$ -méthyllanthionine.

Largement utilisée dans l'industrie agroalimentaire [25], [55], [57]–[59], elle est disponible commercialement chez Sigma-Aldrich ou Molekula et sous le nom de Nisaplin® auprès de Danisco. Dans tous les cas, il s'agit d'une préparation issue de la fermentation de *L. lactis* contenant des débris de protéines lactiques, des sels minéraux, et de la nisine entre 2,5 et 5% en masse.

La nisine présente l'avantage de bénéficier d'une autorisation d'utilisation dans l'industrie alimentaire. Cela signifie, pour notre projet, que la molécule peut potentiellement être utilisée dans un procédé industriel.

### 2.5.7 Exemple 2 : le lysozyme

Le lysozyme entre dans la catégorie des protéines (ou polypeptides), avec son assemblage de 129 acides aminés, pour une masse de 14,313 kDa. Sa structure tridimensionnelle est ovoïde, et elle est estimée à 45 x 30 x 30 Å [60]. On retrouve ce type de protéine dans de nombreuses sécrétions du corps humain (larmes, salive, etc.), ou encore dans le blanc d'œuf de poule (HEWL : Hen Egg White Lysozyme). Leur structure et composition chimique varient selon leur source.

L'action du lysozyme sur les bactéries diffère nettement du mécanisme employé par les peptides. En effet, celui-ci est connu pour catalyser l'hydrolyse du peptidoglycane [60], [61], entraînant la déstabilisation de la membrane bactérienne, suivi par la lyse du microorganisme. Ce mécanisme présente le désavantage d'être particulièrement sensible à la nature de la paroi, ce qui le rend faiblement efficace voir complètement inefficace contre une partie de la flore bactérienne, principalement les bactéries à gram négatif, mais également la famille des *Staphylococcus*. Néanmoins, HEWL a déjà montré une activité significative sur *Staphylococcus aureus* [61], [62].

L'objectif de ce projet étant de conférer des propriétés antibactériennes à la surface d'échantillons en polypropylène, et après avoir identifié les agents antibactériens candidats, il convient d'étudier les méthodes pour fonctionnaliser du polypropylène avec ces molécules. Les paragraphes suivants ont pour but de présenter l'état des recherches concernant l'immobilisation de peptides et protéines sur ce type de matériau.

### 3 Immobilisation de biomolécules à la surface d'échantillons en polypropylène

#### 3.1 Quelle méthode d'immobilisation pour les peptides ?

L'interaction peptide-surface est un phénomène complexe qui implique différents types de liaisons (électrostatiques, hydrophobe, etc.). Il s'agit alors de comprendre la nature des liaisons mises en jeu afin de choisir la méthode permettant d'obtenir l'immobilisation la plus stable sur la surface [63].

##### 3.1.1 L'adsorption

Le phénomène d'adsorption de protéines sur une surface de polymère est très courant et c'est sur cette interaction que reposent, entre autres, les mécanismes d'adhésion cellulaire [64]. Les forces impliquées dans l'adsorption sont les interactions de Van der Waals, électrostatiques, ioniques et hydrophobes principalement.

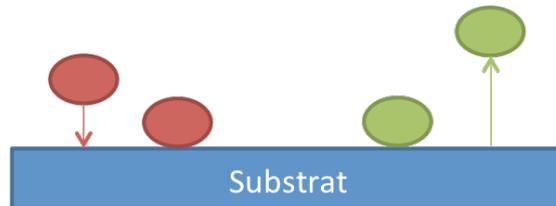


Figure I.16 - Processus d'adsorption (rouge) et de désorption (vert)

L'avantage de cette méthode est sa simplicité puisqu'en contrôlant les paramètres tels que le pH et la force ionique de la solution, l'adsorption a lieu. Les forces électrostatiques entre des protéines chargées positivement et une surface plutôt chargée négativement permet aux molécules d'interagir avec la surface. Toutefois, le phénomène est réversible, la désorption des protéines peut intervenir aussi facilement en modifiant les paramètres mentionnés précédemment, ce qui remet en cause la stabilité d'une telle liaison. En effet, si le pH est de l'ordre du point isoionique de la molécule, cette interaction électrostatique sera fortement défavorisée. De même, une force ionique importante dans la solution aura tendance à limiter les interactions à cause d'un phénomène d'écrantage, les cations de la solution entrant en compétition avec les molécules pour se lier avec les charges de la surface [65].

### 3.1.2 La formation de liaisons covalentes

Cette méthode consiste en la création de liaisons fortes entre le substrat et le peptide, issues d'une réaction chimique entre les deux. La réaction se fait entre des groupements fonctionnels présents sur la molécule et sur le substrat. Dans le cas des peptides, sur les chaînes latérales des acides aminés, on retrouve généralement des amines primaires (-NH<sub>2</sub>), des acides carboxyliques (-COOH), des thiols (-SH), des alcools et des groupements alkyls principalement [55], [66]–[68]. La réactivité de ces groupements envers ceux présents sur le substrat conditionne l'efficacité du couplage covalent permettant d'immobiliser l'agent antibactérien.

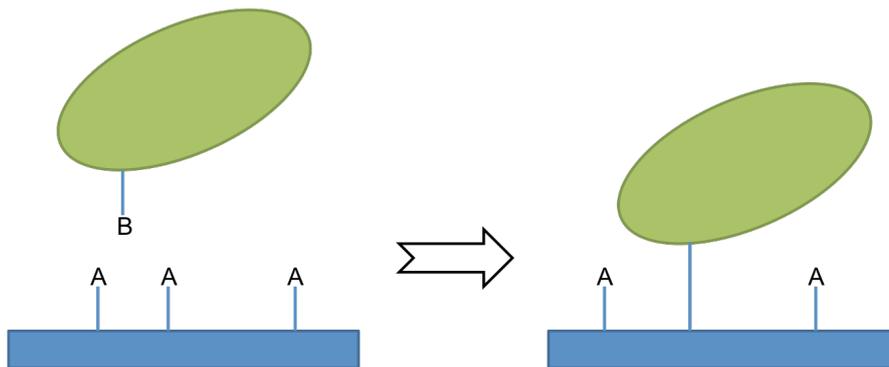


Figure I.17 - Immobilisation d'un peptide par liaison covalente.

### 3.1.3 L'utilisation de composés bifonctionnels

Ce type d'immobilisation reprend le principe de la formation de liaisons covalentes, en utilisant des composés bifonctionnels pour introduire une réactivité de surface au substrat. Les peptides peuvent alors être immobilisés par réaction chimique avec les fonctions chimiques existantes sur ces composés.

Sur des substrats d'or par exemple, l'utilisation de thiols permet d'immobiliser des biomolécules sur des couches de molécules organiques auto-assemblées (SAMs : Self-Assembled Monolayers) grâce à des thiols possédant des fonctions oxydées comme les acides carboxyliques (Figure I.18) [69], [70].

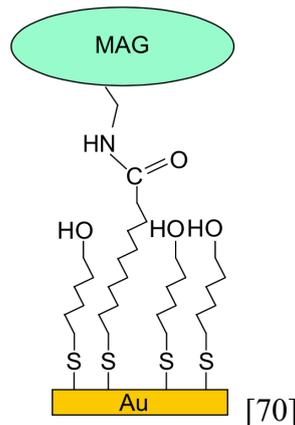


Figure I.18 - Immobilisation covalente de magainine-I (MAG) sur des SAMs [70].

L'immobilisation de peptides peut également être obtenue sur des chaînes polymères structurées en forme de brosse ou de peigne. Si la nature des chaînes polymères et les groupements fonctionnels peuvent varier, l'objectif reste de faire réagir les biomolécules avec des fonctions chimiques situées le long des chaînes polymères du peigne [71]–[74].

### 3.1.4 Autres méthodes d'immobilisation

Les biomolécules peuvent faire l'objet d'une inclusion dans une structure de type gel, afin de les déposer sur une surface qui sera recouverte par le gel [75]. Dans certains cas, les peptides eux-même peuvent faire partie de la structure du gel [76]. Cette méthode est soumise aux contraintes apportées par le gel (stabilité, résistance, etc.), et au risque de dénaturation des peptides au contact du gel, notamment en cas d'interaction hydrophobe par exemple.

Il est également possible d'immobiliser des peptides au cœur d'une structure sous forme de couches (LbL : Layer by Layer), en basant la cohésion de l'ensemble sur les interactions électrostatiques entre les biomolécules et des polyélectrolytes qui serviront de couches intermédiaires [49].

## 3.2 Traitement de surface du polypropylène par plasma

### 3.2.1 Le polypropylène

Le matériau à fonctionnaliser est du polypropylène. Ce polymère est un thermoplastique dont la température de fusion se situe autour de 150°C, sa température de transition vitreuse est d'environ -15°C, ce qui indique qu'il s'agit d'un matériau particulièrement sensible à la

chaleur. Composé exclusivement de carbone et d'hydrogène, le polypropylène isotactique (PP), largement employé dans l'industrie de l'emballage, est chimiquement inerte. Dans la perspective d'immobiliser de façon covalente des peptides à sa surface, il est impératif de le fonctionnaliser.

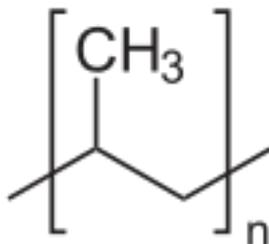


Figure I.19 - Polypropylène

Il existe plusieurs méthodes pour introduire des groupements chimiques en surface d'un matériau polymère tel que le PP. Dans l'optique d'une exploitation industrielle du procédé qui a été développé durant cette thèse, les procédés d'activation chimique conventionnels, à l'aide de bains sulfochromiques par exemple, ont été écartés. En effet, ceux-ci apportent beaucoup de contraintes de sécurité pour les opérateurs, de lourds investissements matériels pour l'entreprise, ainsi qu'un coût important pour le traitement des bains après usage.

La technologie identifiée est l'utilisation de procédés plasma.

### 3.2.2 Qu'est-ce qu'un plasma ?

Le plasma, également appelé 4<sup>ème</sup> état de la matière, est un gaz qui est ionisé à l'aide d'une décharge électrique.

Le gaz destiné à être ionisé, est injecté dans une enceinte confinée sous vide partiel ou à pression atmosphérique. La décharge électrique a pour rôle de transférer de l'énergie à ce gaz pour l'exciter et l'ioniser. En effet, du fait de leur faible masse, les électrons libres d'électrons libres dans le réacteur (l'origine de ces premiers électrons pourrait être liée aux rayons cosmiques) récupèrent l'essentiel de cette énergie et provoquent l'excitation et l'ionisation des particules lourdes du gaz, donc l'entretien du plasma, par collisions. Le plasma est donc un milieu macroscopiquement neutre composé d'ions, de molécules et atomes excités, d'électrons, mais aussi de rayonnements UV. Cette composition rend le gaz hautement réactif chimiquement, et émissif par la désexcitation des états radiatifs qui génère des photons.

Dès lors, un plasma peut être utilisé pour interagir avec des matériaux de tout type (polymères, métaux, oxydes, etc.), mais aussi avec des organismes vivants.

Deux types de plasmas peuvent être distingués : les plasmas à l'équilibre thermodynamique (LTE : Local Thermodynamic Equilibrium), et les plasmas hors équilibre thermodynamique (non-LTE). A la différence des plasmas LTE, la température des électrons dans un plasma non-LTE est largement supérieure à celle des particules lourdes du gaz, assimilée à la température du plasma [77].

Les technologies disponibles au laboratoire sont des plasmas non-LTE, la suite de ce paragraphe concerne donc cette catégorie de plasmas.

### **3.2.3 Les procédés plasma**

Il existe de nombreux types de plasma hors équilibre thermodynamique, mais on peut distinguer 2 grandes familles : les plasmas à basse pression et les plasmas à pression atmosphérique, dont les technologies ainsi que les applications diffèrent.

#### **3.2.3.1 Plasmas à basse pression**

Cette catégorie est probablement la plus décrite dans la littérature. Les procédés plasma à basse pression nécessitent l'utilisation d'un réacteur dans lequel le vide est fait. La génération du plasma se fait ensuite par l'introduction d'un gaz plasmagène dans la chambre du réacteur afin d'atteindre une pression de travail, dont la valeur peut atteindre quelques dixièmes de mbar pour des applications de dépôt chimique assisté par plasma (PECVD), puis l'application d'une haute tension entre 2 électrodes ou un champ électromagnétique dans le cas d'un système sans électrode (Figure I.20), entraînant ainsi le mécanisme de collision décrit précédemment.

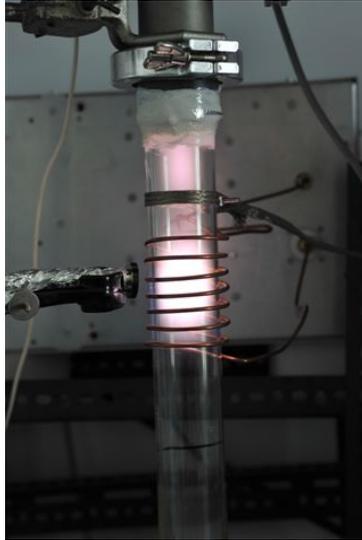


Figure I.20 - Photographie d'un réacteur plasma basse pression par induction. Le champ électromagnétique est généré par le solénoïde entourant le tube. Le plasma émet une lumière dont la couleur dépend du type de gaz réactif (ici, de l'argon, qui donne une couleur rose).

Ce type de procédé permet de traiter des polymères à la surface sans modifier en profondeur la nature du polymère. Le traitement par plasma d'air ou d'azote à basse pression sur du polypropylène permet d'augmenter l'énergie de surface par la formation de fonctions chimiques azotées et oxygénées telles que les C-O, C=O, C-N, C=N, amide ou nitrile (surtout dans le cas d'un plasma d'azote pur) [78], [79].

Il est également possible de déposer sur tout type de substrat (polymères, métaux, céramiques, etc.) des matériaux organiques comme des polymères fluorés [80] ou des PEG [81], ou des dépôts inorganiques, du TiO<sub>2</sub> par exemple, réalisé par Kääriäinen *et al.* [82]. Fakhouri *et al.* ont également réalisé des dépôts de TiO<sub>2</sub> par pulvérisation plasma (sputtering), toutefois cette technologie requiert une pression de travail encore plus faible (quelques 10<sup>-3</sup> mbar) [83].

Le principal intérêt de la technologie plasma à basse pression se situe dans le contrôle de la chimie. La faible concentration de molécules dans le gaz réduit la quantité de collisions intermoléculaires, les collisions dominantes sont alors entre les électrons et les molécules constituant le gaz plasmagène. La chimie du plasma est probablement moins complexe en comparaison avec les procédés plasmas à la pression atmosphérique présentés ci-après. Cette technologie permet de déposer de nombreux matériaux et fonctionnaliser différents types de matériaux [79], [84]–[86].

### 3.2.3.2 Plasmas à pression atmosphérique

Les procédés plasma à pression atmosphérique ne nécessitent pas de vide pour fonctionner. L'absence de pompe à vide et de réacteur dans le cas des traitements dans l'air libre les rend particulièrement intéressants dans une perspective industrielle. L'intérêt porté par la communauté scientifique aux plasmas à la pression atmosphérique est grandissant, comme le montre la Figure I.21.

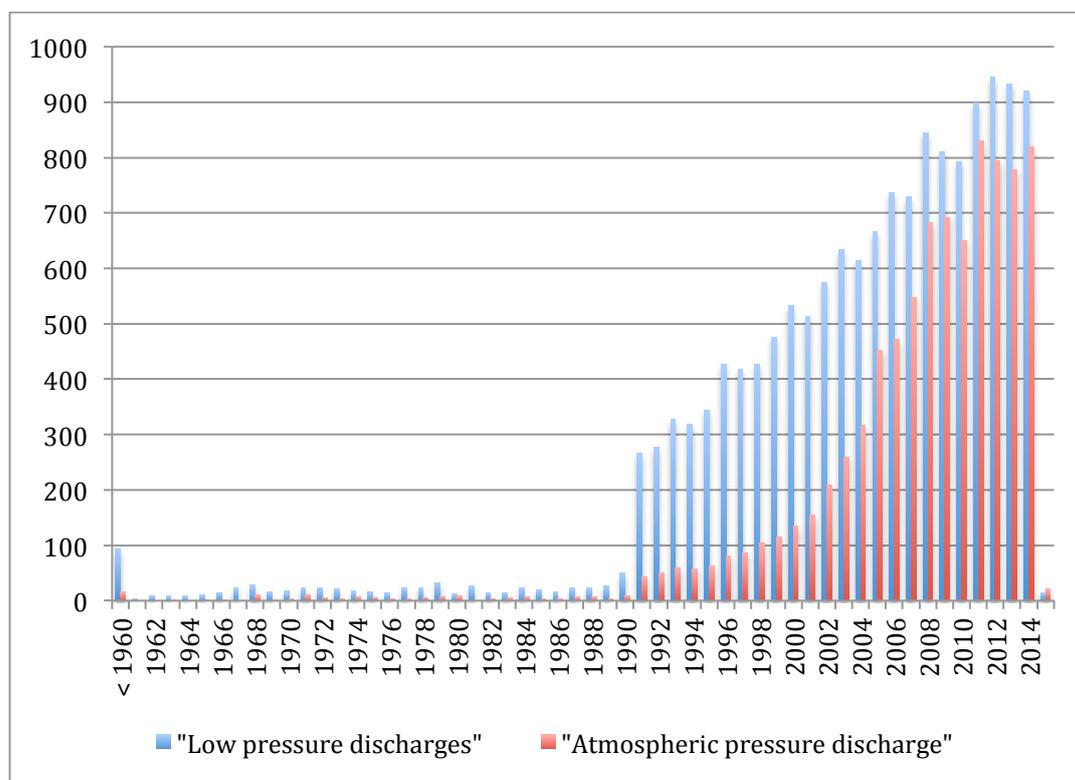


Figure I.21 - Evolution du nombre d'articles scientifiques sur les décharges à basse pression (■) et décharges à pression atmosphérique (■) – Données obtenues depuis : [www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com), Janvier 2015.

Cet intérêt récent peut s'expliquer par l'intérêt industriel de ces dispositifs qui contrebalance la complexité de la chimie du plasma à pression atmosphérique, notamment les technologies « Open Air » pour lesquelles l'interaction du plasma puis du substrat traité avec l'air ambiant, plus particulièrement l'oxygène, influence la chimie en surface.

Plusieurs types de plasmas à pression atmosphérique ont été développés, qui diffèrent par la nature de la décharge: les décharges à barrière diélectrique (DBD), et les torches (ou jet, APPJ : Atmospheric Pressure Plasma Jet).

#### 1.1.1.1.4 Décharges à barrière diélectrique (DBD)

Les DBD nécessitent l'utilisation d'au moins une barrière diélectrique (verre, quartz, alumine, céramique, polymère) qui recouvre souvent une ou les deux électrodes (Figure I.22). La présence de cette barrière diélectrique empêche le déclenchement de l'arc entre les deux électrodes.

En effet pour éviter le passage à l'arc, on place des diélectriques sur l'une ou les deux électrodes, ou entre les électrodes. L'effet des diélectriques est de répartir les charges accumulées uniformément sur leur surface. Au lieu d'avoir une décharge très énergétique et localisée, la décharge est stable, et répartie sur la surface totale des électrodes recouvertes par les diélectriques. En augmentant la capacitance entre les électrodes, les diélectriques permettent de réduire très sensiblement la tension appliquée au gaz, et donc d'éviter la transition vers l'arc.

Pendant le fonctionnement, l'accumulation de charges issues du plasma, sur le diélectrique, entraîne une chute du potentiel appliqué à l'électrode, et donc du champ appliqué au gaz. À des valeurs de tension importante, la charge d'espace positive (ou zone de déplétion) produit un champ électrique local qui accélère les électrons, créés entre la cathode et la charge d'espace positive, par photo-ionisation ou photoémission, ce qui implique un passage en régime filamentaire. L'échelle de temps de ce mécanisme de claquage est de l'ordre de la nanoseconde (ns), et lorsque le filament relie les deux électrodes, une microdécharge (streamers) se développe, avec un rayon de l'ordre de 100µm.

Généralement, les décharges DBD présentent un profil de microdécharges, toutefois il existe certaines conditions dans lesquelles il est possible d'obtenir une décharge homogène [87]–[89]. La température du gaz est faible dans ce type de décharges, donc adapté au traitement des polymères thermosensibles. En revanche la température des électrons, en particulier dans les filaments, peut aller jusqu'à 10 eV, ce qui permet d'avoir une chimie plus riche que dans le cas d'une décharge présentant une température du gaz plus haute.

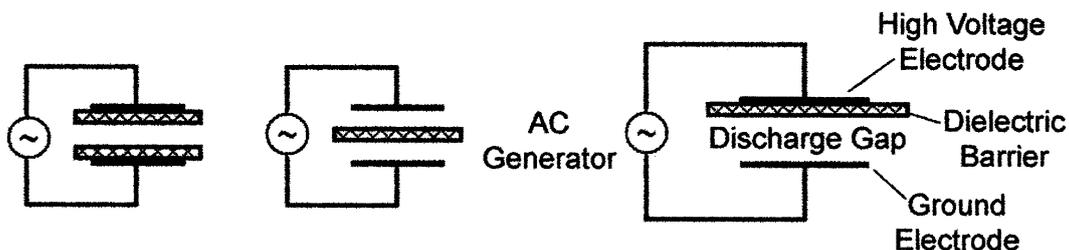


Figure I.22 - Configurations possibles d'une décharge à barrière diélectrique [87].

### 1.1.1.1.5 Jets de plasma à pression atmosphérique

Les jets de plasma sont des plasmas générés à l'intérieur d'une source et « soufflés » vers le milieu environnant par l'intermédiaire d'un débit gazeux. On distingue deux types de jet plasma : les jets sans arcs et ceux générés à partir d'arc électrique.

Pour la 1ère catégorie, les plasmas générés sont, sous nombreux aspects, similaires aux décharges luminescentes à basse pression et de très bonnes revues existent dans la littérature [90], [91]. Il existe de nombreuses configurations possibles pour générer ce type de décharge et la plus courante est la configuration «DBD jet». Celle-ci est obtenue en entourant un tube diélectrique (verre, quartz) avec deux électrodes (« configuration linéaire », Figure I.23 (a)) ou en plaçant l'électrode à la masse à l'extérieur du tube, tandis que l'électrode haute tension est localisée à l'intérieur (« configuration co-axiale », Figure I.23 (b)).

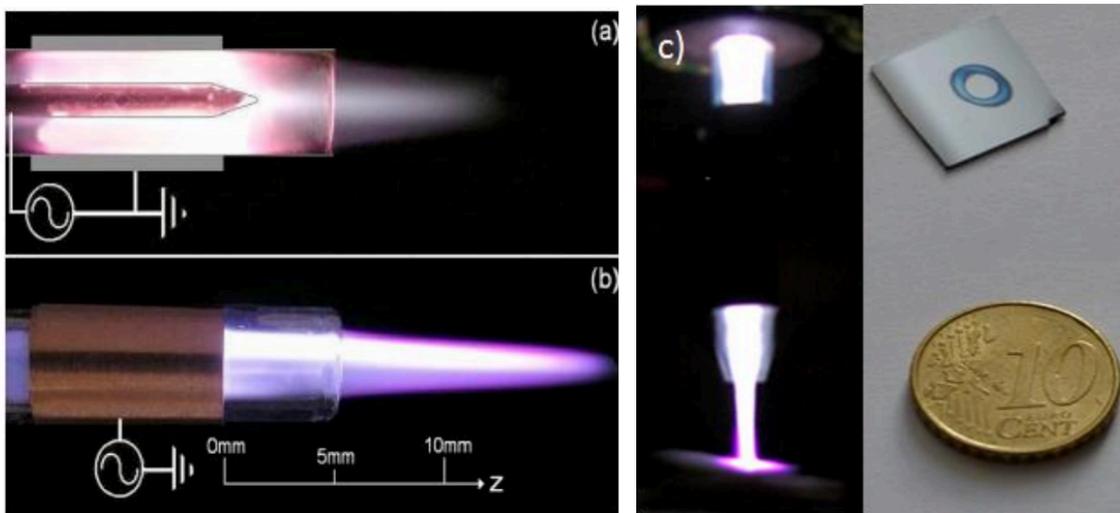


Figure I.23 – Jet de plasma RF d'Hélium. a) Configuration co-axiale, b) Configuration linéaire, l'électrode de masse est en aval de l'écoulement [92], c) Jet DBD d'argon développé au LISE pour le dépôt de polymère de type PEG [91].

L'intérêt de ce type de montage est de pouvoir bénéficier des propriétés d'une décharge DBD, notamment sa faible température, sans les contraintes que peuvent représenter l'utilisation d'électrodes planes.

Les torches plasma à arc utilisent une autre technologie qui consiste à souffler un gaz entre 2 électrodes de façon à ce qu'une fois l'arc généré, il soit poussé hors de la conduite sous forme

d'un arc tournant. Une tension DC pulsée haute (15–25 kHz) est appliquée entre les deux électrodes concentriques tubulaire. L'air comprimé est introduit à un débit de 40 standard liter per minute (slm), dans la torche. Le générateur PT400® (Plasmatreat, GmbH) délivre un courant pulsé modulé. La modulation du courant est contrôlée par le temps du rapport cyclique (Plasma Cycle Time= PCT), qui correspond au rapport de la durée du pulse, sur la durée de pause. Avec un PCT de 100 %, la durée du pulse est égale à la durée de pause.

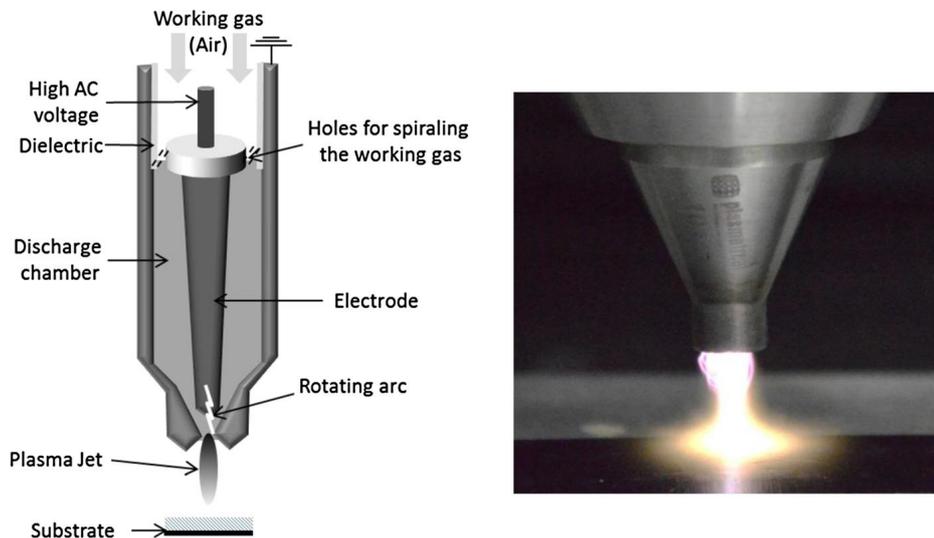


Figure I.24 - Exemples d'une torche à plasma (appareil Plasmatreater 400® - Plasmatreat, GmbH) [93]

La température du gaz dans ce type de plasma est très élevée, elle peut atteindre 1000K à 10mm de la buse, et jusqu'à 1800K à la sortie de la buse [93], [94], ce qui implique que l'effet thermique du plasma s'additionne à celui de la chimie lors d'un traitement de surface. Cet effet thermique peut être diminué en utilisant une torche rotative. Elle est constituée des mêmes éléments que la torche présentée sur la Figure I.24, avec la possibilité de tourner sur elle-même à une vitesse de 2900 tours par minute (Figure I.25). Cela a pour effet de diminuer la température du plasma à la sortie de la torche à cause du brassage avec l'air environnant.



Figure I.25 – Exemple de plasma généré par une torche à plasma rotative

Cette technologie possède un immense potentiel pour l'industrie par son adaptabilité. Une torche comme celle présentée ci-dessus peut être installée sur un bras articulé le long d'une chaîne d'assemblage, comme c'est déjà le cas dans l'industrie automobile par exemple.

### **3.2.3.3 Fonctionnalisation de surface par plasma à la pression atmosphérique sur des matériaux polymères**

Comme vu précédemment, un plasma possède une chimie particulière de par sa composition en espèces fortement réactives et énergétiques. L'interaction d'un plasma avec un polymère amène à des ruptures de liaisons covalentes sur les chaînes de l'extrême surface, qui sont ensuite à l'origine de la formation de radicaux, d'insaturations, mais aussi et surtout, par réaction avec les espèces chimiques du plasma d'air et post-oxydation avec l'air ambiant, de l'introduction de nombreuses espèces oxygénées.

Dorai et Kushner (2003, [95]) ont décrit un modèle pour l'interaction entre un plasma d'air et un film de polypropylène (PP) qui prend en compte le grand nombre de collisions au sein du plasma, ainsi que les réactions qui peuvent avoir lieu en surface du PP. Les mesures ont montré que le carbone en alpha du méthyle, carbone tertiaire repéré comme « Tertiary » sur la Figure I.26, est un site préférentiel pour la formation des radicaux car le taux de réaction des espèces du plasma avec l'hydrogène tertiaire est beaucoup plus important que pour des hydrogènes secondaires ou primaires. Les réactions engendrées par le plasma sur le polymère aboutissent principalement à la formation de groupements oxygénés tels que les carbonyles

(aldéhydes, cétones, acides carboxyliques, alcools) [96]–[100]. La formation de ces groupements est généralement accompagnée d'une diminution de l'hydrophobicité du matériau, synonyme d'une augmentation de l'énergie de surface [101].

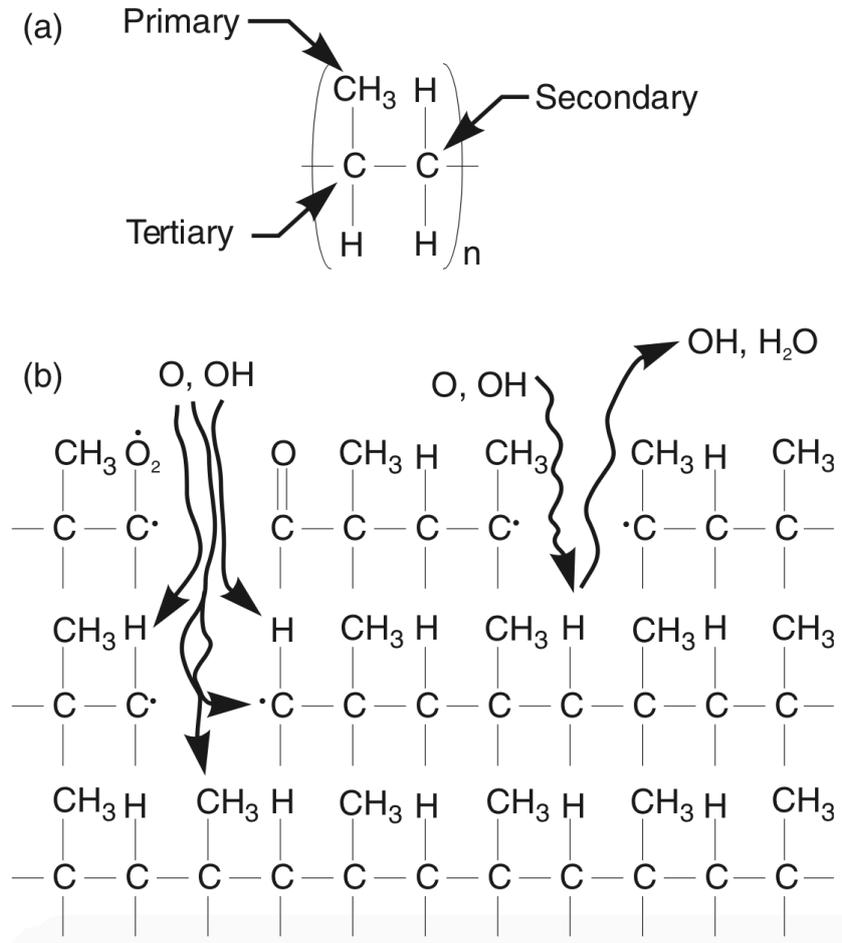


Figure I.26 - Interaction PP - Plasma selon le modèle proposé par Dorai et Kushner (2003).

(a) Motif du PP (b) interaction entre les espèces réactive d'un plasma d'air avec le PP

Bien que les phénomènes décrits ci-dessus aient lieu principalement en surface, il arrive que la structure interne du matériau s'en trouve modifiée à une profondeur dépassant parfois 10 $\mu$ m, notamment la structure cristalline, à cause de l'effet thermique du plasma et des rayonnements VUV, comme l'ont montré Poncin-Epaillard *et al.* sur le polypropylène (1997, [102]) ou encore Ben Salem *et al.* sur du polyamide (2014, [93]).

La formation de ces groupements chimiques en surface doit nous permettre d'immobiliser des peptides par des liaisons covalentes.

### 3.2.4 Le dépôt de couches minces par plasma

Les procédés plasma permettent de réaliser des dépôts de polymères par plasma, à basse ou à la pression atmosphérique. En effet, les précurseurs sont activés et fragmentés par les espèces réactives du plasma (électrons, photons, métastables, etc.) et, suite à des réactions de recombinaison qui ont lieu dans la phase gazeuse et sur la surface, le substrat est recouvert d'une couche mince organique. Selon les conditions du plasma, la structure du polymère peut être très réticulée ou au contraire présenter une composition chimique avec une importante rétention des fonctions du précurseur. Il existe une gamme très importante de précurseurs différents étudiés dans la littérature, toutefois les plus communs sont l'acide acrylique pour les groupements  $-\text{COOH}$  [103], le polyéthylène glycol (PEG) pour les fonctions C-O-C [80] et l'allylamine pour les fonctions  $\text{NH}_2$  [104].

Ces techniques peuvent s'avérer très efficaces pour apporter une réactivité spécifique à une surface. Toutefois, la maîtrise de l'adhésion de la couche mince sur le substrat ainsi que le gonflement de la couche (absorption d'eau) sont des aspects qui complexifient ce procédé notamment par rapport à l'activation par plasma à la pression atmosphérique, plus simple.

### 3.3 Immobilisation covalente des biomolécules sur la surface de polymères traités par plasma

Nous avons pu voir que l'utilisation de procédés plasma permettait l'introduction de groupements chimiques sur la surface de matériaux polymères. Ces groupements pourront servir de site d'accroche pour les peptides, dans le but de les immobiliser par liaison covalente.

La littérature rapporte que les groupements chimiques créés par une torche à plasma à pression atmosphérique sont principalement oxygénés (C-O, C=O, COO, etc.). De plus, la nisine et le lysozyme, nos molécules cibles, possèdent sur leurs chaînes latérales des groupements amines (-NH<sub>2</sub>) et carboxyliques (-COOH). Il est donc important d'identifier les réactions possibles entre ces groupements et les biomolécules cibles, pour obtenir l'immobilisation souhaitée.

#### 3.3.1 Couplage entre acides carboxyliques surfaciques et amines de la protéine

C'est une des méthodes les plus courantes pour immobiliser des protéines sur des substrats, pour la préparation de biocapteurs par exemple [105]. Les protéines, via l'amine primaire portée par la chaîne latérale de leurs lysines (Figure I.27) principalement, peuvent réagir sur les acides carboxyliques préalablement activés par le couple N-ethyl-N'-(3-(diméthylamino)propyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) et N-hydroxysuccinimide (NHS) conduisant à la formation d'une liaison covalente de type liaison peptidique.

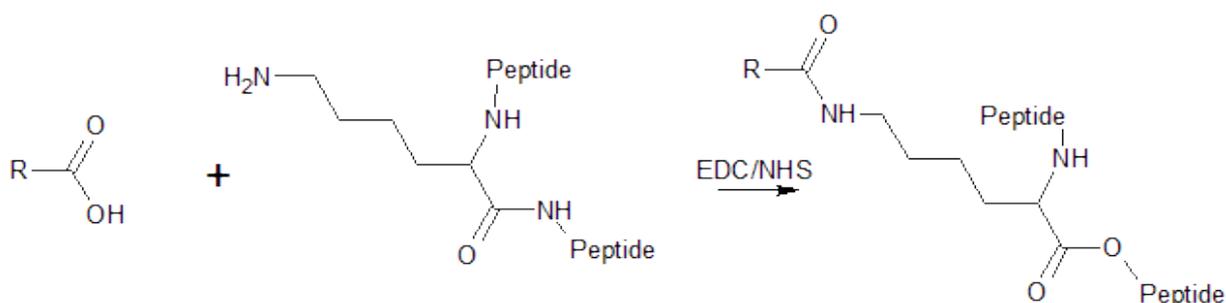


Figure I.27 – Réaction entre un acide carboxylique et la Lysine

Comme l'ont montré Johnsson et al. (1991, [106]), la cinétique de réaction est rapide, ce qui permet de réduire la durée du procédé. La concentration en réactif est également un paramètre

important, Sam *et al.* ont mis en évidence que le rendement de l'activation des acides carboxyliques, déterminé par infrarouge, est influencé par la concentration des solutions de EDC et NHS. L'activation est complète à l'obtention du succinimidyl ester (COOSuc, Figure I.28), le rendement le plus fort est obtenu pour des concentrations de 5 mM pour EDC et NHS [102].

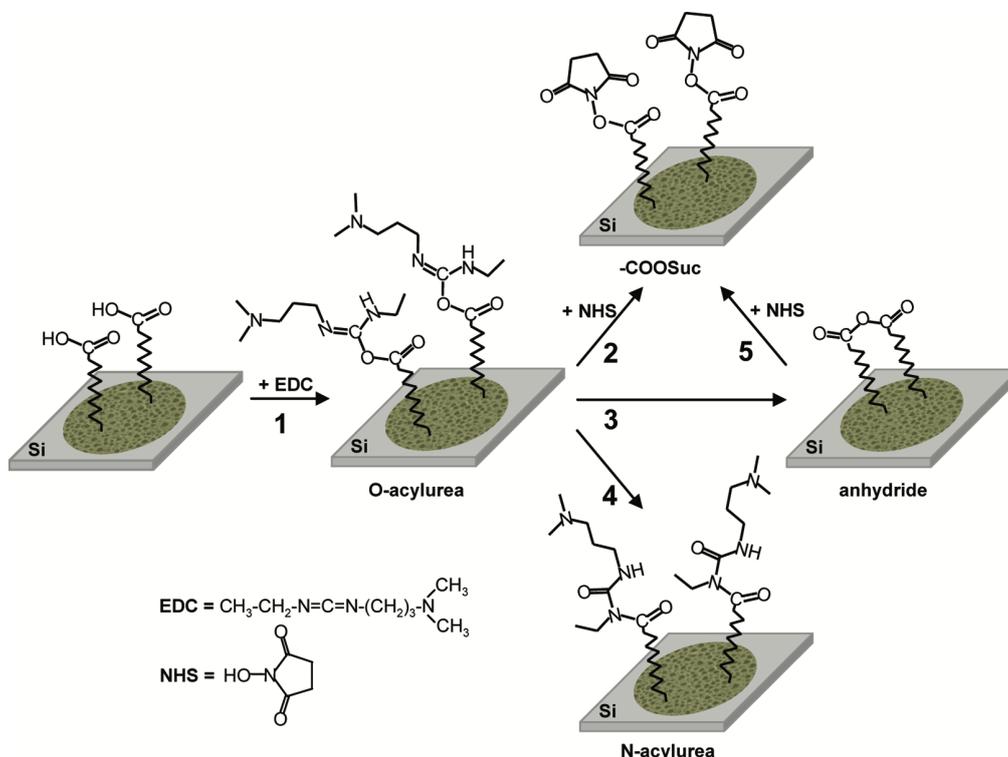


Figure I.28 - Réaction du couple EDC/NHS sur les acides carboxyliques d'une surface [102].

Cette réaction est un moyen efficace d'immobiliser de façon covalente des biomolécules sur une surface activée par plasma.

### 3.3.2 Couplage entre aldéhydes surfaciques et amines peptidiques

Le traitement par plasma à pression atmosphérique peut conduire à la formation de groupements aldéhyde en surface du PP. On peut, dans ce cas, envisager d'immobiliser la biomolécule par formation d'une base de Schiff entre l'aldéhyde surfacique et un groupement amine. La réduction de l'imine en présence de  $\text{NaBH}_4$  ou  $\text{NaCNBH}_3$ , conduit à la formation d'une amine secondaire (Figure I.29).

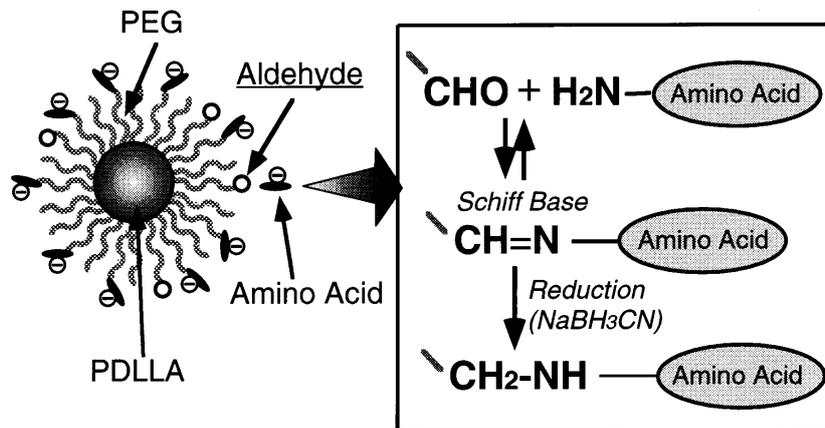


Figure I.29 - Réaction entre aldéhyde et amine sur des particules de Poly(D,L-Lactide) fonctionnalisées avec des PEG (Yamamoto et al., 1999, [103])

L'utilisation d'un réducteur est nécessaire pour la conversion de la base de Schiff en amine secondaire car la réaction aboutissant à l'imine est réversible.

La formation de la base de Schiff présente l'avantage d'être effective sans activateur ou catalyseur. L'inconvénient est la nécessité de réduire la base de Schiff, ce qui implique une étape supplémentaire ainsi que l'utilisation de produits tels que  $\text{NaBH}_4$  ou  $\text{NaCNBH}_3$  qui sont toxiques.

### 3.3.3 Conservation de l'activité des biomolécules après immobilisation

Comme nous l'avons vu précédemment, les peptides ont besoin d'interagir avec la surface des bactéries pour avoir l'effet antibactérien, ils doivent parfois traverser la paroi bactérienne. Dès lors, il n'est pas assuré que les peptides, une fois immobilisés sur une surface, soient toujours actifs. Bagheri *et al.* (2009, [104]) ont montré que les protéines immobilisés sur des surfaces pouvaient conserver leur spectre d'activité. En revanche, l'intensité de l'activité peut être affectée par la distance qui sépare la molécule de la surface.

L'activité enzymatique de la trypsine a été conservée après son immobilisation par formation de liaison covalente à partir des résidus lysines de sa structure [105]. De même, de la nisine a été immobilisée sur des surfaces par le biais de composés bifonctionnels, conservant son activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, bactérie Gram -, ainsi que *Bacillus subtilis* et *Listeria ivanovii*, Gram + [68], [106], [107]. Il en est de même pour le lysozyme, immobilisé sur des surfaces par le biais de couches fonctionnelles, qui présente une activité

antibactérienne significative sur *Micrococcus luteus* et *Listeria ivanovii* [67], ou sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* [57].

Bien que dans les cas cités ici, l'immobilisation des molécules ait été réalisée par le biais de composés bifonctionnels et non sur le substrat directement, cela nous permet d'envisager l'immobilisation de biomolécules sur des échantillons de polypropylène traité par plasma à la pression atmosphérique, par liaison covalente formée directement entre la molécule et le substrat.

## 4 Stratégie de recherche

Ce chapitre a mis en évidence le potentiel que représente le traitement de matériaux polymères par plasma pour la préparation de surfaces antibactériennes fonctionnalisées avec des peptides. Le choix des technologies devra être fait en considérant le cahier des charges industriel.

### 4.1 Choix de l'agent antibactérien

Les technologies à base d'ion argent possèdent un spectre large et une efficacité très importante. Toutefois, leur activité repose sur le relargage d'ions dans le milieu contaminé (liquide, crème cosmétique, aliment), ce qui pose un problème pour notre projet, les manufacturiers de produits cosmétiques ayant la volonté de maîtriser la composition de leurs formulations jusqu'à l'application sur la peau du consommateur. De plus, l'impact des ions argent sur l'environnement ou la santé humaine n'est pas encore élucidé [16].

Le  $\text{TiO}_2$ , autre agent inorganique à l'activité reconnue, nécessite une activation pour que son action photocatalytique puisse agir contre les bactéries. De plus, ce matériau est largement utilisé comme colorant blanc dans l'industrie plasturgique et les peintures. Ce projet a pour but d'obtenir une surface antibactérienne sur une surface de polypropylène sans modification visuelle du matériau, ce qui empêche l'utilisation de cette technologie. Les polymères antibactériens sont également écartés puisque le matériau de base est déjà déterminé.

Concernant les ammoniums quaternaires, leur mécanisme, et notamment la pénétration au sein du microorganisme, est la cible de résistances développées par les bactéries [12]. De plus, de nombreux ammoniums quaternaires sont déjà enregistrés comme conservateurs ou encore interdits d'utilisation dans les produits cosmétiques [108], ce qui empêcherait les fabricants de produits cosmétiques de certifier leurs produits « sans conservateurs », ce qui est pourtant l'objectif initial de ce projet.

Enfin, l'utilisation de molécules organiques à large spectre antibactérien commercialisées à but thérapeutique, les « antibiotiques », n'est pas envisageable compte tenu des controverses concernant les phénomènes de résistance dans lesquels ces médicaments sont impliqués [109], [110].

D'autres biocides tels que le glutaraldéhyde et le triclosan ne peuvent pas être envisagés sur des produits destinés au grand public en raison de leur caractère cancérigène [111].

Les peptides présentent une activité antibactérienne intéressante, couplée à une biocompatibilité et une capacité à être immobilisés sur des surfaces, qui en font les candidats idéal pour ce projet. Les biomolécules choisies pour ce projet sont la nisine et le lysozyme. Elles ont été choisies pour cette étude notamment pour leur disponibilité commerciale, leur prix (dans la perspective d'un procédé industriel) et les connaissances à leur propos. Leur activité cible principalement les bactéries à gram positif, la nisine étant capable de s'attaquer également aux bactéries à gram négatif sous certaines conditions.

### **4.2 Choix de la méthode de fonctionnalisation**

Dans la perspective du développement d'un procédé industriel, les technologies plasma présentent de nombreux avantages, notamment l'absence de bains chimiques pour introduire des groupements fonctionnels en surface de matériaux polymères.

Les procédés plasma à la pression atmosphérique présente une chimie plus complexe que les procédés à basse pression. Toutefois, ces derniers nécessitent un système de pompage qui, au delà de l'investissement que cela représente, pose problème pour traiter un grand nombre de pièces à un rythme soutenu (jusqu'à 500 pièces par minute).

Les procédés plasma à la pression atmosphérique permettent d'introduire des fonctions chimiques oxygénées par voie sèche qui apportent à la surface d'un matériau inerte tel que le polypropylène une réactivité intéressante pour l'immobilisation de peptides. Cette technologie est retenue pour ce projet, plus particulièrement les torches à plasma. Ce type d'appareil est facilement implantable sur une chaîne de production industrielle, ce qui est déjà le cas dans l'industrie automobile par exemple.

### **4.3 Choix de la méthode d'immobilisation des peptides**

L'immobilisation des biomolécules aux propriétés antibactériennes sur la surface du polypropylène peut être obtenu de différentes manières, mais la formation de liaisons covalentes, entre la surface et les peptides, promet de conférer à l'immobilisation une très

grande stabilité. De plus, il a été montré que la nisine et le lysozyme immobilisés conservaient leur spectre d'action et tout ou partie de leur activité antibactérienne. Ce type d'immobilisation étant rendue possible par l'introduction de groupements fonctionnels, cette stratégie sera donc retenue pour ce projet de thèse.

#### 4.4 Choix de la méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de matériaux nécessite de définir le test le plus pertinent, au regard du mode d'action du principe actif et du type de traitement appliqué sur les échantillons à jauger. Dans un rôle qualitatif, la méthode de diffusion sur gélose (Agar Diffusion Method) consiste à déposer les échantillons à tester sur un milieu de culture solide préalablement contaminé par la souche de bactérie choisie et mesurer la zone autour de l'échantillon où les bactéries n'auront pas poussé, témoignant de la capacité d'inhibition de croissance des actifs antibactériens. Cette méthode est efficace pour détecter une activité antibactérienne dans le cas de substances relarguées au cours du test [22], [112], [113].

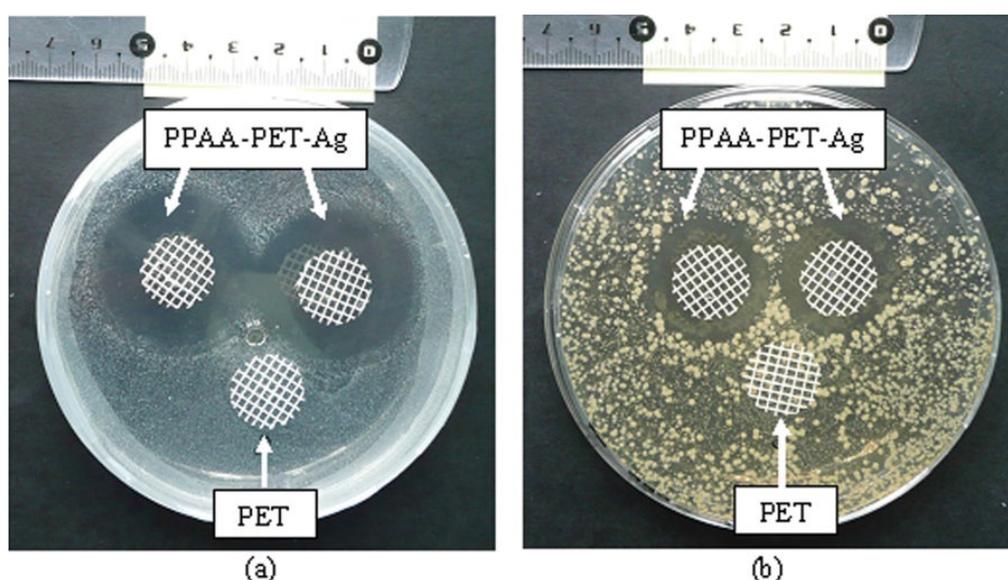


Figure IV.30 - Exemple de visualisation d'une zone d'inhibition autour d'échantillons fonctionnalisés avec des particules d'argent, sur *Staphylococcus aureus* (a) et *Escherichia coli* (b) [22]

Il est également possible d'observer l'effet d'une surface sur les bactéries par microscopie à fluorescence, à l'aide de colorants permettant de distinguer les bactéries vivantes des bactéries mortes. Le kit *LIVE/DEAD BacLight viability kit* commercialisé par Invitrogen (Ref L7012) fait partie des méthodes utilisées régulièrement pour ce type d'observation [65], [66], [107]. Il

existe également d'autres méthodes mises en place par certaines filières industrielles dans le but d'harmoniser les tests, comme l'a fait l'Association Américaine des Chimistes et Coloristes du Textile (American Association of Textile Chemists and Colorists – AATCC) [114].

Dans le cadre de ce projet, la quantification de l'activité antibactérienne des échantillons traités selon le protocole décrit dans les chapitres précédents est primordiale, et doit nous permettre de classer les échantillons en fonction de leur activité, afin de pouvoir identifier le ou les traitements permettant d'aboutir aux performances les plus élevées. Une méthode permettant la quantification des performances biologiques de matériaux aux propriétés antibactériennes est la norme ISO 22196:2007 [115]. Cette méthode, déjà rencontrée dans la littérature [107], est destinée à l'évaluation de matériaux de type polymère ayant des propriétés antibactériennes en surface. C'est un protocole, inspiré de cette norme, et adapté à nos échantillons qui a été utilisé pour l'évaluation de nos traitements.

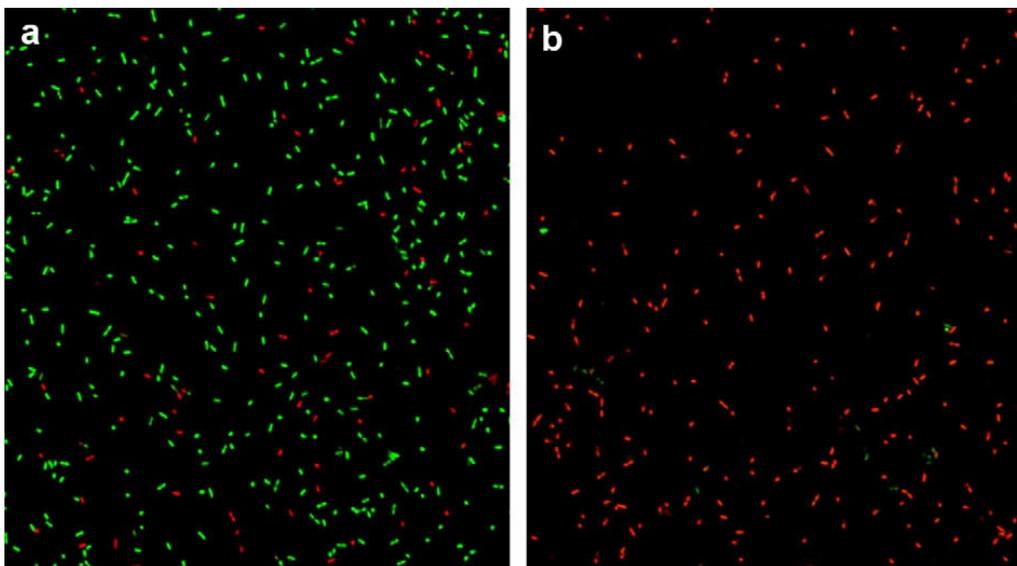


Figure IV.31 – Exemple de vue par microscopie à fluorescence : Viabilité de *Listeria ivanovii* sur des surfaces d'or fonctionnalisées avec des SAMs (a. sans Magainine I ; b. avec Magainine I). Les bactéries vivantes sont en vert, les bactéries mortes en rouge [65].

La fonctionnalisation de surface de polypropylène avec des peptides grâce à l'activation par plasma à la pression atmosphérique doit permettre d'obtenir une surface polymère avec des propriétés antibactériennes sans modification des propriétés mécaniques et visuelles du matériau de base. Ces travaux sont présentés dans la suite de ce manuscrit.

## Références

- [1] J. Guespin-Michel, *Les bactéries, leur monde et nous - Vers une biologie intégrative et dynamique: Vers une biologie intégrative et dynamique*. Dunod, 2011.
- [2] L. M. Sherwood, J. M. Willey, and C. J. Woolverton, *Microbiologie*. De Boeck Supérieur, 2010.
- [3] H. J. Klasen, “Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses,” *Burns*, vol. 26, no. 2, pp. 117–130, 2000.
- [4] H. J. Klasen, “A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver,” *Burns*, vol. 26, no. 2, pp. 131–138, 2000.
- [5] S. Silver, L. T. Phung, and G. Silver, “Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 7, pp. 627–634, 2006.
- [6] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, and J. O. Kim, “A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 662–668, 2000.
- [7] W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim, and Y. H. Park, “Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 7, pp. 2171–2178, 2008.
- [8] S. Pal, Y. K. Tak, and J. M. Song, “Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 6, pp. 1712–1720, 2007.
- [9] I. Sondi and B. Salopek-Sondi, “Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 275, no. 1, pp. 177–182, 2004.
- [10] S. y. Liau, D. c. Read, W. j. Pugh, J. r. Furr, and A. d. Russell, “Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 25, no. 4, pp. 279–283, 1997.
- [11] P. Bragg and D. Rainnie, “Effect of Silver Ions on Respiratory-Chain of *Escherichia-Coli*,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 20, no. 6, pp. 883–889, 1974.
- [12] G. McDonnell and A. D. Russell, “Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 12, no. 1, pp. 147–179, 1999.
- [13] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 1, pp. 76–83, 2009.

- [14] C. Carlson, S. M. Hussain, A. M. Schrand, L. K. Braydich-Stolle, K. L. Hess, R. L. Jones, and J. J. Schlager, "Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 43, pp. 13608–13619, 2008.
- [15] X. Yang, A. P. Gondikas, S. M. Marinakos, M. Auffan, J. Liu, H. Hsu-Kim, and J. N. Meyer, "Mechanism of Silver Nanoparticle Toxicity Is Dependent on Dissolved Silver and Surface Coating in *Caenorhabditis elegans*," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 2, pp. 1119–1127, 2012.
- [16] C. Marambio-Jones and E. M. V. Hoek, "A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 12, no. 5, pp. 1531–1551, 2010.
- [17] T. V. Duncan, "Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 363, no. 1, pp. 1–24, 2011.
- [18] P. Appendini and J. H. Hotchkiss, "Review of antimicrobial food packaging," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 3, no. 2, pp. 113–126, 2002.
- [19] F. Heidarpour, W. A. Wan Ab Karim Ghani, A. Fakhru'l-Razi, S. Sobri, V. Heydarpour, M. Zargar, and M. R. Mozafari, "Complete removal of pathogenic bacteria from drinking water using nano silver-coated cylindrical polypropylene filters," *Clean Technol. Environ. Policy*, vol. 13, no. 3, pp. 499–507, 2010.
- [20] N. Maréchal, E. Quesnel, and Y. Pauleau, "Silver thin films deposited by magnetron sputtering," *Thin Solid Films*, vol. 241, no. 1–2, pp. 34–38, 1994.
- [21] N. Radic, B. M. Obradovic, M. Kostic, B. Dojcinovic, M. M. Kuraica, and M. Cernak, "Deposition of silver ions onto DBD and DCSBD plasma treated nonwoven polypropylene," *Surf. Coat. Technol.*, vol. 206, no. 23, pp. 5006–5011, 2012.
- [22] V. Kumar, C. Jolival, J. Pulpytel, R. Jafari, and F. Arefi-Khonsari, "Development of silver nanoparticle loaded antibacterial polymer mesh using plasma polymerization process," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 101A, no. 4, pp. 1121–1132, 2013.
- [23] S. Saxena, A. R. Ray, A. Kapil, G. Pavon-Djavid, D. Letourneur, B. Gupta, and A. Meddahi-Pellé, "Development of a New Polypropylene-Based Suture: Plasma Grafting, Surface Treatment, Characterization, and Biocompatibility Studies," *Macromol. Biosci.*, vol. 11, no. 3, pp. 373–382, 2011.
- [24] A. Kumar, P. K. Vemula, P. M. Ajayan, and G. John, "Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil," *Nat. Mater.*, vol. 7, no. 3, pp. 236–241, 2008.

- [25] Z. Ustaoglu Iyigündođdu, S. Demirci, N. Baç, and F. şAhin, "Development of durable antimicrobial surfaces containing silver- and zinc-ion-exchanged zeolites," *Turk. J. Biol.*, vol. 38, pp. 420–427, 2014.
- [26] C. Sarantopoulos, "Photocatalyseurs à base de TiO<sub>2</sub> préparés par infiltration chimique en phase vapeur (CVI) sur supports microfibreux," 2007.
- [27] A. Fujishima, T. N. Rao, and D. A. Tryk, "Titanium dioxide photocatalysis," *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–21, 2000.
- [28] K. Sunada, T. Watanabe, and K. Hashimoto, "Studies on photokilling of bacteria on TiO<sub>2</sub> thin film," *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, vol. 156, no. 1–3, pp. 227–233, 2003.
- [29] E.-R. Kenawy, S. D. Worley, and R. Broughton, "The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 5, pp. 1359–1384, 2007.
- [30] A. Munoz-Bonilla and M. Fernandez-Garcia, "Polymeric materials with antimicrobial activity," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 281–339, 2012.
- [31] H. B. Kocer, I. Cerkez, S. D. Worley, R. M. Broughton, and T. S. Huang, "Polymeric Antimicrobial N-Halamine Epoxides," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 3, no. 8, pp. 2845–2850, 2011.
- [32] V. P. Dhende, S. Samanta, D. M. Jones, I. R. Hardin, and J. Locklin, "One-Step Photochemical Synthesis of Permanent, Nonleaching, Ultrathin Antimicrobial Coatings for Textiles and Plastics," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 3, no. 8, pp. 2830–2837, 2012.
- [33] T. Ganz and R. I. Lehrer, "Defensins," *Pharmacol. Ther.*, vol. 66, no. 2, pp. 191–205, 1995.
- [34] T. Ganz, "Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 9, pp. 710–720, 2003.
- [35] A. Bahar and D. Ren, "Antimicrobial Peptides," *Pharmaceuticals*, vol. 6, no. 12, pp. 1543–1575, 2013.
- [36] X. Zhao, H. Wu, H. Lu, G. Li, and Q. Huang, "LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, 2013.
- [37] H. Jenssen, P. Hamill, and R. E. W. Hancock, "Peptide Antimicrobial Agents," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 19, no. 3, pp. 491–511, 2006.
- [38] J. B. Peravali, S. R. Kotra, K. Sobha, R. Nelson, K. V. Rajesh, and K. K. Pulicherla, "Antimicrobial peptides, an effective alternative for antibiotic therapy," *Mintage J. Pharm. Med. Sci.*, vol. 2, no. 2, pp. 1–7, 2013.
- [39] M. R. Yeaman and N. Y. Yount, "Mechanisms of antimicrobial peptide action and

resistance,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 55, no. 1, pp. 27–55, 2003.

[40] R. M. Epanand and H. J. Vogel, “Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action,” *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.*, vol. 1462, no. 1, pp. 11–28, 1999.

[41] J.-P. S. Powers and R. E. Hancock, “The relationship between peptide structure and antibacterial activity,” *Peptides*, vol. 24, no. 11, pp. 1681–1691, 2003.

[42] Y. Shai, “Mode of action of membrane active antimicrobial peptides,” *Pept. Sci.*, vol. 66, no. 4, pp. 236–248, 2002.

[43] K. A. Brogden, “Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, pp. 238–250, 2005.

[44] K. Glinel, P. Thebault, V. Humblot, C. M. Pradier, and T. Jouenne, “Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches,” *Acta Biomater.*, no. 0, 2012.

[45] H. Ulvatne, S. Karoliussen, T. Stiberg, Ø. Rekdal, and J. S. Svendsen, “Short antibacterial peptides and erythromycin act synergically against *Escherichia coli*,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 48, no. 2, pp. 203–208, 2001.

[46] M. N. Melo, R. Ferre, and M. A. R. B. Castanho, “Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 3, pp. 245–250, 2009.

[47] N. B. Russi, C. Bantar, and L. F. Calvinho, “Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds,” *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 40, no. 2, pp. 116–119, 2008.

[48] E. Breukink and B. de Kruijff, “The lantibiotic nisin, a special case or not?,” *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.*, vol. 1462, no. 1, pp. 223–234, 1999.

[49] R. A. Demel, T. Peelen, R. J. Siezen, B. Kruijff, and O. P. Kuipers, “Nisin Z, mutant nisin Z and lactacin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 235, no. 1–2, pp. 267–274, 1996.

[50] E. A. Davies and J. Delves-Broughton, “Nisin,” *Bacteriocins*, pp. 191–198, 1999.

[51] J. Delves-Broughton, “Nisin as a food preservative,” *Food Australia*, vol. 57, no. 12, pp. 525–527, 2005.

[52] J. Cleveland, T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas, “Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 71, pp. 1–20, 2001.

[53] S. Quintavalla and L. Vicini, “Antimicrobial food packaging in meat industry,” *Meat Sci.*, vol. 62, no. 3, pp. 373–380, 2002.

[54] W. C. de Freitas, E. L. de Souza, C. P. de Sousa, and A. E. R. Travassos, “Anti-

staphylococcal effectiveness of nisaplin in refrigerated pizza doughs,” *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 51, no. 3, pp. 595–599, 2008.

[55] D. M. Chipman and N. Sharon, “Mechanism of Lysozyme Action,” *Science*, vol. 165, no. 3892, pp. 454–465, 1969.

[56] D. Nakimbugwe, B. Masschalck, M. Atanassova, A. Zewdiebosuner, and C. Michiels, “Comparison of bactericidal activity of six lysozymes at atmospheric pressure and under high hydrostatic pressure,” *Int. J. Food Microbiol.*, 2006.

[57] S. Yuan, D. Wan, B. Liang, S. O. Pehkonen, Y. P. Ting, K. G. Neoh, and E. T. Kang, “Lysozyme-Coupled Poly(poly(ethylene glycol) methacrylate)–Stainless Steel Hybrids and Their Antifouling and Antibacterial Surfaces,” *Langmuir*, vol. 27, no. 6, pp. 2761–2774, 2011.

[58] J. N. Talbert and J. M. Goddard, “Enzymes on material surfaces,” *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 93, no. 0, pp. 8–19, 2012.

[59] B. Kasemo and J. Gold, “Implant Surfaces and Interface Processes,” *Adv. Dent. Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 8–20, 1999.

[60] F. Carlsson, E. Hyltner, T. Arnebrant, M. Malmsten, and P. Linse, “Lysozyme Adsorption to Charged Surfaces. A Monte Carlo Study,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 28, pp. 9871–9881, 2004.

[61] R. E. Canfield, “The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme,” *J. Biol. Chem.*, vol. 238, no. 8, pp. 2698–2707, 1963.

[62] L. J. Smith, M. J. Sutcliffe, C. Redfield, and C. M. Dobson, “Structure of Hen Lysozyme in Solution,” *J. Mol. Biol.*, vol. 229, no. 4, pp. 930–944, 1993.

[63] F. J. M. van De Ven and G. Jung, “Structures of lantibiotics studied by NMR,” *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 69, no. 2, pp. 99–107, 1996.

[64] K. L. Prime and G. M. Whitesides, “Self-Assembled Organic Monolayers: Model Systems for Studying Adsorption of Proteins at Surfaces,” *Science*, vol. 252, no. 5009, pp. 1164–1167, 1991.

[65] V. Humblot, J.-F. Yala, P. Thebault, K. Boukerma, A. Héquet, J.-M. Berjeaud, and C.-M. Pradier, “The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 21, pp. 3503–3512, 2009.

[66] K. Glinel, A. M. Jonas, T. Jouenne, J. Leprince, L. Galas, and W. T. S. Huck, “Antibacterial and Antifouling Polymer Brushes Incorporating Antimicrobial Peptide,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 20, no. 1, pp. 71–77, 2009.

[67] A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, M. Salmain, and C.-M. Pradier,

“Grafting of Lysozyme and/or Poly(ethylene glycol) to Prevent Biofilm Growth on Stainless Steel Surfaces,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 7, pp. 2101–2109, 2009.

[68] A. Héquet, V. Humblot, J.-M. Berjeaud, and C.-M. Pradier, “Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests,” *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 84, no. 2, pp. 301–309, 2011.

[69] N. Hadjesfandiari, K. Yu, Y. Mei, and J. N. Kizhakkedathu, “Polymer brush-based approaches for the development of infection-resistant surfaces,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 31, p. 4968, 2014.

[70] D. Avnir, S. Braun, O. Lev, and M. Ottolenghi, “Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials,” *Chem. Mater.*, vol. 6, no. 10, pp. 1605–1614, 1994.

[71] C. Zhou, P. Li, X. Qi, A. R. M. Sharif, Y. F. Poon, Y. Cao, M. W. Chang, S. S. J. Leong, and M. B. Chan-Park, “A photopolymerized antimicrobial hydrogel coating derived from epsilon-poly-L-lysine,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 11, pp. 2704–2712, 2011.

[72] C. Tendero, C. Tixier, P. Tristant, J. Desmaison, and P. Leprince, “Atmospheric pressure plasmas: A review,” *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 61, no. 1, pp. 2–30, 2006.

[73] F. Poncin-Epaillard, J.-C. Brosse, and T. Falher, “Reactivity of surface groups formed onto a plasma treated poly(propylene) film,” *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 200, no. 5, pp. 989–996, 1999.

[74] N. V. Bhat and D. J. Upadhyay, “Plasma-induced surface modification and adhesion enhancement of polypropylene surface,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 86, no. 4, pp. 925–936, 2002.

[75] S. Bhatt, J. Pulpytel, G. Ceccone, P. Lisboa, F. Rossi, V. Kumar, and F. Arefi-Khonsari, “Nanostructure Protein Repellant Amphiphilic Copolymer Coatings with Optimized Surface Energy by Inductively Excited Low Pressure Plasma,” *Langmuir*, vol. 27, no. 23, pp. 14570–14580, 2011.

[76] S. Bhatt, J. Pulpytel, M. Mirshahi, and F. Arefi-Khonsari, “Nano thick poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) coatings developed by catalyst-free plasma assisted copolymerization process for biomedical applications,” *RSC Adv.*, vol. 2, no. 24, pp. 9114–9123, 2012.

[77] T. O. Kääriäinen, S. Lehti, M. L. Kääriäinen, and D. C. Cameron, “Surface modification of polymers by plasma-assisted atomic layer deposition,” *Surf. Coat. Technol.*, vol. 205, Supplement 2, no. 0, pp. S475–S479, 2011.

[78] H. Fakhouri, J. Pulpytel, W. Smith, A. Zolfaghari, H. R. Mortaheb, F. Meshkini, R.

Jafari, E. Sutter, and F. Arefi-Khonsari, "Control of the visible and UV light water splitting and photocatalysis of nitrogen doped TiO<sub>2</sub> thin films deposited by reactive magnetron sputtering," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 144, pp. 12–21, 2014.

[79] F. Arefi-Khonsari, J. Kurdi, M. Tatoulian, and J. Amouroux, "On plasma processing of polymers and the stability of the surface properties for enhanced adhesion to metals," *Surf. Coat. Technol.*, vol. 142, pp. 437–448, 2001.

[80] H. Drnovská, L. Lapčík, V. Buršíková, J. Zemek, and A. Barros-Timmons, "Surface properties of polyethylene after low-temperature plasma treatment," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 281, no. 11, pp. 1025–1033, 2003.

[81] S. Veprek, "Plasma-induced and plasma-assisted chemical vapour deposition," *Thin Solid Films*, vol. 130, no. 1–2, pp. 135–154, 1985.

[82] U. Kogelschatz, "Dielectric-Barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications," *Plasma Chem. Plasma Process.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–46, 2003.

[83] M. C. Bouzidi, "Etude d'une Décharge à Barrière Diélectrique (DBD) homogène dans l'azote à pression atmosphérique : Effet mémoire et Optimisation du transfert de Puissance," Engineering Science, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2013.

[84] E. Lecoq, "Traitement préventif antifongique du pin maritime par post-décharge DBD à la pression atmosphérique et étude de l'action directe des post-décharges sur les champignons de bleuissement du bois," Physique, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2009.

[85] M. Laroussi and T. Akan, "Arc-Free Atmospheric Pressure Cold Plasma Jets: A Review," *Plasma Process. Polym.*, vol. 4, no. 9, pp. 777–788, 2007.

[86] S. Bhatt, J. Pulpytel, S. Mori, M. Mirshahi, and F. Arefi-Khonsari, "Cell Repellent Coatings Developed by an Open Air Atmospheric Pressure Non-Equilibrium Argon Plasma Jet for Biomedical Applications," *Plasma Process. Polym.*, vol. 11, no. 1, pp. 24–36, 2014.

[87] J. L. Walsh and M. G. Kong, "Contrasting characteristics of linear-field and cross-field atmospheric plasma jets," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 93, no. 11, p. 111501, 2008.

[88] D. Ben Salem, J. Pulpytel, F. Pillier, A. Pailleret, and F. Arefi-Khonsari, "Amorphization and Polymorphism Modification of Polyamide-6 Films via Open-Air Non-Equilibrium Atmospheric Pressure Plasma Jet Treatment," *Plasma Process. Polym.*, vol. 11, no. 10, pp. 961–973, 2014.

[89] D. P. Dowling, F. T. O'Neill, V. Milosavljevic, and V. J. Law, "DC Pulsed Atmospheric-Pressure Plasma Jet Image Information," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 39, no. 11, pp. 2326–2327, 2011.

- [90] R. Dorai and M. J. Kushner, "A model for plasma modification of polypropylene using atmospheric pressure discharges," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 6, p. 666, 2003.
- [91] N. Encinas, B. D'Áz-Benito, J. Abenojar, and M. A. Mart'Ánez, "Extreme durability of wettability changes on polyolefin surfaces by atmospheric pressure plasma torch," *Surf. Coat. Technol.*, vol. 205, no. 2, pp. 396–402, 2010.
- [92] N. Encinas, J. Abenojar, and M. A. Mart'Ánez, "Development of improved polypropylene adhesive bonding by abrasion and atmospheric plasma surface modifications," *Int. J. Adhes. Adhes.*, vol. 33, no. 0, pp. 1–6, 2011.
- [93] N.-Y. Cui and N. M. D. Brown, "Modification of the surface properties of a polypropylene (PP) film using an air dielectric barrier discharge plasma," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 189, no. 1 et 2, pp. 31–38, 2002.
- [94] Y. Akishev, M. Grushin, N. Dyatko, I. Kochetov, A. Napartovich, N. Trushkin, T. M. Duc, and S. Descours, "Studies on cold plasma–polymer surface interaction by example of PP- and PET-films," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 41, no. 23, p. 235203, 2008.
- [95] A. Sarani, A. Y. Nikiforov, N. De Geyter, R. Morent, and C. Leys, "Surface modification of polypropylene with an atmospheric pressure plasma jet sustained in argon and an argon/water vapour mixture," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 20, pp. 8737–8741, 2011.
- [96] V. Fombuena, J. Balart, T. Boronat, L. Sánchez-Nácher, and D. Garcia-Sanoguera, "Improving mechanical performance of thermoplastic adhesion joints by atmospheric plasma," *Mater. Des.*, vol. 47, pp. 49–56, 2013.
- [97] F. Poncin-Epaillard, J. C. Brosse, and T. Falher, "Cold plasma treatment: Surface or bulk modification of polymer films?," *Macromolecules*, vol. 30, no. 15, pp. 4415–4420, 1997.
- [98] O. Carton, D. Ben Salem, S. Bhatt, J. Pulpytel, and F. Arefi-Khonsari, "Plasma Polymerization of Acrylic Acid by Atmospheric Pressure Nitrogen Plasma Jet for Biomedical Applications," *Plasma Process. Polym.*, vol. 9, no. 10, pp. 984–993, 2012.
- [99] Z.-M. Liu, S. Tingry, C. Innocent, J. Durand, Z.-K. Xu, and P. Seta, "Modification of microfiltration polypropylene membranes by allylamine plasma treatment: Influence of the attachment route on peroxidase immobilization and enzyme efficiency," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 39, no. 4, pp. 868–876, 2006.
- [100] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, 2013.
- [101] B. Johnsson, S. Löfas, and G. Lindquist, "Immobilization of Proteins to a Carboxymethyldextran-Modified Gold Surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface Plasmon Resonance Sensors," *Anal. Biochem.*, no. 198, pp. 268–277, 1991.
- [102] S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J. N. Chazalviel, A. C. Gouget-

- Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, and N. Gabouze, "Semi-quantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces," *Langmuir*, vol. 26, no. 2, pp. 809–814, 2009.
- [103] Y. Yamamoto, Y. Nagasaki, M. Kato, and K. Kataoka, "Surface charge modulation of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles: conjugation of charged peptides," *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 16, no. 1–4, pp. 135–146, 1999.
- [104] M. Bagheri, M. Beyermann, and M. Dathe, "Immobilization Reduces the Activity of Surface-Bound Cationic Antimicrobial Peptides with No Influence upon the Activity Spectrum," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 3, pp. 1132–1141, 2009.
- [105] A. Abbas, D. Vercaigne-Marko, P. Supiot, B. Bocquet, C. Vivien, and D. Guillochon, "Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine," *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 73, no. 2, pp. 315–324, 2009.
- [106] C. Vreuls, G. Zocchi, B. Thierry, G. Garitte, S. S. Griesser, C. Archambeau, C. V. de Weerd, J. Martial, and H. Griesser, "Prevention of bacterial biofilms by covalent immobilization of peptides onto plasma polymer functionalized substrates," *J. Mater. Chem.*, vol. 20, no. 37, pp. 8092–8098, 2010.
- [107] D. Duday, C. Vreuls, M. Moreno, G. Frache, N. D. Boscher, G. Zocchi, C. Archambeau, C. Van De Weerd, J. Martial, and P. Choquet, "Atmospheric pressure plasma modified surfaces for immobilization of antimicrobial nisin peptides," *Surf. Coat. Technol.*, vol. 218, pp. 152–161, 2013.
- [108] "COUNCIL DIRECTIVE n° 76/768/EC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products - Amended on 01 March 2010," *Official Journal of the European Communities*, 2010.
- [109] H. C. Neu, "The Crisis in Antibiotic Resistance," *Science*, vol. 257, no. 5073, pp. 1064–1073, 1992.
- [110] P. S. Stewart and J. William Costerton, "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms," *The Lancet*, vol. 358, no. 9276, pp. 135–138, 2001.
- [111] S. P. Yazdankhah, A. A. Scheie, E. A. Høiby, B.-T. Lunestad, E. Heir, T. Ø. Fotland, K. Naterstad, and H. Kruse, "Triclosan and Antimicrobial Resistance in Bacteria: An Overview," *Microb. Drug Resist.*, vol. 12, no. 2, pp. 83–90, 2006.
- [112] S. Degoutin, M. Jimenez, M. Casetta, S. Bellayer, F. Chai, N. Blanchemain, C. Neut, I. Kacem, M. Traisnel, and B. Martel, "Anticoagulant and antimicrobial finishing of non-woven polypropylene textiles," *Biomed. Mater.*, vol. 7, no. 3, p. 035001, 2012.
- [113] D. Nithyakalyani, T. Ramachandran, R. Rajendran, and M. Mahalakshmi,

“Assessment of antibacterial activity of herbal finished surface modified polypropylene nonwoven fabric against bacterial pathogens of wound,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 129, no. 2, pp. 672–681, 2013.

[114] AATCC Committee RA31, “AATCC Test Method 100-2012 Antibacterial Finishes on Textile Materials.” 1961.

[115] “ISO 22196:2007.” Afnor, 2011.

**CHAPITRE II : INTRODUCTION DE GROUPEMENTS  
FONCTIONNELS EN SURFACE DU  
POLYPROPYLENE PAR DES PROCÉDÉS PLASMA À  
PRESSION ATMOSPHERIQUE**

## Introduction

Les procédés plasma à pression atmosphérique permettent d'introduire, en surface de matériaux polymère inertes, des groupements chimiques réactifs, conférant au matériau des propriétés particulières, et notamment une réactivité permettant l'immobilisation de peptides par liaisons covalentes.

L'objectif de ce chapitre est d'identifier les paramètres permettant d'activer la surface d'échantillons en PP, et de caractériser le traitement d'un point de vue physico-chimique, afin d'envisager la possibilité de greffer des peptides.

À la suite de la description des appareils et des protocoles, nous déterminerons dans un premier temps les propriétés physiques des matériaux traités, en particulier l'énergie de surface grâce à la mesure de l'angle de contact. La composition chimique des surfaces traitées sera ensuite analysée à l'aide de techniques de spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier (FTIR), et spectroscopie photoélectronique à rayon X (XPS), ainsi qu'avec des techniques de dérivation chimique des fonctions surfaciques réactives telles que les acides carboxyliques et aldéhydes.

Concernant l'activation de la surface par plasma d'air à la pression atmosphérique, l'effet du traitement sera également mis en relation avec l'étude par spectroscopie d'émission optique du plasma.

L'analyse transversale de ces résultats nous permettra de retenir les meilleures conditions possibles pour l'immobilisation de biomolécules sur une surface de polypropylène.

Ces résultats seront également comparés au dépôt d'acide acrylique par plasma qui permet l'introduction de groupements fonctionnels de type acide carboxylique sur la surface.

# **1 Activation par torche plasma à pression atmosphérique : Protocole expérimental**

Comme vu précédemment, le procédé retenu pour ces travaux est de type « torche » à plasma à la pression atmosphérique. Le traitement d'une surface par cette technologie permet de créer en surface des fonctions chimiques, généralement oxygénées pour un plasma d'air, à la pression atmosphérique, ce qui a pour effet de rendre réactif un matériau inerte comme le polypropylène.

Comme nous avons vu dans le chapitre précédent, il existe deux types de torche à plasma à la pression atmosphérique également appelés jet plasma à la pression atmosphérique (APPJ) : la torche DBD et la torche à l'arc. Cette dernière présente une température du gaz qui est nettement plus importante que les torches DBD qui sont considérées comme des plasmas froids, très utilisés dans le domaine biomédical [1]–[3].

## **1.1 Montage expérimental**

La torche à plasma utilisée pour ce projet est fabriquée par la société Plasmatrete GmbH, et est constituée d'une électrode haute tension de forme conique, incluse dans un cylindre concentrique qui joue le rôle de contre-électrode (Figure II.32). Le gaz plasmagène circule à haut débit (2400 L/h) dans ce cylindre et le plasma est allumé à l'aide d'un arc électrique pulsé, rotatif, créé entre les 2 électrodes. L'alimentation de l'électrode haute tension est gérée par un générateur haute tension, permettant de contrôler les paramètres électriques de la décharge. La buse rotative est animée par un moteur qui la fait tourner à 2900 tours par minutes. Ce type de jet de plasma peut atteindre une température de translation de 1700K (environ 1430°C) à la sortie de la buse [1], [4].

Le substrat est positionné sur un chariot mobile qui passe en dessous de la torche, et dont la vitesse de déplacement va de 0 à 50 m/min. La distance entre la torche et le substrat peut également être contrôlée et est typiquement comprise entre 5 et 15 mm.

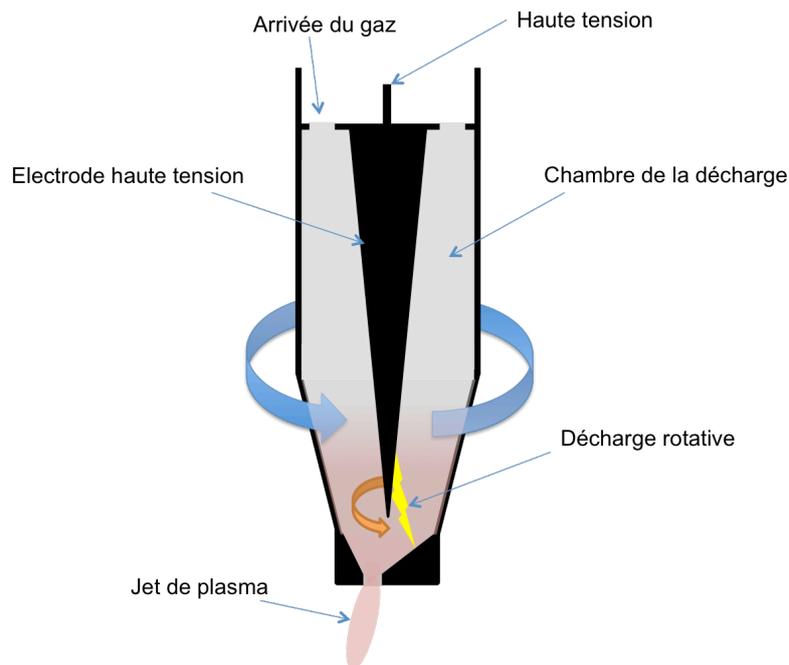


Figure II.32 - Schéma d'une torche plasma rotative à la pression atmosphérique

### 1.2 Contrôle des conditions de traitement

Plusieurs paramètres peuvent être modifiés, permettant de jouer avec les différents effets du plasma (chimique ou thermique) dans le but d'obtenir l'activation la plus adéquate pour réaliser par la suite l'immobilisation de peptides.

#### 1.2.1 Nature du gaz plasmagène

La nature du gaz détermine la composition chimique du plasma, et peut avoir une influence sur la nature des groupements chimiques identifiés en surface du matériau traité. Dans la perspective d'un procédé industriel, le critère économique doit être pris en compte au moment de choisir le gaz à utiliser.

#### 1.2.2 Fréquence de l'arc électrique

La tension délivrée à l'électrode haute tension est en courant continu (DC), pulsé à une fréquence qui varie entre 19 et 23 kHz. Cette fréquence régule donc le nombre d'impulsions pendant une durée donnée. Plus la fréquence d'impulsion est importante, plus la puissance délivrée au plasma est grande.

### 1.2.3 Plasma Cycle Time (PCT)

Le PCT est un paramètre qui contrôle la durée d'allumage de l'arc électrique. La valeur du PCT est déterminée par la relation suivante :

$$PCT (\%) = 100 \cdot \frac{t_{ON}}{t_{OFF}}$$

Équation II.1 - Expression du Plasma Cycle Time

Avec  $T_{ON}$  la durée de l'allumage de l'arc électrique, et  $T_{OFF}$  la durée pendant laquelle l'arc n'est pas allumé. A une fréquence 20 kHz, la période du signal est de  $50\mu s$ . À un PCT de 100%, l'impulsion va durer  $25\mu s$ .

Pour le traitement, théoriquement plus le PCT est important, plus la puissance délivrée au plasma est importante, et donc plus le plasma est énergétique. Toutefois, expérimentalement il s'avère que sur la gamme de 0 à 100% du PCT, l'appareil ne produit que 2 régimes de puissance bien distincts, comme le montre la Figure II.33. Entre 10 et 40% de PCT, le courant à l'électrode haute tension, lu sur l'écran de contrôle de l'appareil, se situe autour de 14 A, alors qu'entre 70 et 100%, il est observé aux alentours de 19 A. Ce comportement est inhérent à l'appareil, et il est impossible de s'affranchir de ce comportement, il devient alors inutile de sonder l'intégralité de la gamme du PCT. Pour la suite des expériences, le PCT a été fixé à 80%.

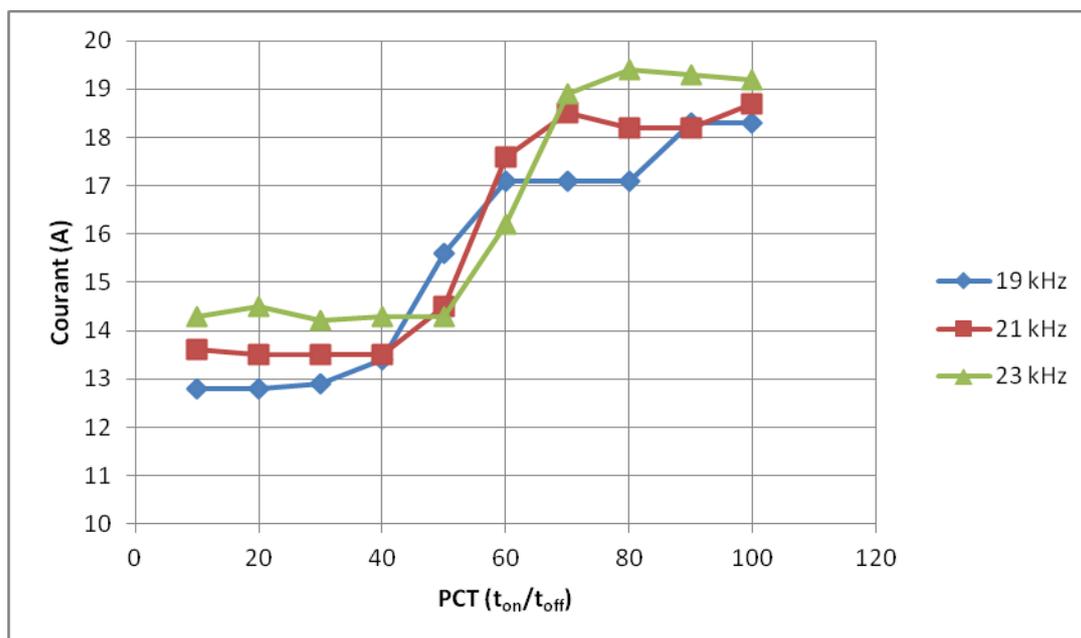


Figure II.33 – Mesure du courant à l'électrode haute tension en fonction du PCT, pour 3 fréquences différentes

### 1.2.4 Distance torche-substrat

La distance entre la sortie de la torche et le substrat est un paramètre très important dans le procédé de traitement de surface. En effet, ce paramètre permet de contrôler à la fois l'effet thermique du plasma sur l'échantillon puisque le gaz se refroidit par convection dans l'air environnant à un rythme compris entre 15 et 26K par mm comme l'ont montré Pulpytel *et al.* (2011, [4]), et également la chimie du plasma car la composition du gaz peut varier dans l'espace, entre la sortie de la torche et des distances s'étalant de 5 à 20 mm de celle-ci.

### 1.2.5 Vitesse de balayage de l'échantillon

Comme décrit précédemment, l'échantillon est placé sur un chariot mobile dont la vitesse peut varier. Elle détermine le temps de traitement de chaque échantillon, et donc le temps de contact entre le plasma et l'échantillon. C'est ici un moyen de contrôler l'effet thermique du gaz sur l'échantillon.

## 1.3 Dépôt d'acide acrylique par jet de plasma de type DBD

Les dépôts de couches polymères sont possibles avec la technologie plasma, y compris à la pression atmosphérique. Le montage de Bhatt *et al.* (2014, [5]) décrit dans le chapitre I.3.2, et représenté dans la Figure II.34 ci-dessous.

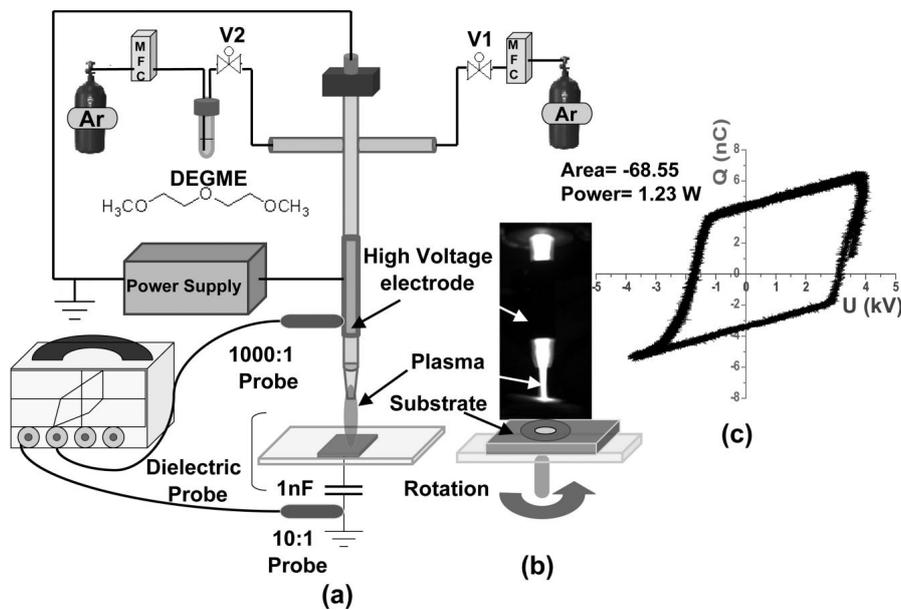


Figure II.34 – Montage expérimental d'une torche à plasma DBD à la pression atmosphérique pour le dépôt de polymère de type PEG [5].

Ce montage a été repris à l'identique, avec de l'acide acrylique comme précurseur, afin d'obtenir un dépôt d'acide acrylique polymérisé par plasma sur les échantillons de polypropylène. L'utilisation de l'acide acrylique comme monomère a pour but d'enrichir fortement la surface en acides carboxyliques (Figure II.35) afin d'y greffer par la suite des biomolécules.

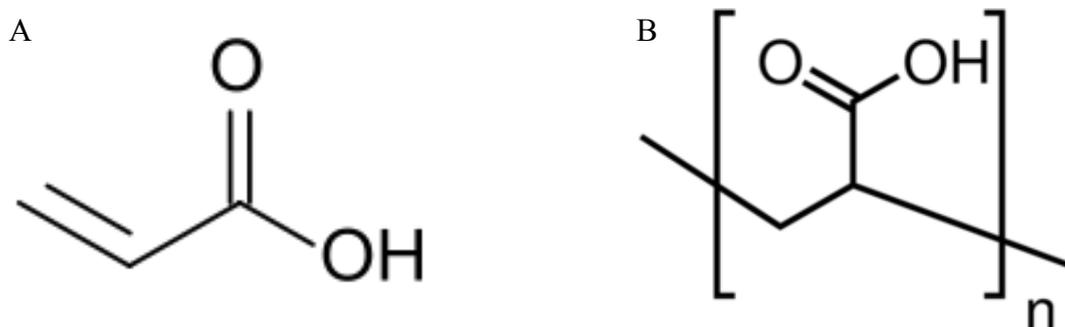


Figure II.35 – (A) Monomère d'acide acrylique, (B) motif de poly (acide acrylique) polymérisé par voie traditionnelle

## **2 Caractérisation d'une surface traitée par torche plasma à la pression atmosphérique**

L'objectif de ces travaux est d'identifier les meilleures conditions de traitement pour introduire des groupements chimiques réactifs tels que les aldéhydes et les acides carboxyliques, en vue de l'immobilisation de biomolécules à la surface des échantillons, et ce en étudiant l'impact des paramètres décrits ci-dessus sur l'activation par plasma.

### **2.1 Méthodes de caractérisation**

Les matériaux fonctionnalisés durant ce projet sont caractérisés selon les méthodes classiques de caractérisation de surface : calcul de l'énergie de surface par mesure de l'angle de contact, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS). Ces techniques sont décrites en annexe, les appareils utilisés sont décrits ci-dessous.

#### **2.1.1 Spectromètre infrarouge**

Le spectromètre IR utilisé pendant ce projet, Tensor 27 de Bruker est équipé d'un accessoire ATR MIRacle de Pike, comprenant un cristal de Germanium ( $n = 4,0$ ). L'angle d'incidence du faisceau est de  $45^\circ$ , et la gamme spectrale s'étend de  $900$  à  $4500 \text{ cm}^{-1}$ .

#### **2.1.2 Spectromètre photoélectronique à rayons X**

Les spectres XPS étudiés durant cette thèse sont collectés sur un spectromètre photoélectronique à rayons X Omicron (ESCA +), les rayons X sont générés par une source Al K $\alpha$  ( $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$ ). Les énergies de liaisons sont calibrées en utilisant la composante principale de la bande C1s ( $E_{\text{liaison}} = 285 \text{ eV}$ ). Les spectres sont édités et décomposés en utilisant le logiciel Casa XPS.

#### **2.1.3 Profondeur de pénétration des analyses**

Dans l'analyse de surfaces de matériaux, la notion de profondeur de pénétration des faisceaux (photons, électrons) dans les échantillons à sonder est importante. Une profondeur de

pénétration élevée analysera une plus grande partie du cœur du matériau, au détriment de la surface. Les signaux spectraux issus de la surface du matériaux en seront diminués.

La profondeur de pénétration ( $d_p$ ) du rayonnement infrarouge en ATR est définie par la relation suivante :

$$d_p = \frac{1}{2\pi\nu n_1 \sqrt{\sin^2\theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}$$

Équation II.2 - Expression de la profondeur de pénétration d'une onde infrarouge en fonction de la longueur d'onde, de l'angle d'incidence et de l'indice de réfraction du milieu

Avec  $\nu$  le nombre d'onde du rayonnement ( $\text{cm}^{-1}$ ),  $\theta$  l'angle d'incidence du faisceau par rapport à la normale à la surface,  $n_1$  et  $n_2$  les indices de réfraction, respectivement, du cristal et de l'échantillon [6].

La profondeur de pénétration de l'onde à  $1700 \text{ cm}^{-1}$  (5882 nm) dans différents matériaux est reportée dans le Tableau II.2:

Tableau II.2 - Profondeur de pénétration d'une onde infrarouge en ATR avec une incidence de  $45^\circ$  dans des matériaux d'indice de réfraction différents

Matériau	Indice de réfraction	Profondeur de pénétration à $1700 \text{ cm}^{-1}$ (nm)
Verre Pyrex	1,47	387
Or	1,12	360
Polycarbonate	1,59	400
PP	1,49	389

Assurément, la profondeur est assez importante par rapport à l'épaisseur d'un traitement de surface ou d'une monocouche de protéines (quelques nanomètres), ce qui fait qu'une analyse de l'extrême surface ne pourra pas être faite de façon rigoureuse avec cette seule technique. Les liaisons chimiques présentes en surface ne représenteront qu'une faible proportion du signal renvoyé par le matériau en ATR. De plus, l'intensité du signal reçu dépend également de la pression appliquée sur l'échantillon lors de l'analyse. Le matériel utilisé lors de cette thèse ne permettant pas de la contrôler, les analyses réalisées par cette méthode ne pourront pas être quantitatives. La spectroscopie ATR-FTIR présente tout de même l'avantage de

pouvoir être réalisée en routine dans le but de vérifier l'état de surface du matériau après traitement par torche plasma à la pression atmosphérique.

La spectroscopie XPS permet d'analyser des matériaux sur une profondeur de 10 nm, ce qui est beaucoup plus adapté pour l'étude de phénomènes de surface.

## 2.2 Choix du gaz plasmagène

Le gaz utilisé pour créer le plasma influe fortement sur les espèces chimiques du plasma, et donc la réactivité de celui-ci sur d'une surface. Dans le domaine des plasmas à la pression atmosphérique, et pour de l'activation de surface, deux phénomènes distincts sont susceptibles de réduire la distinction entre les effets des différents gaz. L'air ambiant, situé à proximité du jet de plasma peut être en partie entraîné par le jet, à cause du fort débit de plasma. De ce fait, quel que soit le gaz plasmagène utilisé, le plasma s'enrichit en oxygène, comme pourrait l'être un plasma d'air. De plus, des phénomènes de post-oxydation se produisent sur le matériau après le traitement, au contact de l'air ambiant.

Trois gaz ont été utilisés sur la torche plasma et étudiés par OES, leur effet sur du PP a été analysé par FTIR. L'objectif est d'identifier le ou les gaz les plus appropriés pour oxyder la surface d'un polymère, notamment pour créer des groupements carbonyles C=O, et plus particulièrement des acides carboxyliques.

### 2.2.1 Gaz et mélanges gazeux utilisés

Les gaz utilisés sont décrits dans le Tableau II.3 :

Tableau II.3 – Liste des gaz testés par plasma à la pression atmosphérique

Gaz	Composition	Fournisseur
Air	N <sub>2</sub> : 78% O <sub>2</sub> : 22%	Circuit d'air comprimé du laboratoire
Azote (ALPHAGAZ 1)	N <sub>2</sub> : 100%	Air Liquide
Mélange Azote / Hydrogène	N <sub>2</sub> : 97% H <sub>2</sub> : 3%	Air Liquide

L'air, l'azote et un mélange azote / hydrogène (3%) ont été testés comme gaz plasmagène pour la génération du plasma dans la torche. L'air et l'azote possèdent l'avantage de leur disponibilité et de leur faible coût. Le mélange azote/hydrogène a été choisi pour enrichir le plasma en hydrogène, en espérant favoriser la formation des acides carboxyliques en surface.

Des gaz comme l'hélium ou l'argon sont trop onéreux pour être utilisés dans un procédé où le débit atteint 2400 L/h. Les gaz inflammables, combustibles ou corrosifs, comme l'hydrogène pur ou l'oxygène pur, ne sont pas envisageables sur un procédé Open Air, pour des raisons de sécurité.

### 2.2.2 Diagnostic plasma par OES

La spectroscopie d'émission optique nous a permis d'identifier les espèces chimiques émissives qui composent le plasma issu des gaz choisis, dans des conditions de traitement choisies arbitrairement, représentant possiblement des conditions de traitement de polymères.

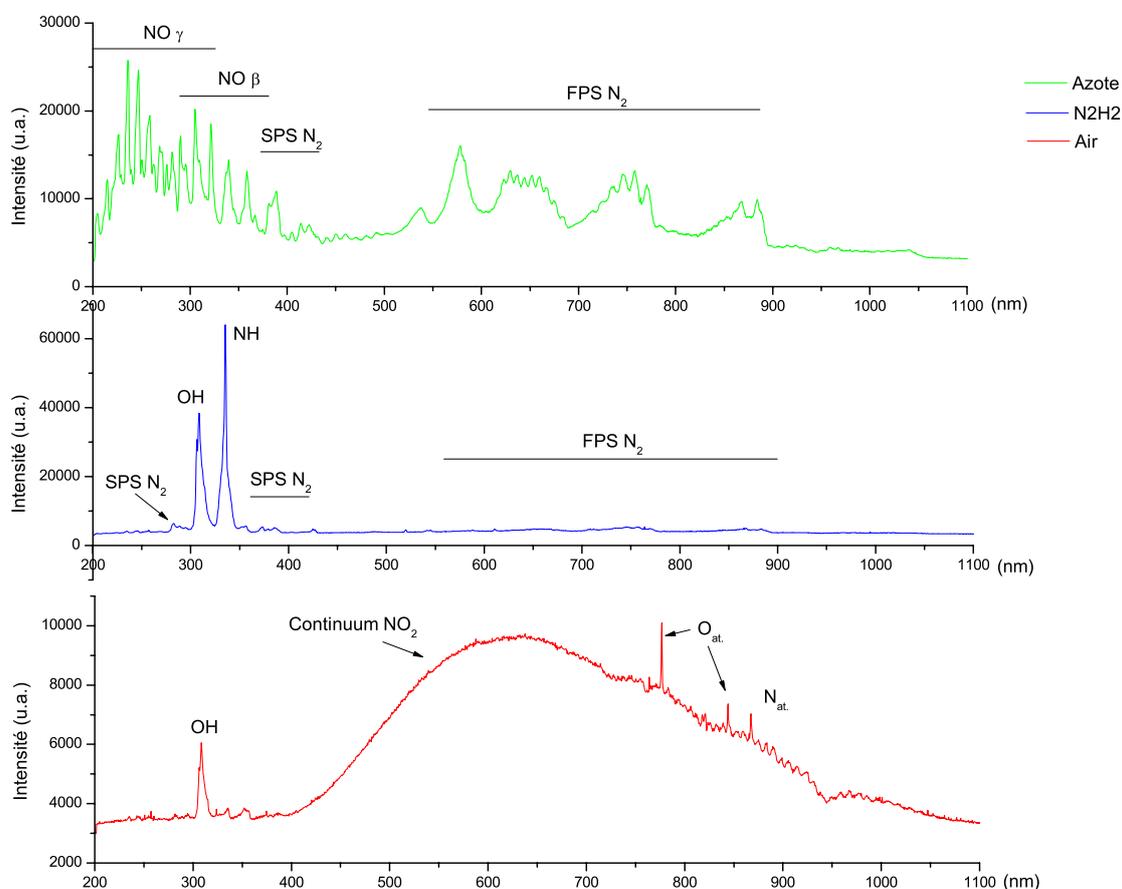


Figure II.36 – Spectres OES d'un plasma d'air (—), d'azote (—), et d'un mélange  $\text{N}_2/\text{H}_2$  (3%) (—)  
Conditions d'expériences : 21 kHz, 10 mm, PCT 100%

La Figure II.36 présente la comparaison des spectres OES des plasmas d'air, azote et N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>. La composition est complètement différente d'un plasma à un autre. Le plasma d'azote est principalement caractérisé par l'émission du N<sub>2</sub> et des radicaux NO\*. En revanche, le plasma d'air est dominé par le continuum de NO<sub>2</sub> qui s'étend sur tout le domaine visible (400 – 800 nm). Les radicaux OH\* à 309 nm, l'oxygène atomique à 777 nm et 844 nm, et l'azote atomique à 868 nm sont également détectés de façon nette (750 – 850 nm). En revanche, la transition de l'azote atomique située théoriquement n'apparaît pas.

Le plasma créé à partir du mélange N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> présente quant à lui un spectre où se distinguent particulièrement les transitions des radicaux OH\* à 309 nm, et une transition repérée à 336 nm, correspondant aux radicaux NH\* ainsi qu'à certaines transitions du second système positif de l'azote (C<sup>3</sup>Π vers B<sup>3</sup>Π).

### 2.2.3 Caractérisation de surface du polypropylène traité

Les trois plasmas étudiés présentent des compositions différentes, leur impact sur la surface du PP lors d'un traitement plasma est étudié par FTIR. Les spectres obtenus sont présentés dans les Figure II.37, Figure II.38 et Figure II.39 ci-dessous.

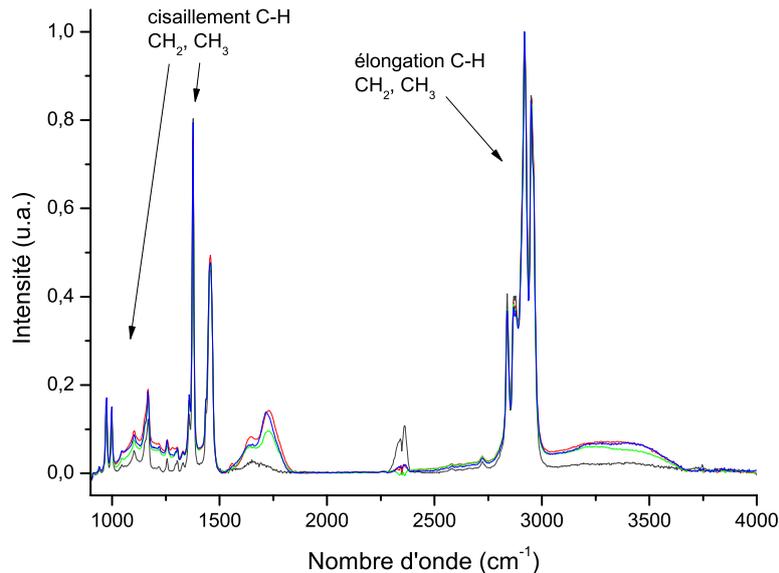


Figure II.37 – Spectre FTIR de polypropylène traité par plasma d'air (—), d'azote (—), et d'un mélange N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (3%) (—). Conditions de traitement : 21 kHz, 10 mm, 10 m/min. PP non traité (—).

Les bandes intenses dans la zone spectrale 2840 à 2960  $\text{cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations d'élongation de  $-\text{CH}_2$  et  $-\text{CH}_3$ , les vibrations de cisaillement de ces mêmes groupes sont repérées entre 1320 et 1480  $\text{cm}^{-1}$ . Ces bandes, ajoutées aux vibrations de déformation situées entre 900 et 1280  $\text{cm}^{-1}$ , correspondent à la signature spectrale du polypropylène [7], [8]. Celui-ci ne semble pas avoir subi de modification ou dégradation.

Deux larges bandes sont ensuite observées entre 1500 et 1900  $\text{cm}^{-1}$ , puis entre 3000 et 3900  $\text{cm}^{-1}$ . Des différences entre les traitements semblent apparaître dans ces zones, ce qui pourrait nous permettre de faire un choix parmi les gaz en vue de l'immobilisation de peptides.

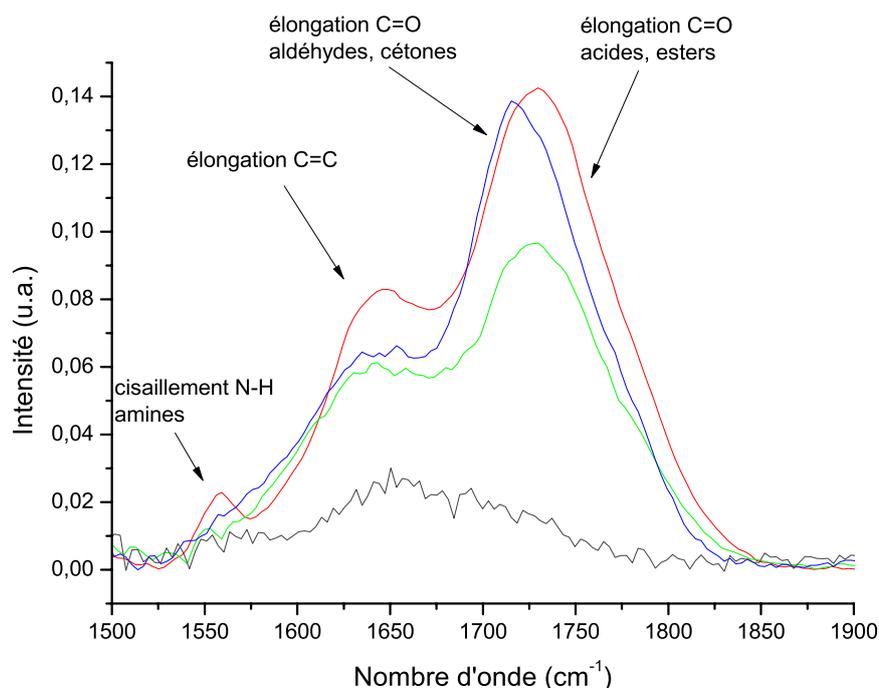


Figure II.38 – Portion de spectre FTIR de polypropylène traité par plasma d'air (—), d'azote (—), et d'un mélange  $\text{N}_2/\text{H}_2$  (3%) (—). Conditions de traitement : 21 kHz, 10 mm, 10 m/min. PP non traité (—).

La distinction entre les différentes liaisons chimiques dans la gamme 1500-1900  $\text{cm}^{-1}$  (Figure II.38) est difficile car on retrouve de nombreuses contributions. Toutefois, on pourra identifier les vibrations d'élongation de la liaison  $\text{C}=\text{O}$ , entre 1700 et 1850  $\text{cm}^{-1}$ , pour les cétones et aldéhydes vers 1700  $\text{cm}^{-1}$ , ainsi que les acides carboxyliques et ester aux alentours de 1750  $\text{cm}^{-1}$  [9]–[11]. Une bande, attribuée à la liaison  $\text{C}=\text{C}$ , est également observée à 1640  $\text{cm}^{-1}$  pour le traitement à 20 mm (en rouge) [12], témoin de la réticulation des chaînes polymères en surface du matériau, les processus de création d'insaturations et de réticulation étant des phénomènes synergiques [13].

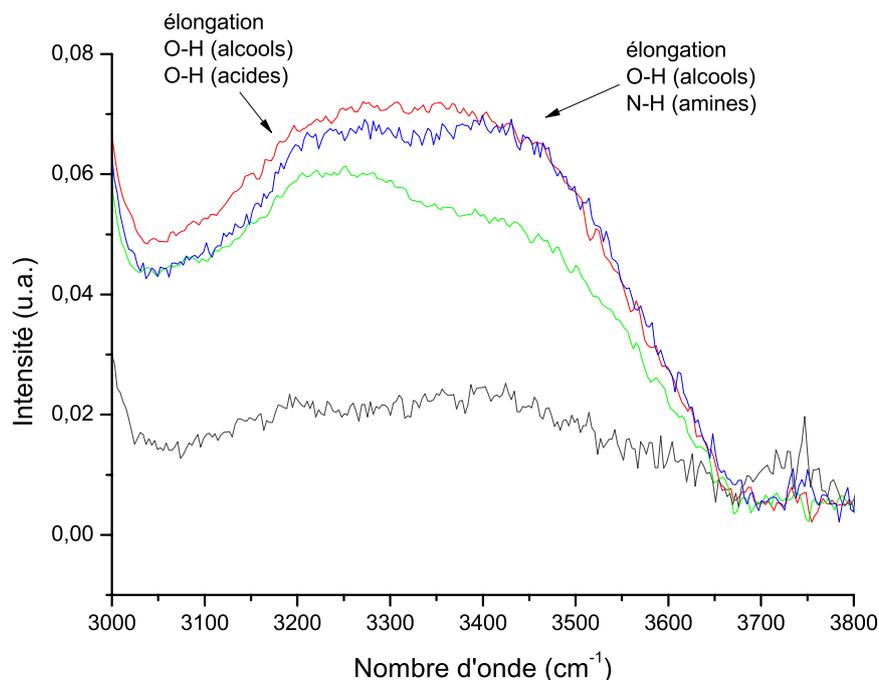


Figure II.39 – Portion de spectre FTIR de polypropylène traité par plasma d'air (—), d'azote (—), et d'un mélange  $N_2/H_2$  (3%) (—). Conditions de traitement : 21 kHz, 10 mm, 10 m/min. PP non traité (—).

La bande large repérée entre 3000 et 4000  $cm^{-1}$  (Figure II.39) correspond aux vibrations d'élongation des liaisons O-H des alcools et acides carboxyliques, et des liaisons N-H des amines.

En dépit de la différence de composition entre les plasmas étudiés, la nature des groupements chimiques, créés lors de l'interaction avec la surface du PP, reste commune aux trois traitements. Toutefois, l'échantillon traité par le plasma de  $N_2/H_2$  présente une bande de carbonyles (environ 1750  $cm^{-1}$ ) légèrement décalée vers les plus bas nombres d'onde, comparé au traitement au plasma d'air. Cela peut signifier que la fonctionnalisation au plasma d'air aboutit à la formation d'acides carboxyliques et esters, en plus grande quantité, leurs contributions étant communément identifiées au delà de 1715  $cm^{-1}$ .

Enfin, l'utilisation du plasma  $N_2/H_2$  ne permet pas d'observer la signature spectrale des amines, malgré la présence des radicaux  $NH^*$  dans le plasma. Ces fonctions ont probablement été oxydées lors du traitement ou en post-oxydation. Les amides potentiellement créés sont caractérisés par une bande intense à 1650  $cm^{-1}$ . Cette contribution ne peut pas être distinguée des autres carbonyles sur les spectres obtenus, ce qui ne permet pas de confirmer ou non leur présence, et donc l'oxydation d'amines.

La bande située entre 3000 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  présente un profil similaire pour les traitements au plasma d'air ou  $\text{N}_2/\text{H}_2$ . En revanche, le traitement au plasma d'azote apparaît comme le moins intéressant des trois d'un point de vue fonctionnalisation.

L'objectif du traitement par plasma étant la formation de groupements oxydés en surface du PP ( $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{OC}=\text{O}$ , etc.), l'utilisation de l'air apparaît comme la meilleure solution. En effet, le plasma d'air permet de générer des carbonyles et des alcools en surface du matériau. Le mélange  $\text{N}_2/\text{H}_2$  fonctionnalise également la surface avec des groupements oxygénés, mais ce mélange est plus coûteux et nécessite de s'approvisionner en bouteilles régulièrement, d'autant que la torche plasma utilisée fonctionne à un débit de 2400L/h.

Pour la suite des expériences, l'air sera utilisé comme gaz plasmagène.

### 2.3 Diagnostic plasma

#### 2.3.1 Précisions sur l'analyse spectrale

Expérimentalement, l'intensité d'une raie ou d'une bande est proportionnelle à la quantité totale de photons reçue pour chaque longueur d'onde (« counts ») :

$$\text{Intensité } (\lambda) \propto \text{Flux de photon} \times \text{temps d'intégration}$$

Or en fonction des conditions de traitement, notamment pour la distance torche-substrat (ici remplacée par la distance torche-fibre), l'intensité lumineuse du plasma varie fortement. Afin de conserver un rapport signal/bruit satisfaisant, il est nécessaire d'augmenter le temps d'intégration pour des distances importantes. Ainsi, afin de comparer l'ensemble des spectres, nous avons simplement calculé la grandeur  $I/t$  pour chaque espèce :

$$\frac{\text{Intensité } (\lambda)}{\text{Temps d'intégration}} \propto \text{Flux de photon } (\lambda)$$

Chaque spectre a donc été acquis pour cinq durées d'acquisition différentes : 50, 100, 250, 500 et 1000 ms (Figure II.40). On calcule ensuite la pente de la régression linéaire ( $I/t$ ) exprimée en counts/ms. Ce calcul très simple permet de comparer qualitativement l'ensemble des conditions opératoires en maximisant le rapport signal/bruit.

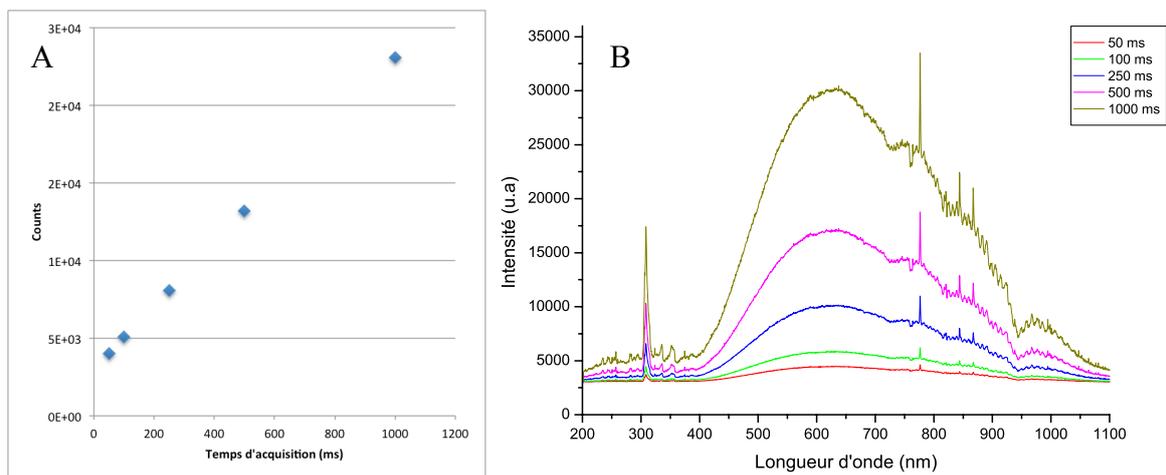


Figure II.40 –Évolution de l’intensité de (A) la raie d’oxygène (777nm) et (B) du spectre OES d’un plasma d’air en fonction du temps d’acquisition. Conditions d’analyse : 21 kHz, PCT 80 %.

L’analyse des spectres d’émission d’un plasma d’air à la pression atmosphérique permet d’identifier les espèces présentes dans le plasma (Figure II.41).

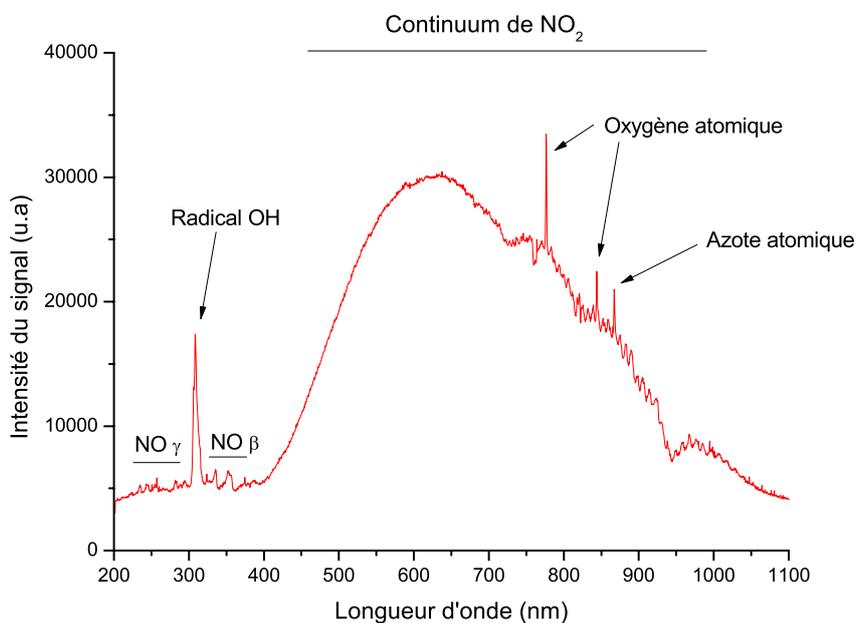


Figure II.41 - Spectre d’émission d’un plasma d’air à 10 mm de la torche. Conditions de traitement : 21 kHz, PCT 80 %.

Conformément au modèle de Dorai et Kushner (2003, [14]) les atomes d’oxygène et les radicaux hydroxyles sont observées, et ces 2 espèces sont les espèces majoritaires responsables de l’oxydation du polypropylène sous l’effet du plasma. De plus, la présence d’azote atomique, de NO<sup>•</sup> et NO<sub>2</sub> laisse supposer que de l’azote pourrait être retrouvé sur les surfaces de PP traitées par plasma d’air.

Pour étudier l'influence des paramètres du plasma sur la composition de celui-ci, l'évolution de l'intensité des bandes de l'oxygène atomique ( $O^*$ , 777nm) et de  $OH^*$  (309 nm) a donc été suivie par la méthode décrite précédemment.

### 2.3.2 Influence du PCT

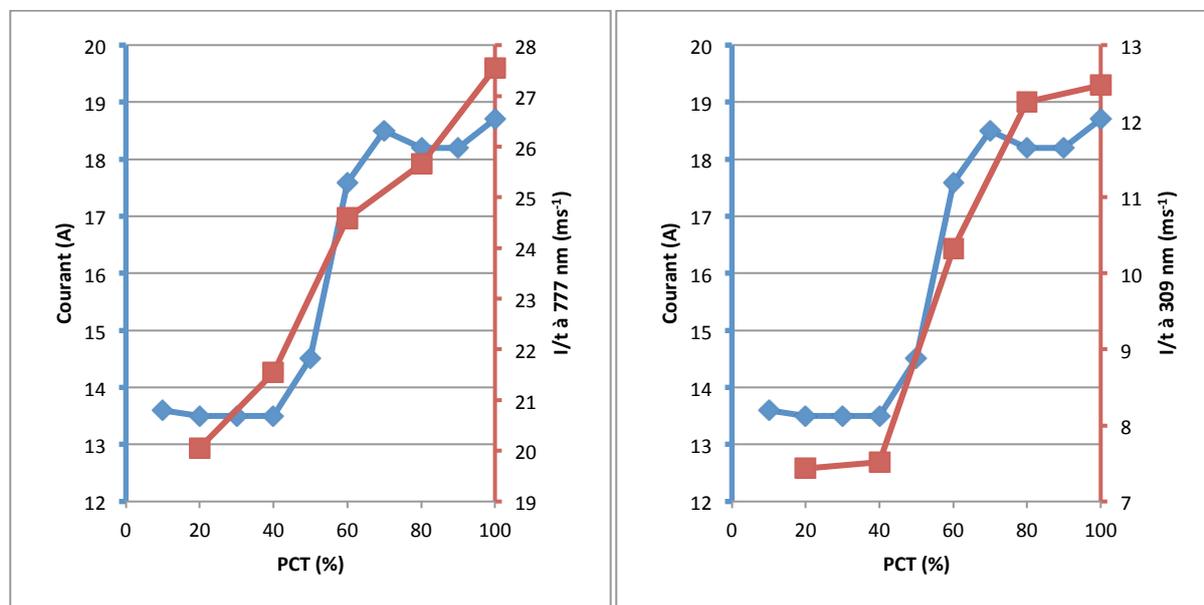


Figure II.42 - Évolution de I/t à 777 nm ( $O^*$ ) et 309 nm ( $OH^*$ ) en fonction du PCT de la torche plasma.

Gauche : (■) I/t à 777 nm, (◆) Courant électrique dans la torche.

Droite : (■) I/t à 309 nm, (◆) Courant électrique dans la torche.

Conditions d'analyse : 21 kHz, 10 mm.

La Figure II.42 ci-dessus présente l'évolution des rapports I/t de  $O^*$  et  $OH^*$  en fonction du PCT. Ces mesures sont mises en regard de l'évolution du courant relevé sur l'appareil selon le PCT. Si le rapport I/t des radicaux  $OH^*$  a un comportement parfaitement coordonné avec l'évolution du courant dans la torche, celui de  $O^*$  présente une croissance un peu plus linéaire avec le PCT.

L'augmentation du PCT, qui correspond à une augmentation de la puissance délivrée au plasma, implique une augmentation de la production d'espèces excitées, ce qui est bien observé expérimentalement. Concernant  $OH^*$ , au-delà de 80 % de PCT, I/t n'augmente pas, suivant le profil du courant à l'électrode. Au regard de ces résultats, le choix d'un PCT à 80 % apparaît comme un choix pertinent, cette valeur de PCT permettant de se placer dans la zone de plus grande réactivité chimique du plasma. Un PCT supérieur à 80% ne semble pas

permettre d'augmenter la réactivité de celui-ci, en revanche, cela pourrait augmenter l'usure des pièces (électrode, nez de la torche).

Pour la suite des expériences, le PCT sera fixé à 80%.

### 2.3.3 Influence de la fréquence

L'évolution de  $I/t$  pour  $O^*$  et  $OH^*$  en fonction de la fréquence de l'arc électrique est représentée dans la Figure II.43.  $I/t$  augmente de façon quasiment linéaire avec la fréquence de l'arc électrique, donc de la puissance délivrée : dans un même laps de temps, il y a un nombre d'impulsions plus grand si la fréquence augmente. Ce résultat est donc cohérent avec celui obtenu en augmentant le PCT. Plus la fréquence est importante, plus la quantité d'espèces réactives est importante.

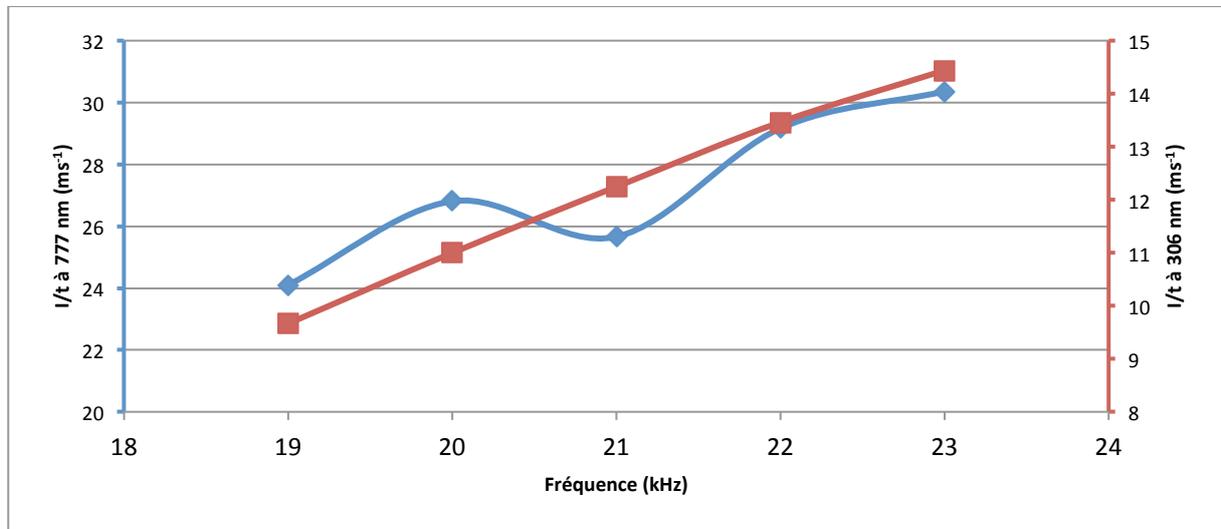


Figure II.43 - Évolution des rapports  $I/t$  pour  $O^*$  (◆) et  $OH^*$  (■) en fonction de la fréquence de l'arc électrique.

### 2.3.4 Influence de la distance torche-fibre optique

Les rapports  $I/t$  de  $O^*$  et  $OH^*$  diminuent fortement avec la distance. Plus on s'éloigne de la torche, plus les phénomènes de relaxation, de recombinaison, de collision sont nombreux sur le trajet des espèces. Dès lors, à plus grande distance ( $> 10$  mm), les espèces réactives présentes sont moins nombreuses, et également moins énergétiques (Figure II.44).

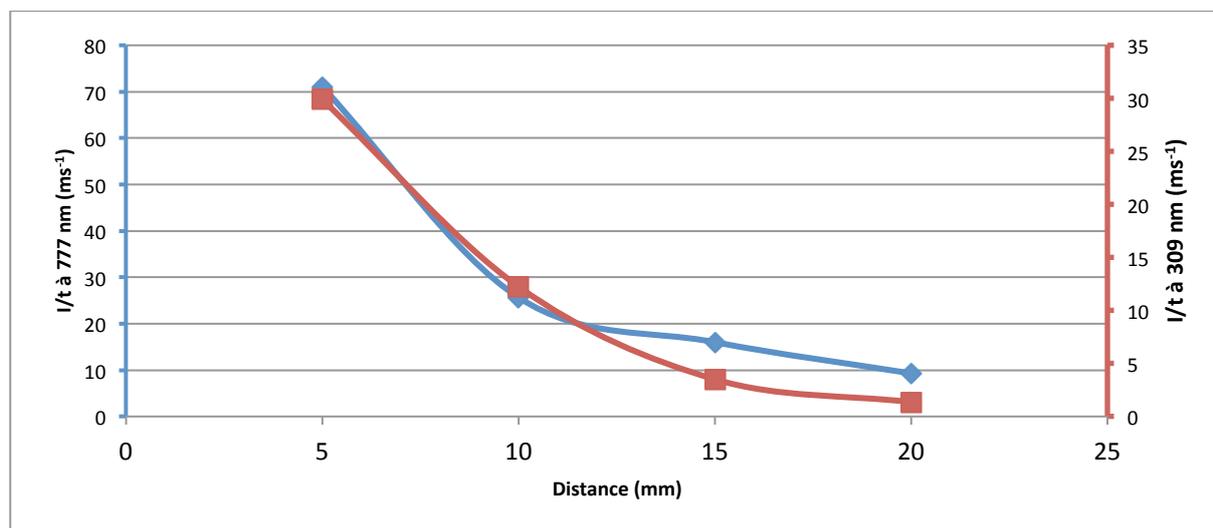


Figure II.44 – Évolution de I/t pour O\* (◆) et OH\* (■) en fonction de la distance torche-fibre optique.

L'utilisation de la spectroscopie d'émission nous a permis d'identifier les espèces présentes dans le plasma, et d'observer l'évolution des espèces O\* et OH\*. Ces espèces, attendues pour être responsables de l'oxydation de la surface du PP après traitement par plasma, sont largement dépendantes des paramètres de traitement (PCT, fréquence, distance). Pour optimiser l'interaction de ces espèces avec la surface du matériau à traiter, il semble préférable de travailler à faible distance et à fréquence élevée.

Ces conditions correspondent à des traitements forts, en terme de température de gaz, leur application sur un matériau polymère tel que le PP pourrait dégrader le matériau. La caractérisation de la surface du polypropylène traité par plasma pourrait nous apporter ces informations afin de déterminer les meilleures conditions pour l'introduction de groupements tels que les acides carboxyliques.

## 2.4 Influence du traitement sur l'énergie de surface du matériau

La mesure de l'angle de contact se fait par l'acquisition d'images de gouttes de liquide (4μL) déposées à la surface de chaque échantillon testé (3 échantillons par condition, 3 mesures par échantillon, chaque valeur est donc la moyenne de 9 acquisitions).



Figure II.45 - Clichés utilisés pour la mesure d'angles de contact. Ici une goutte d'eau sur un PP non traité (gauche), et sur un PP traité par plasma (droite).

Comme on peut l'observer sur la Figure II.45, le PP, matériau intrinsèquement hydrophobe (angle de contact mesuré à environ  $90^\circ$ , énergie de surface d'environ  $30 \text{ mJ/m}^2$ ), voit son hydrophobicité diminuer drastiquement avec le traitement, ce qui correspond à une augmentation de l'énergie de surface. On compare à présent l'énergie de surface d'échantillons traités selon les conditions présentées dans le Tableau II.4. La régression linéaire pour 4 conditions de traitements est présentée sur la Figure II.46.

Tableau II.4 - Paramètres de l'étude de l'énergie de surface

Paramètres	Valeurs
Fréquence (kHz)	19, 21, 23
Distance torche-substrat (mm)	5, 10, 15
Vitesse de traitement (m/min)	10, 15

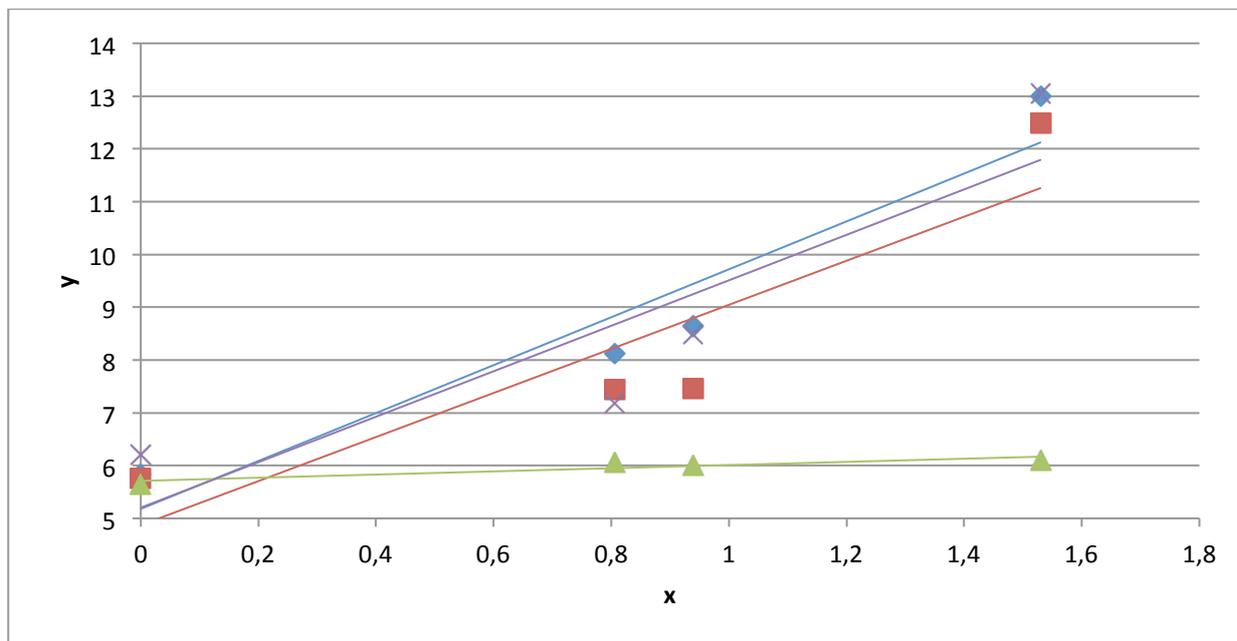


Figure II.46 - Régression linéaire pour le calcul de l'énergie de surface de différents PP traités

(▲) PP non traité, (◆) 19kHz, 10mm, 15m/min, (■) 19kHz, 5mm, 10m/min, (×) 23kHz, 15mm, 10m/min.

Dans un premier temps, c'est la distance torche-substrat qui est sondée, et comme le montre la Figure II.47, on obtient la plus haute énergie de surface pour 10 mm, avec environ  $50 \text{ mJ/m}^2$ , soit une augmentation de plus de 50% par rapport au PP non traité. On remarque également que l'énergie de surface obtenue après un traitement à 15 m/min semble supérieure à celle obtenue après un traitement à 10 m/min.

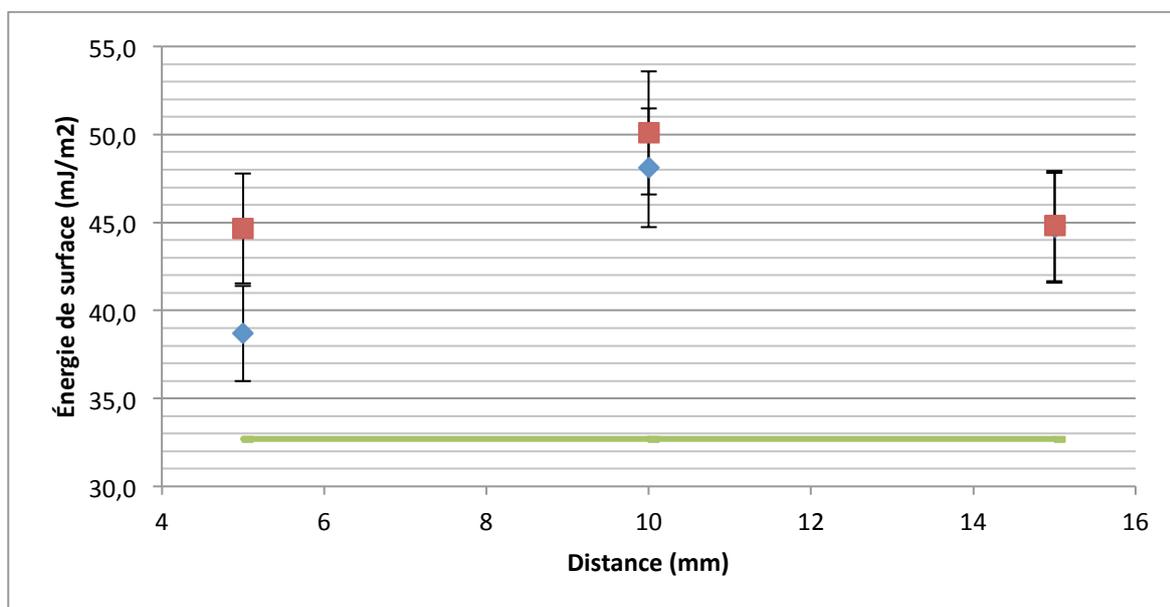


Figure II.47 - Evolution de l'énergie de surface un PP traité par plasma à 21 kHz, en fonction de la distance torche-substrat. (◆) 10 m/min. (■) 15 m/min. La ligne verte correspond à l'énergie de surface de PP non traité ( $32,7 \text{ mJ/m}^2$ ).

L'effet de la fréquence de l'arc électrique est ensuite évalué de la même manière, et les résultats sont présentés dans la Figure II.48. La plus haute énergie de surface est obtenue pour 21 kHz et 15 m/min. La plus faible l'a été avec un traitement à 5 mm de la torche et 10 m/min de vitesse de balayage, qui correspondent pourtant à des conditions plus dures et à un plasma plus riche en O\* et OH\*, attendues pour réaliser un traitement plus fort sur l'échantillon. Ce phénomène, qui devrait également être observé durant les analyses spectroscopiques ci-après, peut s'expliquer par une compétition entre activation et dégradation thermique du matériau, du fait de ses propriétés physiques particulières (Température de transition vitreuse : -15°C, Température de fusion : 150°C). Il s'agit donc de réussir à fonctionnaliser suffisamment le matériau sans le dégrader, ce qui semble être le cas à 10mm.

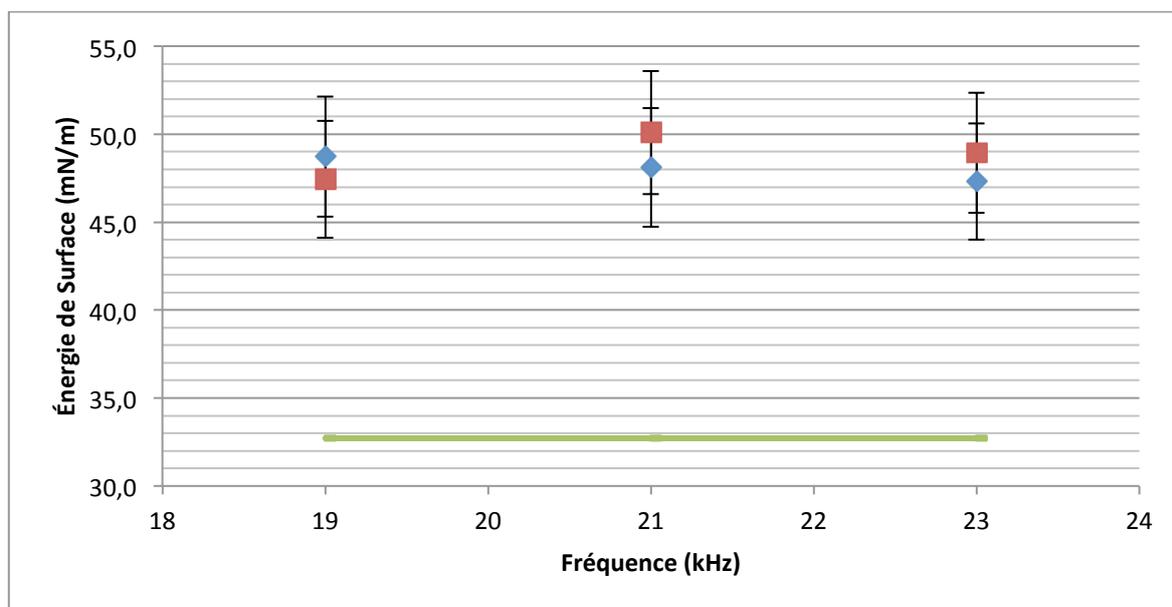


Figure II.48 - Évolution de l'énergie de surface d'un PP traité par plasma à 10 mm de la torche, en fonction de la fréquence de l'arc électrique. (◆) 10 m/min. (■) 15 m/min.

La ligne verte correspond au PP non traité (32,7 mJ/m<sup>2</sup>).

## 2.5 Caractérisations de surface d'échantillons traités par plasma par spectroscopie

L'information obtenue par le calcul de l'énergie de surface ne nous permet pas d'en savoir plus sur les fonctions chimiques introduites en surface du matériau après le traitement par plasma. Les techniques d'analyse par spectroscopie (FTIR, XPS) sont des méthodes non destructives, qui permettent d'obtenir des informations sur la composition chimique en surface et plus en profondeur de l'échantillon traité.

### 2.5.1 Modification de la cristallinité du matériau (FTIR)

Le polypropylène présente différentes phases structurales : la phase atactique, syndiotactique et isotactique (Figure II.49). La phase isotactique est capable de former des structures cristallines [15], tandis que la phase atactique est amorphe.

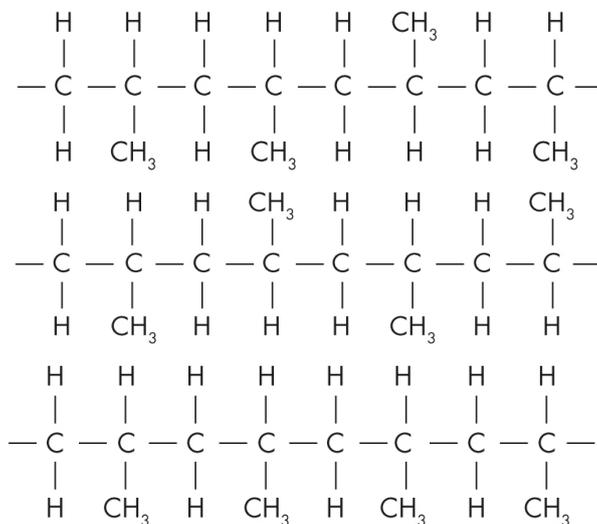


Figure II.49 – Différents isomères de constitution du polypropylène.

De haut en bas : PP atactique, PP syndiotactique, PP isotactique.

J.P. Luongo (1960, [7]) a réalisé une étude empirique concernant le lien entre les bandes à 974 et 997  $\text{cm}^{-1}$  observées sur le spectre infrarouge du polypropylène et la proportion de phase isotactique et atactique du matériau. L'étude de ces bandes infrarouge issues de différents PP (0, 20, 40, 60, 80 et 100% isotactique) a permis d'obtenir la courbe présentée dans la Figure II.50. Le calcul du ratio des intensités 997/974  $\text{cm}^{-1}$  est ensuite reporté sur la courbe, déterminant ainsi le pourcentage de phase atactique et isotactique.

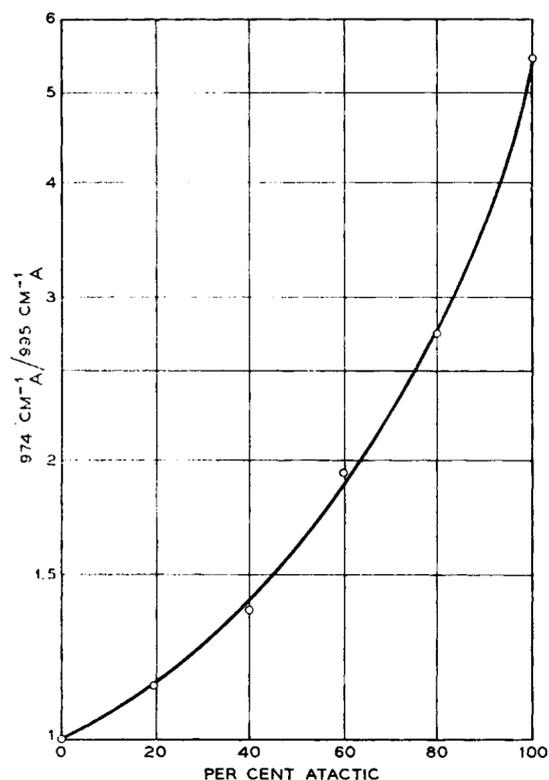


Figure II.50 - Courbe expérimentale obtenue par J.P. Luongo (1960, [7]) reliant le ratio des intensités des bandes infrarouge situées à 974 et 997  $\text{cm}^{-1}$ , et le pourcentage de phase cristalline (isotactique).

La mesure est réalisée pour différentes conditions d'activation, et les résultats sont reportés dans la Figure II.51 ci-dessous.

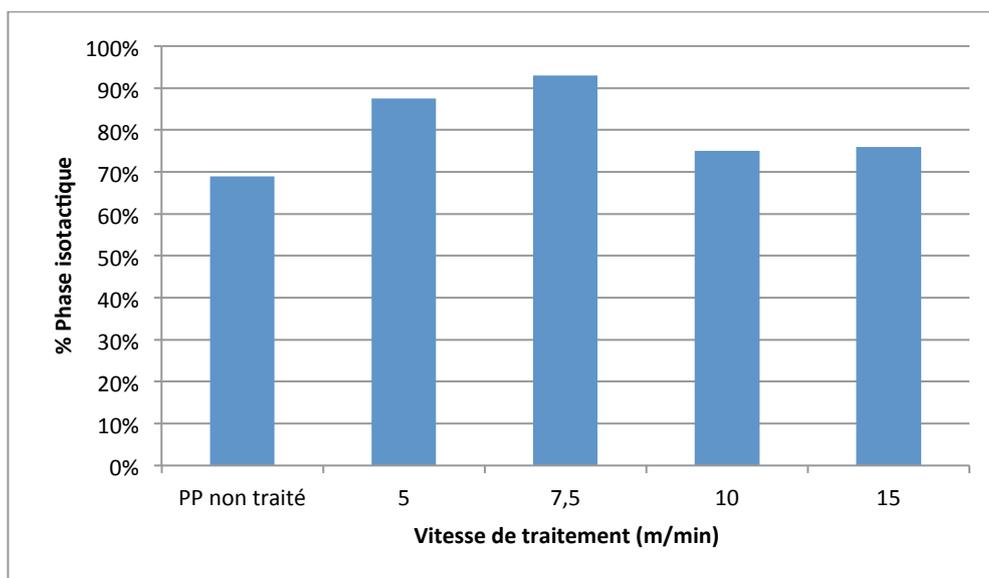


Figure II.51 – Évolution de la composition de phase de PP traité par plasma en fonction de la vitesse de balayage de l'échantillon. Conditions de traitement : 21 kHz, 10 mm.

Les traitements à plus faible vitesse (5 et 7,5 m/min) provoquent une augmentation importante du taux de cristallinité, passant de 69% pour le PP non traité, à 88 et 93% pour,

respectivement 5 et 7,5 m/min. Le même comportement est observé lorsque l'on fait varier la distance torche-substrat à vitesse de traitement constante : les distances les plus faibles correspondent aux taux de cristallinité les plus hauts.

Ces résultats peuvent résulter de l'effet thermique du plasma. En effet, les vitesses et distances les plus faibles correspondent aux traitements où le plasma, et en conséquence la surface, est à une température plus élevée puisque la torche est plus près de l'échantillon, et celui-ci passe plus de temps à portée du plasma. L'effet thermique du traitement augmente la mobilité des chaînes du polymère en apportant suffisamment d'énergie, sous forme de chaleur. Celles-ci ont donc la possibilité de se réarranger dans une configuration plus stable thermodynamiquement, c'est-à-dire la phase cristalline.

En revanche, comme le montre la Figure II.52, l'évolution de la cristallinité en fonction de la fréquence de l'arc électrique ne suit pas cette tendance. La fréquence de 21 kHz apparaît comme celle qui apporte le plus de modifications au niveau structural. Ce comportement est difficile à justifier puisqu'il est attendu que plus la fréquence est importante, plus la puissance délivrée par la décharge au plasma est importante.

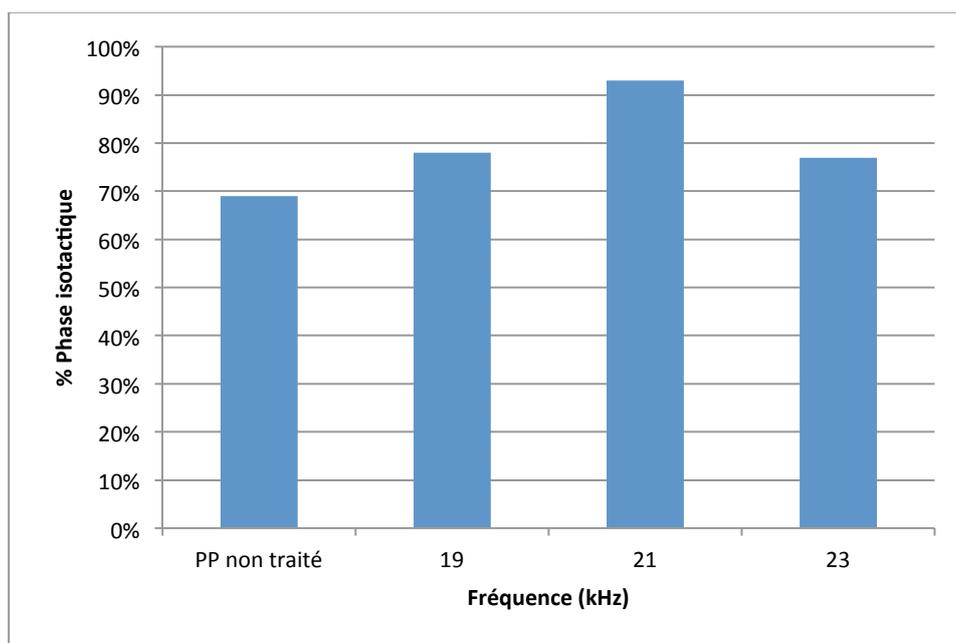


Figure II.52 - Impact de la fréquence de l'arc électrique sur le taux de cristallinité d'un PP traité par plasma.

L'étude de la composition cristalline du polypropylène par spectroscopie infrarouge a montré que le traitement par plasma à la pression atmosphérique modifiait la structure cristalline du propylène, augmentant le pourcentage de phase isotactique après traitement, notamment grâce à l'apport d'énergie sous forme de chaleur. L'augmentation de la phase cristalline de l'échantillon correspond à une augmentation de la stabilité physique du matériau, ce qui pourra être un atout par la suite, notamment vis à vis du vieillissement du traitement. Enfin, la profondeur de ces modifications ne dépassant pas  $10\mu\text{m}$  [3], [16], les propriétés mécaniques d'une pièce de plusieurs millimètres d'épaisseur ne devraient pas être modifiées.

## 2.5.2 Modification de la composition chimique de la surface

### 2.5.2.1 Spectroscopie FTIR

Le spectre présenté en Figure II.53 et qui compare 2 distances torche-substrat différentes, nous permet d'observer un comportement différent selon la distance de traitement, en particulier dans la gamme  $1500 - 1900\text{ cm}^{-1}$ . Les bandes C-H du polypropylène ne sont pas modifiées par le traitement, que ce soit au niveau de leur position ou de leurs intensités relatives, signe que le traitement ne dégrade pas le matériau.

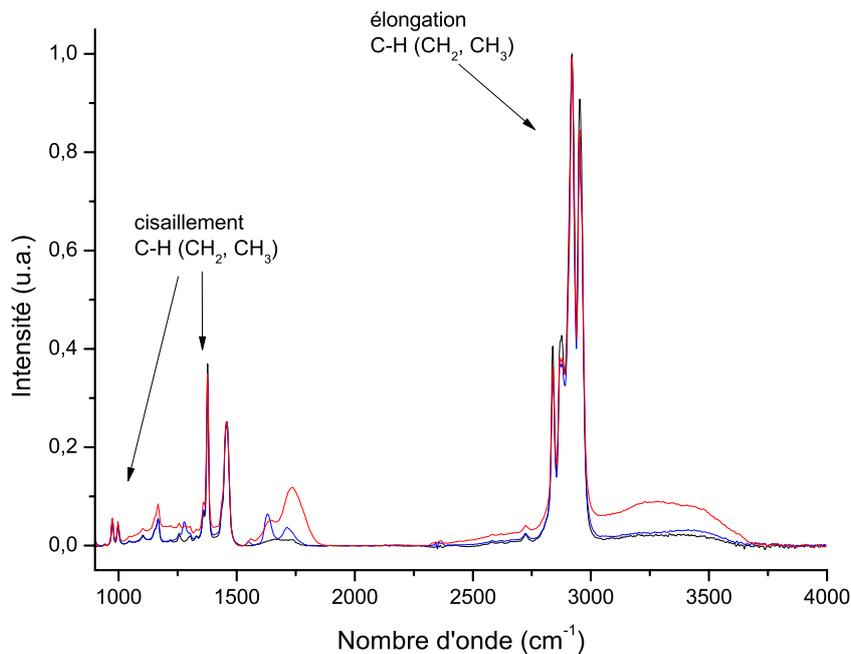


Figure II.53 - Spectre FTIR-ATR d'un polypropylène traité par plasma : 21 kHz, 15 m/min.

(-)  $d_{\text{torche-substrat}} = 10\text{ mm}$ , (-)  $d_{\text{torche-substrat}} = 20\text{ mm}$ , (-) PP non traité

Plusieurs bandes plus ou moins bien résolues apparaissent entre 1500 et 1900  $\text{cm}^{-1}$  (Figure II.54), pour lesquelles, la distance torche-substrat a un impact important. La formation de groupements carbonyles ( $\text{C}=\text{O}$ , 1700 – 1850  $\text{cm}^{-1}$ ) semble largement plus importante à 10mm qu'à 20mm. En revanche, la formation d'insaturations ( $\text{C}=\text{C}$ ) est favorisée par le traitement à plus longue distance. La présence d'une bande à 1550  $\text{cm}^{-1}$  témoigne de la présence d'oxydes d'azote ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) probablement issus de l'adsorption ou de l'interaction avec la surface du  $\text{NO}_2$  observé précédemment par OES [17], [18].

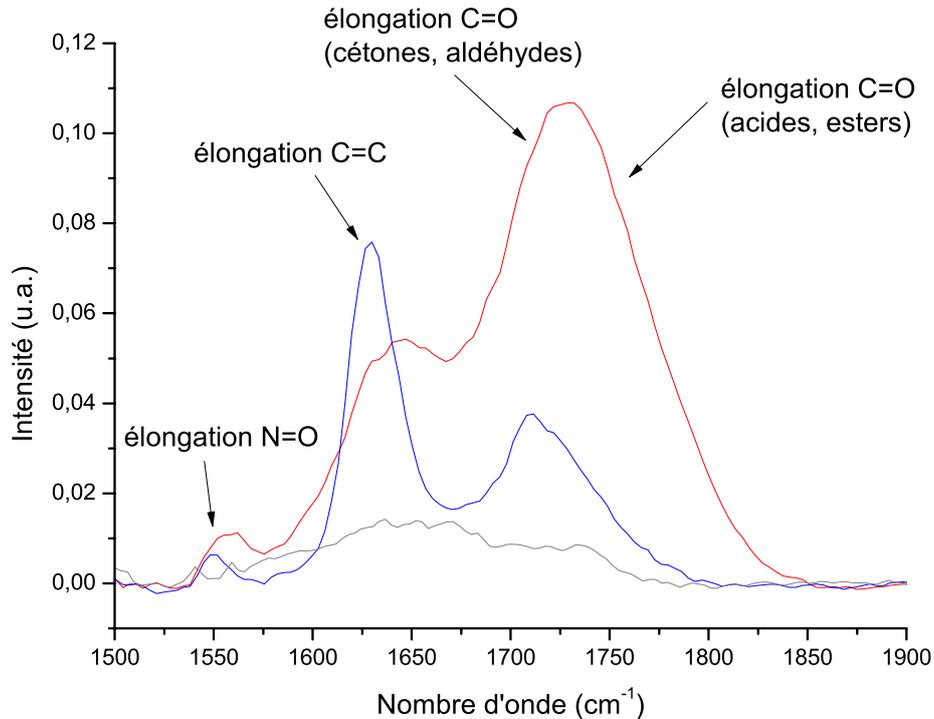


Figure II.54 - Spectre FTIR-ATR, entre 1500 et 1900  $\text{cm}^{-1}$ , d'un polypropylène traité par plasma : 21 kHz, 15 m/min. (—)  $d_{\text{torche-substrat}} = 10$  mm, (—)  $d_{\text{torche-substrat}} = 20$  mm, (—) PP non traité

L'observation de la bande large située entre 3000 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  confirme la tendance observée précédemment (Figure II.55). Le traitement à 10mm résulte en la formation de fonctions O-H (alcools, acides). À 20mm, le signal des O-H à environ 3250  $\text{cm}^{-1}$  est quasiment au même niveau que le PP non traité, en revanche, la bande à 3450  $\text{cm}^{-1}$  présente une légère augmentation.

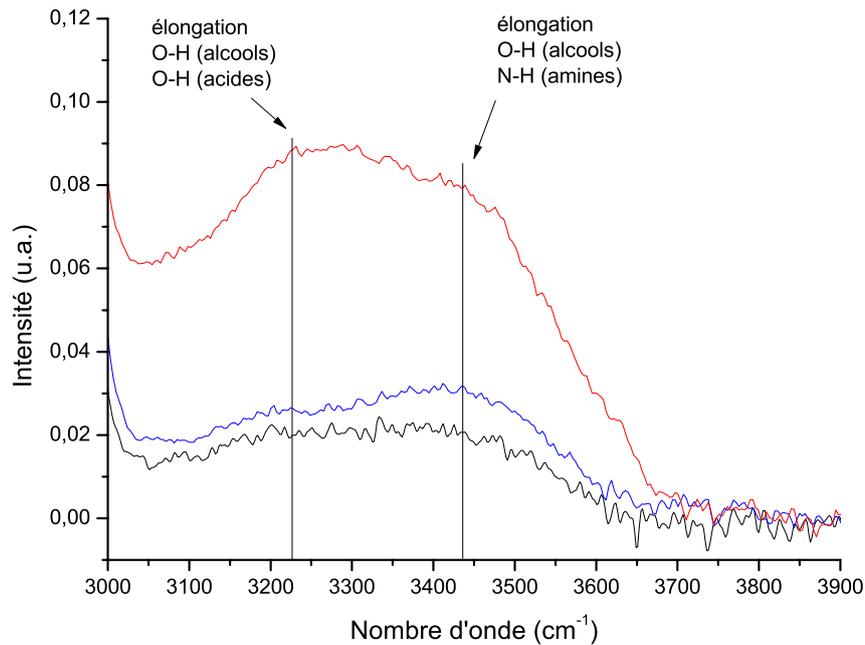


Figure II.55 - Spectre FTIR-ATR, entre 3000 et 3900  $\text{cm}^{-1}$ , d'un polypropylène traité par plasma : 21 kHz, 15 m/min. (→)  $d_{\text{torche-substrat}} = 10 \text{ mm}$ , (→)  $d_{\text{torche-substrat}} = 20 \text{ mm}$ , (→) PP non traité

Les spectres IR mettent en évidence la compétition entre 2 phénomènes lors du traitement par plasma, en accord avec le modèle de Dorai et Kushner (2003, [14]) décrit dans le chapitre 1: la scission de la chaîne polymérique, aboutissant à la formation de doubles liaisons  $\text{C}=\text{C}$  observées à  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , et l'oxydation, à l'origine de la formation des liaisons  $\text{C}=\text{O}$  détectées entre  $1700$  et  $1850 \text{ cm}^{-1}$ .

Un traitement plasma à 10 mm favorise la formation d'espèces oxydées telles que les alcools, les aldéhydes, cétones mais aussi les acides carboxyliques. Ce comportement est mis en évidence par la présence d'une bande d'absorption centrée sur  $1750 \text{ cm}^{-1}$  témoignant de la formation de  $\text{C}=\text{O}$ , ainsi que la large bande entre  $3000$  et  $3700 \text{ cm}^{-1}$  attribuée aux O-H et N-H. En revanche, un traitement à 20 mm favorise la formation d'insaturations ( $\text{C}=\text{C}$ ) repérées à  $1640 \text{ cm}^{-1}$ . Dans le même temps, les intensités des bandes à  $1750$  et  $3250 \text{ cm}^{-1}$  témoignent de la plus faible proportion de groupements  $\text{C}=\text{O}$ , notamment les acides carboxyliques.

L'identification des paramètres privilégiant l'un ou l'autre des scénarii est primordiale pour s'assurer de traiter le polypropylène de façon à obtenir des groupements acide carboxylique en surface. La Figure II.56, qui présente l'évolution du ratio des intensités des bandes  $\text{C}=\text{C}$

( $1640\text{ cm}^{-1}$ ) et C=O ( $1750\text{ cm}^{-1}$ ), montre clairement qu'à partir de 10mm, jusqu'à 20mm, la formation de liaisons C=C est favorisée par rapport aux espèces oxydées. Cette observation est cohérente avec les calculs d'énergie de surface. Cette étude a également été réalisée pour mesurer l'impact de la vitesse de balayage de l'échantillon lors du traitement, ainsi que la fréquence de l'arc électrique. La même tendance sur la composition de surface est observée lorsque l'on augmente la vitesse de balayage de l'échantillon (Figure II.57).

Globalement, moins les conditions de traitement sont drastiques (augmentation de la distance torche-substrat, augmentation de la vitesse de balayage), plus la formation de liaisons C=C est favorisée, ce qui n'est pas propice à l'immobilisation covalente de biomolécules. En revanche, la fréquence de l'arc électrique ne semble avoir qu'un très faible impact sur ce phénomène, le ratio C=O/C=C présentant un léger maximum à 21 kHz (Figure II.58).

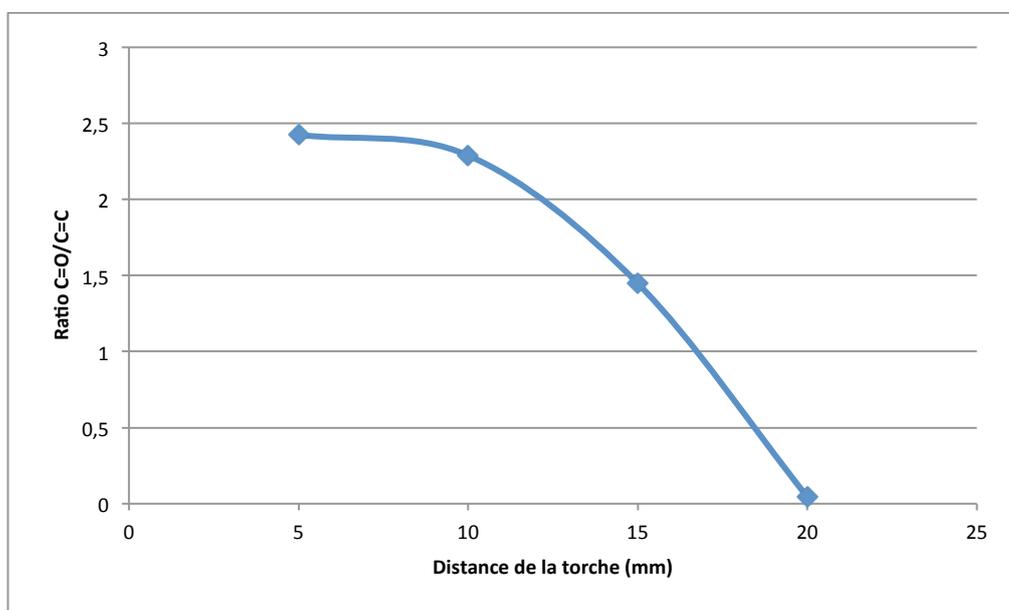


Figure II.56 - Evolution du ratio C=O ( $1720\text{ cm}^{-1}$ ) / C=C ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ) en fonction de la distance torche-substrat. Ratio calculé à partir de la hauteur de chaque bande. Conditions du traitement : 21 kHz, 15 m/min.

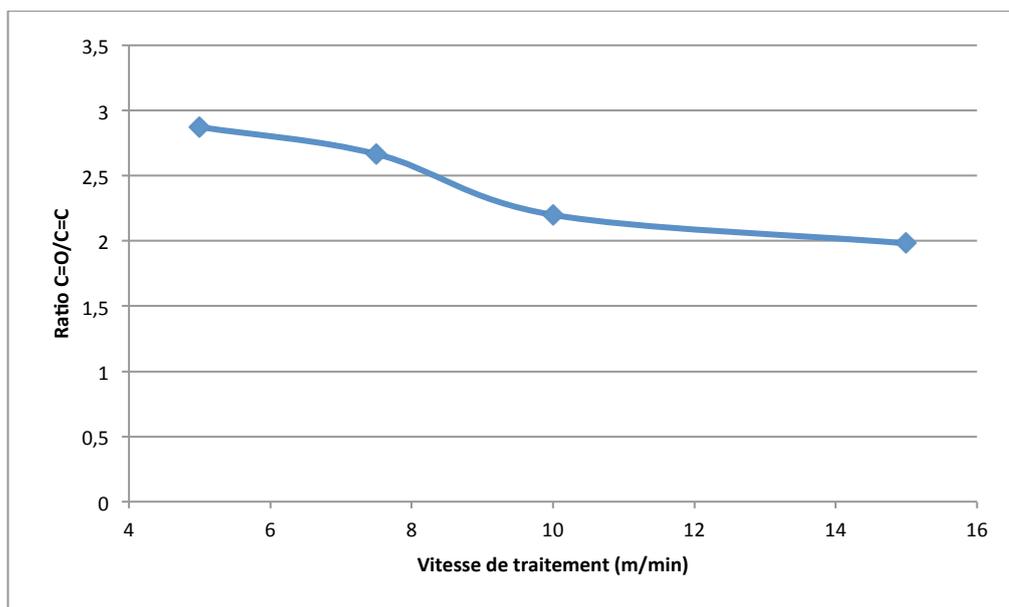


Figure II.57 - Évolution du ratio C=O ( $1720\text{ cm}^{-1}$ ) / C=C ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ) en fonction de la vitesse de balayage de l'échantillon. Conditions de traitement : 21 kHz, 10 mm.

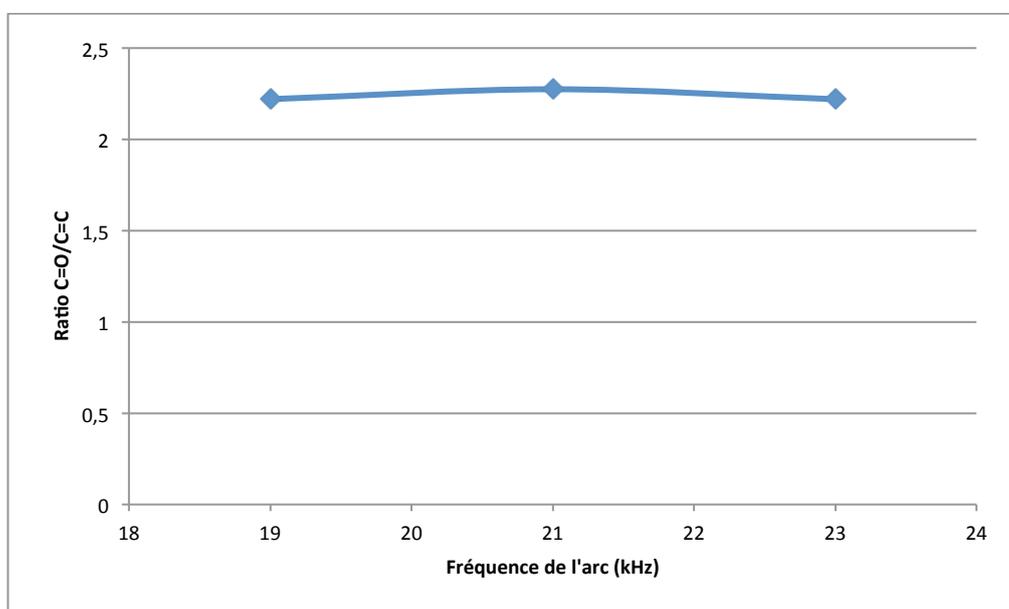


Figure II.58 - Évolution du ratio C=O ( $1720\text{ cm}^{-1}$ ) / C=C ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ) en fonction de la fréquence de l'arc électrique. Conditions de traitement : 7,5 m/min, 10 mm.

### 2.5.2.2 Analyse par XPS

La spectroscopie photoélectronique à rayons X est une excellente méthode pour connaître la nature chimique de la surface d'un matériau sur une profondeur d'au plus 10 nm. L'impact du traitement par plasma à la pression atmosphérique sur du polypropylène est étudié par XPS, l'objectif étant d'identifier les paramètres permettant d'obtenir un maximum de fonctions carbonyle, en particulier acide carboxylique, sur la surface.

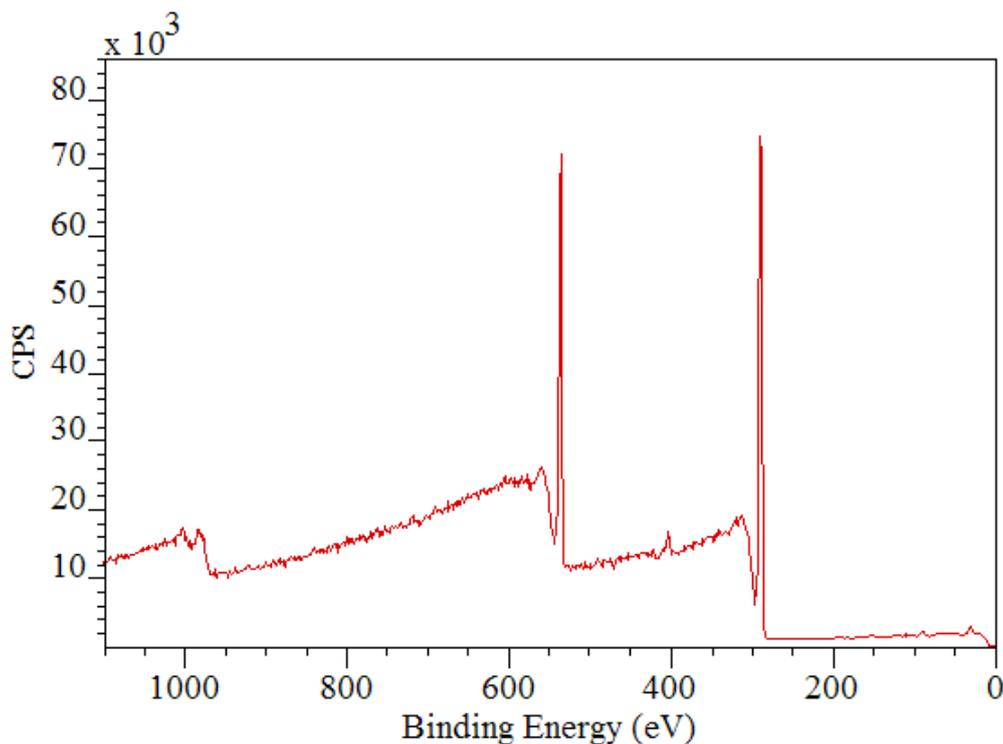


Figure II.59 - Spectre XPS de survol (ou basse résolution) d'un échantillon de polypropylène activé par plasma d'air à la pression atmosphérique. On note ici que l'échantillon contient 25,94% d'oxygène, 70,01% de carbone et 4,05% d'azote.

La Figure II.59 présente le spectre XPS basse résolution du polypropylène traité par plasma. Les pics photoélectriques du carbone C1s, de l'oxygène O1s et de l'azote N1s se distinguent respectivement à environ 285 eV, 532,5 eV, et 400,2 eV.

Sur un échantillon activé par plasma, on souhaite avant tout connaître la nature des groupements chimiques oxygénés : alcools, cétones, et plus particulièrement les aldéhydes et acides carboxyliques. De ce fait, la décomposition du pic C1s du carbone est particulièrement intéressante car elle peut permettre d'identifier des liaisons C-O ou C=O.

La Figure II.60 présente la décomposition du pic C1s du PP non traité, comparé au pic C1s du PP traité par plasma. Le signal du pic C-C/C-H est calibré à 285 eV [19], le polypropylène non traité ne présente aucune autre contribution, signe que le carbone de ce matériau n'est impliqué dans aucune autre liaison que C-C ou C-H.

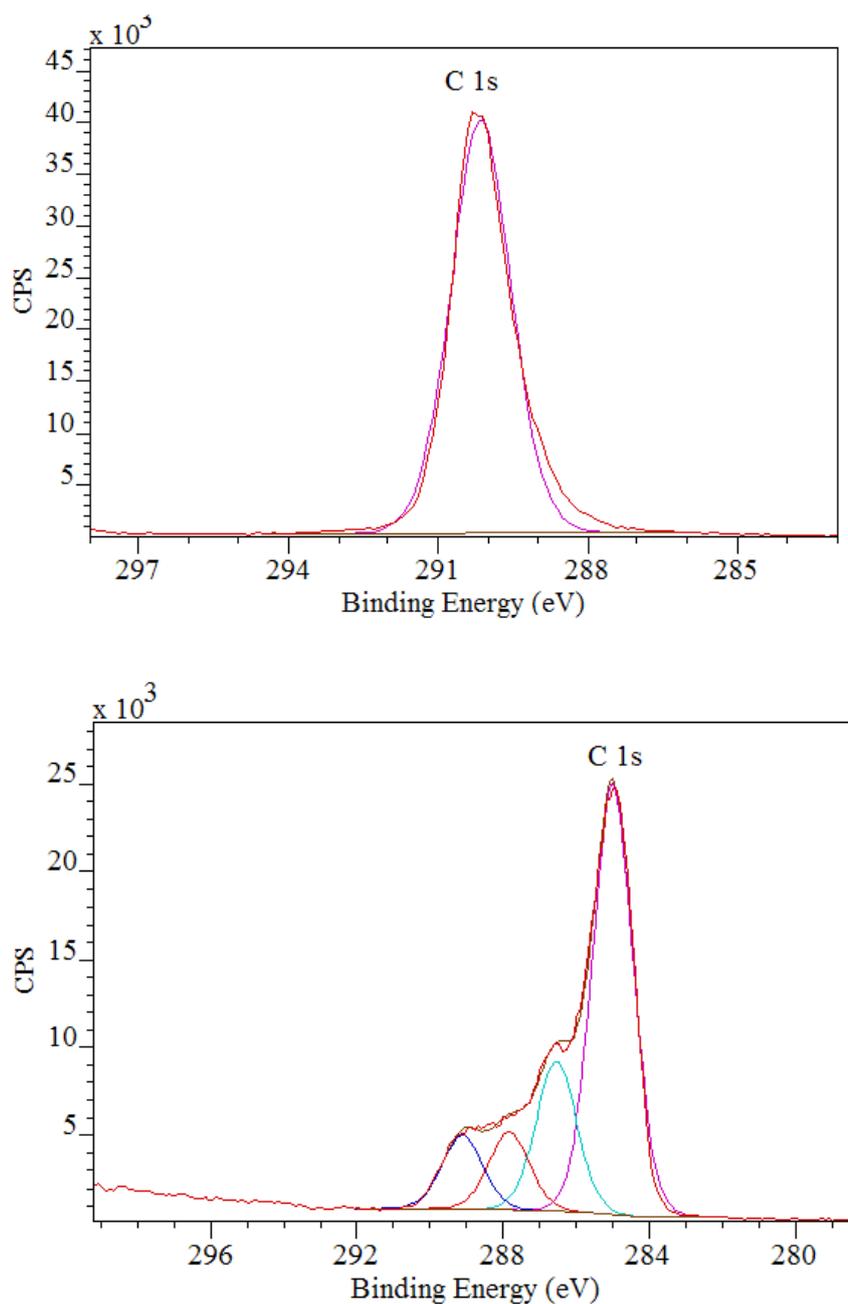


Figure II.60 - Décomposition du pic C1s du spectre XPS haute résolution du carbone. (Haut) Pic C1s d'un PP non traité. (Bas) Pic C1s d'un PP traité par plasma d'air et sa décomposition.

Le traitement par plasma résulte en l'apparition de nombreuses contributions entre 285 et 290 eV. La bande à 285 eV correspond aux liaisons C-C et C-H. La bande à 286,5 eV est attribuée aux liaisons C-O et C-N [20]. La contribution à 287,8 eV est attribuée à des liaisons C=O. Enfin les groupements O-C=O (acides carboxyliques et esters) sont observés à 289,1 eV [21]–[25].

Les pics O1s et N1s permettent également de compléter les informations obtenues grâce à la décomposition du pic C1s. La Figure II.61 présente ces pics, O1s se décompose en deux contributions C=O (532,2 eV) et C-O (533,5 eV), tandis que pic N1s présente deux massifs distincts. Les azotes organiques N-C/N=C et N-C=O sont repérés respectivement à 400 et 401,7 eV, l'azote à plus haut degré d'oxydation (+4 et +5) est observé à 405,8 et 407,7 eV [23], [26]–[28].

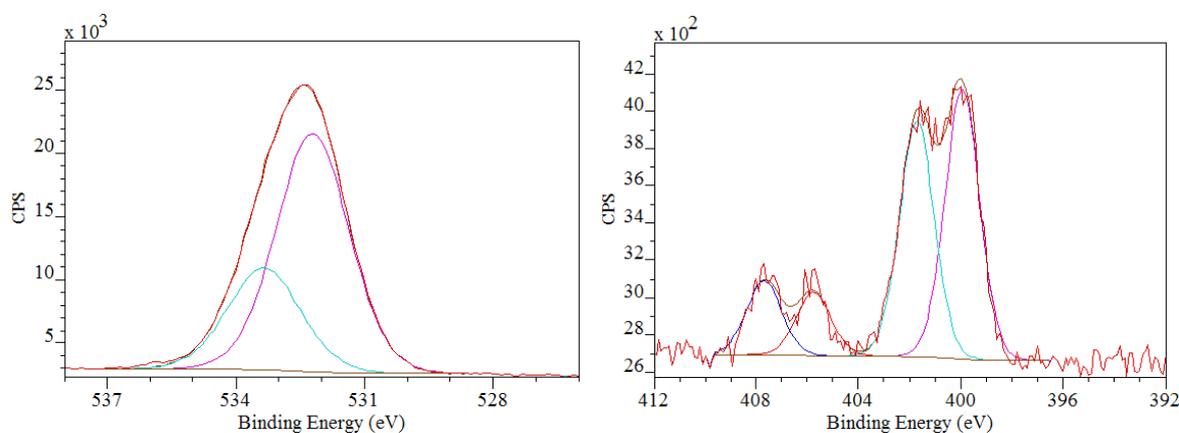


Figure II.61 – Décomposition des pics O1s (gauche) et N1s (droite) détectés sur du PP traité par plasma d'air à la pression atmosphérique

L'analyse des spectres XPS du polypropylène traité par plasma confirme la formation de groupements chimiques oxygénés tels que les carbonyles (aldéhydes, cétones, acides, esters). De plus, de l'azote organique a été détectée en surface, confirmant ainsi l'analyse des signaux infrarouge attribués à N-H.

Grâce à cette méthode d'analyse, de nombreuses conditions de traitement ont pu être comparées au regard de la composition chimique de la surface après traitement. La Figure II.62 présente l'influence de la fréquence du jet de plasma sur la teneur en C=O sur la surface d'un PP traité, obtenue en prenant la somme des contributions attribuées à C=O, à 287,8, 288,6 et 289,5 eV.

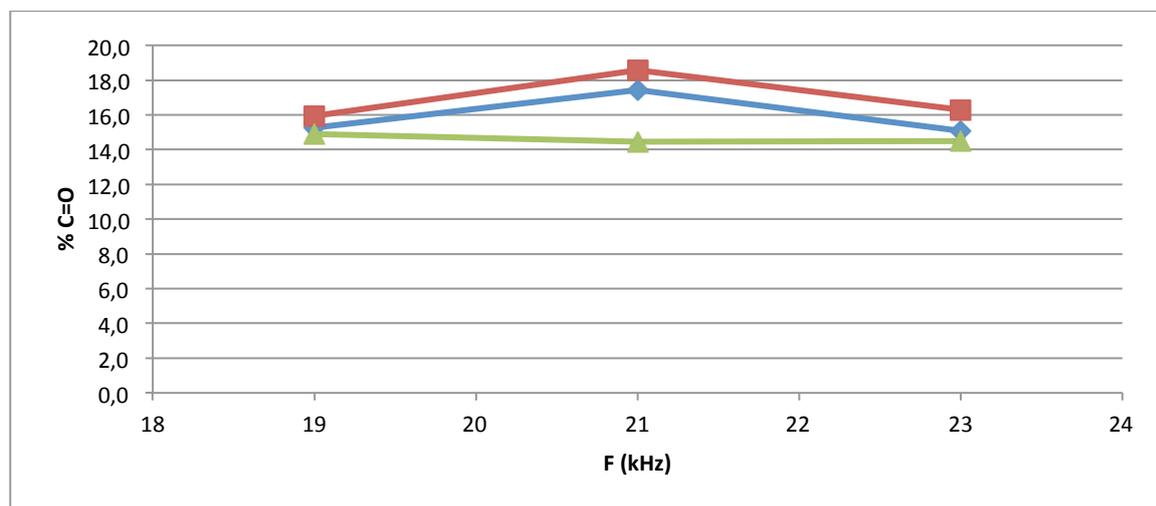


Figure II.62 - Evolution du pourcentage de C=O sur la surface d'un PP traité par plasma en fonction de la fréquence de l'arc électrique, à 10 mm.

(▲) Traitement à 5 m/min. (◆) Traitement à 7,5 m/min. (■) Traitement à 15 m/min.

La fréquence de 21 kHz apparaît comme la plus efficace pour introduire des groupements aldéhydes, cétones ou acides carboxyliques à la surface du polypropylène. De plus, le traitement réalisé à 15 m/min semble introduire une plus grande quantité de groupements C=O qu'à plus faible vitesse. Ce comportement est en adéquation avec les mesures de cristallinité, l'étude d'énergie de surface et la spectroscopie infrarouge.

L'influence de la distance torche-substrat est plus importante, comme le montre la Figure II.63. Le pourcentage de C=O augmente de 5 à 10mm, puis décroît sur le reste de la plage de distance étudiée.

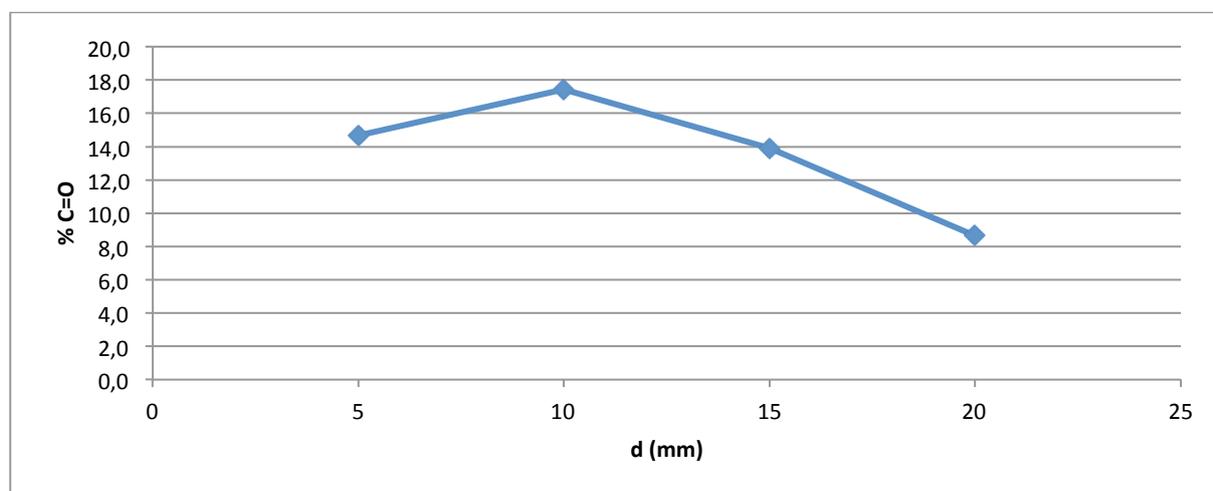


Figure II.63 - Évolution du pourcentage de C=O à la surface du PP traité par plasma en fonction de la distance torche-substrat. Conditions de traitement : 21 kHz, 7,5 m/min.

C'est enfin la vitesse de déplacement de l'échantillon sous la torche qui est soumise à l'évaluation, les résultats sont présentés dans la Figure II.64. La vitesse de traitement la plus grande (15 m/min) permet la fonctionnalisation la plus efficace, quelle que soit la fréquence de traitement (on notera que la plus grande proportion de C=O est bien obtenue à 21 kHz). Les mêmes tendances sont observées pour l'évolution du ratio O/C.

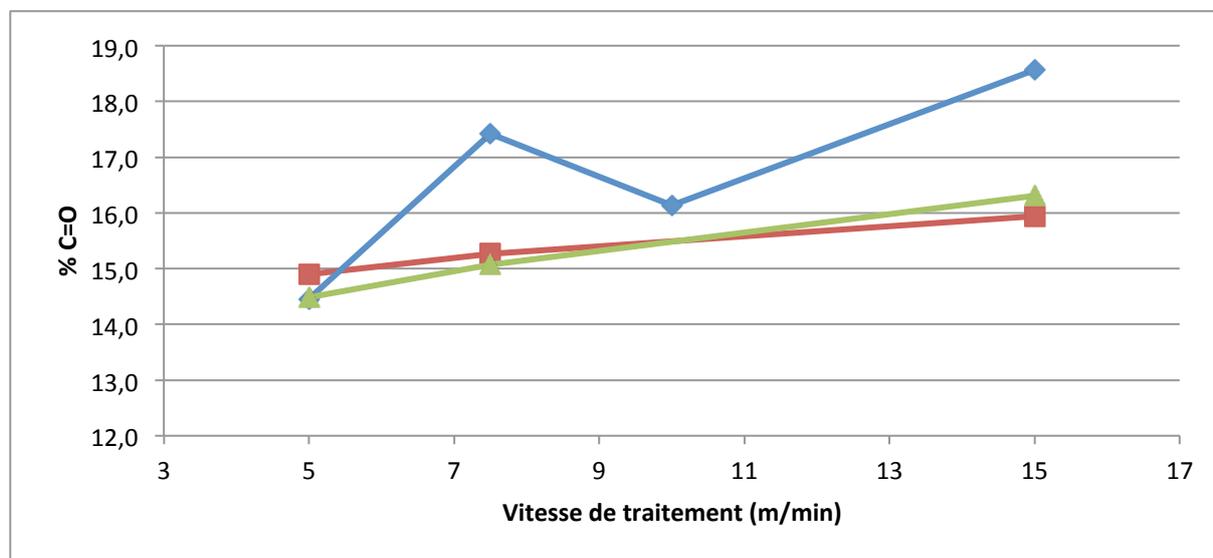


Figure II.64 - Évolution du pourcentage de C=O à la surface du PP traité par plasma en fonction de la vitesse de traitement, à 10 mm. (■) 19 kHz, (◆) 21 kHz, (▲) 23 kHz.

Cette analyse par XPS a pour but d'identifier les conditions de traitement nous permettant d'obtenir les concentrations surfaciques de groupements fonctionnels les plus importantes. La décomposition des bandes C 1s des spectres XPS a permis de mettre en évidence la présence des groupements aldéhydes, cétones et acides carboxyliques. Il apparaît que la fonctionnalisation est optimale à 10 mm, tandis que la vitesse de déplacement de l'échantillon semble devoir être d'au moins 15 m/min, alors que la fréquence n'apparaît pas comme un paramètre influent. Le Tableau II.5 présente un récapitulatif des résultats obtenus par XPS : le ratio O/C et le pourcentage de C=O par échantillon, en fonction des différents traitements.

Tableau II.5 - Résultats XPS pour différentes conditions de traitements.

V (m/min)	F (kHz)	d (mm)	O/C	C=O % global
PP non traité			0,02	0,00
5	21	10	0,25	14,5
7,5	21	10	0,32	17,4
10	21	10	0,32	16,1
<b>15</b>	<b>21</b>	<b>10</b>	<b>0,35</b>	<b>18,6</b>
15	23	5	0,38	14,7
15	23	10	0,40	16,3
15	23	15	0,33	14,5
15	23	20	0,18	8,6
7,5	19	10	0,32	15,3
7,5	21	10	0,32	17,4
7,5	23	10	0,33	15,1

### 2.5.3 Caractérisation de la surface du PP traité par plasma : lien avec l'OES

La Figure II.65 présente l'évolution conjointe des rapports I/t des espèces O\* et OH\* et de la concentration surfacique en oxygène et groupements carbonyles en fonction de la fréquence de l'arc électrique.

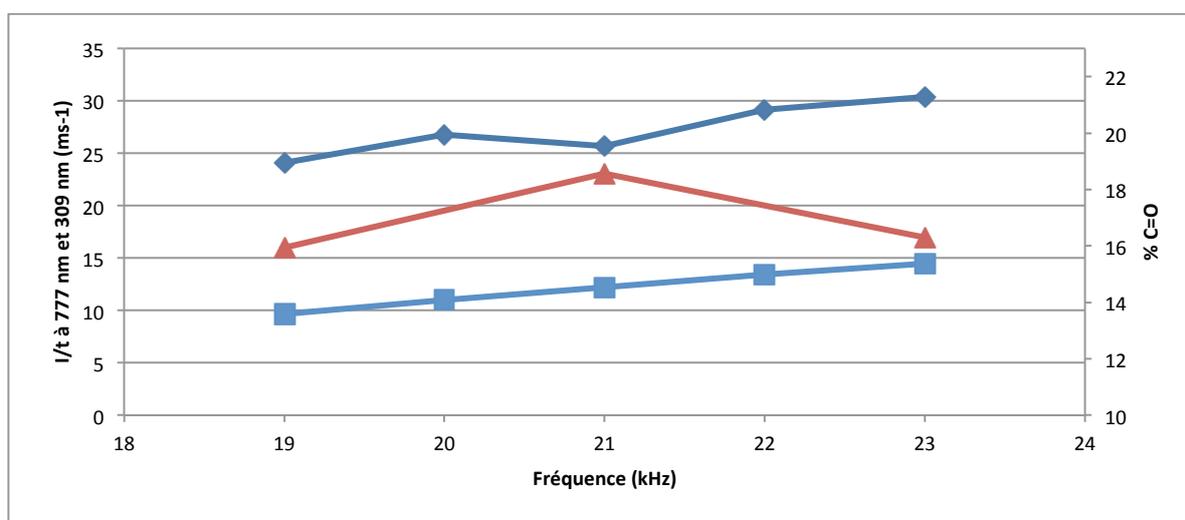


Figure II.65 – Comparaison entre les rapports I/t de O\* et OH\* obtenus en OES, et la concentration surfacique en C=O issue de l'analyse XPS en fonction de la fréquence de la torche plasma .

(◆) I/t de O\*, (■) I/t de OH\*, pourcentage de C=O (▲) sur la surface.

La fonctionnalisation de la surface, caractérisée par la concentration surfacique en O et C=O, n'est pas simplement corrélée au rapport I/t de O\* et OH\* en fonction de la fréquence de traitement. L'influence de la fréquence de la torche sur la fonctionnalisation de la surface reste difficile à distinguer.

En revanche, l'impact de la distance, sur la fonctionnalisation et l'intensité du flux d'espèces dans le plasma est plus évident (Figure II.66). En dessous de 10 mm, le plasma est riche en espèces réactives, mais très énergétique et trop chaud pour la fonctionnalisation. Sur le reste de la gamme de distance testée, le rapport I/t des espèces diminue de façon drastique, et ce n'est plus suffisant pour la fonctionnalisation. La distance de 10 mm se présente comme le meilleur choix pour la fonctionnalisation de surface par plasma à la pression atmosphérique.

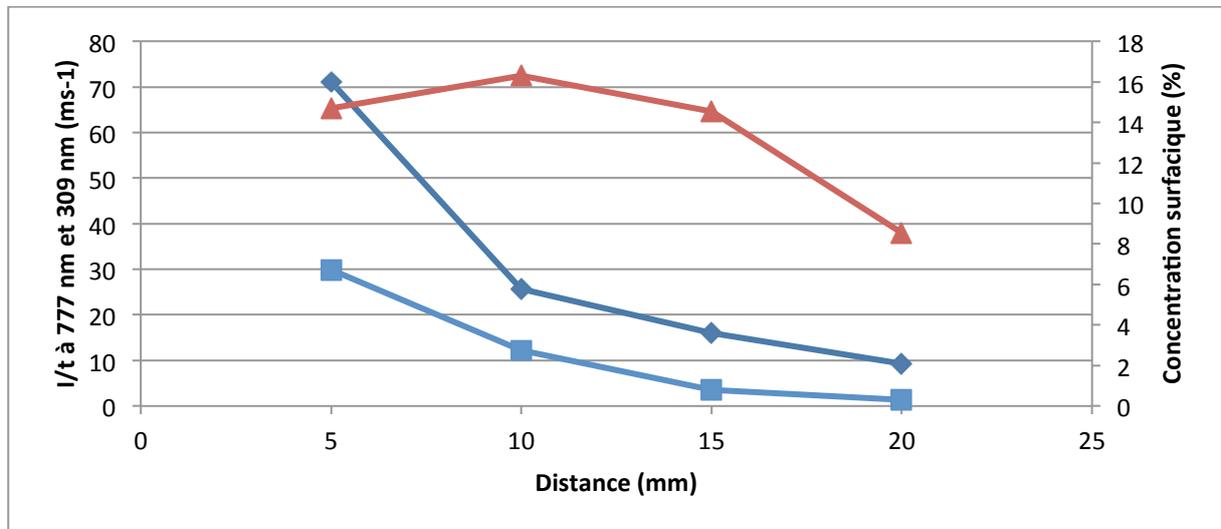


Figure II.66 – Comparaison entre les rapports I/t de O\* et OH\* obtenus en OES, et la concentration surfacique en C=O issue de l'analyse XPS en fonction de la distance torche-substrat/fibre optique.

(◆) I/t de O\*, (■) I/t de OH\*, pourcentage de C=O (▲) sur la surface.

La fonctionnalisation de surface semble bien être en lien avec la présence de O\* et OH\* dans le plasma, toutefois, à plus faible distance, la fonctionnalisation (%C=O) décroît, tandis que les rapports I/t augmente beaucoup. Ces résultats caractérisent la compétition qui a lieu lors du traitement, entre la fonctionnalisation de la surface grâce aux espèces réactives du plasma, l'oxygène en particulier, et la dégradation thermique due à la température importante du plasma à la sortie de la torche et à la forte concentration en espèces émissives, détectées par OES. Des conditions drastiques (faible vitesse de traitement, faible distance torche-substrat) aboutissent à un fort échauffement matérialisé par la modification de la cristallinité du

matériau, et la fonctionnalisation n'est pas optimale. À l'opposé, des conditions de traitement trop douces ne sont pas suffisantes pour obtenir une meilleure fonctionnalisation, la création d'insaturations prenant le pas sur l'oxydation du matériau.

L'étude XPS des échantillons traités par plasma nous a permis d'observer la formation de fonctions carbonyles dont des aldéhydes et des acides carboxyliques qui peuvent servir à ancrer des peptides par liaisons covalentes par le biais de réactions chimiques présentées dans le chapitre I. L'influence des différentes conditions de traitement (vitesse, distance, fréquence) sur la quantité relative d'oxygène, c'est-à-dire le rapport O/C, et sur le pourcentage de groupements carbonyles (C=O) issu de la décomposition du pic C1s a permis de déterminer les conditions de traitement les plus pertinentes, à savoir :

- Gaz plasmagène : Air
- PCT : 80%
- Fréquence de l'arc électrique : 21 kHz
- Distance torche-substrat : 10 mm
- Vitesse de déplacement du substrat : 15 m/min

### 2.6 Mise en évidence de groupements aldéhyde de surface

L'analyse XPS a permis de mettre en évidence la présence de fonctions chimiques oxygénées et notamment des carbonyles en surface du matériau après traitement par plasma d'air à la pression atmosphérique. Il est toutefois difficile d'attribuer sans ambiguïté certains pics et de distinguer notamment les aldéhydes des cétones. C'est pourquoi, en dérivant chimiquement les aldéhydes avec une molécule servant de sonde, il pourrait être possible de discriminer les fonctions chimiques concernées.

#### 2.6.1 Principe de la dérivation chimique

Les aldéhydes réagissent spontanément avec les hydrazides pour former une hydrazone, dont la double liaison C=N peut être ensuite réduite pour éviter l'hydrolyse [29]. Cette sélectivité des hydrazides pour les aldéhydes est la base du principe de dérivation chimique utilisé pour ce projet, et est régulièrement utilisé pour réaliser des bioconjugaisons de ligands avec des protéines [30]–[32]. L'idée est d'utiliser un hydrazide possédant une sonde interne pour une

méthode d'analyse particulière pour le faire réagir avec les aldéhydes en surface d'un échantillon traité par plasma.

La sonde utilisée est la 2-chlorobenzoic hydrazide (Figure II.67), dont la réaction avec un aldéhyde surfacique est représentée sur la Figure II.68.

La réaction se déroule pendant 4h dans l'éthanol (le cycle aromatique de l'hydrazide limite fortement la solubilité de celle-ci dans l'eau) avec un large excès d'hydrazide (0,1 mg/mL), chaque échantillon étant immergé dans 5 mL de solution d'hydrazide dans des béchers distincts, avec une légère agitation. 50 $\mu$ L d'une solution de NaCNBH<sub>3</sub> à 2 mol/L sont ajoutés dans chaque bécher (soit 10 $\mu$ L par mL de solution d'hydrazide), les échantillons sont placés ainsi à 4°C pendant toute une nuit (environ 18h) pour réduire l'hydrazone. Pour terminer la dérivation, et s'assurer que les molécules n'ayant pas réagi ne parasitent pas l'analyse à cause du phénomène d'adsorption, les échantillons dérivés sont lavés pendant 5 minutes dans l'éthanol, sous agitation mécanique, puis 5 minutes dans l'eau, toujours sous agitation.

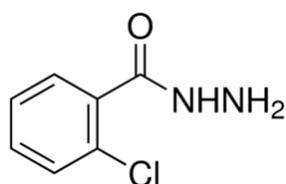


Figure II.67 - 2-chlorobenzoic hydrazide

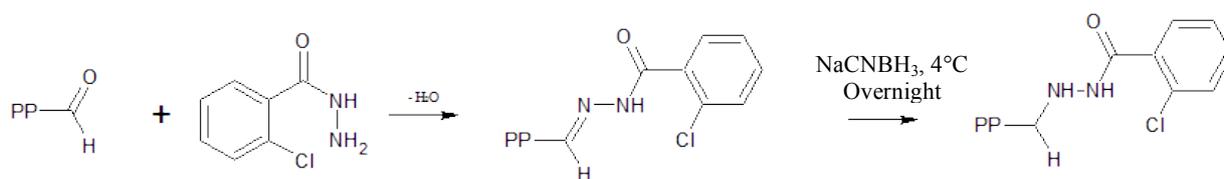


Figure II.68 - Schéma réactionnel de la dérivation des aldéhydes par la 2-chlorobenzoic hydrazide

La 2-Chlorobenzoic Hydrazide possède plusieurs avantages pour la dérivation chimique des aldéhydes. Sa taille est plutôt réduite, ce qui limitera la gêne stérique à la surface des échantillons. De plus, le chlore en position ortho servira de sonde pour l'analyse XPS puisque cet élément chimique induit l'apparition de pics à environ 200 eV correspondant au Cl 2p, et la nature du chlore est identifiable puisque le chlore organique (C-Cl) présente un doublet à 200,6 et 202,2 eV, alors que le chlore ionique (Cl<sup>-</sup>) présente une bande à 197,9 eV [33]. Il est également possible d'observer l'apparition de contributions des carbones liés au chlore dans

la décomposition de la bande C 1s à 287,2 eV environ (C-Cl) et même C\*-C-Cl à 285,5 eV [34].

### 2.6.2 Caractérisation de la surface des échantillons dérivés chimiquement

Les échantillons dérivés chimiquement selon le protocole décrit ci-dessus sont analysés par XPS. L'analyse du spectre nous permet d'obtenir la composition atomique de la surface en pourcentage, et la décomposition des pics atomiques permet par la suite d'identifier les liaisons chimiques existantes et donc les fonctions chimiques présentes en surface.

Tableau II.6 - Composition atomique de la surface d'échantillons de PP

	<b>C</b>	<b>O</b>	<b>N</b>	<b>Cl</b>	<b>F</b>
<b>PP non traité</b>	98,32	1,68			
<b>PP traité par plasma</b>	69,14	25,62	4		1,24*
<b>PP traité et dérivé avec hydrazide</b>	87,1	11,43	1,39	0,08	

\* Le fluor présent dans l'échantillon traité par plasma est une pollution issue du moulage des échantillons, ceux-ci étant réalisés sur une presse principalement utilisée pour le moulage de polymères fluorés. Certains échantillons présentent donc des traces de fluor.

Le Tableau II.6 présente la composition atomique de 3 échantillons, le polypropylène non traité ayant subi la réaction de dérivation chimique (PP), le PP traité par plasma, et le PP traité par plasma puis ayant subi la dérivation chimique avec le 2-chlorobenzoic hydrazide. Plusieurs phénomènes sont identifiés à l'observation de ces résultats.

Les teneurs en oxygène (de 25,62 à 11,43 %) et en azote (4 à 1,39 %) diminuent entre le traitement plasma et la dérivation, ce qui peut s'expliquer par la dissolution d'une couche de faible cohésion qui s'est formée à la surface du matériau. En effet, le traitement plasma provoque des ruptures de liaisons chimiques, raccourcissant ainsi certaines chaînes de polymères, formant à la surface des zones de faible poids moléculaire. Ces zones, appelées « couche de faible cohésion » sont facilement dissoutes en solution, ce qui a pour effet de retirer une certaine quantité de fonctions chimiques oxydées. Enfin, Le chlore est uniquement détecté sur l'échantillon dérivé par l'hydrazide chlorée. L'oxygène détecté sur le PP non traité provient probablement de l'oxydation par vieillissement des échantillons, ceux-ci étant moulés sans agents antioxydants.

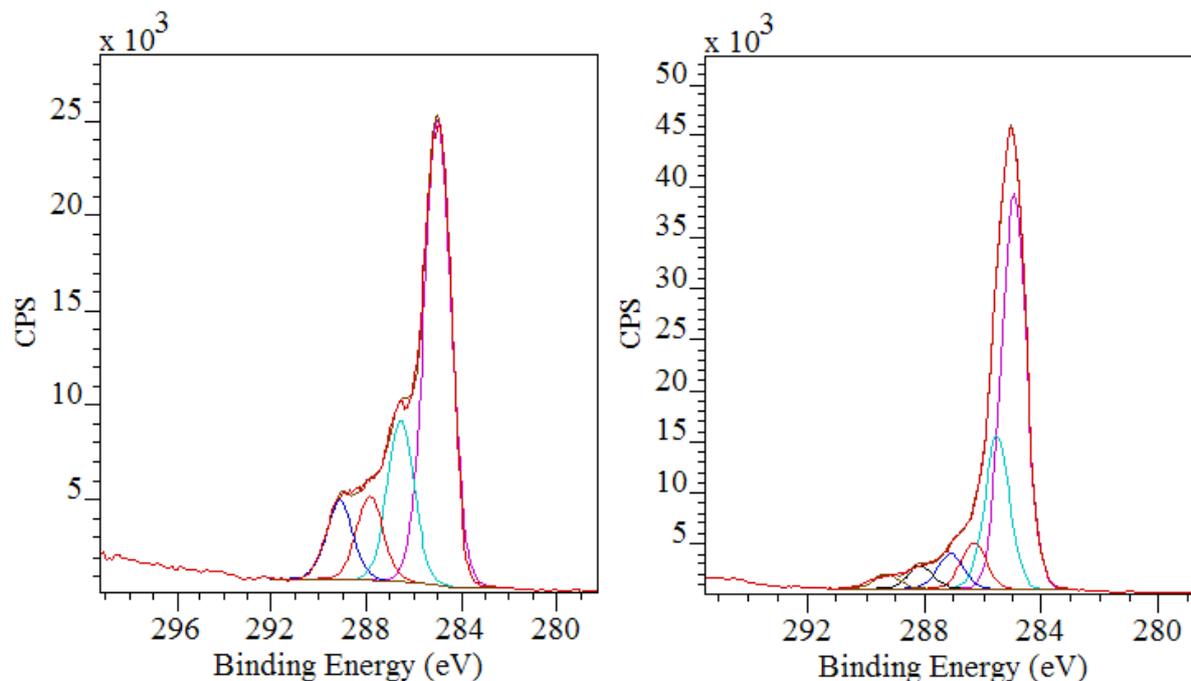


Figure II.69 - Décomposition des pics C 1s du PP traité par plasma (gauche) et du PP traité par plasma et dérivé avec la 2-chlorobenzoïc hydrazide (Droite)

Comme cela peut se voir sur la Figure II.69, la composition du pic C 1s est fortement modifiée par la dérivation chimique. La présence de nouvelles contributions (et la disparition de certaines autres) au sein de la bande provoque un léger déplacement des différentes composantes. En effet, on observe dans le Tableau II.7 que le PP dérivé présente des contributions à 285,5 eV, 287,2 eV et 288,2 eV, attribuées respectivement aux liaisons C-C-Cl, C-Cl, et N-C=O, ce qui n'est pas le cas du PP traité par plasma ou non traité. Ces bandes proviennent bien de la structure de l'hydrazone réduite. Cette observation est accompagnée de la très forte diminution des contributions des carbonyles et principalement des aldéhydes.

Tableau II.7 - Décomposition de la bande C 1s des échantillons de PP

C 1s	C-C 285 eV	C*-C-Cl 285,5 eV	C-O, C-N 286,5 eV	C-Cl 287,2 eV	C=O 287,8 eV	N-C=O 288,2 eV	OC=O 289,1 eV
<b>PP</b>	100						
<b>PP traité</b>	58,90		20,38		10,64		10,08
<b>PP dérivé</b>	59,37	23,05	6,96	5,43		3,24	1,95

Il convient toutefois de préciser que les 23,05% calculés pour C-C-Cl sur le PP dérivé avec l'hydrazide ne proviennent probablement pas uniquement du C-C-Cl, mais également du C-C, et des C-O et C-N situés de part et d'autre de la contribution C-C-Cl.

La Figure II.70 montre que la bande Cl 2p présente un doublet à 200,6 et 202,2 eV, qui correspond au chlore organique, donc engagé dans une liaison avec un atome de carbone, comme cela est le cas pour l'hydrazone en surface [33]. Cette observation permet de s'assurer, au regard de la composition chimique de la surface et de la décomposition du pic C 1s, que la dérivation chimique des aldéhydes a bien eu lieu, confirmant ainsi leur présence en surface du PP traité par plasma.

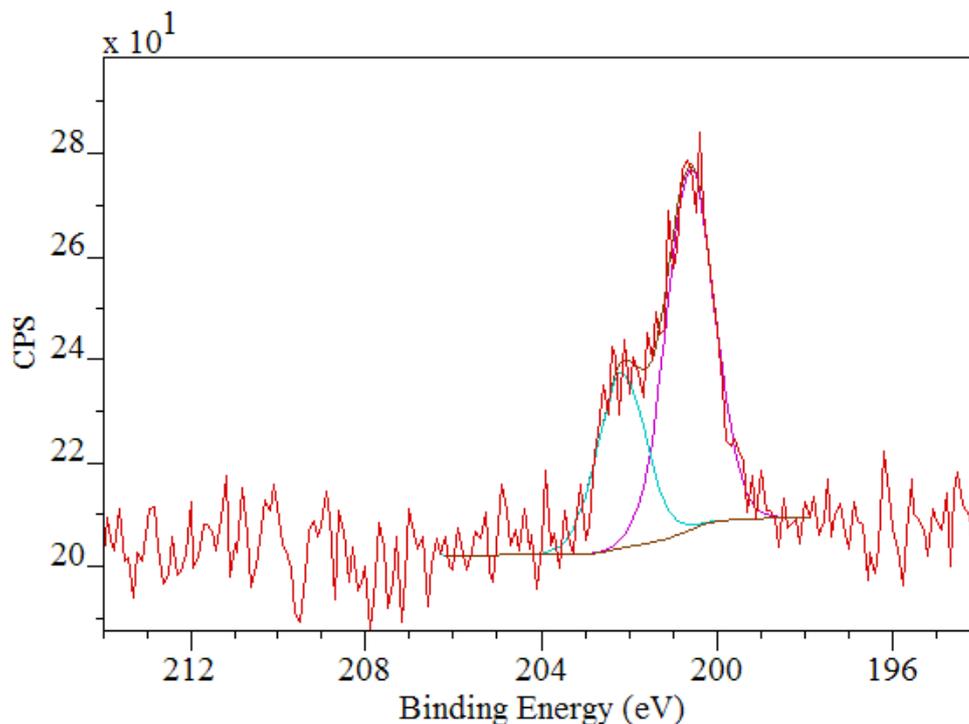


Figure II.70 - Décomposition de la bande Cl 2p du PP traité par plasma et dérivé avec la 2-chlorobenzoyl hydrazide

La caractérisation de surface par XPS des échantillons ayant subi une dérivation chimique avec la 2-chlorobenzoyl hydrazide a permis de montrer, par la présence de chlore organique, que la réaction sélective entre hydrazide et aldéhyde a bien eu lieu, témoignant de la présence d'aldéhydes à la surface de l'échantillon. Cette méthode de dérivation des aldéhydes sera mise à profit dans la suite afin de réaliser le greffage de biomolécules sur une surface de PP dérivée chimiquement avec la 2-chlorobenzoyl hydrazide, uniquement sur les groupements de type carboxyliques de surface. La comparaison avec un échantillon traité par plasma et non dérivé pourrait ainsi permettre de préciser la nature des liaisons chimiques impliquées dans le greffage.

## 2.7 Dépôt d'acide acrylique

Afin d'utiliser les paramètres permettant d'obtenir le dépôt d'acide acrylique le plus riche en acides carboxyliques en vue de l'immobilisation de biomolécules sur l'échantillon, une étude par mesure des angles de contact a été réalisée, en faisant varier l'intensité du courant dans l'électrode haute tension, ou encore le débit du gaz plasmagène et le débit de précurseurs (Figure II.71). Plus les échantillons sont hydrophiles après le dépôt, plus la surface est riche en groupements oxygénés, et notamment en acides carboxyliques. Le procédé comprend un passage d'activation au plasma d'argon seul, 5 passages de dépôt (argon et acide acrylique), puis un passage de recuit au plasma d'argon seul.

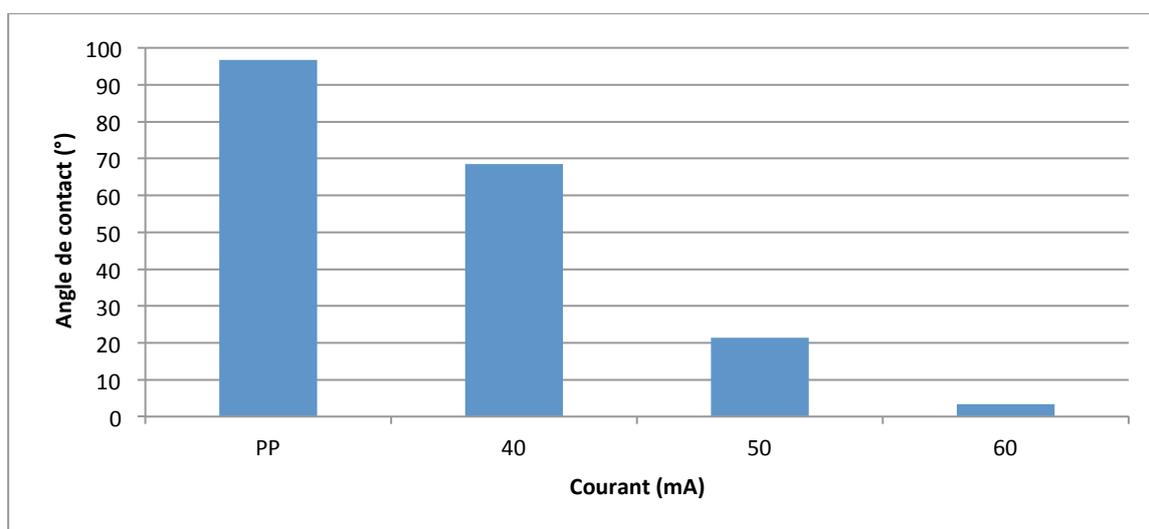


Figure II.71 – Angles de contact mesurés sur les dépôts d'acide acrylique en fonction du courant à l'électrode haute tension.

Flux d'argon : 3000 sccm (standard cubic centimeter per minute), Flux de vapeur d'acide acrylique : 2,5 sccm.

La présence du dépôt diminue de façon drastique l'angle de contact mesuré sur les échantillons. La présence des groupements carboxyliques en surface augmente fortement la mouillabilité du substrat grâce à la formation de liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau et les acides carboxyliques.

Les conditions retenues à l'issue de cette étude sont les suivantes :

- Distance torche substrat : 10mm
- Courant : 60 mA
- Flux de travail (argon) : 3000 sccm
- Flux d'acide acrylique : 2,5 sccm (flux du gaz porteur (Ar) : 250 sccm)

### 2.7.1 Caractérisation du dépôt

Les dépôts d'acide acrylique ont été caractérisés par les spectroscopies IR et XPS, afin d'analyser la composition de la surface, et s'assurer de la présence du dépôt et donc des groupements carboxyliques.

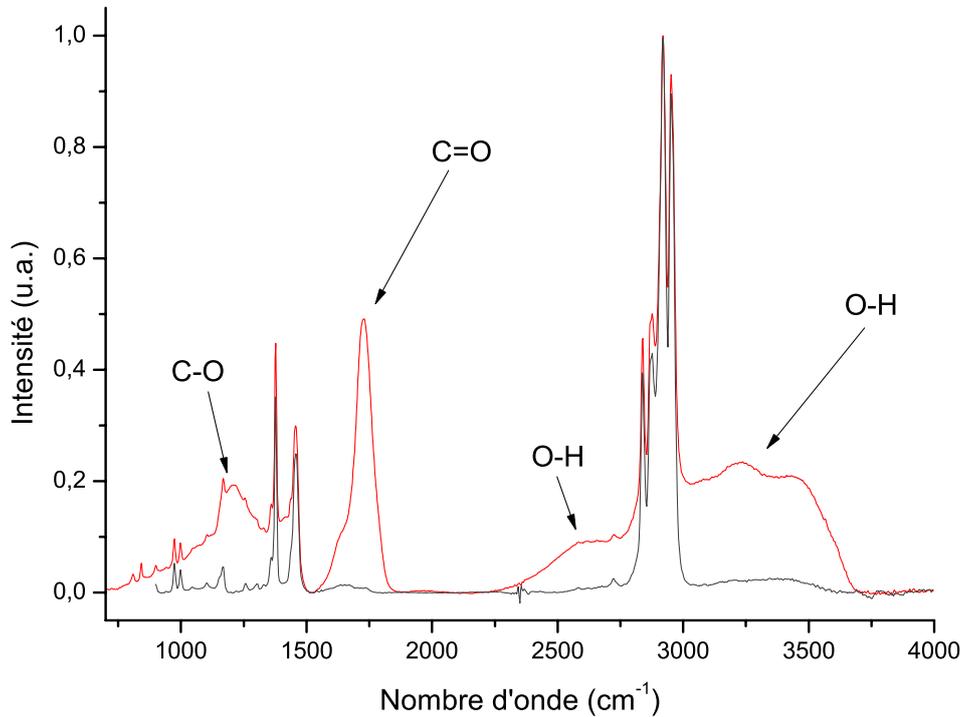


Figure II.72 – Spectres infrarouge du polypropylène non traité (—), et du PP fonctionnalisé avec un dépôt d'acide acrylique (—).

Le spectre IR du dépôt d'acide acrylique présente des bandes C-O situées vers 1200 cm<sup>-1</sup>, C=O et O-C=O à 1700 cm<sup>-1</sup>, et une large bande O-H de 2300 à 3700 cm<sup>-1</sup>, de forte intensité correspondant aux groupements carboxyliques, et témoignant ainsi de l'existence du dépôt. Toutefois, la signature spectrale du PP (1350-1450 cm<sup>-1</sup> et 2750-3000 cm<sup>-1</sup>) est toujours bien présente. Cela signifie que le dépôt présente une faible épaisseur. En effet, comme cela a été calculé dans le paragraphe II.0, la profondeur de pénétration du faisceau peut atteindre 390 nm. La présence des bandes C-H du PP démontre que le dépôt possède une épaisseur inférieure à cette valeur, permettant ainsi au faisceau infrarouge de traverser le dépôt et atteindre le cœur du polypropylène.

Une analyse XPS a également été réalisée pour comparer l'effet du traitement par torche à plasma à celui du dépôt d'acide acrylique. La composition chimique de la surface est détaillée dans le Tableau II.8, tandis que les pics C1s des deux traitements sont présentés dans la Figure II.73.

Tableau II.8 – Composition atomique de la surface de PP en fonction du traitement subit.

Traitement	C	O	N	Si	F	O/C
Activation par plasma d'air	72,21	24,1	2,75		0,93	0,33
Dépôt d'acide acrylique	77,39	21,47	0,73	0,41		0,28

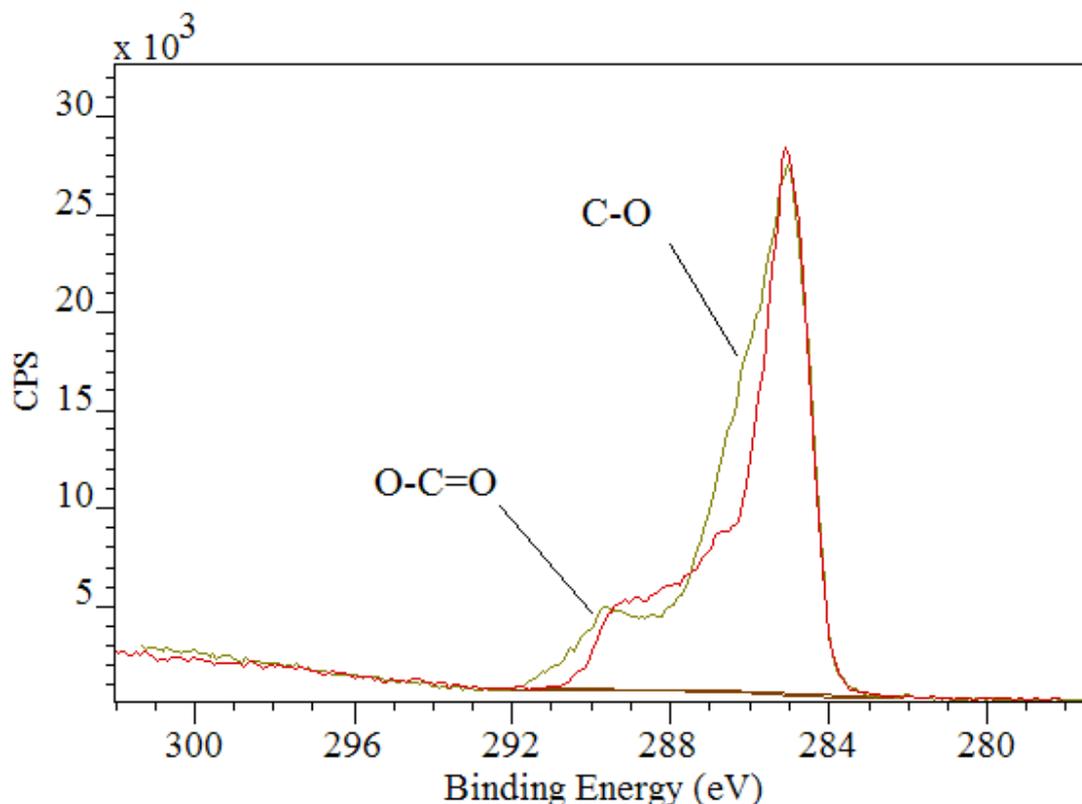


Figure II.73 – Pics C1s de PP activé par plasma d'air (—) et d'un dépôt d'acide acrylique par torche DBD sur un échantillon de PP (—).

La composition atomique du PP diffère légèrement selon le traitement réalisé. Le dépôt semble aboutir à une fonctionnalisation plus faible, le taux de carbone étant plus élevé suite à ce traitement, au détriment de l'oxygène et de l'azote, et est réalisé sous plasma d'argon. La présence de l'azote sur la surface du dépôt d'acide acrylique provient probablement d'une contamination de l'air ambiant, liée au procédé utilisé sous atmosphère non contrôlée.

Aussi, le rapport O/C est plus faible dans le cas du dépôt que dans celui du traitement par plasma d'air, ce qui semble indiquer que la densité des groupements oxygénés, et donc la fonctionnalisation, est plus faible dans le cas du dépôt d'acide acrylique.

L'étude du pic C1s révèle que le dépôt d'acide acrylique permet d'obtenir des quantités plus importantes de liaisons C-O, repérées à 286,5 eV, tandis que l'intensité du signal autour de 288 eV (C=O) est plus faible. La fonctionnalisation par dépôt d'acide acrylique présente donc une composition chimique légèrement différente de celle obtenue après activation par plasma d'air.

Le dépôt d'acide acrylique permet d'enrichir la surface en groupements oxygénés, notamment des acides carboxyliques, qui doivent permettre l'immobilisation de biomolécules sur la surface.

### 2.7.2 Stabilité du dépôt

Le but du dépôt d'acide acrylique étant d'immobiliser des biomolécules à sa surface grâce aux fonctions carboxyliques, il est important de s'assurer que le dépôt se maintienne pendant le protocole de greffage. Le suivi de la stabilité du dépôt a été réalisé par mesure de l'angle de contact, les échantillons ont été analysés avant et après rinçage à l'eau. Les résultats présentés sur la Figure II.74 montrent très clairement que le dépôt ne résiste pas à ce rinçage à l'eau.

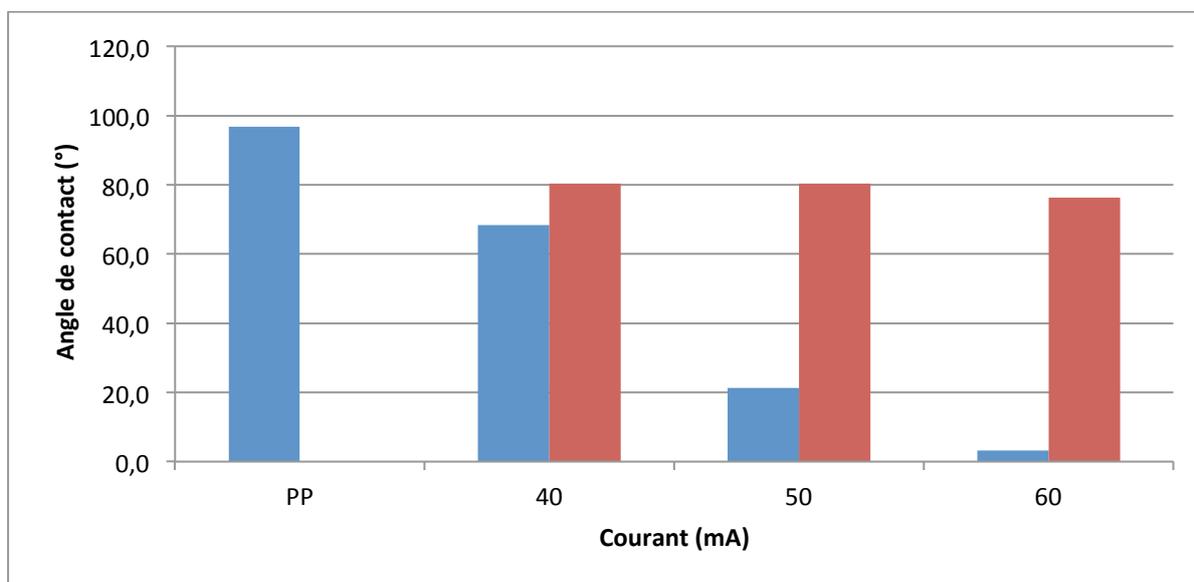


Figure II.74 - Angles de contact mesurés sur les dépôts d'acide acrylique en fonction du courant à l'électrode haute tension, avant (■) et après rinçage (■).

Les angles de contact mesurés après rinçages ont ainsi nettement augmenté, passant de 21,4° à 80,4° dans le cas d'un traitement réalisé avec un courant de 50mA, ou encore de 3,3° à 76,3° pour un courant de 60mA. Il apparaît également que, quel que soit l'intensité du courant utilisée pour réaliser le dépôt d'acide acrylique, les angles de contact mesurés après rinçage présentent quasiment la même valeur, à environ 80°.

Ces valeurs demeurent néanmoins inférieures à celle du polypropylène non traité qui est de 96,8°, ce qui signifie qu'après rinçage, il est possible qu'une certaine quantité du dépôt soit retenue à la surface du PP, permettant ainsi de conserver une partie des fonctions oxygénées, comme les acides carboxyliques entre autres.

L'utilisation d'une torche DBD à la pression atmosphérique pour réaliser un dépôt d'acide acrylique est possible, et peut permettre d'immobiliser des biomolécules à la surface du PP. En revanche, la faible résistance du dépôt au lavage risque de limiter les possibilités de greffage, le dépôt risquant de se dissoudre pendant l'immobilisation des biomolécules.

### 3 Conclusion

L'effet d'un traitement de surface par plasma à la pression atmosphérique sur du polypropylène a été étudié dans ce chapitre.

Le traitement du polypropylène par plasma à la pression atmosphérique crée des fonctions chimiques oxygénées en surface, observées par FTIR-ATR avec des pics entre 1500 et 1900  $\text{cm}^{-1}$ , et vers 3000  $\text{cm}^{-1}$ , ainsi qu'en XPS avec des contributions de C-O et C=O dans la décomposition du pic du carbone 1s, compatibles avec la présence de fonctions chimiques de type aldéhyde ou acide carboxylique pouvant permettre l'immobilisation de peptides par liaisons covalentes. La dérivation chimique par le biais d'un hydrazide chloré a permis de confirmer la présence de fonctions aldéhydes en surface après traitement par plasma d'air à la pression atmosphérique. Les conditions du traitement plasma ont été optimisées afin de maximiser la densité de groupements fonctionnels en surface.

Cette étude a également montré l'existence de deux phénomènes en compétition qui affectent le polypropylène lors du traitement par plasma : la scission des chaînes de polymère avec la formation d'insaturations et l'oxydation. Les conditions de traitement conditionnent l'importance de l'un ou l'autre des effets. De plus, la dégradation thermique du matériau peut avoir lieu à cause de la température importante. Si la distance torche-substrat est trop grande ou la vitesse de traitement trop élevée, ce qui correspond aux conditions de traitement plus douces, l'effet du plasma aboutit à de la scission des chaînes polymères et la formation de liaisons C=C, comme l'indique la prépondérance de la bande IR à 1640  $\text{cm}^{-1}$  vis-à-vis de la bande à 1720  $\text{cm}^{-1}$  regroupant les C=O (aldéhydes, cétones, acides). En effet le phénomène de formation d'insaturations sur la surface du polymère est souvent accompagné de la réticulation de celui-ci. À l'inverse, si les conditions sont trop dures (distance faible, vitesse faible), l'effet thermique du gaz plasmagène provoque probablement une fusion locale suivie d'un recuit rapide qui conduit à une modification de la cristallinité du matériau avec une augmentation du taux de la phase isotactique.

De plus, le diagnostic plasma par spectroscopie d'émission optique a confirmé la pertinence de ces conditions, et montré que la fonctionnalisation de surface est liée, entre autres espèces, à la présence d'espèces oxygénées et notamment les radicaux OH $\cdot$  au sein du plasma.

L'étude de différentes conditions de traitement par XPS a permis de montrer que les conditions adéquates pour la formation des fonctions carbonyles sur le polypropylène sont :

- Fréquence de la décharge électrique : 21 kHz
- Distance torche-substrat : 10 mm
- Vitesse de déplacement du substrat : 15 m/min

Enfin, le dépôt de polymères tels que l'acide acrylique par le biais d'une torche à plasma de type DBD peut représenter une alternative intéressante pour enrichir la surface du PP en acides carboxyliques. Toutefois, les dépôts obtenus ne possèdent qu'une faible résistance à l'immersion, ce qui risque de réduire fortement la quantité de biomolécules immobilisées à la surface du dépôt.

## Références

- [1] D. P. Dowling, F. T. O'Neill, V. Milosavljevic, and V. J. Law, "DC Pulsed Atmospheric-Pressure Plasma Jet Image Information," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 39, no. 11, pp. 2326–2327, 2011.
- [2] B. Twomey, A. Nindrayog, K. Niemi, W. G. Graham, and D. P. Dowling, "Correlation Between the Electrical and Optical Properties of an Atmospheric Pressure Plasma During Siloxane Coating Deposition," *Plasma Chem. Plasma Process.*, vol. 31, no. 1, pp. 139–156, 2011.
- [3] D. Ben Salem, J. Pulpytel, F. Pillier, A. Pailleret, and F. Arefi-Khonsari, "Amorphization and Polymorphism Modification of Polyamide-6 Films via Open-Air Non-Equilibrium Atmospheric Pressure Plasma Jet Treatment," *Plasma Process. Polym.*, vol. 11, no. 10, pp. 961–973, 2014.
- [4] J. Pulpytel, V. Kumar, P. Peng, V. Micheli, N. Laidani, and F. Arefi-Khonsari, "Deposition of Organosilicon Coatings by a Non-Equilibrium Atmospheric Pressure Plasma Jet: Design, Analysis and Macroscopic Scaling Law of the Process," *Plasma Process. Polym.*, vol. 8, no. 7, pp. 664–675, 2011.
- [5] S. Bhatt, J. Pulpytel, S. Mori, M. Mirshahi, and F. Arefi-Khonsari, "Cell Repellent Coatings Developed by an Open Air Atmospheric Pressure Non-Equilibrium Argon Plasma Jet for Biomedical Applications," *Plasma Process. Polym.*, vol. 11, no. 1, pp. 24–36, 2014.
- [6] L. Brancalion, M. P. Bamberg, T. Sakamaki, and N. Kollias, "Attenuated Total Reflection–Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Possible Method to Investigate Biophysical Parameters of Stratum Corneum In Vivo," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 116, no. 3, pp. 380–386, 2001.
- [7] J. P. Luongo, "Infrared study of polypropylene," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 3, no. 9, pp. 302–309, 1960.
- [8] N. V. Bhat and D. J. Upadhyay, "Plasma-induced surface modification and adhesion enhancement of polypropylene surface," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 86, no. 4, pp. 925–936, 2002.
- [9] G. Dana, "Constantes des spectres infrarouges," in *Techniques de l'ingénieur*, 1999, p. k1010.
- [10] N. Encinas, J. Abenojar, and M. A. Martánez, "Development of improved polypropylene adhesive bonding by abrasion and atmospheric plasma surface modifications,"

*Int. J. Adhes. Adhes.*, vol. 33, no. 0, pp. 1–6, 2011.

[11] O. Carton, D. Ben Salem, S. Bhatt, J. Pulpytel, and F. Arefi-Khonsari, “Plasma Polymerization of Acrylic Acid by Atmospheric Pressure Nitrogen Plasma Jet for Biomedical Applications,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 9, no. 10, pp. 984–993, 2012.

[12] K. Wang, W. Wang, D. Yang, Y. Huo, and D. Wang, “Surface modification of polypropylene non-woven fabric using atmospheric nitrogen dielectric barrier discharge plasma,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 256, no. 22, pp. 6859–6864, 2010.

[13] F. Arefi-Khonsari and M. Tatoulian, “Plasma Processing of Polymers by a Low-Frequency Discharge with Asymmetrical Configuration of Electrodes,” in *Advanced Plasma Technology*, Wiley - VCH Weinheim., R. D’Agostino, P. Favia, Y. Kawai, H. Ikegami, N. Sato, and F. Arefi-Khonsari, Eds. 2007.

[14] R. Dorai and M. J. Kushner, “A model for plasma modification of polypropylene using atmospheric pressure discharges,” *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 6, p. 666, 2003.

[15] P. J. Morris, *Polymer Pioneers: A Popular History of the Science and Technology of Large Molecules*. Chemical Heritage Foundation, 2005.

[16] F. Poncin-Epaillard, J. C. Brosse, and T. Falher, “Cold plasma treatment: Surface or bulk modification of polymer films?,” *Macromolecules*, vol. 30, no. 15, pp. 4415–4420, 1997.

[17] H. Miyata, S. Konishi, T. Ohno, and F. Hatayama, “FTIR studies of adsorption of NO, NO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O on layered V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ZrO<sub>2</sub>,” *J Chem Soc Faraday Trans*, vol. 91, no. 10, pp. 1557–1562, 1995.

[18] J. Baltrusaitis, *Experimental and Theoretical Studies of the Adsorption of Atmospherically Relevant Gases on Metal Oxide and Carbonate Surfaces*. ProQuest, 2007.

[19] D. Briggs and G. Beamson, “Primary and secondary oxygen-induced C1s binding energy shifts in x-ray photoelectron spectroscopy of polymers,” *Anal. Chem.*, vol. 64, no. 15, pp. 1729–1736, 1992.

[20] Y.-G. Lei, K.-M. Ng, L.-T. Weng, C.-M. Chan, and L. Li, “XPS C 1s binding energies for fluorocarbon–hydrocarbon microblock copolymers,” *Surf. Interface Anal.*, vol. 35, no. 10, pp. 852–855, 2003.

[21] C. D. Wagner, A. V. Naumkin, A. Kraut-Vass, W. Allison, C. J. Powell, and J. R. Rumble Jr, *The NIST X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Database*. .

[22] E. P. Ivanova, J. P. Wright, D. K. Pham, N. Brack, P. Pigram, Y. V. Alekseeva, G. M. Demyashev, and D. V. Nicolau, “A comparative study between the adsorption and covalent binding of human immunoglobulin and lysozyme on surface-modified poly(tert-butyl methacrylate),” *Biomed. Mater.*, vol. 1, no. 1, p. 24, 2006.

- [23] M. Ghasemi, “Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma,” Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, Paris, 2007.
- [24] A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, M. Salmain, and C.-M. Pradier, “Grafting of Lysozyme and/or Poly(ethylene glycol) to Prevent Biofilm Growth on Stainless Steel Surfaces,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 7, pp. 2101–2109, 2009.
- [25] D. Duday, C. Vreuls, M. Moreno, G. Frache, N. D. Boscher, G. Zocchi, C. Archambeau, C. Van De Weerd, J. Martial, and P. Choquet, “Atmospheric pressure plasma modified surfaces for immobilization of antimicrobial nisin peptides,” *Surf. Coat. Technol.*, vol. 218, pp. 152–161, 2013.
- [26] J. Baltrusaitis, P. M. Jayaweera, and V. H. Grassian, “XPS study of nitrogen dioxide adsorption on metal oxide particle surfaces under different environmental conditions,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 11, no. 37, pp. 8295–8305, 2009.
- [27] D. Briggs and G. Beamson, “XPS studies of the oxygen 1s and 2s levels in a wide range of functional polymers,” *Anal. Chem.*, vol. 65, no. 11, pp. 1517–1523, 1993.
- [28] H. J. Kim, I.-S. Bae, S.-J. Cho, J.-H. Boo, B.-C. Lee, J. Heo, I. Chung, and B. Hong, “Synthesis and characteristics of NH<sub>2</sub>-functionalized polymer films to align and immobilize DNA molecules,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 7, no. 1, p. 30, 2012.
- [29] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, 2013.
- [30] T. P. King, S. W. Zhao, and T. Lam, “Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkage,” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 25, no. 19, pp. 5774–5779, 1986.
- [31] S. Raddatz, J. Mueller-Ibeler, J. Kluge, L. Wäß, G. Burdinski, J. R. Havens, T. J. Onofrey, D. Wang, and M. Schweitzer, “Hydrazide oligonucleotides: new chemical modification for chip array attachment and conjugation,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 21, pp. 4793–4802, 2002.
- [32] J.-M. Heldt, N. Fischer-Durand, M. Salmain, A. Vessières, and G. Jaouen, “The Use of Glycidol to Introduce Aldehyde Functions Into Proteins – Application to the Fluorescent Labelling of Bovine Serum Albumin and Avidin,” *Eur. J. Org. Chem.*, vol. 2007, no. 32, pp. 5429–5433, 2007.
- [33] L. E. Pimentel Real, A. M. Ferraria, and A. M. Botelho do Rego, “The influence of weathering conditions on the properties of poly(vinyl chloride) for outdoor applications. An analytical study using surface analysis techniques,” *Polym. Test.*, vol. 26, no. 1, pp. 77–87, 2007.
- [34] D. J. Balazs, K. Triandafillu, Y. Chevolut, B.-O. Aronsson, H. Harms, P. Descouts,

and H. J. Mathieu, “Surface modification of PVC endotracheal tubes by oxygen glow discharge to reduce bacterial adhesion,” *Surf. Interface Anal.*, vol. 35, no. 3, pp. 301–309, 2003.

**CHAPITRE III : IMMOBILISATION DE PEPTIDES  
SUR LA SURFACE D'UN POLYPROPYLENE TRAITÉ  
PAR PLASMA À LA PRESSION ATMOSPHÉRIQUE**

## Introduction

L'immobilisation de biomolécules, de type peptide, sur des surfaces permet dans de nombreux domaines (équipements publics ou médicaux) de conférer au matériau d'origine leurs propriétés biologiques, en particulier le caractère antibactérien de ces molécules [1]–[4].

L'introduction de fonctions chimiques en surface d'échantillons en polypropylène par un traitement par torche plasma à la pression atmosphérique ou par dépôt d'acide acrylique, méthodes étudiées dans le chapitre précédent, permet d'envisager des réactions chimiques entre la surface et les peptides d'intérêt, aboutissant à la formation de liaisons covalentes.

Dans le cadre de ce projet, les biomolécules choisies sont le lysozyme et la nisine. En raison de sa plus grande disponibilité, le lysozyme sera principalement utilisé pour l'étude de l'immobilisation, ceci permettant de conserver la nisine pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des échantillons fonctionnalisés.

Cette immobilisation a été étudiée par le biais des méthodes de caractérisation de surface classiques telles que les spectroscopies FTIR et XPS. Après avoir décrit le protocole expérimental mis au point pour cette fonctionnalisation, les conditions de l'immobilisation seront étudiées, c'est-à-dire : la durée du procédé, la concentration des solutions en agents chimiques et peptides, mais aussi la nature des liaisons chimiques mises en jeu grâce à l'utilisation de différentes techniques et produits de rinçage. Enfin, le vieillissement de la fonctionnalisation sera examiné par analyse de la surface pour des échantillons traités à différentes périodes.

L'utilisation de la technique de dérivation chimique utilisée dans le chapitre précédent permettra d'identifier la contribution des différentes réactions chimiques possibles, avec les acides carboxyliques et les aldéhydes, dans l'immobilisation.

L'activation par plasma sera comparée au dépôt d'acide acrylique par plasma, comme support de l'immobilisation des peptides.

L'étude ainsi menée permettra d'identifier les paramètres permettant l'immobilisation des biomolécules, avant de tester l'activité biologique des échantillons traités dans le chapitre suivant.

## 1 Protocole d'immobilisation des peptides par réaction chimique sur la surface du PP

L'obtention des fonctions chimiques de type carbonyle décrite dans le chapitre II va nous permettre de faire réagir les amines présentes sur la structure des peptides pour obtenir une immobilisation par liaison covalente, en se basant sur les réactions chimiques entre ces amines et les acides carboxyliques ou les aldéhydes, comme décrit dans le chapitre I.3.3 (Figure III.75).

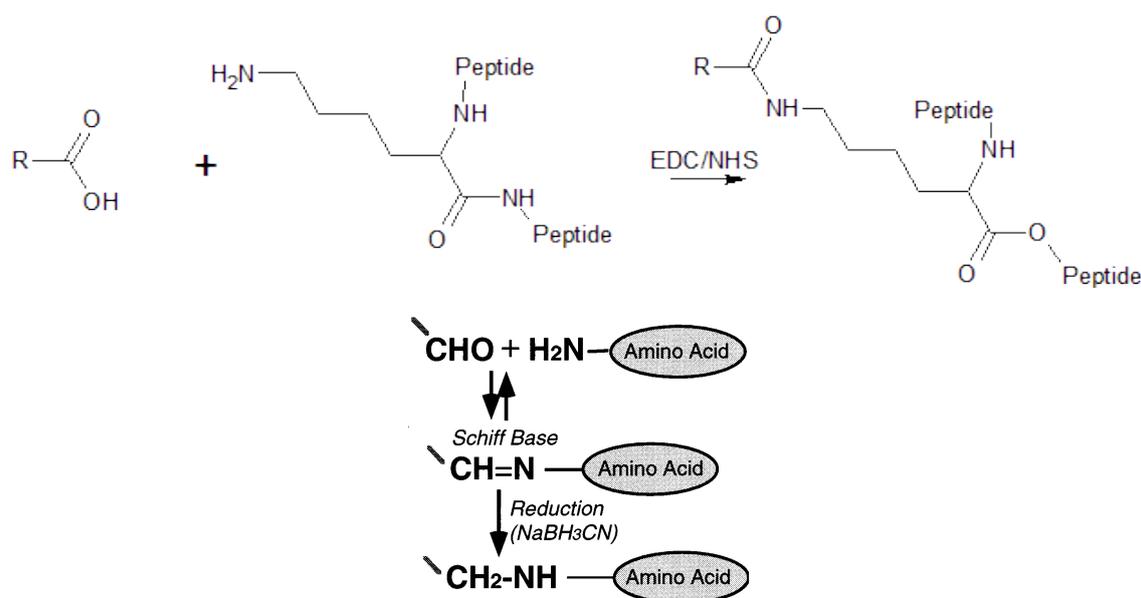


Figure III.75 – Réactions chimiques entre une amide et (A) un acide carboxylique, et (B) un aldéhyde

Dans ce travail de thèse, la perspective d'un développement industriel est primordiale dans la conception des méthodes de travail. Dans ce contexte, le procédé doit être économique en durée, en coût, en équipement et en produits. C'est donc dans cet esprit que le protocole qui sera décrit dans les lignes qui suivent a été élaboré.

### 1.1 Description du protocole

Le protocole mis au point pour l'immobilisation des peptides comporte deux étapes distinctes : une étape de mise en contact des peptides avec la surface pour permettre la réaction chimique d'immobilisation, et une étape de lavage des échantillons qui permet d'éliminer les molécules n'ayant pas réagi avec des groupements chimiques de la surface.

### 1.1.1 Matériels

Deux types de biomolécules ont été sélectionnés pour cette étude, le lysozyme et la nisine. Le lysozyme de blanc d'œuf de poule (Hen Egg White Lysozyme, HEWL) est fourni par Sigma-Aldrich et BioSolve, la nisine provient de Danisco (Nisaplin, 2,5% de nisine), de Sigma-Aldrich (Nisin from *Lactococcus lactis*, 2,5%) et de Molekula (Nisin, environ 5%). Les activateurs chimiques utilisés dans ce procédé, à savoir le N-ethyl-N'-(3-(diméthylamino) propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS), ont été acquis auprès de Sigma-Aldrich.

La préparation commerciale de lysozyme est utilisée telle quelle pour la préparation des solutions de greffage. La nisine est utilisée après avoir été purifiée par un procédé de chromatographie liquide à haute performance (HPLC, voir annexe).

### 1.1.2 Greffage des peptides sur la surface

Une solution aqueuse contenant l'EDC, le NHS et les peptides (lysozyme et nisine) est préparée. La concentration des activateurs est déterminée par la suite. La solution (300 $\mu$ L) est déposée sur la surface des échantillons à fonctionnaliser (Figure III.76). Les échantillons sont laissés à température ambiante le temps de la réaction.

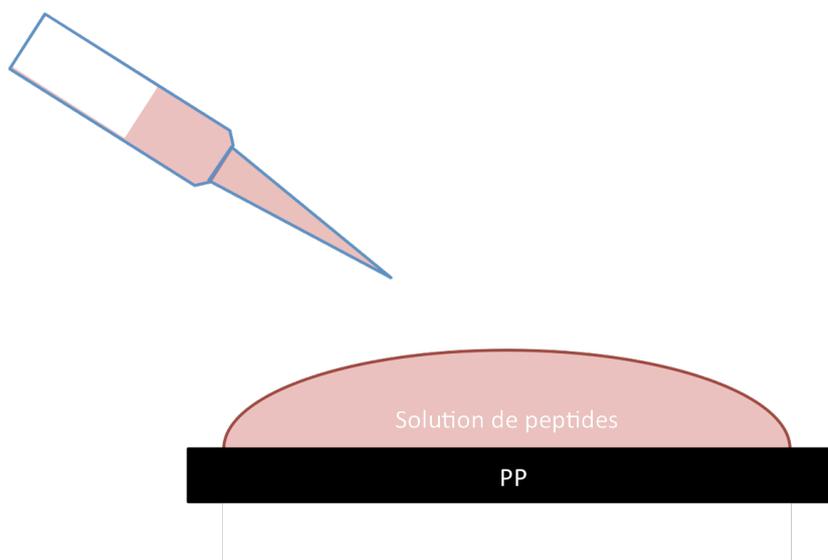


Figure III.76 - Schéma du protocole de greffage des peptides sur la surface d'échantillons en PP.

Deux variantes de ce protocole peuvent également être réalisées, en fonction des expériences. Il est possible de travailler avec les peptides et les activateurs dans deux solutions distinctes, et déposées sur l'échantillon en deux étapes.

### 1.1.3 Lavage des échantillons

Après immobilisation, les échantillons sont lavés afin d'éliminer les peptides n'ayant pas créé de liaisons covalentes avec la surface. Le lavage se fait en solution, dans un volume d'environ 50 mL, sous agitation. La nature de la solution peut varier selon les expériences.

## 1.2 Paramètres influençant l'immobilisation

Le protocole décrit dans ce chapitre est dépendant de nombreux paramètres ayant une influence sur l'immobilisation de peptides sur la surface d'échantillons en PP qui sera étudiée. Ci-dessous sont présentés ces critères ainsi que les moyens d'étudier leur impact sur l'efficacité de l'immobilisation.

La concentration de protéine n'a pas été étudiée, celle-ci a été choisie de façon à obtenir un excès de molécules par rapport au nombre de fonctions chimiques possiblement présentes en surface en considérant une couche dense de groupements.

### 1.2.1 Nature des fonctions chimiques créées par l'activation par plasma

L'impact du type de fonctions chimiques obtenues par le traitement plasma sera évalué selon 2 méthodes :

- la première consiste à utiliser des échantillons traités selon les conditions décrites dans le chapitre II.2.5 aboutissant soit à de l'oxydation, soit majoritairement à de la scission de chaîne et formation de liaisons C=C. L'objectif est de mettre en évidence l'importance du traitement plasma, en particulier la création de fonctions oxygénées, dans l'immobilisation et le greffage des peptides.
- la seconde se base sur le principe de dérivation chimique avec le 2-chlorobenzoïc hydrazide abordé dans le chapitre II.2.6 (Figure III.77). Cette expérience pourra nous permettre d'évaluer la contribution des acides carboxyliques et aldéhydes dans la formation de liaisons covalentes sur la surface des échantillons.

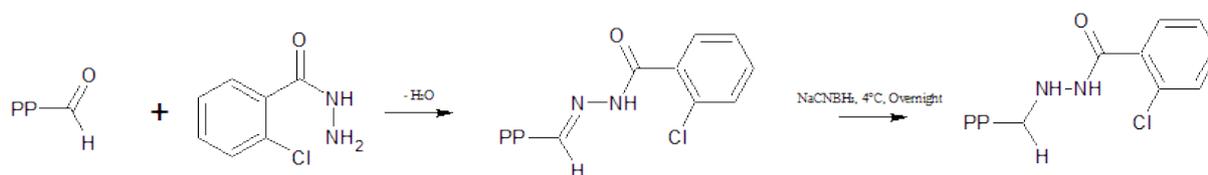


Figure III.77 – Réaction du 2-chlorobenzoic hydrazide avec un aldéhyde surfacique

### 1.2.2 Nombre d'étapes dans le protocole

Comme annoncé dans le paragraphe 1.1, il existe plusieurs variations du protocole, permettant d'immobiliser les peptides à la surface de l'échantillon. Elles seront comparées pour identifier le protocole permettant d'immobiliser la plus grande quantité de molécules sur la surface des échantillons à fonctionnaliser.

- Protocole A (1 étape) : la solution aqueuse contient les activateurs EDC et NHS ainsi que les peptides (lysozyme ou nisine). L'intérêt de cette méthode est de développer un protocole rapide et efficace dans la perspective d'une industrialisation.
- Protocole B (2 étapes) : Dans un premier temps, une solution aqueuse des activateurs EDC et NHS est mise en contact avec les échantillons traités par plasma afin de rendre les acides carboxyliques réactifs en formant un ester de N-succinimide. Dans un second temps, les peptides en solution sont ajoutés à la goutte contenant le mélange EDC/NHS. L'intérêt de ce protocole est d'éviter la réticulation des peptides, le lysozyme ou la nisine possédant une ou plusieurs fonctions acides carboxyliques et amines sur leur structure. De plus, faire réagir les peptides avec une surface présentant directement des fonctions suffisamment réactives pourrait être bénéfique pour l'immobilisation, notamment d'un point de vue cinétique.
- Protocole C (2 étapes) : Dans un premier temps, la solution de peptide (300µL) est mise en contact avec les échantillons traités par plasma, permettant ainsi leur adsorption sur la surface. Dans un second temps, cette surface est mise en contact avec le mélange d'activateurs EDC et NHS afin de former des liaisons covalentes. L'intérêt de cette méthode est de faire réagir la surface avec les molécules lorsque celles-ci sont à proximité des groupements chimiques formés sur l'échantillon.

### 1.2.3 Durée du greffage

La durée de la mise en contact des échantillons avec la ou les solutions de peptides et d'activateurs chimiques est un paramètre très important dans le contrôle de l'immobilisation. En effet, celle-ci doit être suffisamment longue pour permettre à la fois l'adsorption des molécules et la formation des liaisons chimiques, mais suffisamment courte pour que le protocole reste cohérent avec la perspective d'une industrialisation. Une réaction de plusieurs dizaines de minutes est donc à exclure.

### 1.2.4 pH de la solution de peptides

Lors de réactions chimiques en solutions aqueuses, le pH de la solution est un paramètre influant sur la faisabilité de la réaction. En effet, les fonctions chimiques mises en jeu, -COOH et -NH<sub>2</sub>, sont impliqués dans des couples acide/base et leur nature dépend fortement du pH de la solution. La maîtrise de ce critère doit nous permettre d'optimiser les conditions d'immobilisations.

Le couple COO<sup>-</sup>/COOH pour des groupements surfaciques possède un pKa entre 4 et 5 [5]–[7], tandis que le couple NH<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub><sup>+</sup> de la lysine présente un pKa de 10,5 [8]. Les COOH sont activés par EDC/NHS, mais les amines de la lysine sont majoritairement sous forme NH<sub>3</sub><sup>+</sup> à un pH inférieur à 10,5, rendant théoriquement la réaction chimique difficile [9].

De plus, Carlsson et al. (2004, [10]) ont montré que l'adsorption du lysozyme sur une surface dépend du pH, et notamment de son écart avec le point isoélectrique des peptides, qui est de 11,35 pour le lysozyme, et d'environ 8,5 pour la nisine.

### 1.2.5 Concentration en activateurs EDC et NHS

Comme décrit par Sam *et al.* [11] et présenté dans le chapitre I, l'utilisation de EDC et NHS conjointement aboutit à la formation d'ester de N-hydroxysuccinimide, suffisamment réactifs pour réagir avec les amines des résidus lysine des peptides. De plus, la concentration de ces espèces influe sur le rendement de la conversion des acides en esters. C'est pourquoi, l'effet de la variation des concentrations de EDC et NHS sur l'immobilisation de peptides sera étudié.

### 1.2.6 Méthodes et solutions de lavage

Le lavage des échantillons n'a pas d'influence sur les processus physico-chimiques impliqués dans l'immobilisation de peptides sur une surface (adsorption, formation de liaisons chimiques, etc.). En revanche, cette étape a pour but de retirer les peptides n'ayant pas formé de liaisons avec la surface, et de ne laisser sur les échantillons que les peptides liées de façon covalente.

Plusieurs méthodes de lavage seront comparées afin de déterminer la méthode la plus adéquate pour terminer le procédé, mais aussi pour étudier les interactions peptide-surface et peptide-peptide :

- Lavage à l'eau sous agitation : méthode la plus simple et économique pour laver les échantillons après immobilisation.
- Lavage à l'eau sous ultrasons, plus efficace que le précédent sans changer de solvant.
- Lavage avec des tensio-actifs : l'utilisation de tensio-actifs permet d'ajouter une dimension chimique au lavage des échantillons. Les tensio-actifs, par leur nature amphiphile, se positionnent à l'interface entre l'eau et les peptides, facilitant ainsi leur détachement de la surface. Néanmoins, leur capacité à s'adsorber sur les surfaces et autour de molécules de type protéine risque de poser un problème dans le maintien de l'activité biologique des peptides immobilisés.

### 1.3 Immobilisation des biomolécules sur un dépôt d'acide acrylique

Le dépôt d'acide acrylique par torche DBD à la pression atmosphérique a été étudié dans le chapitre II, cette technique permet de réaliser une couche de poly(acide acrylique) à la surface du matériau, enrichissant ainsi la surface en groupements carboxyliques. Bien que les dépôts obtenus présentent une faible résistance à l'eau, la mesure d'angle de contact des échantillons rincés suggère qu'une partie du dépôt s'est maintenu à la surface, permettant ainsi l'immobilisation des biomolécules. L'immobilisation de nisine et lysozyme sur le dépôt d'acide acrylique sera ainsi comparé à l'immobilisation issue d'une activation par torche plasma d'air à la pression atmosphérique.

## 2 Caractérisation des surfaces après immobilisation des biomolécules

Les différentes conditions de traitement sont évaluées par XPS et FTIR (ATR-IR), afin de s'assurer de l'immobilisation des biomolécules sur la surface du PP traité par plasma, et d'identifier les conditions permettant un greffage covalent maximal des biomolécules.

### 2.1 Importance des conditions du traitement par plasma

L'étude du traitement du polypropylène par plasma à la pression atmosphérique décrite dans le chapitre II montre clairement qu'en fonction des conditions, il est possible d'obtenir des états de surface (ou traitements de surface) différents, notamment une surface présentant principalement des insaturations ou principalement des groupements oxygénés réactifs. L'objectif de ce paragraphe est de démontrer l'intérêt de l'introduction de groupements chimiques oxygénés sur la surface par le biais du traitement par plasma à la pression atmosphérique, dans le but d'y immobiliser des biomolécules. Cette expérience sera réalisée avec du lysozyme.

Le protocole de greffage décrit ci-dessus a été réalisé sur deux échantillons A et B traités par plasma dans des conditions différentes (Tableau III.9). La concentration en activateurs chimiques est de  $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  en EDC, et  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  en NHS, le lysozyme est utilisé à  $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), le pH final de la solution est mesuré à 5. Les matériaux fonctionnalisés ont ensuite été lavés à l'eau. Ces concentrations sont choisies afin de représenter un large excès par rapport aux groupements carboxyliques en surface. Le modèle des sphères dures permet d'estimer la concentration surfacique d'une couche dense d'acides carboxyliques à environ  $4 \cdot 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$ , soit  $9 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$  par échantillon de  $2,25 \text{ cm}^2$  de surface. Les concentrations utilisées permettent donc d'être en excès de peptides et d'activateurs.

Tableau III.9 - Conditions d'activation par plasma et de greffage des échantillons fonctionnalisés avec le lysozyme.

	Échantillon A	Échantillon B
PCT (%)	80	
Fréquence (kHz)	21	
Vitesse (m/min)	15	
Distance (mm)	10	20

Ces conditions aboutissent à une composition chimique de la surface différente pour chacun des échantillons, comme cela peut être observé par ATR-IR. Les spectres obtenus sont présentés sur la Figure III.78.

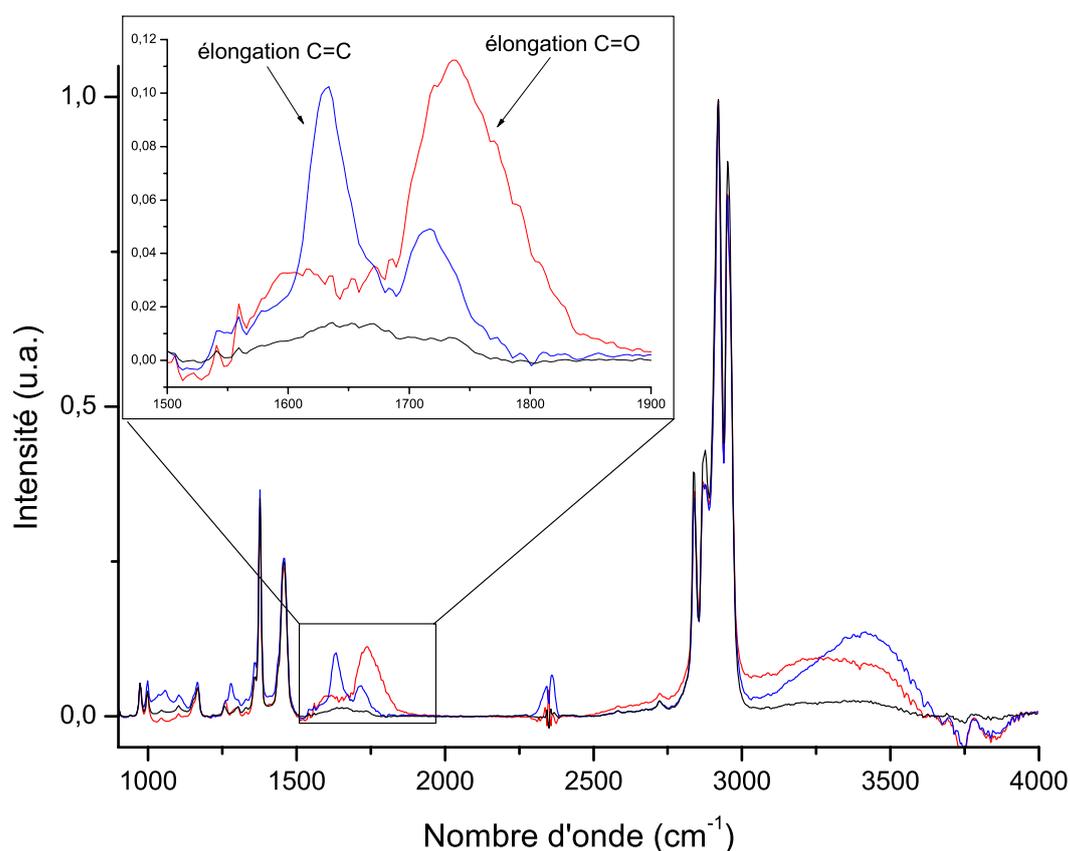


Figure III.78 – Analyse ATR-IR des échantillons A (10 mm, —) et B (20 mm, —) après activation par plasma. PP non traité (—).

L'échantillon A présente une bande intense à environ  $1750\text{ cm}^{-1}$ , regroupant la contribution de la liaison C=O (vibration d'élongation) des groupements chimiques aldéhydes, cétones, acides carboxyliques et esters. Cette bande est beaucoup moins intense pour l'échantillon B, et plutôt

centrée autour de  $1710\text{ cm}^{-1}$ , témoignant de la contribution plus importante des cétones et aldéhydes par rapport aux acides carboxyliques et esters. De plus, une bande intense détectée à  $1640\text{ cm}^{-1}$  sur cet échantillon correspond à la formation d'insaturations (C=C). Enfin, le profil des échantillons diffère également entre  $3000$  et  $3700\text{ cm}^{-1}$ . L'échantillon B présentant un signal intense autour de  $3450\text{ cm}^{-1}$  (amines, alcools), et moindre à  $3250\text{ cm}^{-1}$  (alcools, acides), tandis que le spectre de l'échantillon A est plus intense à  $3250\text{ cm}^{-1}$ . L'échantillon A présente donc une surface plus riche en groupements carbonyles, et notamment en acides carboxyliques.

Les conditions d'activation des deux échantillons aboutissant à des surfaces chimiquement différentes, le greffage est réalisé de manière identique sur les matériaux A et B afin d'évaluer l'efficacité de celui-ci en fonction de la composition chimique de la surface.

L'effet de la fonctionnalisation de la surface avec du lysozyme selon les conditions A, est présenté sur la Figure III.79 ci-dessous, et apparaît distinctement entre  $1500$  et  $1800\text{ cm}^{-1}$ . En effet, la bande à  $1750\text{ cm}^{-1}$  précédemment attribuée aux groupements C=O des aldéhydes, cétones, esters et acides carboxyliques a très fortement diminué, et dans le même temps, la signature spectrale des amides secondaires, constituée des deux bandes, une petite à  $1550\text{ cm}^{-1}$  attribuée aux N-H (Amide II) et une plus intense à  $1650\text{ cm}^{-1}$  (C=O, Amide I) a fait son apparition suite à la fonctionnalisation de la surface. À des nombres d'ondes plus grands, le greffage du lysozyme à la surface du matériau a induit la modification des bandes entre  $3000$  et  $3700\text{ cm}^{-1}$  avec une diminution de l'intensité des bandes à  $3250$  et  $3450\text{ cm}^{-1}$ , le signal étant ainsi centré sur  $3300\text{ cm}^{-1}$ , attribué aux N-H des amines et amides [12]–[15].

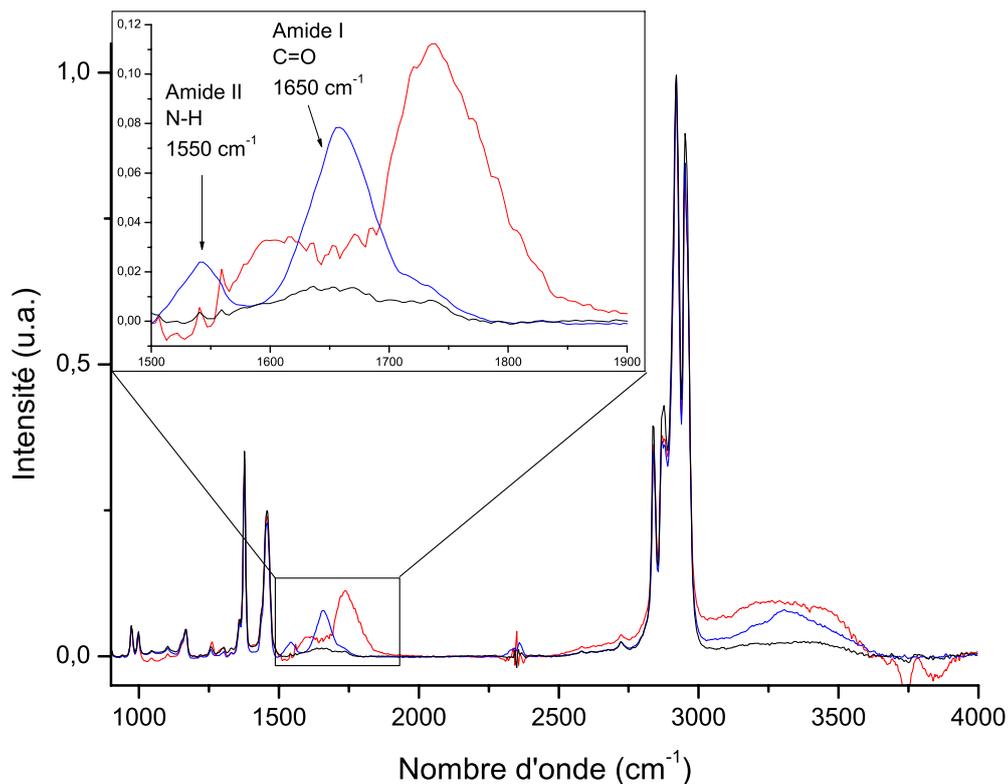


Figure III.79 - Spectre IR du traitement de l'échantillon A (d = 10 mm).

(—) Échantillon traité par plasma, (—) échantillon greffé avec du lysozyme, (—) PP non traité.

La présence de bandes des groupements amides secondaires sur le spectre ATR-IR des échantillons témoigne de la présence du lysozyme sur la surface du polypropylène, en effet les peptides et protéines sont constitués d'un enchaînement d'acides aminés, liés entre eux par des liaisons peptidiques (Figure III.80) [12]. Une petite contribution de cette bande est due à la liaison covalente formée entre la surface et le lysozyme, mais sa contribution reste minoritaire dans ce pic.

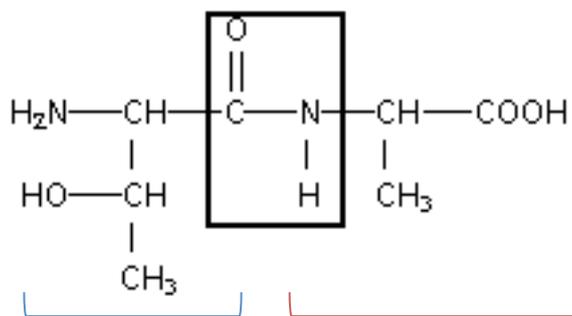


Figure III.80 - Schéma d'une liaison peptidique entre les acides aminés L-Thréonine (bleu), et L-Alanine (rouge).

La Figure III.81 présente les résultats de la fonctionnalisation de l'échantillon B avec le lysozyme. Cet échantillon, traité par plasma d'air à la pression atmosphérique à une distance de 20 mm présentait principalement des insaturations en surface, matérialisées par une bande IR intense à  $1640\text{ cm}^{-1}$ .

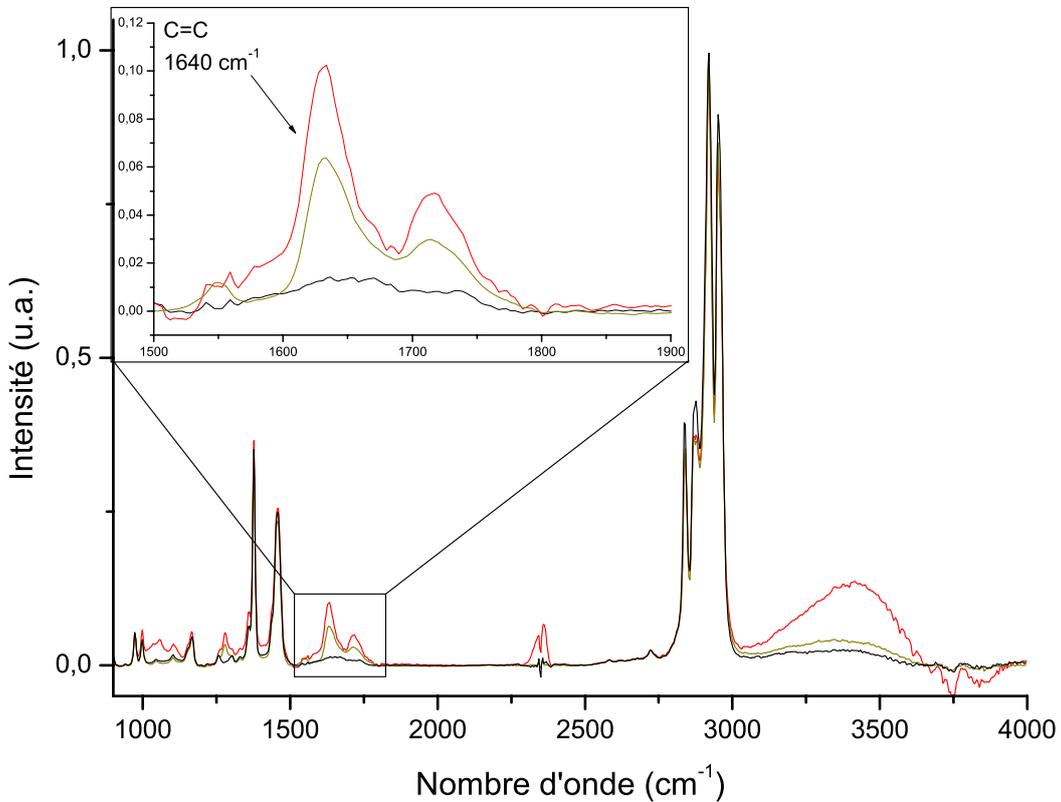


Figure III.81 - Spectre IR du traitement de l'échantillon B ( $d = 20\text{ mm}$ ).

(—) Échantillon traité par plasma, (—) échantillon greffé avec du lysozyme, (—) PP non traité.

Le greffage du lysozyme sur cette surface n'a pas apporté les modifications observées sur la Figure III.79, les bandes amides I et II (resp.  $1650$  et  $1550\text{ cm}^{-1}$ ) ne se distinguent pas des bandes C=C, de même que la bande à  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Le spectre après greffage présente les mêmes bandes qu'après le traitement par plasma, avec une intensité un peu plus faible, liée à la dissolution de la couche de faible cohésion, comportant probablement une partie des groupements chimiques en surface.

La fonctionnalisation avec le lysozyme n'a pas eu lieu sur l'échantillon B qui présentait principalement des insaturations. En revanche, l'échantillon A a bien été fonctionnalisé par la protéine, en témoigne la présence des signaux des groupements amides (C=O, N-H). La

présence des groupements oxygénés de type carbonyle, en particulier les aldéhydes et acides carboxyliques, est donc primordiale pour pouvoir immobiliser de façon covalente des biomolécules sur la surface du polypropylène activé par plasma.

## 2.2 Contrôle des paramètres du greffage

Le protocole de fonctionnalisation du polypropylène traité par plasma est régi par plusieurs paramètres (concentration des solutions, pH, durée, etc.), l'objectif de ce paragraphe est d'étudier l'influence de ces paramètres sur l'efficacité du greffage, et d'identifier les conditions permettant de réaliser une fonctionnalisation optimale.

### 2.2.1 Nombre et ordre des étapes du greffage

Les trois variantes (A, B et C) du protocole d'immobilisation des biomolécules sur du polypropylène traité par plasma, décrites dans le paragraphe 1 de ce chapitre et rappelées dans le Tableau III.10, sont comparées pour le greffage covalent de lysozyme. Les concentrations en EDC et NHS fixées à  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , comme le préconisent Sam *et al.* [11], la concentration en lysozyme est de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , et le pH est mesuré à 5. Le lavage est réalisé à l'eau.

Tableau III.10 – Description des protocoles de greffage A, B et C. Les échantillons sont mis en contact avec 1 (protocole A) ou 2 (B et C) solutions contenant le lysozyme ou les activateurs. Le tableau donne la composition des solutions en fonction de l'étape à suivre.

	Étape n°1	Étape n°2
<b>Protocole A</b>	Activateurs + Lysozyme	-
<b>Protocole B</b>	Activateurs	Lysozyme
<b>Protocole C</b>	Lysozyme	Activateurs

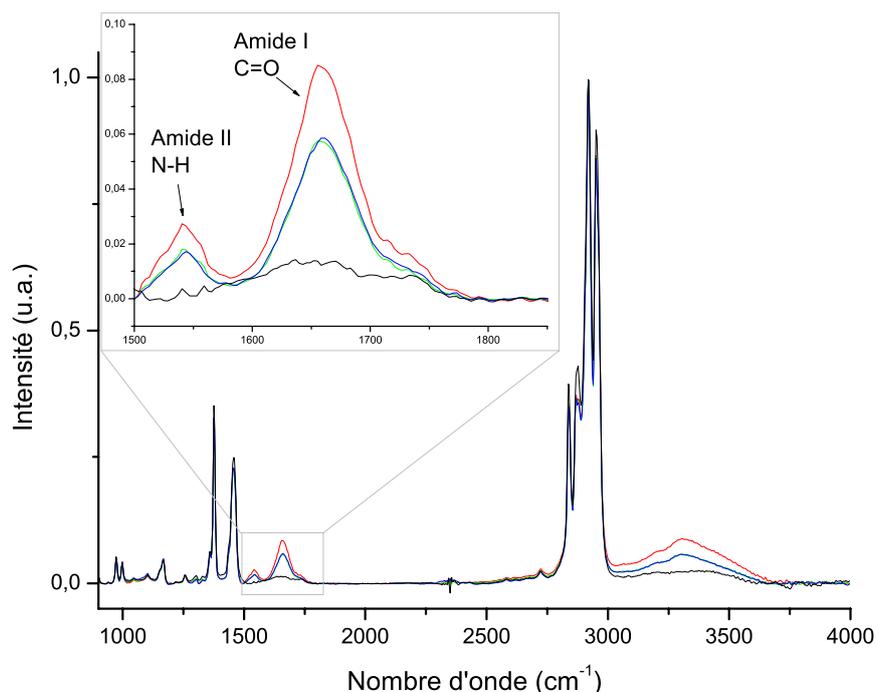


Figure III.82 – Spectre IR du PP après immobilisation du lysozyme en suivant l'un des protocoles, (—) A, (—) B, ou (—) C. PP non traité (—).

La Figure III.82 présente le spectre IR comparant les trois protocoles. Les bandes amide I et II sont présentes sur le spectre issu de chaque protocole, de même que la bande N-H repérée à  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Le greffage a fonctionné, quelque soit l'ordre d'utilisation des solutions. La même expérience a été reproduite et étudiée par XPS afin d'obtenir une analyse quantitative de l'immobilisation. Les compositions chimiques de la surface des échantillons traités selon les protocoles A, B et C sont reportées dans le Tableau III.11 ci-dessous.

Tableau III.11 – Composition chimique de la surface des échantillons fonctionnalisés selon les protocoles A, B et C. Résultats obtenus par XPS et exprimés en %.

Protocole	C	O	N	S	Autres (polluants) Si, F, Cl
PP non traité	98,81	0,88			0,32
PP traité par plasma	69,14	25,62	4		1,24
A	70,9	17,5	10,23	0,58	0,79
B	73,55	16,81	8,55	0,47	0,62
C	71,44	18,45	8,12	0,48	1,50
Lysozyme	66,26	16,21	15,53	0,97	1,04

Du soufre est détecté sur chaque échantillon, confirmant ainsi la présence du lysozyme. En effet, les résidus cystéine et méthionine contiennent du soufre et sont présents dans la structure du lysozyme, au nombre de 8 pour la cystéine, et 2 pour la méthionine. De plus, le taux d'azote augmente fortement et le taux d'oxygène diminue après l'immobilisation du lysozyme, s'approchant ainsi des valeurs mesurées sur le lysozyme commercial (poudre). Le calcul des ratios O/C, N/C, S/C et S/N, en comparaison avec le lysozyme, apporte une observation complémentaire des résultats (Figure III.83).

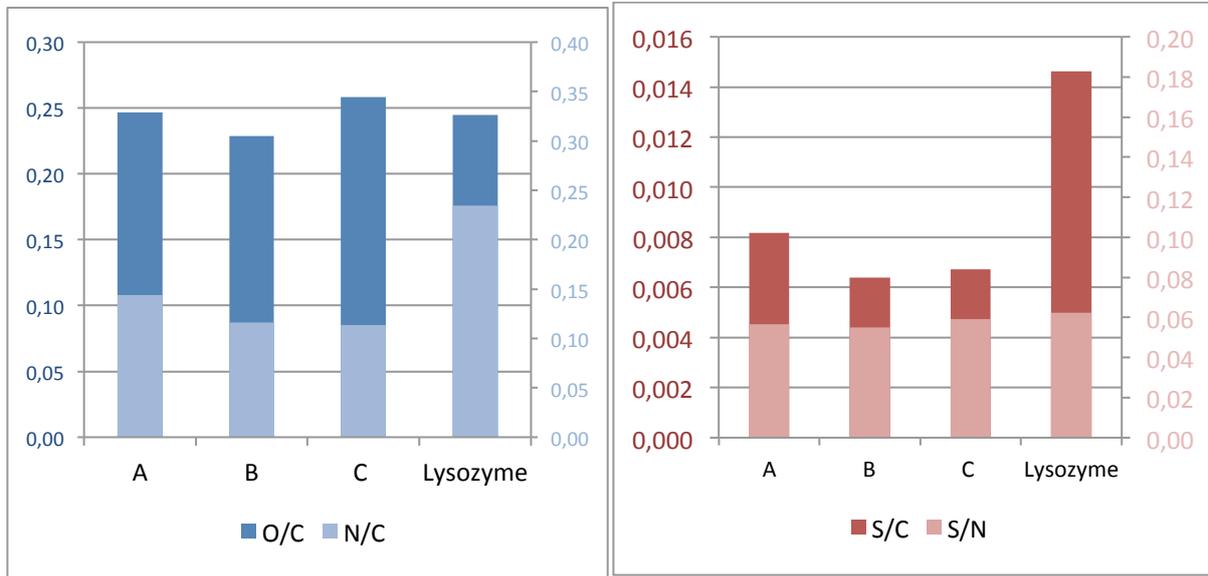


Figure III.83 – Calcul des ratios O/C, N/C, S/C et S/N des échantillons après immobilisation du lysozyme selon le protocole utilisé

Le protocole A présente les résultats les plus proches du lysozyme commercial pour les ratios O/C, N/C et S/C. C'est le ratio S/N de l'échantillon C qui se rapproche le plus du lysozyme, mais les différences entre les trois échantillons sont très faibles.

Des traces de pollutions sont retrouvées dans les analyses, celles-ci peuvent avoir plusieurs origines. Le fluor, retrouvé dans de nombreux échantillons de PP, provient d'une mauvaise purge de la vis et du moule avant le moulage du polymère. Le silicium peut provenir de la manipulation des échantillons avec des gants, enfin le chlore n'est détecté que dans la préparation commerciale de lysozyme.

La décomposition des pics C1s, N1s et S2p permet de s'assurer de la présence du lysozyme sur la surface, notamment grâce à l'identification des liaisons chimiques dans lesquelles sont impliqués les atomes. La Figure III.84 présente la décomposition du pic C1s de l'échantillon

fonctionnalisé avec le protocole A. Les résultats des décompositions pour les protocoles A, B et C sont résumés dans le Tableau III.12.

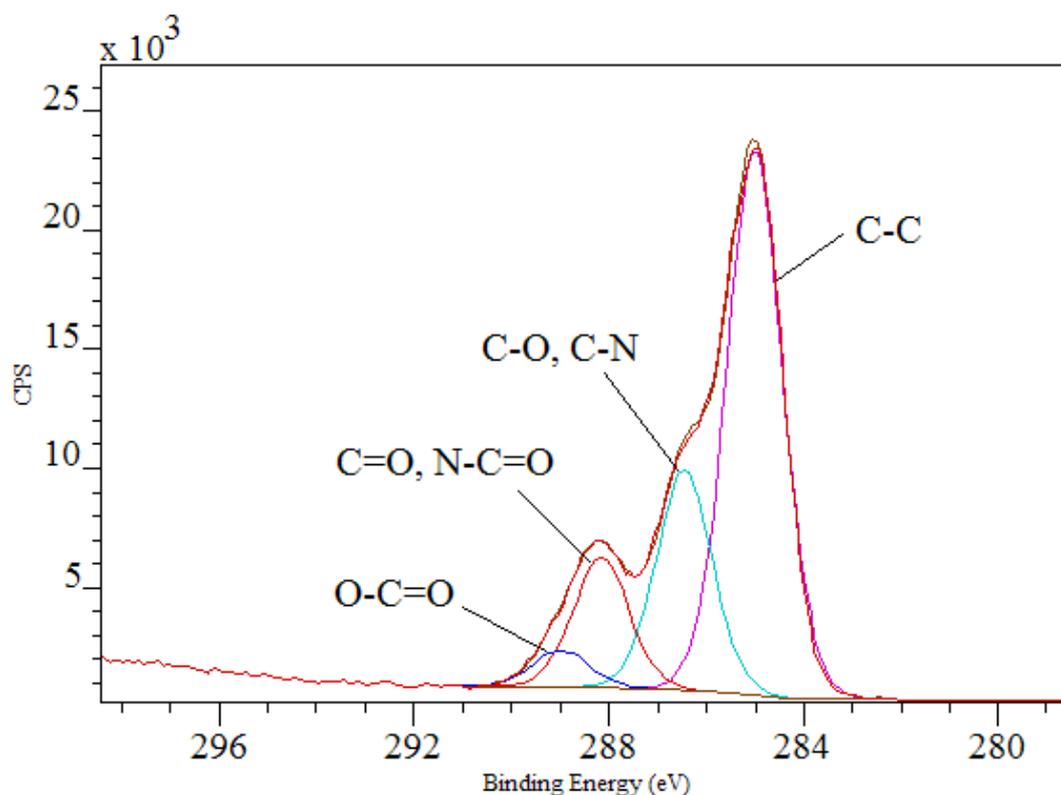


Figure III.84 – Décomposition du pic C1s du spectre XPS de l'échantillon fonctionnalisé selon le protocole A.

Tableau III.12 – Détails de la décomposition du pic C1s des échantillons A, B et C.

<b>C1s</b>	<b>C-C/C-S 285 eV</b>	<b>C-O, C-N 286,5 eV</b>	<b>C=O, N-C=O 288,2 eV</b>	<b>OC=O 289 eV</b>
<b>A</b>	58,56	23,59	14	3,85
<b>B</b>	63,73	20,57	11,34	4,36
<b>C</b>	62,07	21,48	12,48	3,98
<b>Lysozyme</b>	50,94	26,88	22,18	

Les décompositions présentent le même profil, toutefois le protocole A semble aboutir à la meilleure fonctionnalisation, avec une contribution en C-O,C-N (286,5 eV) et surtout N-C=O (288,2 eV) légèrement supérieure aux deux autres (Figure III.85). Ce profil possède des similarités avec celui du lysozyme commercial (Figure III.86), notamment l'épaule à 286,5 eV, ainsi que la bande à 288,2 eV.

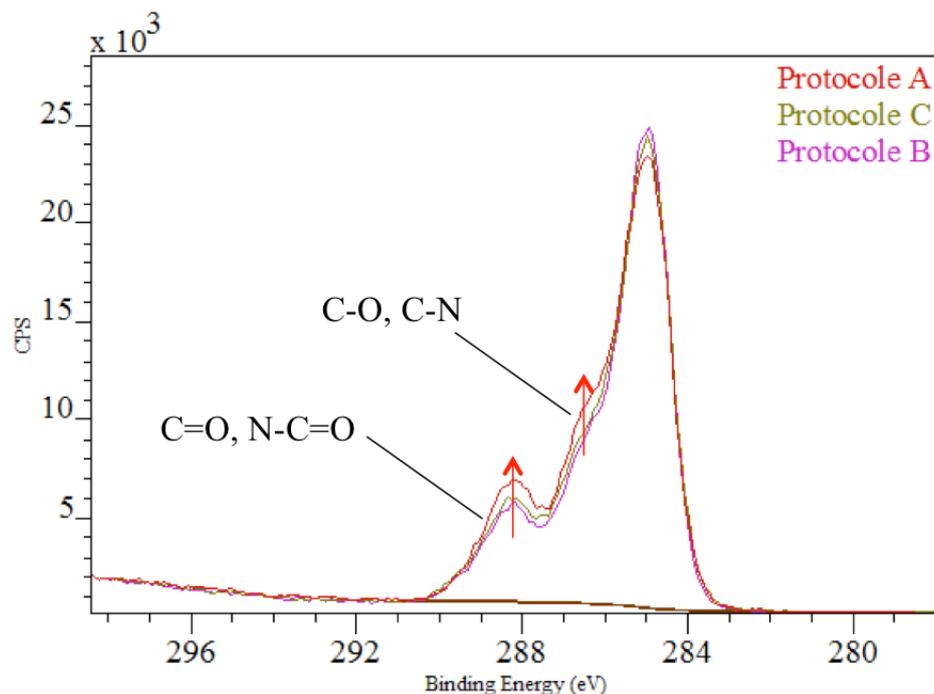


Figure III.85 – Comparaison des pics C1s des trois protocoles A, B et C

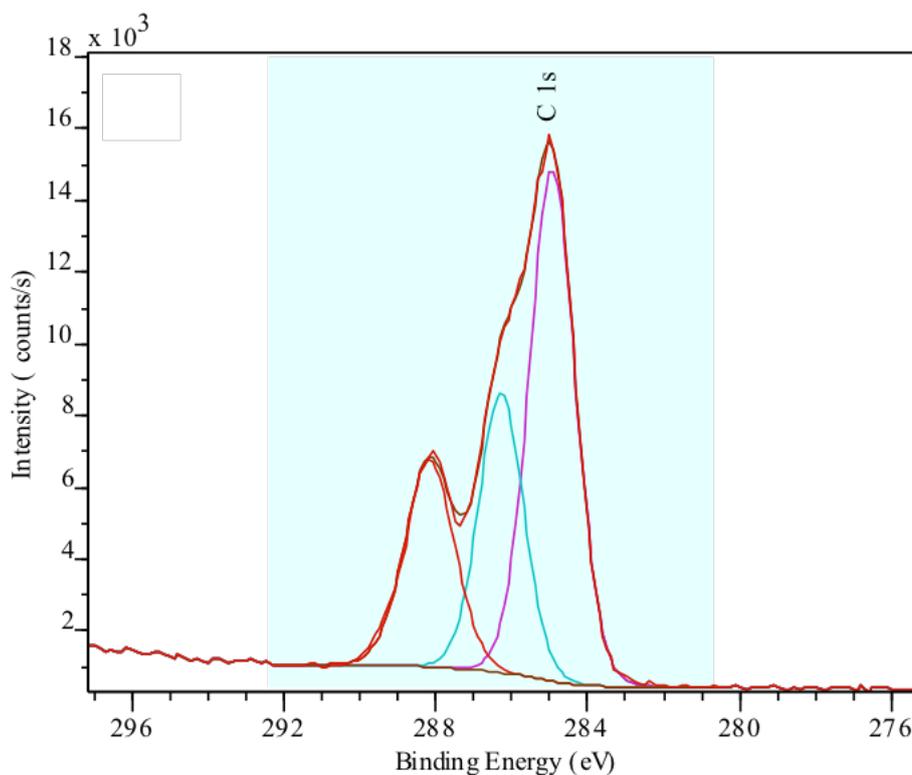


Figure III.86 – Comparaison des pics C1s de la préparation commerciale de lysozyme (poudre)

La décomposition du pic N1s (Figure III.87) ne permet pas de distinguer particulièrement un protocole par rapport aux autres, mais celui-ci confirme la présence d'azote organique sous forme N-C et N-C=O. On peut également distinguer la contribution des fonctions ammonium

$\text{NH}_3^+$ . Enfin, le pic du soufre S2p permet de faire la différence entre le soufre organique S-C (ou S-S) et les sulfates S-O qui ne proviennent pas de la protéine (Figure III.87, Tableau III.13). Dès lors, il est possible de corriger les pourcentages de soufre donnés précédemment, pour connaître la teneur en soufre issu de la protéine.

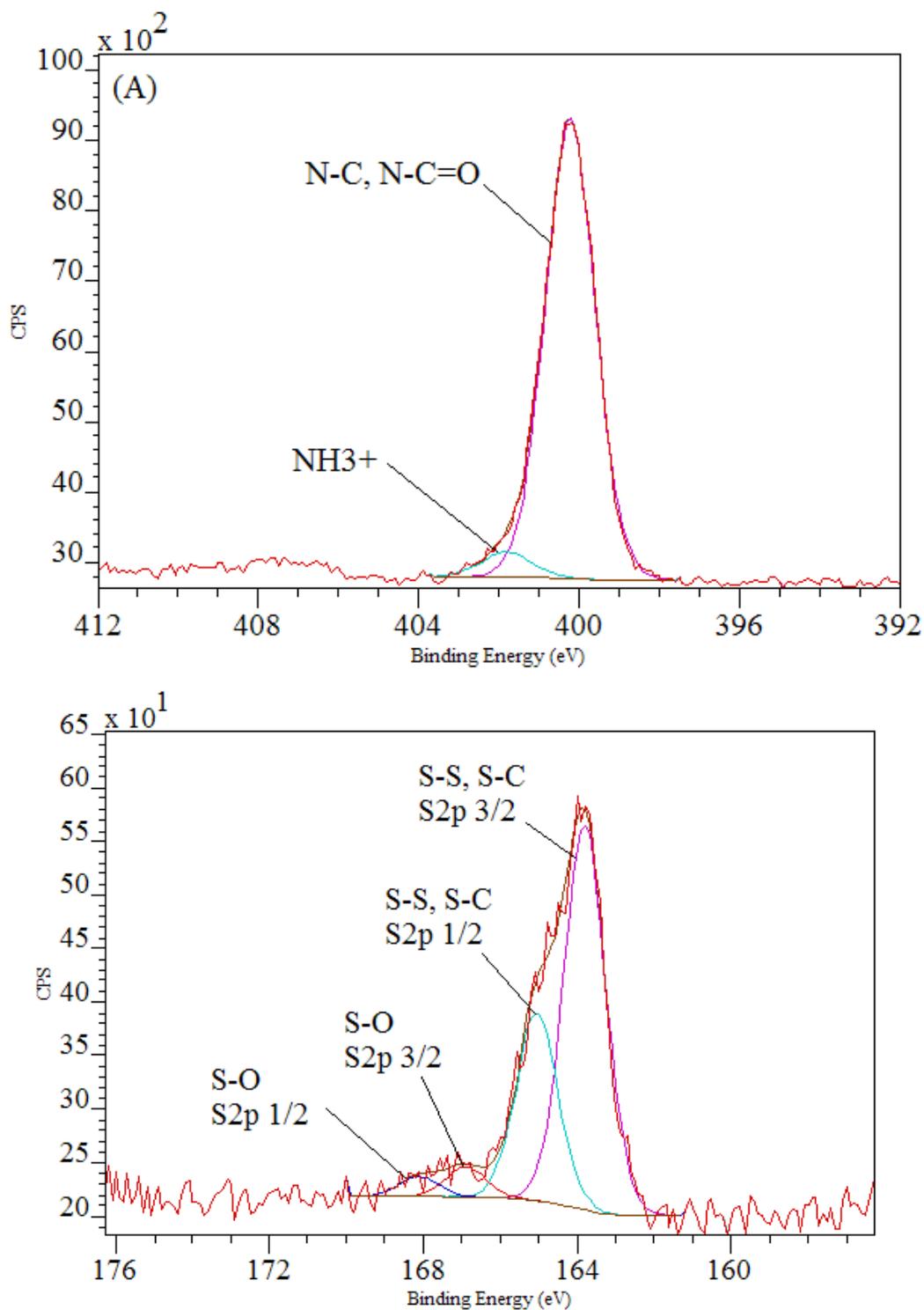


Figure III.87 – Décomposition des pics N1s (A) et S2p (B) de l'échantillon fonctionnalisé selon le protocole B.

Tableau III.13 – Détail de la décomposition du pic S2p des échantillons traités selon le protocole A, B ou C.

S2p	S-S, S-C (protéine)		S-O		%S-S, S-C	%S Protéines
	2p 3/2 (163,8 eV)	2p 1/2 (+1,2 eV)	2p 3/2 (166,5 eV)	2p 1/2 (+1,3 eV)		
A	61,65	30,27	4,83	3,25	91,92	0,53
B	54,06	26,31	12,92	6,71	80,37	0,38
C	53,36	26,24	13,64	6,76	79,6	0,38

Le pic S2p du soufre est composé de deux doublets. La contribution S-S, S-C est localisée à 163,8 eV (2p 3/2) et 165 eV (2p 1/2), la contribution S-O se situe quant à elle à 166,5 eV et 167,8 eV pour 2p 3/2 et 2p 1/2 respectivement. Pour chacun de ces doublets, le pic 2p 3/2 présente une aire deux fois plus grande que celui de 2p 1/2 [16]. D'après ces mesures, 92% du signal du soufre détecté sur l'échantillon A provient de la protéine, contre environ 80% pour B et C. Le taux de soufre global issu de la protéine est alors nettement plus grand sur l'échantillon A (0,54%) que sur les deux autres (0,38%). L'application de cette correction sur les ratios S/N et S/C permet de mettre en évidence que le protocole A est celui dont les ratios sont les plus proches de ceux du lysozyme commercial (Figure III.88).

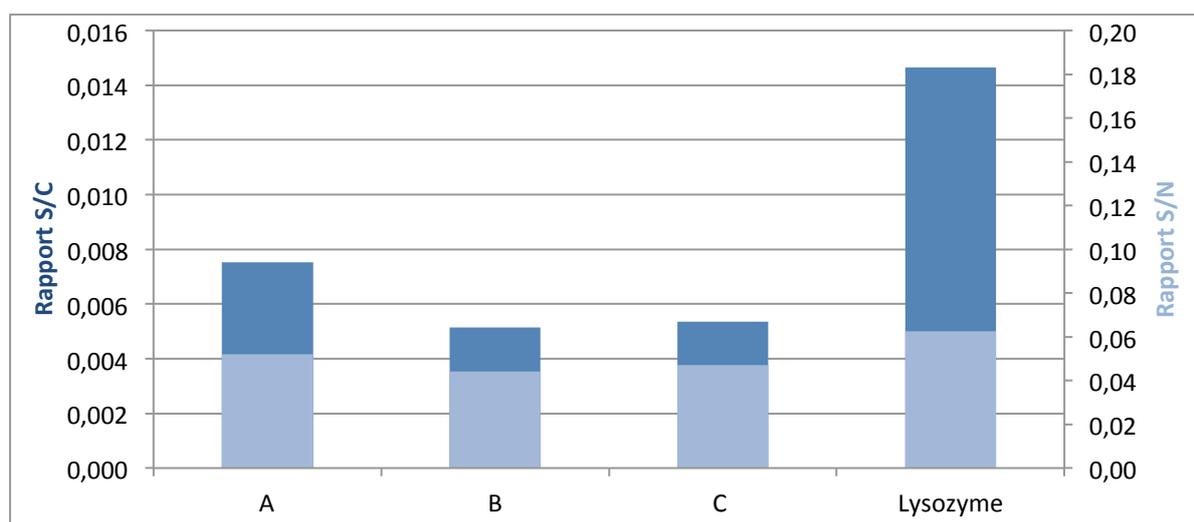


Figure III.88 – Ratios S/C (■) et S/N (■) calculés avec la teneur en soufre corrigée grâce à la décomposition des pics S2p.

Il apparaît clairement que la plus grande quantité de lysozyme immobilisé sur la surface du matériau est obtenu grâce au protocole A, à savoir l'utilisation d'une seule solution contenant protéine et activateurs chimiques, et donc une seule étape en plus de l'activation par plasma et du lavage. Le taux d'azote et de soufre est supérieur grâce à ce protocole, confirmant la tendance observée lors de l'analyse infrarouge. La composition de la surface se rapproche

fortement de celle du lysozyme pur, laissant supposer que la surface est largement recouverte de protéines, les contributions des couches inférieures étant alors masquées. Ce protocole en une étape est la meilleure solution pour la mise en place d'un procédé industriel car cela réduit le temps de traitement, et limite également la quantité de solution utilisée. Il sera utilisé pour le reste des expériences.

### 2.2.2 Durée de la réaction de greffage (Protocole A)

Le temps de mise en contact de la solution de protéine avec la surface du PP traité par plasma est un paramètre particulièrement sensible dans la perspective d'un passage à l'échelle industrielle. En effet, une durée trop importante réduirait fortement l'intérêt d'un tel procédé. En revanche, une durée trop courte risquerait de diminuer la quantité de protéines immobilisées sur la surface du PP. L'étude de l'immobilisation de lysozyme en fonction de la durée du greffage est suivie par XPS.

Les activateurs EDC et NHS seront utilisés à  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , la concentration en lysozyme est fixée à  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , et le pH est mesuré à environ 5. La solution ( $300 \mu\text{L}$ ) est déposée à la surface de 7 échantillons, pour 7 durées différentes : 5, 10, 30, 60, 120, 180 et 1080 min, et les échantillons sont placés dans un récipient hermétique afin de limiter l'évaporation.

Tableau III.14 – Composition chimique des échantillons fonctionnalisés avec du lysozyme selon différentes durées de greffage.

Durée	C	O	N	S	F	Autres
PP non traité	98,81	0,88			0,32	
PP traité par plasma	69,14	25,62	4		1,24	
5 min	68,68	16,08	9,24	0,48	4,78	0,73*
10 min	75,32	15,57	8,32	0,45	0,34	
30 min	74,85	15,42	8,61	0,4	0,72	
60 min	73,02	16,68	9,19	0,45	0,66	
120 min	77,23	14,43	7,26	0,35	0,73	
180 min	77,99	14,04	7,37	0,41	0,18	
1080 min	76,47	14,31	8,07	0,39	0,75	

\* 0,15% de chlore et 0,58% de silicium

Les spectres XPS des différents échantillons présentent le profil attendu et se rapprochent de celui du lysozyme, permettant de s'assurer de sa présence sur la surface. L'observation du pic C1s permet de mettre en évidence l'évolution de la composition de la surface en fonction de la durée du greffage (Figure III.89).

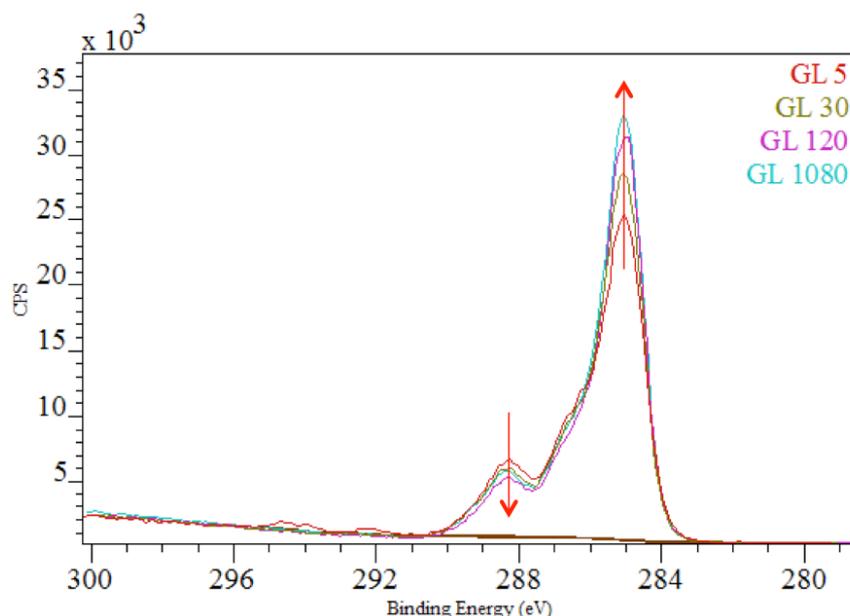


Figure III.89 – Pic C1s du spectre XPS d'échantillons de PP fonctionnalisés avec du lysozyme selon différentes durées. (—) 5 min, (—) 30 min, (—) 120 min, (—) 1080 min.

L'augmentation de la durée du greffage se traduit par l'augmentation de la contribution C-C, ainsi que la diminution des contributions C-O, C-N et N-C=O. Plus la durée est longue, moins l'immobilisation semble efficace. La représentation des ratios N/C et S/C sur la Figure III.90 affiche la même tendance que celle observée sur le pic C1s (le ratio S/C est calculé à partir de la teneur en soufre corrigée grâce à la décomposition du pic S2p). Les plus faibles durées aboutissent à des ratios plus élevés, à l'exception de la mesure à 60 minutes qui ressemble à une anomalie. De plus, un palier semble atteint à partir de 120 minutes.

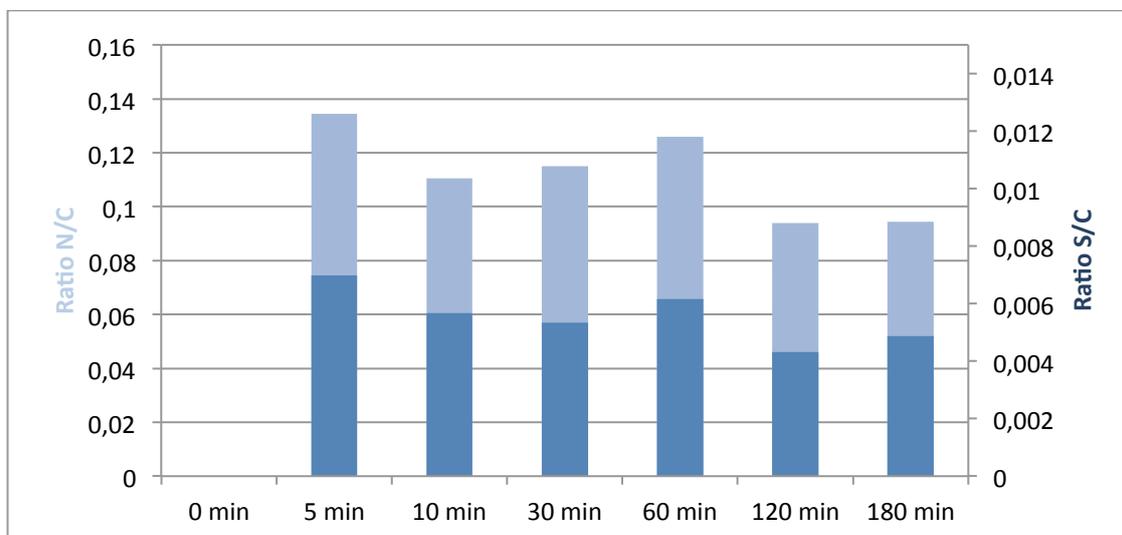


Figure III.90 – Représentation de l'évolution des ratios N/C (■) et S/C (■), calculés à partir des résultats d'analyse XPS sur des échantillons fonctionnalisés avec du lysozyme, en fonction de la durée du greffage.

Johnsson *et al.* ont montré que la réaction entre des acides carboxyliques de surface activés par EDC et NHS avec des protéines atteignait l'équilibre en 6 minutes environ [17], ce qui est en accord avec les résultats obtenus, qui montrent des ratios N/C et S/C plus importants pour l'échantillon ayant subi un greffage pendant 5 minutes. La diminution au cours du temps de ces ratios, synonyme de plus faible quantité de protéine en surface, peut s'expliquer par la dissolution de la couche de faible cohésion créée à l'extrême surface du matériau lors du traitement par plasma, du fait de l'effet thermique de la torche. Cette couche, de très faible épaisseur, en se dissolvant dans la solution de greffage, va retirer de la surface une certaine proportion de groupements réactifs ainsi que les molécules de lysozyme ayant réagi sur les fonctions chimiques relarguées, provoquant une diminution de la quantité de protéines détectées à la surface du matériau lorsque celui-ci est laissé suffisamment longtemps en contact avec la solution.

La durée de contact entre la solution de biomolécules et la surface du PP traité par plasma a un réel impact sur l'efficacité de l'immobilisation. En effet, la réaction chimique permettant l'immobilisation covalente du lysozyme sur la surface est rapide, et une mise en contact trop longue provoque une perte de matière par dissolution de la couche de faible cohésion dans la solution. La durée de 5 minutes apparaît comme un bon compromis pour réaliser l'immobilisation de biomolécules sur la surface du PP.

### 2.2.3 Concentration de EDC et NHS en solution

Les activateurs EDC et NHS jouent un rôle important dans le greffage puisqu'ils permettent de rendre les acides carboxyliques suffisamment électrophiles pour permettre l'immobilisation des protéines de façon covalente, via leurs groupements amine. L'étude, suivie par XPS, permet de déterminer quelles sont les concentrations en activateurs permettant l'immobilisation de lysozyme la plus efficace.

La composition chimique de surface des échantillons est déterminée à partir des spectres XPS, les ratios N/C et S/C peuvent ainsi être calculés, et sont présentés dans la Figure III.91. Il apparaît que le couple 5:5 ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) présente la composition chimique la plus proche du lysozyme pur.

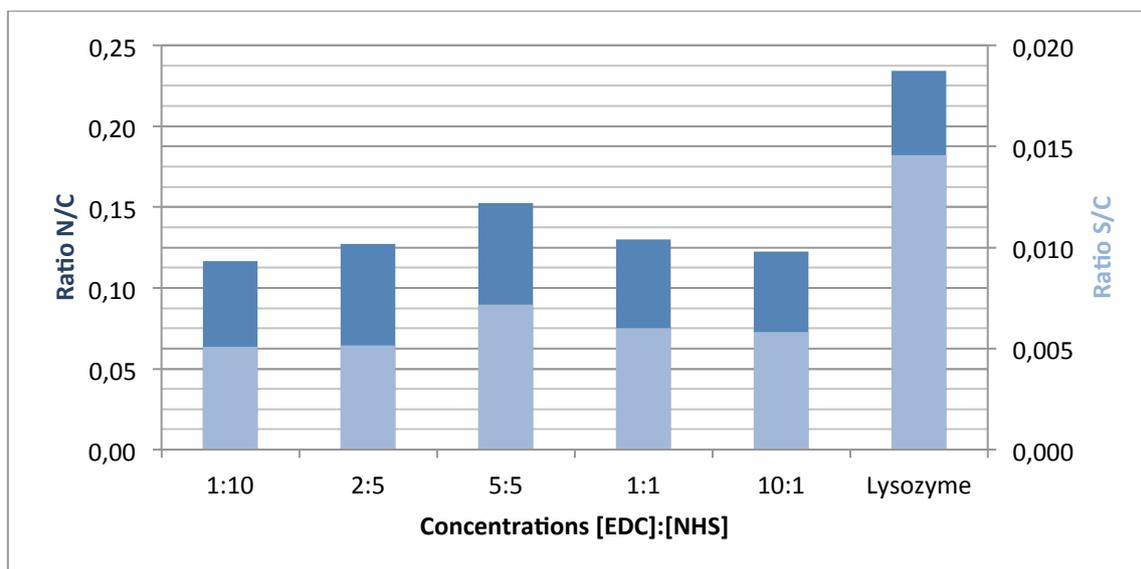


Figure III.91 – Evolution des ratios N/C (■) et S/C (■) en fonction des concentrations de EDC et NHS, exprimés en  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

La décomposition du pic C1s permet d'obtenir le pourcentage d'atomes de carbone impliqués dans des liaisons amides, ces valeurs sont reportées sur la Figure III.92. De façon surprenante, c'est le ratio 2:5 qui présente le plus fort taux de liaisons amides, toutefois, il convient de préciser que la décomposition n'a pas permis de distinguer les N-C=O, généralement repérées à 288,2 eV, des C-F situées vers 287,8 eV, l'échantillon présentant plus de 1,5% de fluor, ce qui peut expliquer ce résultat. La contribution C-F<sub>2</sub> a également été observée à 291,1 eV. Le ratio 5:5 est celui qui présente ensuite la teneur en amides la plus élevée.

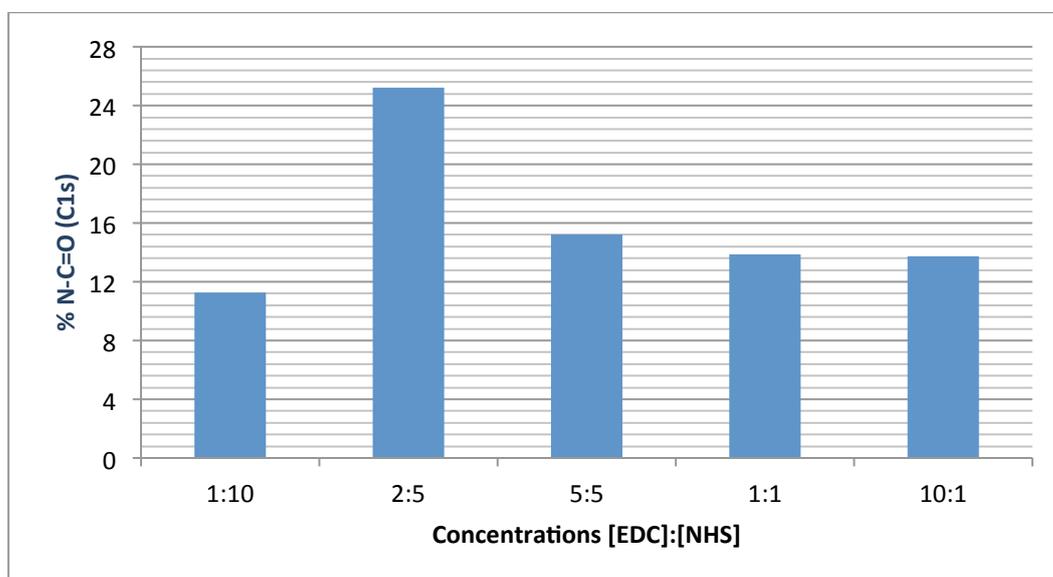


Figure III.92 – Evolution de la composition en N-C=O (■) du pic C1s en fonction de la concentration des activateurs EDC et NHS.

Sam *et al.* (2009, [11]) ont montré que la réaction du couple EDC/NHS avec des acides carboxyliques sur une surface présente le meilleur rendement pour des concentrations identiques en EDC et NHS comprises entre 5 et 10 mmol.L<sup>-1</sup>. Une étude par spectroscopie infrarouge leur a permis de montrer que la condition [EDC] > [NHS] aboutit à un faible rendement et favorise la formation de sous-produits non désirés comme des anhydrides d'acide ou des fonctions N-acylurées. De plus, lorsque [EDC] < [NHS], le rendement est également faible, mais aucun sous-produit n'est détecté à la surface du matériau. Enfin, si [EDC]=[NHS] < 5 mmol.L<sup>-1</sup>, des acides carboxyliques n'ayant pas réagi sont encore détectés, et si [EDC]=[NHS] > 10 mmol.L<sup>-1</sup>, des N-acylurées sont produites.

Ces observations sont cohérentes avec les résultats obtenus, excepté pour le couple de concentration 2:5 mmol.L<sup>-1</sup>, mais la présence des contributions C-F et C-F<sub>2</sub> permet de justifier cet écart.

L'influence de la concentration en EDC et NHS est manifeste, une concentration identique de EDC et NHS, à 5 mmol.L<sup>-1</sup> permettant d'obtenir la plus grande quantité de lysozyme immobilisé. Néanmoins, il apparaît que toutes les concentrations testées permettent d'immobiliser des biomolécules sur la surface du PP traité par plasma à la pression atmosphérique. Les aldéhydes, détectées dans le chapitre II, peuvent réagir avec les fonctions amines des résidus lysine, ce qui peut expliquer ce résultat.

### 2.2.4 pH de la solution de greffage

Lors de réactions chimiques en solution, le pH peut jouer un rôle déterminant en raison des couples acide/base impliqués dans la réaction, comme expliqué dans le paragraphe 1.2.4, page 122. Les analyses XPS permettent d'étudier l'influence du pH sur l'immobilisation du lysozyme. Trois solutions sont utilisées :

- Eau distillée, pH mesuré : 5
- Tampon phosphate 0,1M, pH mesuré : 6,5
- Tampon phosphate 0,1M, pH mesuré : 7,5

Les ratios S/C et N/C sont calculés à partir des analyses XPS réalisées sur les trois échantillons fonctionnalisés à différents pH, et sont reportés sur la Figure III.93. Le ratio S/C

augmente sensiblement avec l'augmentation du pH, contrairement au ratio N/C pour lequel aucune tendance ne parvient à se dégager. De plus, pour les deux facteurs, les valeurs sont très proches les unes des autres, N/C variant de 0,14 à pH 6,5, à 0,15 à pH 7,5, et S/C s'étalant de 0,007 à pH 5, jusqu'à 0,008 à pH 7,5. La décomposition du pic C1s n'apporte pas non plus d'information permettant de dégager une tendance, les pics de chaque échantillon présentant une composition très similaire, notamment au niveau de la bande amide N-C=O (Figure III.94).

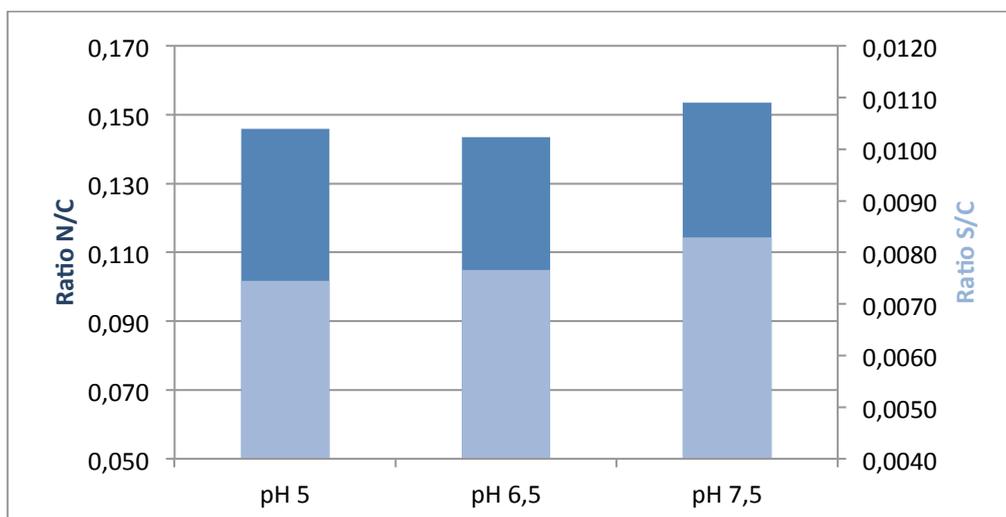


Figure III.93 – Evolution des ratios N/C (■) et S/C (■) en fonction du pH de la solution de greffage.

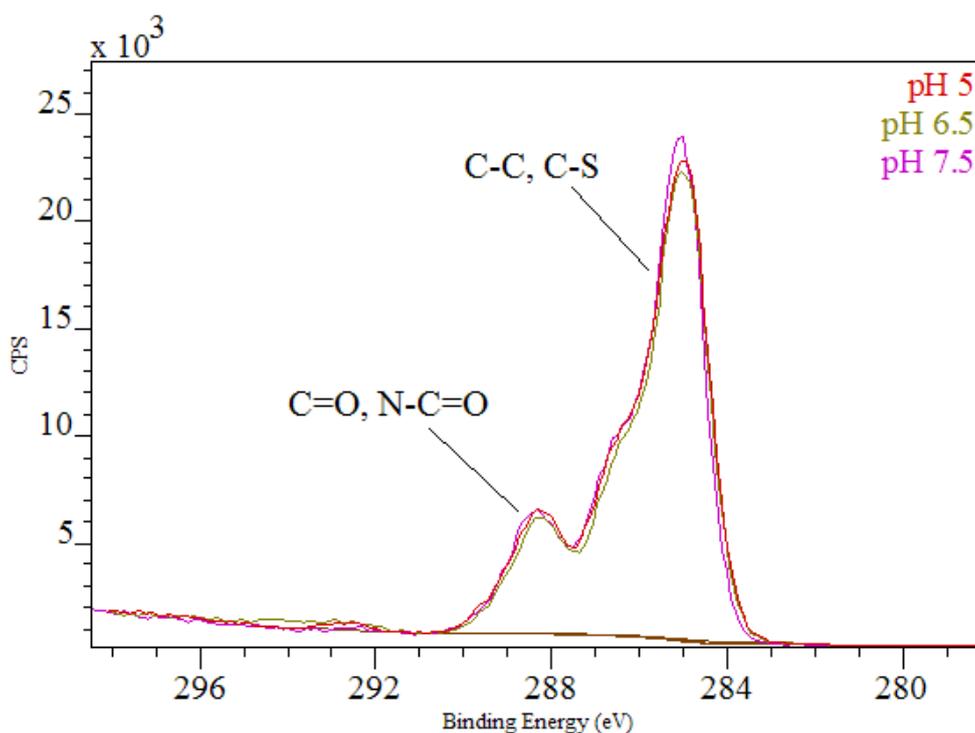


Figure III.94 – Pics C1s du spectre C1s des échantillons fonctionnalisés avec des solutions de pH différents :  
 (—) pH 5, (—) pH 6,5, (—) pH 7,5.

Comme cela a été montré dans le chapitre précédent, un traitement par plasma modifie la surface du polypropylène d'un point de vue chimique. Cette modification a un impact sur la charge électrostatique de la surface, le potentiel zeta ( $\zeta$ ). La présence de fonctions oxygénées sur la surface, telles que les acides carboxyliques, détermine la valeur de  $\zeta$ . A pH très acide ( $\text{pH} < 2,5-3$ ), les groupements acides sont protonés, le potentiel est positif. En revanche, en augmentant le pH de la solution, le potentiel  $\zeta$  diminue et devient négatif, parallèlement à la déprotonation des groupements acides de la surface [18]–[20].

Or, il a été montré que l'adsorption de protéines sur une surface chargée, était favorisée lorsque le pH est fixé à une valeur suffisamment inférieure au point isoélectrique de la molécule, à savoir environ 11,3 pour le lysozyme et environ 8,5 pour la nisine [10], [17].

L'augmentation du pH permet donc d'augmenter la charge électronégative de la surface, mais diminue la capacité d'adsorption des molécules à sa surface en réduisant leur charge nette. De plus, l'augmentation du pH est à l'origine de deux phénomènes chimiques opposés : la déprotonation des fonctions ammonium qui augmente le pouvoir nucléophile des amines, et la réduction de la catalyse acide lors de l'activation des acides carboxyliques par EDC et NHS.

Ces différentes compétitions qui ont lieu durant l'étape de l'immobilisation des peptides sur le polypropylène activé par plasma peuvent expliquer le faible écart entre les résultats des immobilisations réalisées à différents pH.

Toutefois, dans la gamme étudiée, le pH de la solution reste très éloigné du pKa du couple  $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$ , ce qui devrait se traduire par une proportion importante de groupes ammonium non réactifs, et donc empêcher la réaction de greffage. L'immobilisation ayant lieu malgré cette contrainte, les résultats suggèrent qu'à proximité de la surface, les fonctions  $\text{NH}_3^+$  subissent une réaction de déprotonation par les fonctions  $\text{COO}^-$  n'ayant pas été activées par EDC/NHS (il a été montré qu'une large proportion de groupements carboxyliques n'est pas activée par EDC/NHS [17]). Dès lors, à proximité de la surface, certaines amines peuvent réagir avec les acides activés de la surface et permettre ainsi l'immobilisation des biomolécules de façon covalente (Figure III.95).

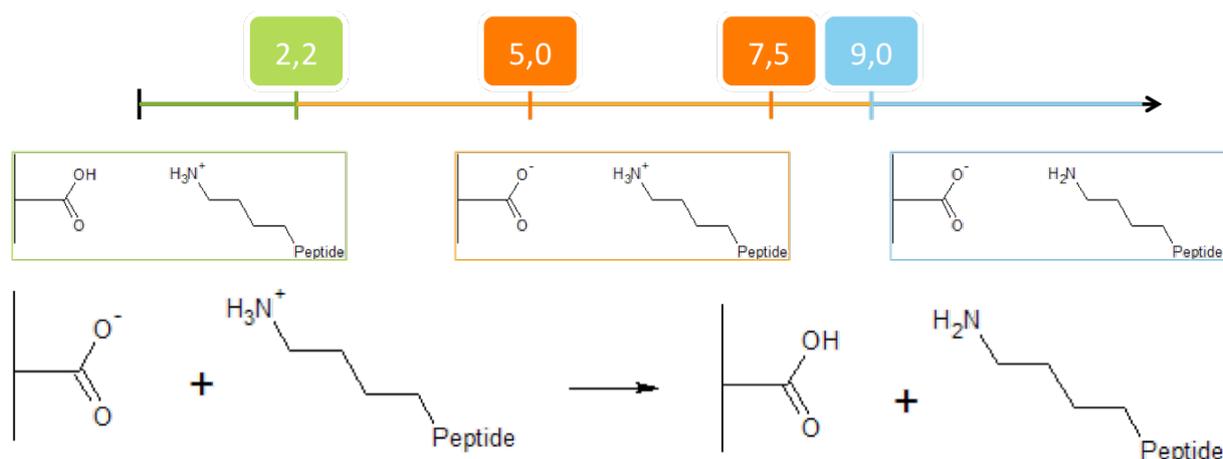


Figure III.95 - Influence du pH sur la nature des groupements chimiques des protéines et de la surface

Travailler à un pH légèrement basique a permis d'obtenir les meilleurs résultats pour l'immobilisation de lysozyme à la surface du polypropylène traité par plasma. Toutefois, les écarts entre chaque expérience n'apparaissent pas comme réellement significatifs. Les phénomènes mis en évidence dans ce paragraphe entrent en compétition, et peuvent expliquer les faibles écarts entre chaque expérience.

### 2.3 Contribution des groupements aldéhydes à l'immobilisation du lysozyme

Le travail durant cette thèse est focalisé sur la réaction entre les acides carboxyliques et les amines, conduisant à une fonction amide de façon irréversible. Toutefois, l'expérience de dérivation chimique par le 2-chlorobenzoic hydrazide décrite dans le chapitre II a mis en évidence la présence d'aldéhydes à la surface du matériau traité par plasma. Ces aldéhydes peuvent réagir avec les amines des protéines de façon à former une base de Schiff sans activateur chimique, et peuvent donc servir de point d'accroche sur la surface pour les biomolécules utilisées. Néanmoins, la base de Schiff peut être hydrolysée si elle n'est pas réduite. L'objectif de cette expérience est d'évaluer la contribution des aldéhydes et des acides carboxyliques dans la fonctionnalisation de la surface du matériau traité par plasma.

Pour cela, 3 conditions d'immobilisation sont comparées :

- Condition A : Avec activateurs chimiques, sans dérivation chimique préalable des aldéhydes : Les COOH et CHO sont disponibles pour l'immobilisation
- Condition B : Avec activateurs, avec dérivation : seuls les COOH sont disponibles pour réagir
- Condition C : Sans activateurs, avec dérivation : aucun groupement ne sera théoriquement en mesure de permettre l'immobilisation du lysozyme

Les analyses XPS permettent de suivre cette étude, la composition chimique des échantillons est reportée dans le Tableau III.15 ci-dessous. La teneur en soufre, S\*, a été rectifiée au regard de la décomposition du pic S2p en ne prenant en compte que le soufre organique, et non le soufre issu des sulfates ou sulfites. Le chlore détecté sur l'échantillon C provient bien, en partie, de l'hydrazide chlorée, la Figure III.96 montrant que le pic contient une contribution de chlore organique.

Le calcul des ratios N/C et S/C est représenté graphiquement sur la Figure III.97. Moins les fonctions chimiques sont disponibles pour l'immobilisation, moins l'immobilisation semble effective. Le ratio N/C de l'échantillon C semble toutefois plus élevé qu'attendu. Cela peut s'expliquer par la présence d'azote dans l'hydrazide utilisée pour la dérivation chimique.

Tableau III.15 – Composition chimique déterminée par XPS des échantillons fonctionnalisés selon les conditions A, B et C décrites ci-dessus.

Condition	C	O	N	S*	Cl	Si	F
A	67,51	18,57	7,06	0,37		5,56	0,94
B	72,22	15,41	5,79	0,32		5,35	0,85
C	70,82	16,4	5,78	0,26	0,21	5,93	0,55

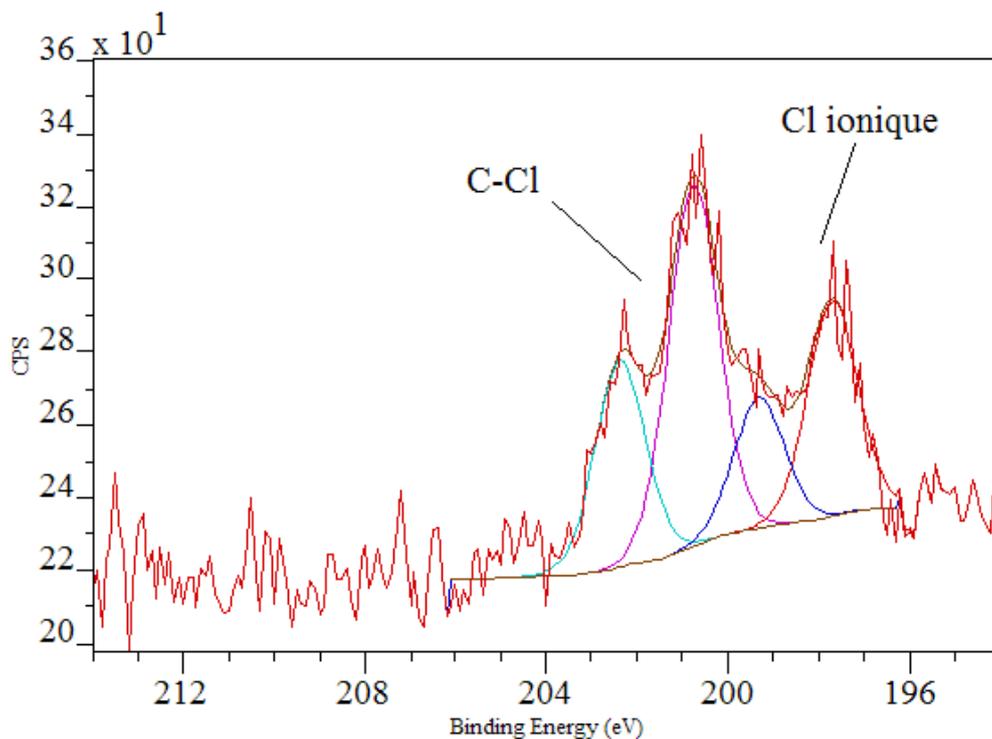


Figure III.96 – Pic Cl 2p de l'échantillon C

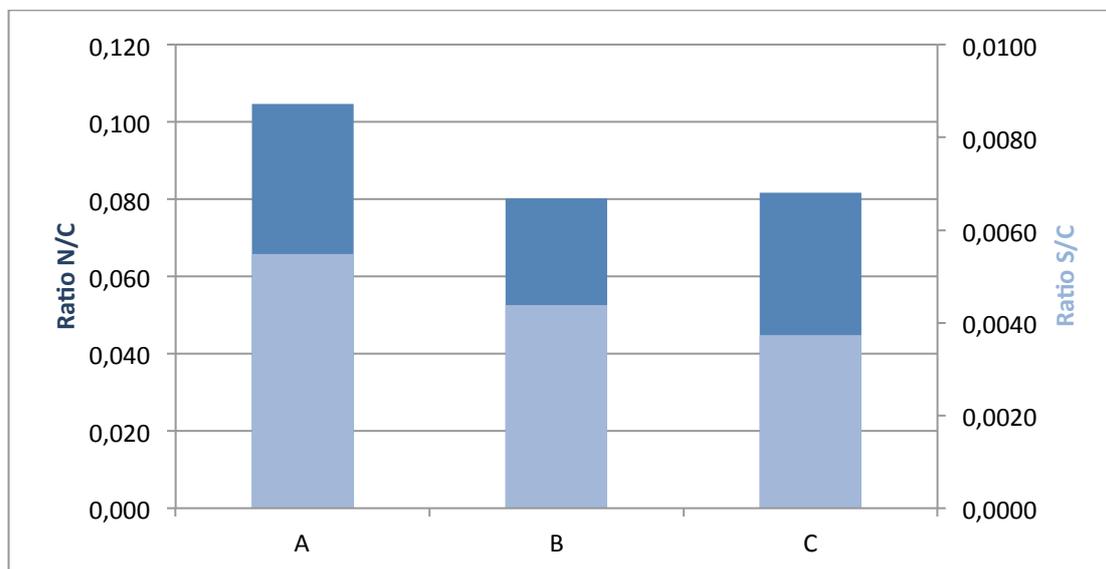


Figure III.97 – Evolution des ratios N/C (■) et S/C (■) en fonction des conditions de fonctionnalisation.

Cette tendance se retrouve également dans l'étude du pic C1s des échantillons (Figure III.98). Les contributions C=O, N-C=O et C-O, C-N sont plus grandes pour la condition A, et diminuent par la suite.

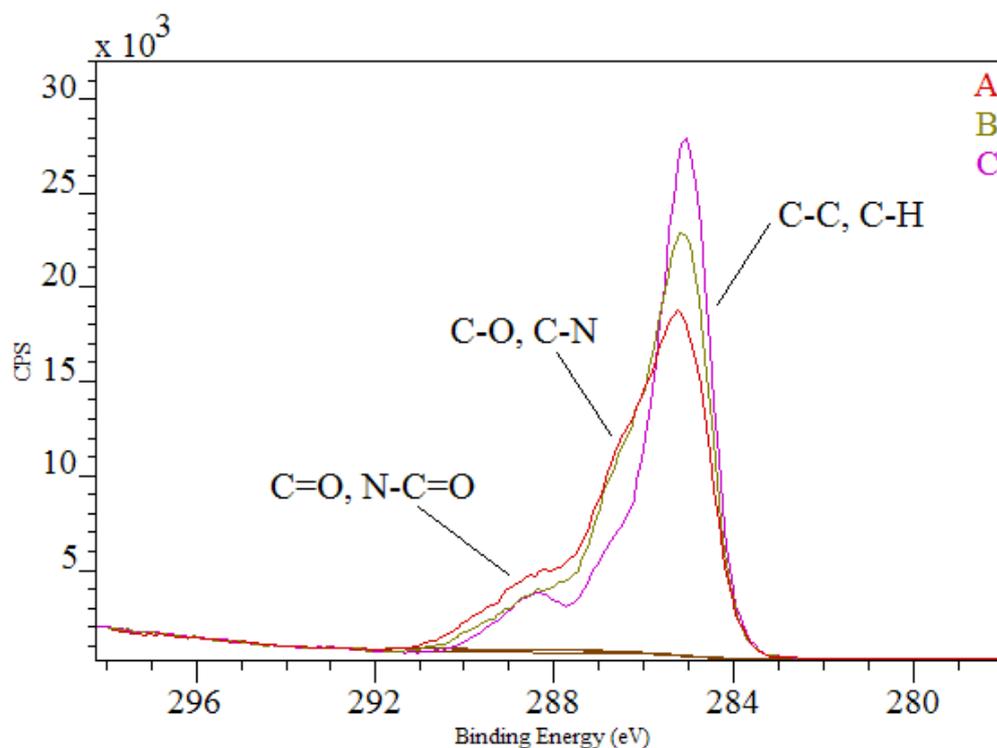


Figure III.98 – Pics C1s des spectres XPS des échantillons fonctionnalisés dans les conditions A (—), B (—), et C (—).

Les aldéhydes et les acides carboxyliques participent donc conjointement à l'immobilisation du lysozyme sur la surface du PP. Il reste néanmoins difficile d'estimer si l'une ou l'autre des fonctions chimiques est prépondérante par rapport à l'autre. En effet, tous les groupements carboxyliques ne sont pas activés avec EDC et NHS, de même on peut supposer que la dérivation chimique n'a pas permis de bloquer l'intégralité des fonctions aldéhydes de la surface du matériau, ce qui peut expliquer la composition chimique de la surface de l'échantillon C. De plus, la présence de molécules seulement adsorbées sur la surface ne peut être écartée, malgré l'étape de lavage qui suit l'immobilisation.

L'absence de chlore sur l'échantillon B peut être lié au masquage de celui-ci par le lysozyme, détecté en plus grande quantité sur cet échantillon.

## 2.4 Vieillessement des matériaux fonctionnalisés

L'objectif de ce projet étant de développer un procédé permettant d'attribuer des propriétés antibactériennes à un pousoir utilisé sur des flacons de produits cosmétique dont la durée optimale d'utilisation est de plusieurs mois, il est important de s'assurer de la bonne tenue de l'immobilisation des biomolécules dans le temps.

Des échantillons sont fonctionnalisés avec du lysozyme et de la nisine et laissés pendant plusieurs jours à l'air libre. La technique XPS permet de suivre l'évolution de la composition chimique de la surface à 1, 17 et 32 jours après la fonctionnalisation.

Les échantillons sont traités dans les conditions suivantes :

- Traitement par plasma
  - PCT : 80 %
  - Fréquence de l'arc électrique : 21 kHz
  - Distance torche-substrat : 10 mm
  - Vitesse de traitement : 15 m/min
- Fonctionnalisation avec des peptides
  - Concentration en peptides : Lysozyme, 5 mg.mL<sup>-1</sup> ; Nisine, 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>
  - Concentration en activateurs : EDC et NHS : 5 mmol.L<sup>-1</sup>
  - pH : 5
  - Durée : 5 minutes
  - Lavage : à l'eau (2 x 5 min)

La composition chimique des échantillons est reportée dans le Tableau III.16, la teneur en soufre est corrigée suivant la décomposition du pic S2p. Le soufre est détecté sur chacun des matériaux sondés, qu'ils soient fonctionnalisés avec du lysozyme et de la nisine, la teneur en azote et en soufre, ainsi que la décomposition du pic C1s (Figure III.99), témoigne de la présence des peptides sur leur surface.

Tableau III.16 – Composition chimique des échantillons fonctionnalisés, selon la durée du vieillissement

	<b>C</b>	<b>O</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>Autres (F, Si, Cl)</b>
<b>Lysozyme 1 j</b>	70,92	17,44	10,26	0,55	0,8
<b>Lysozyme 17 j</b>	69,47	18,09	7,79	0,33	4,32
<b>Lysozyme 30 j</b>	73,25	17,18	8,67	0,36	0,44
<b>Nisine 1 j</b>	70,87	18,37	6,2	0,39	4,11
<b>Nisine 17 j</b>	72,5	16,85	6,57	0,32	3,63
<b>Nisine 30 j</b>	74,5	17,16	5,94	0,29	1,9

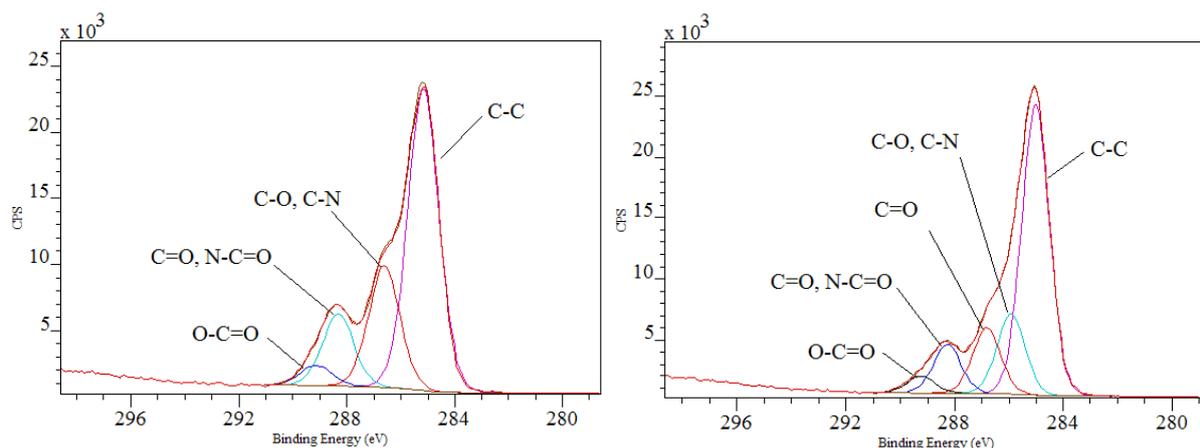


Figure III.99 – Décomposition du pic C1s d’un échantillon fonctionnalisé avec du lysozyme (Gauche), et de la nisine (Droite)

Dans le but d’observer l’effet du vieillissement des échantillons, les ratios S/C et N/C sont calculés et leur évolution est présentée dans la Figure III.100. Le vieillissement ne semble que légèrement impacter l’immobilisation, témoignant de sa bonne stabilité. De même, la Figure III.101 présente l’évolution de la contribution N-C=O du pic C1s. Celle-ci témoigne de la stabilité du greffage des peptides à la surface des échantillons.

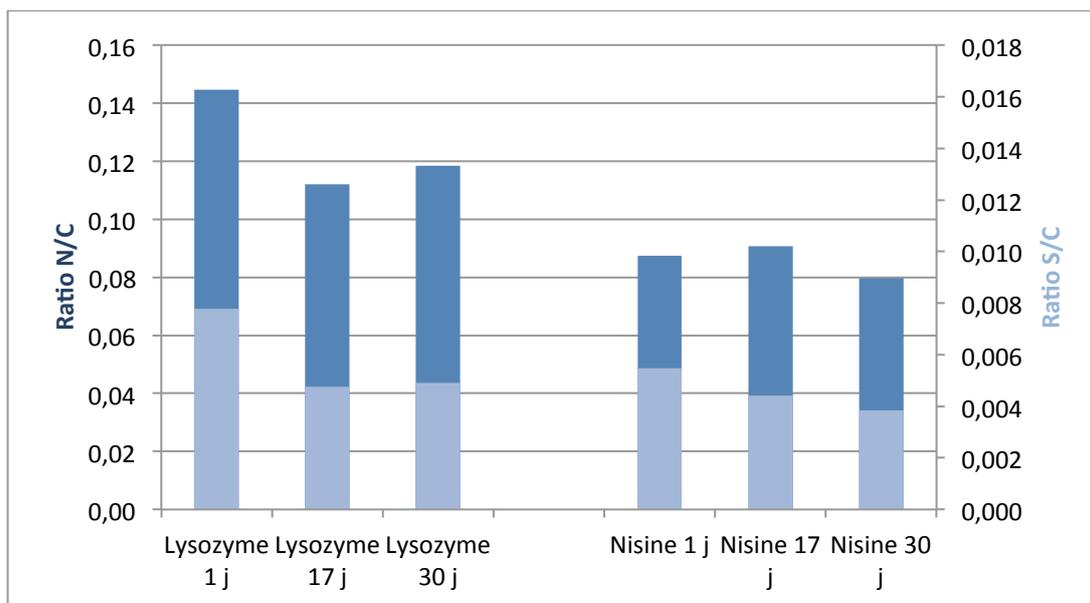


Figure III.100 – Evolution des ratios N/C (■) et S/C (■) en fonction du vieillissement

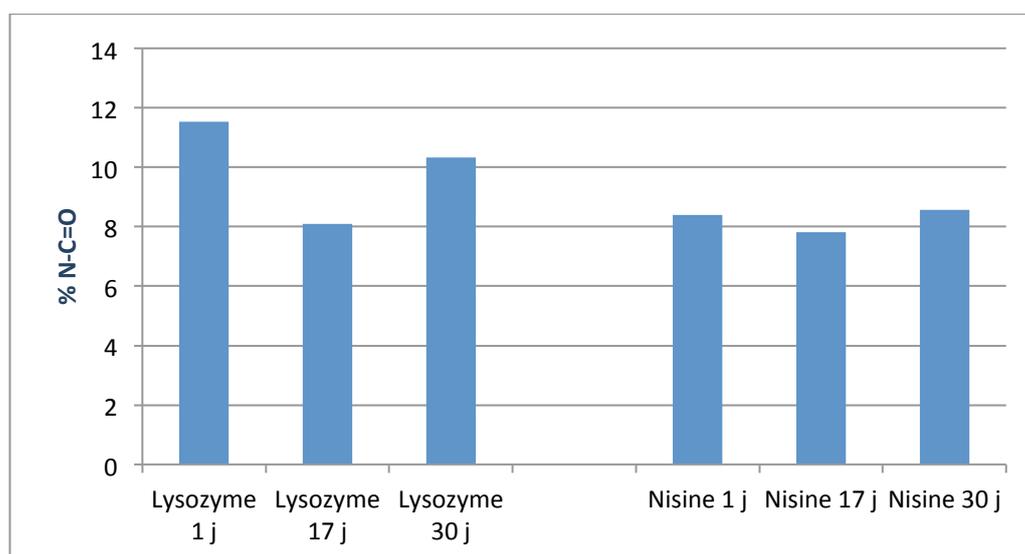


Figure III.101 – Evolution de la contribution N-C=O (288,4 eV) du pic C1s des échantillons fonctionnalisés

Le vieillissement des matériaux est matérialisé par une légère augmentation de la teneur en carbone sur les échantillons, qui se traduit par une diminution des ratios N/C et S/C. Ce résultat peut s'expliquer par le dépôt d'une couche de contamination issue de l'atmosphère ambiante (pollution, poussières, CO<sub>2</sub>). La composition du pic C1s, et notamment la contribution N-C=O à 288,2 eV, n'est pas modifiée par le vieillissement, ce qui témoigne du maintien des biomolécules à la surface du matériau. Néanmoins, en cas de présence d'une couche de contamination, l'activité biologique des échantillons pourrait diminuer par masquage des biomolécules vis-à-vis des bactéries.

Enfin, ces travaux ont permis de montrer que la fonctionnalisation est également effective avec la nisine.

## 2.5 Étude de l'immobilisation

La présence des protéines à la surface du PP traité par plasma est avérée grâce aux études précédentes. Toutefois, et comme cela a été mis en évidence dans le paragraphe précédent, la nature de l'immobilisation peut être variée (adsorption, réaction avec les acides ou les aldéhydes), et la façon dont la couche de peptides et protéines est structurée sur la surface reste à déterminer : les biomolécules sont-elles réticulées entre elles à la suite de l'action de EDC et NHS sur les acides carboxyliques des protéines ? Sont-elles immobilisées sous forme de monocouche ou multicouches ? L'objectif de ce paragraphe est de tenter de répondre à ces interrogations.

### 2.5.1 Etude de la réticulation du lysozyme par électrophorèse

Le traitement des polypeptides, lysozyme ou nisine, par les activateurs EDC et NHS fait suspecter une possible réticulation des protéines par réaction entre leurs fonctions amines et acides carboxylique. La réalisation d'une électrophorèse SDS-PAGE peut nous aider à répondre à cette question.

#### 2.5.1.1 Principe de l'électrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse est une technique de séparation de protéines ou d'ADN qui joue sur les propriétés physico-chimiques des molécules pour les séparer (taille et charge). La technique SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) requiert l'utilisation de SDS qui, en se regroupant autour des molécules, masque la charge électrostatique des molécules à séparer. Dès lors, la séparation des molécules ne repose que sur leur taille. Plus les molécules sont grosses (et donc lourdes), plus leur vitesse de migration au travers du gel de polyacrylamide est lente. Leur distance de migration est donc plus faible que les plus petites protéines. La visualisation du front de migration est possible grâce à l'utilisation d'un colorant tel que le bleu de bromophénol. Une fois la migration terminée, les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie [21].

En cas de réticulation des peptides en solution, la masse moléculaire de la structure réticulée est supérieure à celle du « monomère », ce qui permet de détecter la réticulation si elle intervient.

#### 2.5.1.2 Résultats

Les résultats sont analysés en observant directement le gel après coloration, comme présenté dans la Figure III.102. Une solution contenant des protéines de poids moléculaires connus est déposée sur la gauche du gel. Les poids moléculaires correspondants sont relevés sur la figure. Les colonnes CP1, 2 et 3 sont les différentes solutions de lysozyme : CP1, 2 et 3 correspondent à des solutions de lysozyme seul ( $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) respectivement à pH 5, 7 et 8 ; T1, T2 et T3 sont des solutions de lysozyme ( $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) auxquelles les activateurs chimiques EDC et NHS ont été ajoutés à une concentration de  $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ces solutions sont préparées dans les mêmes conditions que lors des expériences de greffage.

Toutes les solutions contiennent uniquement une protéine dont le poids moléculaire est compris entre 12 et 17 kDa. Il est possible de déterminer précisément le poids moléculaire d'une protéine en traçant le logarithme du poids moléculaire des étalons en fonction de la distance relative de migration. Ici, le calcul a permis d'obtenir un poids moléculaire de 14,5 kDa. Le lysozyme présente un poids moléculaire de 14,3 kDa. En cas de réticulation, les solutions auraient contenu des espèces de poids moléculaire égal à un multiple de 14,3 kDa : le dimère à 28,6 kDa ; le trimère à 42,9 kDa, etc. Il apparaît nettement que la réticulation du lysozyme n'a pas eu lieu, toutes les solutions ne présentant qu'une seule tâche repérée à environ 15 kDa.

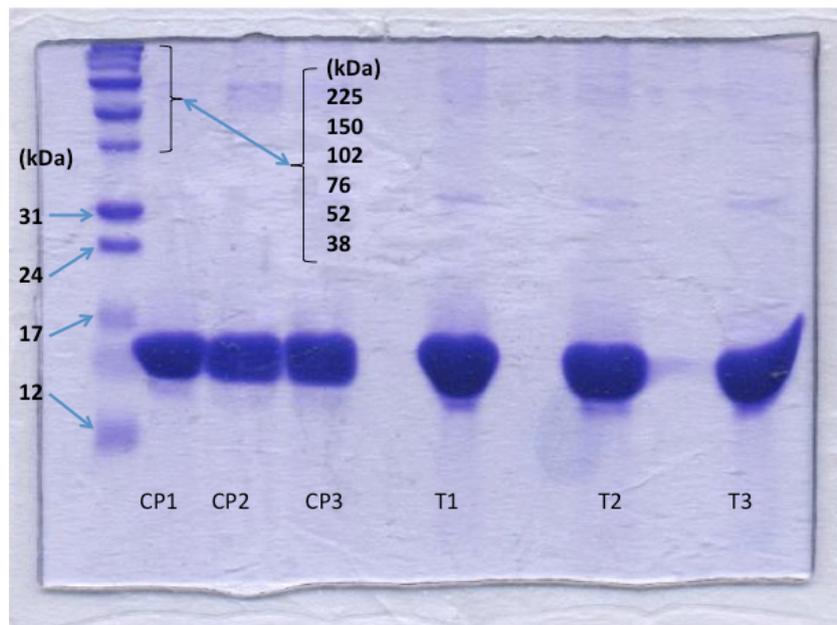


Figure III.102 – Gel d'électrophorèse après coloration au bleu de Coomassie

Les conditions de greffage n'entraînent pas la réticulation du lysozyme en solution, les molécules sont individuelles au moment de leur adsorption sur la surface.

### 2.5.2 Lavage des échantillons

Afin de s'assurer que les protéines détectées à la surface des matériaux soient bien liées de façon covalente avec la surface, les échantillons sont lavés après le greffage. Un lavage à l'eau (2 fois 5 minutes, sous agitation magnétique) est réalisé par défaut, toutefois il est possible d'utiliser des molécules détergentes telles que le sodium dodecyl sulfate (SDS) ou le Tween 20 (Figure III.103) pour leurs propriétés de désorption [16]. Dans ces cas là, le premier lavage à l'eau est remplacé par une solution de détergent à une concentration de 10 mmol.L<sup>-1</sup>, soit environ 3% en masse.

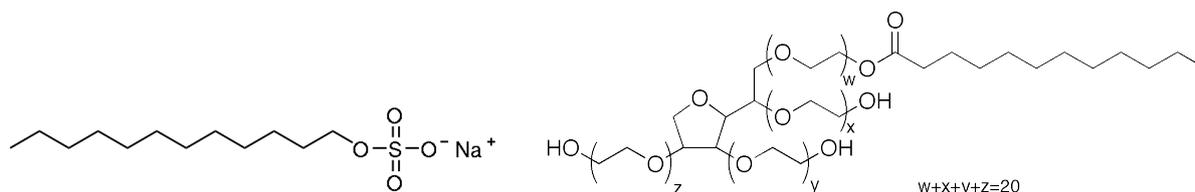


Figure III.103 – Molécules de SDS (gauche) et Tween 20 (droite)

L'analyse XPS des échantillons lavés avec différentes solutions permet l'obtention des compositions atomiques de surface (Tableau III.17), ainsi que le calcul des ratios O/C et N/C (Figure III.104). De son côté, le soufre n'est pas détecté sur tous les échantillons.

Tableau III.17 – Composition atomique de la surface des échantillons fonctionnalisés avec du lysozyme et rincés avec différentes solutions.

	C	O	N	S	Si	F, Ca, Cl
<b>PP</b>	97,4	1,96			0,64	
<b>PP traité par plasma</b>	67,65	24,62	3,18			4,55
<b>PP fonctionnalisé non rincé</b>	72,59	17,92	7,68	1,00	0,28	0,53
<b>Rinçage à l'eau</b>	75,97	15,65	6,19	1,03	0,40	0,76
<b>Rinçage au Tween 20</b>	80,03	15,59	2,09			2,29
<b>Rinçage au SDS (exp. n°1)</b>	83,37	14,99	1,32			0,32

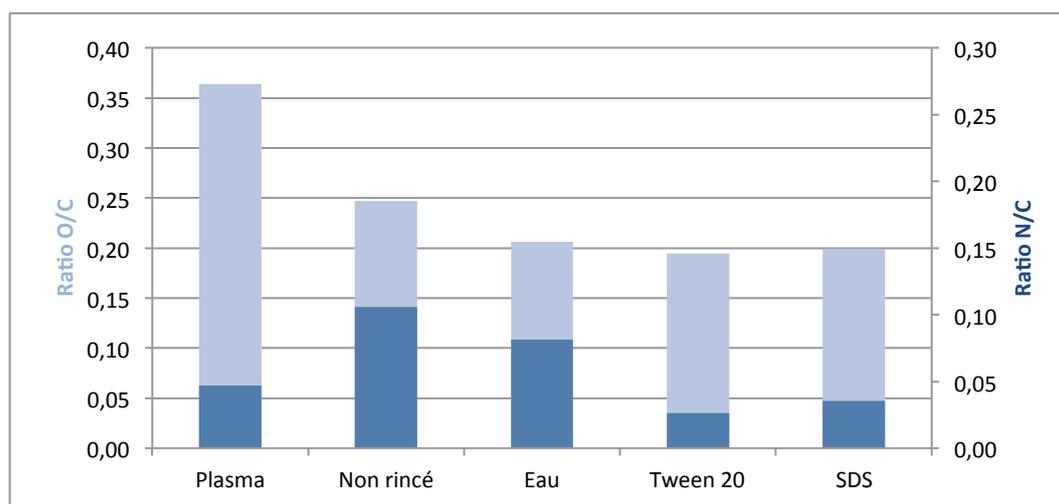


Figure III.104 – Evolution des ratios O/C (■) et N/C (■) en fonction du mode de lavage des échantillons.

L'utilisation de solutions de détergents pour le lavage des échantillons modifie largement la composition chimique de la surface. Tout d'abord, le soufre n'est plus détecté après le rinçage au Tween 20 ou au SDS, ce qui peut signifier la désorption de toutes les molécules, et donc de toute fonctionnalisation de la surface. Toutefois, l'évolution des ratios O/C et N/C apporte

plus d'informations. En effet, tandis que le ratio N/C diminue fortement avec l'utilisation des détergents (de 7 à 2 %), le ratio O/C se maintient à environ 15%. La légère diminution est attribuée à l'augmentation de la concentration en carbone, la concentration en oxygène restant au même niveau, ce qui ne permet pas de statuer sur la désorption des protéines qui fonctionnalisent la surface. Un scénario possible est l'adsorption des tensio-actifs sur la surface des échantillons par le biais de leurs interactions avec les protéines. Dès lors, les tensio-actifs masquent les protéines, ce qui peut expliquer la diminution forte de la concentration en azote, absent de la structure du SDS et du Tween 20, le maintien de la concentration en oxygène, et l'augmentation de la teneur en carbone.

Une deuxième série d'expériences a été réalisée, cette fois-ci uniquement avec un rinçage à l'eau ou au SDS. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.18, et la Figure III.105, ci-dessous.

Tableau III.18 - Composition atomique de la surface des échantillons fonctionnalisés avec du lysozyme et rincés avec différentes solutions.

Echantillon	C	O	N	S	Si	F
Eau	69,01	16,80	9,49	0,65	1,54	2,52
SDS	77,82	17,06	4,39	0,36		0,37

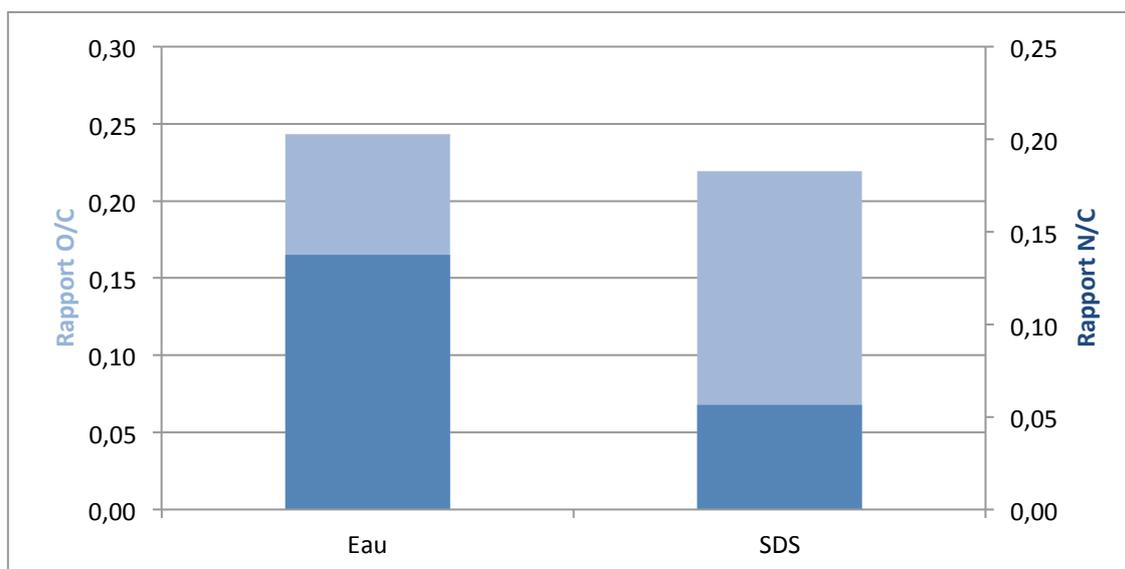


Figure III.105 - Evolution des rapports O/C (■) et N/C (■) en fonction du mode de lavage des échantillons.

Le comportement observé suit la même tendance que sur la série précédente. Le rinçage au SDS provoque une forte diminution du rapport N/C, tandis que le rapport O/C reste du même

ordre de grandeur. En revanche, sur cette série, du soufre est détecté sur l'échantillon rincé avec une solution de SDS, celui-ci présente une proportion importante de soufre de type S-O (Figure III.106). Le soufre oxydé provient probablement du SDS, ce qui témoigne de l'adsorption du tensio-actif à la surface de l'échantillon.

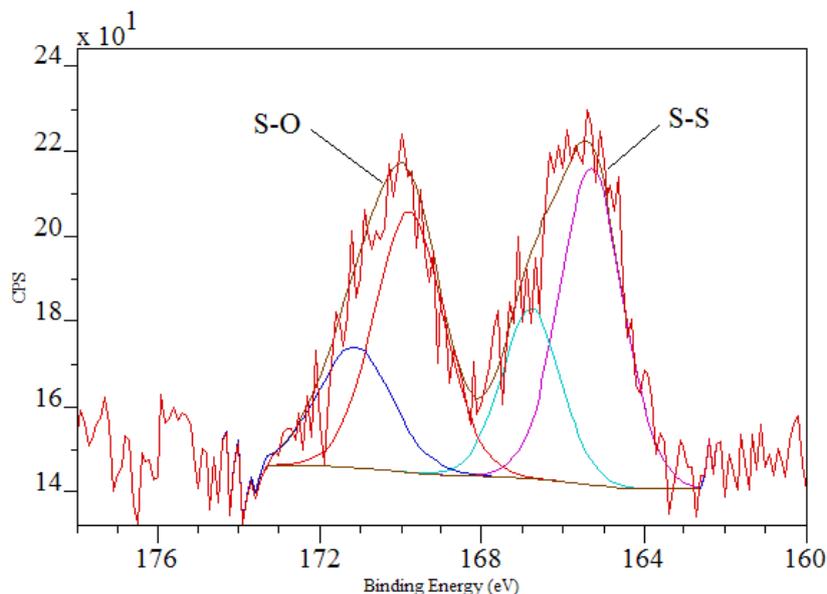


Figure III.106 – Pic S2p de l'échantillon rincé au SDS

Il est difficile, par cette expérience, de conclure sur la nature de l'immobilisation des protéines, notamment l'assurance d'avoir des liaisons covalentes entre la surface et les molécules, ainsi que leur présence sous forme de monocouches ou multicouches. En revanche, la diminution du rapport N/C après rinçage, le maintien du rapport O/C ainsi que la présence, en quantités importantes, du soufre oxydé sur la surface suggère que les tensio-actifs utilisés pour le rinçage (SDS, Tween 20) s'adsorbent sur la couche de lysozyme.

### 2.5.3 Etude de l'état de surface des échantillons par microscopie électronique à balayage (MEB)

L'utilisation de la microscopie électronique à balayage permet d'observer la surface à de très forts grossissements (ici jusqu'à 150 000 fois par exemple), permettant d'analyser visuellement la morphologie des échantillons et l'impact de la fonctionnalisation.

#### 2.5.3.1 Principe du MEB

La microscopie électronique, décrits de façon détaillée notamment par Radetic (2011, [22]), repose sur l'interaction entre la surface de l'échantillon et un faisceau d'électrons présentant une énergie pouvant aller de 1 à 30 keV (contre 1,2 à 1,5 keV en XPS). Les électrons

rétrodiffusés émis par la surface sont ensuite collectés, l'observation de ces électrons permet d'analyser la morphologie de la surface (Figure III.107).

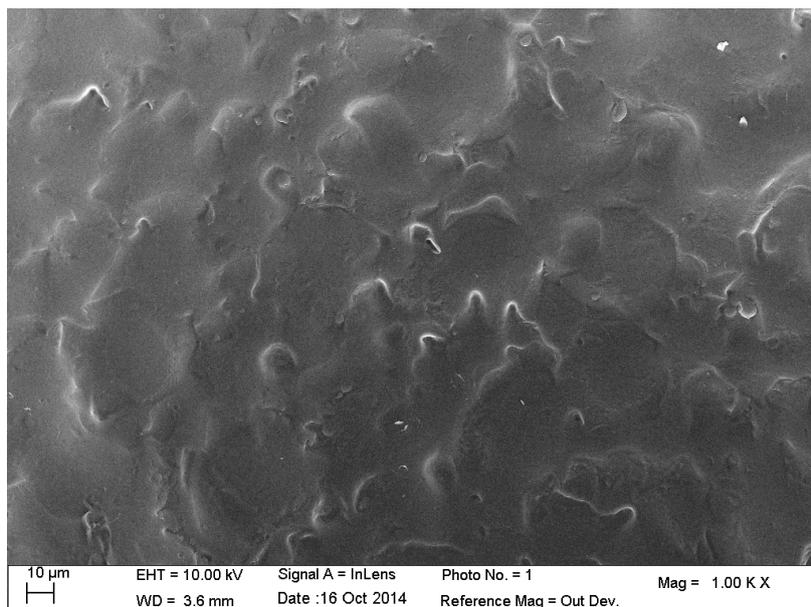


Figure III.107 - Surface d'un échantillon de polypropylène vierge obtenu par MEB

L'intensité du signal dépend de la morphologie de la surface, notamment de l'angle entre la surface et le faisceau lié à la rugosité du matériau. Dans le cas d'une surface inclinée à cause d'un relief, le parcours du faisceau d'électron, avant d'atteindre la profondeur maximum d'échappement des électrons rétrodiffusés, augmente, ce qui augmente leur production (Figure III.108).

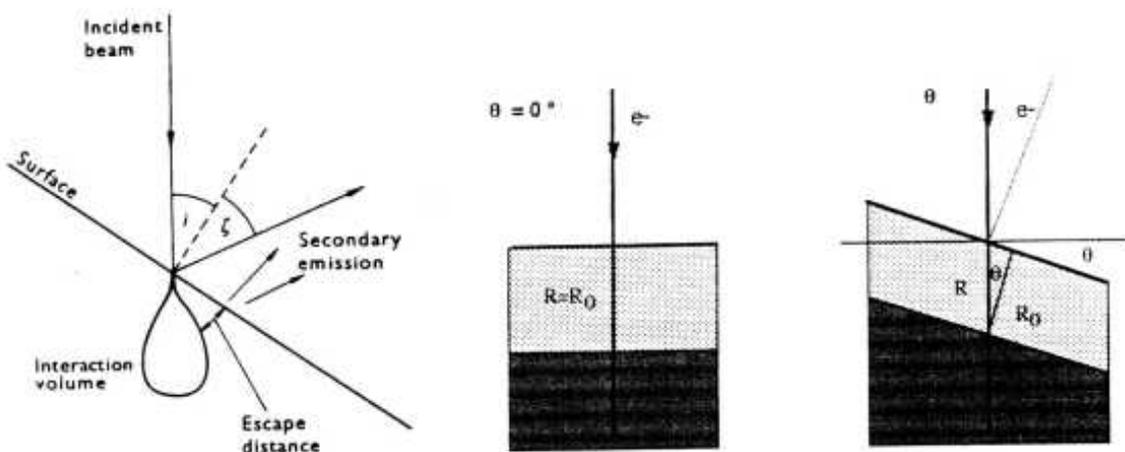


Figure III.108 – Réduction de la profondeur d'échappement des électrons rétrodiffusés

Dès lors, les surfaces planes apparaissent sombres, tandis que les reliefs tels que les bosses ou les pointes apparaissent plus clairs. Cette technique peut être couplée avec une analyse par

énergie dispersive à rayons X (EDX), qui permet de faire une analyse élémentaire de la surface par la détection des électrons secondaires émis lors de l'interaction entre le faisceau électronique et la matière.

### 2.5.3.2 Observation de la fonctionnalisation de surface du PP par MEB

L'expérience a, cette fois-ci, été réalisée avec la nisine. Les clichés de la surface sont obtenus dans les conditions suivantes :

- Courant haute tension appliqué pour la génération des électrons : 5 kV
- Méthode de détection des électrons secondaires : In-Lens
- Grossissement : 150.000 X

Trois échantillons sont comparés les uns aux autres afin d'observer l'impact du traitement sur la surface des matériaux : un PP non traité, un PP traité par plasma, un PP traité par plasma et fonctionnalisé avec de la nisine. Les images sont présentées dans la Figure III.109. Des microstructures, absentes des échantillons non traités et traités par plasma, sont observées sur l'échantillon fonctionnalisé avec la nisine. Ces sphères présentent un diamètre d'environ 50 nm et forment un tapis dense sur la surface. Toutefois, ces structures ne sont pas présentes de façon homogène sur l'ensemble de la surface des échantillons, comme le montre la Figure III.110. Ces microstructures peuvent certainement être les molécules de nisine sous forme de petits regroupements.

L'origine de cette hétérogénéité peut provenir d'un manque d'homogénéité du traitement plasma, notamment en raison de la rotation de la torche, ou d'un manque d'homogénéité de l'adsorption des peptides à cause du protocole, la solution n'étant pas agitée une fois déposée sur l'échantillon. Les plus grosses structures présentes sur la surface des échantillons peuvent être des poussières, ou des déformations de la surface du matériau.

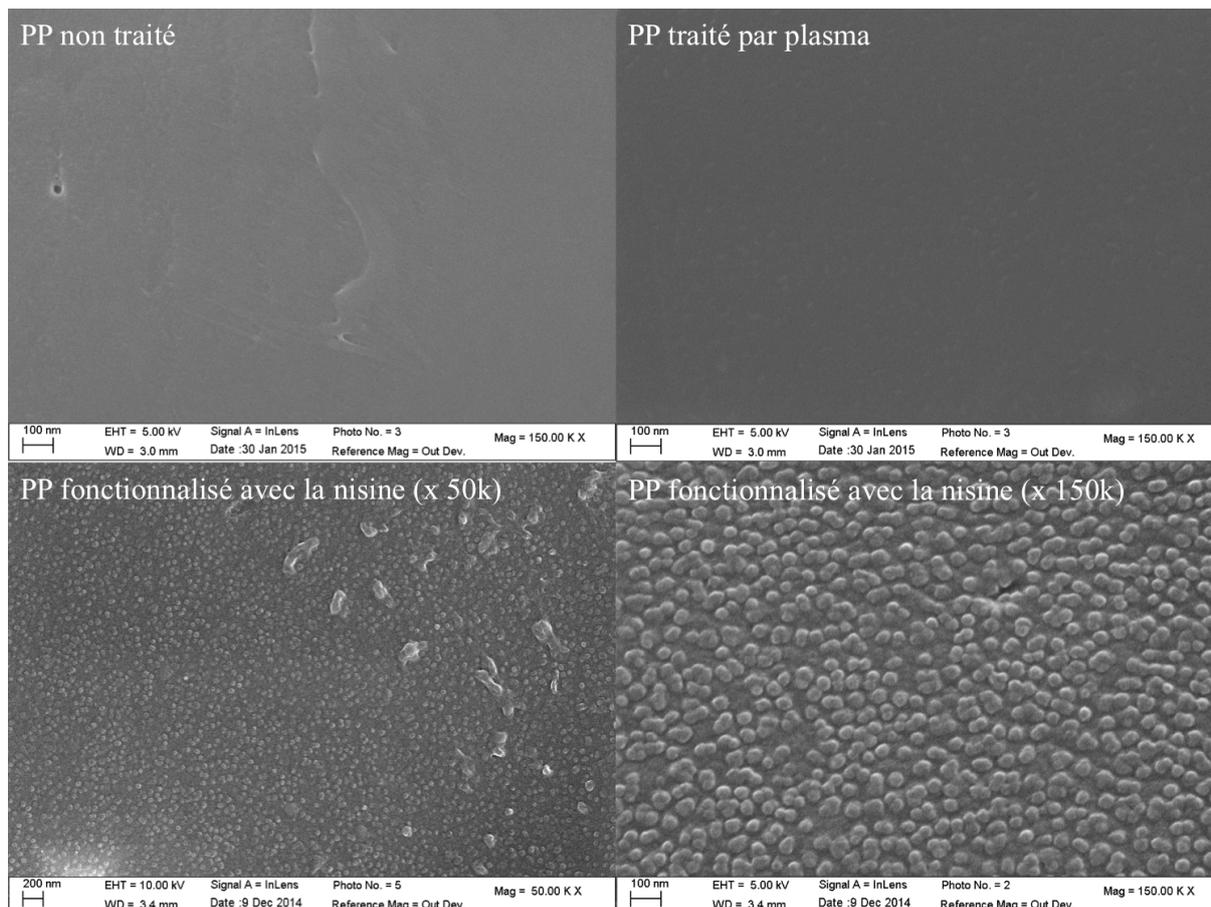


Figure III.109 – Images MEB des différents échantillons de PP.

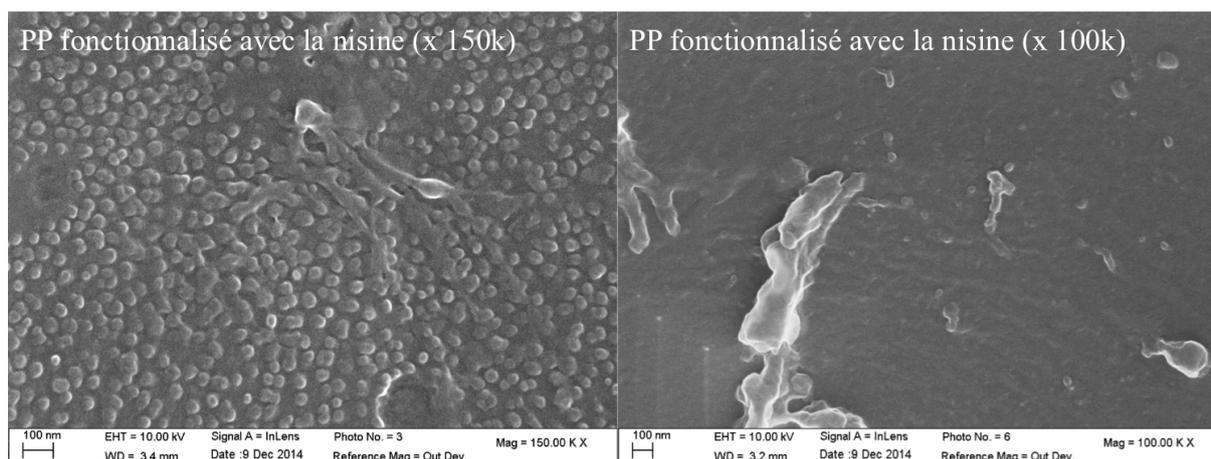


Figure III.110 – Images MEB d'un même échantillon de PP fonctionnalisé avec de la nisine, à gauche la densité de « sphères » est importante, à droite il n'y en a presque pas.

Ces images montrent une structuration particulière de la couche de nisine sur la surface du matériau, mais cela met également en évidence l'hétérogénéité de la fonctionnalisation. Les peptides semblent être immobilisés en grand nombre, et probablement regroupés en amas de plusieurs molécules de façon à former des sphères de cette taille (environ 25 nm). Ces regroupements de molécules peuvent se produire lors de leur adsorption sur la surface.

L'étude de la solution de lysozyme par électrophorèse SDS-PAGE a montré que les protéines ne réticulaient pas en solution, en revanche cela est valable pour le lysozyme, l'étude n'a pas été réalisée sur la nisine, en raison du manque de disponibilité du produit. Enfin, l'absence de réticulation en solution ne garantit pas que les molécules ne réticulent pas une fois adsorbées sur la surface.

Une telle structuration a déjà été observée pour de la myoglobine, adsorbée sur une couche auto-assemblée de SDS [23], mais également pour l'immobilisation de la trypsine sur un substrat de silicium sur lequel un dépôt d'allylamine a été déposé par plasma [24]. La structure serait déterminée par les interactions protéine-protéine et protéine-surface.

L'analyse élémentaire de ces amas n'a pas été possible car la technique d'analyse EDX utilise le faisceau d'électrons pour interagir avec la matière et analyser les électrons secondaires émis. Or, la profondeur de pénétration d'un faisceau d'électrons est calculable à partir de l'équation développée par P.J. Potts en 1992 [25]:

$$x(\mu m) = \frac{0,1 \cdot E_0^{1,5}}{\rho}$$

Équation II.3 - Expression de la profondeur de pénétration d'un faisceau d'électrons dans un milieu solide

Avec  $E_0$  l'énergie du faisceau d'électron en keV, et  $\rho$  la densité du milieu sondé en  $g/cm^3$ .

Dans les conditions de l'analyse ( $E_0 = 5$  keV,  $\rho_{PP} = 0,9$ ), le faisceau d'électron atteint une profondeur de  $1,24\mu m$ , ce qui correspond à environ 250 monocouches de 5 nm d'épaisseur. Cette profondeur est beaucoup trop importante pour l'analyse de l'extrême surface de l'échantillon, le résultat correspond à l'analyse du cœur du polypropylène.

### **2.6 Immobilisation des biomolécules sur la couche d'acide acrylique déposée par torche DBD**

Les dépôts d'acide acrylique réalisés dans le chapitre II ont permis d'enrichir la surface du PP en acides carboxyliques. Les échantillons ainsi fonctionnalisés ont ensuite été greffés avec les biomolécules à pH de 5 pendant 5 minutes, en présence de EDC et NHS utilisés à  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , suivi d'un lavage à l'eau. Les échantillons ont été analysés par infrarouge et XPS, et comparés

avec des échantillons fonctionnalisés via une activation par torche à plasma d'air à la pression atmosphérique.

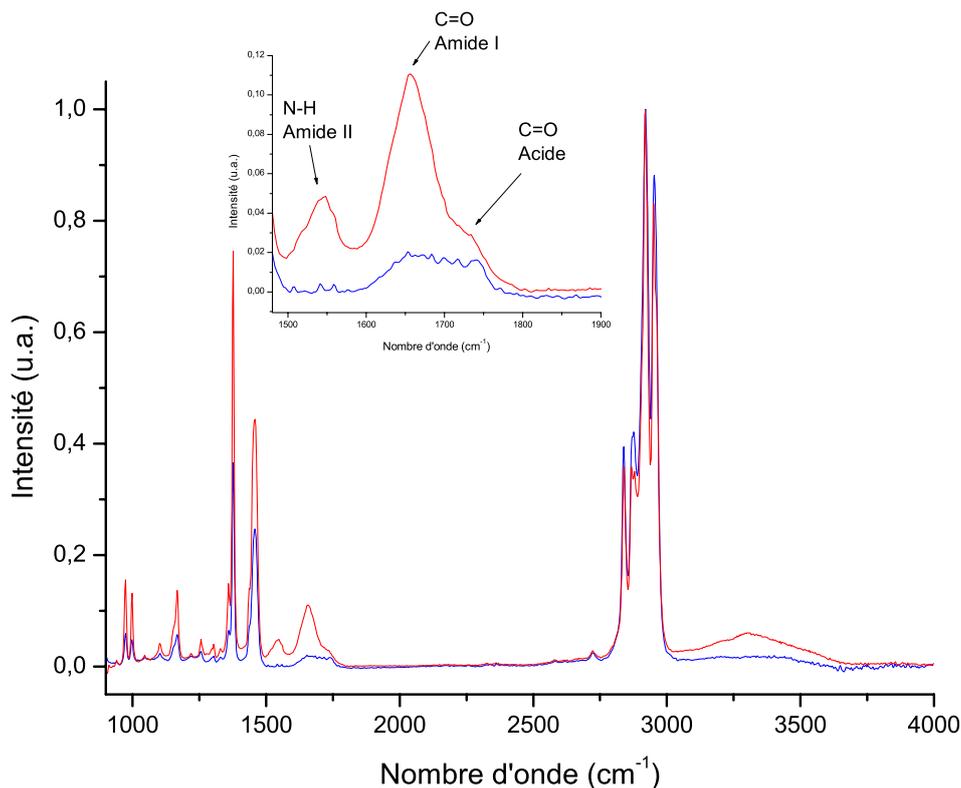


Figure III.111 – Spectres IR du PP fonctionnalisé avec du lysozyme, après activation par torche plasma (—) et après dépôt d'acide acrylique par torche DBD (—).

Le spectre infrarouge du PP fonctionnalisé avec du lysozyme après dépôt d'une couche d'acide acrylique polymérisée par plasma est comparé à la fonctionnalisation avec du lysozyme après activation par plasma sur la Figure III.111.

La bande amide I à  $1650\text{ cm}^{-1}$  semble se distinguer sur le spectre de l'échantillon fonctionnalisé avec du lysozyme immobilisé sur un dépôt d'acide acrylique, malgré une faible intensité, de même qu'une bande à  $1740\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ , attribuée aux carboxyles (esters et acides). Ces traces témoignent probablement de la présence d'une petite partie du dépôt (COOH), et d'une fonctionnalisation avec le lysozyme (amide).

Il apparaît que l'immobilisation est beaucoup plus faible, voir quasiment inexistante, lorsque celle-ci est réalisée sur le dépôt d'acide acrylique. Cela s'explique par la dissolution de la couche d'acide lors du greffage, ce comportement était attendu, le phénomène de dissolution ayant été déjà observé dans le chapitre II.

Des échantillons fonctionnalisés avec du lysozyme et de la nisine via le dépôt d'acide acrylique par plasma ont ensuite été analysés par XPS. La composition atomique de la surface des échantillons ainsi traités est reportée dans le Tableau III.19.

Tableau III.19 – Rapports atomiques des éléments chimiques de la surface des échantillons fonctionnalisés. PP = Polypropylène, AA = dépôt d'acide acrylique par torche DBD, Plasma = activation par torche à plasma d'air.

<b>Echantillon</b>	<b>Traitement</b>	<b>O/C</b>	<b>N/C</b>	<b>S*/C</b>	<b>S*/N</b>
<b>1</b>	<b>PP + AA</b>	0,28	0,01	0	0
<b>2</b>	<b>PP + AA + Nisine</b>	0,06	0,01	0	0
<b>3</b>	<b>PP + AA + Lysozyme</b>	0,07	0,01	0,001	0,054
<b>4</b>	<b>PP + Plasma</b>	0,33	0,04	0	0
<b>5</b>	<b>PP + Plasma + Lysozyme</b>	0,25	0,14	0,008	0,57
<b>6</b>	<b>PP + Plasma + Nisine</b>	0,26	0,09	0,006	0,71

\* la teneur en soufre a été corrigée grâce à la décomposition du pic S2p. Cette valeur correspond au pourcentage de soufre de type S-S ou S-C apporté par les biomolécules, et non S-O (sulfates).

La teneur en oxygène a très fortement diminué après l'immobilisation, tandis que la teneur en carbone a augmenté dans des proportions équivalentes sur les échantillons n° 2 et 3. La comparaison avec les échantillons 5 et 6, ayant été fonctionnalisés via une activation par torche à plasma d'air, montre que l'immobilisation est beaucoup plus importante lorsque l'activation se fait par torche plasma à la pression atmosphérique. Ce phénomène est également observé sur le pic C1s des échantillons (Figure III.112). L'activation par plasma aboutit à une surface beaucoup plus riche en groupements oxygénés et azotés, témoignant ainsi d'un meilleur greffage en surface.

La dissolution de la majeure partie du dépôt d'acide acrylique est à nouveau observée par XPS, ce qui implique nécessairement une diminution de la quantité de molécules immobilisées en surface, caractérisé par la très faible teneur en azote et soufre sur ces mêmes échantillons.

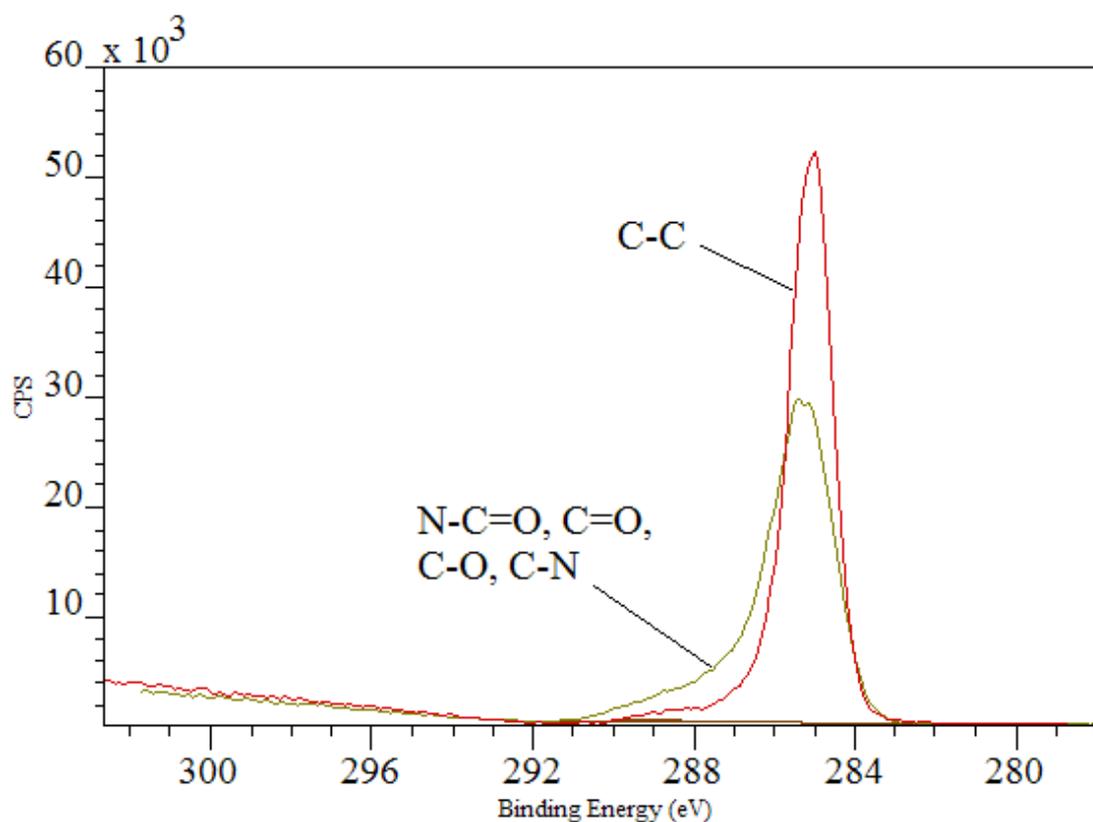


Figure III.112 – Comparaison des pics C1s de l'échantillon 3 (dépôt d'acide acrylique et fonctionnalisation avec le lysozyme) (—), et de l'échantillon 5 (activation par plasma et fonctionnalisation avec le lysozyme) (—).

Du soufre est détecté sur l'échantillon n°3 en très faible quantité (0,17% au total, dont 0,05% pour le soufre organique). Cette trace semble témoigner de la présence de lysozyme sur la surface de l'échantillon.

De plus, le ratio S/N des échantillons sur lesquels a été immobilisé du lysozyme, est du même ordre de grandeur que celui du lysozyme (0,062), ce qui tend à confirmer l'immobilisation. En effet, quelque soit la méthode de fonctionnalisation, la principale source d'azote et de soufre reste les peptides à la surface. Le ratio S/N correspond ainsi à une sonde interne aux biomolécules.

Il convient toutefois de préciser que le projet s'étant principalement orienté vers la technologie de torches à plasma, le procédé de dépôt d'acide acrylique n'a pas été optimisé, ce qui explique la dissolution d'une partie de la couche.

### 3 Conclusion

L'immobilisation de peptides et protéines, tels que la nisine et le lysozyme, sur du polypropylène préalablement activé par plasma a été réalisée avec succès, les paramètres permettant d'optimiser le greffage ont également été identifiés.

Les fonctions chimiques aldéhydes et acides carboxyliques ont été identifiées comme jouant un rôle essentiel dans l'immobilisation des molécules à la surface du PP. Ceci est également caractérisé par l'absence de peptides sur la surface après greffage lorsque celui-ci n'est pas traité ou présente principalement des insaturations.

La présence des biomolécules est révélée par l'apparition sur les spectres IR des bandes amide I ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) et amide II ( $1550\text{ cm}^{-1}$ ). La forme du signal entre  $1500$  et  $1900\text{ cm}^{-1}$  est caractéristique de celle de la liaison peptidique entre acides aminés. De plus, l'analyse XPS confirme l'immobilisation des biomolécules en surface. D'une part, une contribution intense attribuée à la fonction  $\text{N-C=O}$  ( $288,2\text{ eV}$ ) est détectée dans le pic C1s des échantillons fonctionnalisés avec des peptides. D'autre part, les teneurs en azote et en soufre sont également des marqueurs de la fonctionnalisation du matériau. Le pic S2p du soufre ( $163,8\text{ eV}$ ) est, par ailleurs, composé des contributions S-S et S-C, signe du caractère organique du soufre.

Le protocole de greffage a été optimisé, les analyses par XPS ont permis de montrer que l'activation simultanée des groupements carboxyliques de surface et le greffage covalent des biomolécules conduit au greffage le plus efficace, ce qui permet de réduire le nombre d'étapes du protocole de greffage. L'électrophorèse a permis de montrer que le lysozyme ne se réticule pas en solution en présence des agents activateurs.

Les paramètres d'immobilisation optimaux ont été déterminés :

- Durée : 5 min
- $\text{pH} > 7,5$
- Concentration en EDC et NHS :  $5\text{ mmol.L}^{-1}$

Les biomolécules immobilisées semblent former un tapis dense de molécules, regroupées en amas sphériques sur la surface comme l'ont montré les images obtenues par MEB. Enfin, la fonctionnalisation s'est maintenue trente jours après l'immobilisation.

L'utilisation d'un dépôt d'acide acrylique pour fonctionnaliser la surface avec de la nisine ou du lysozyme a également été entreprise, mais la faible résistance du dépôt à l'eau dans les conditions étudiées, et peut-être pas optimisées, (greffage, rinçage) conduit à une immobilisation des biomolécules moins efficace que le traitement par plasma d'air à la pression atmosphérique.

Le protocole mis au point a permis de fonctionnaliser du PP traité par plasma à la pression atmosphérique, en une seule étape après activation, cette immobilisation est stable pendant au moins trente jours. L'objectif du prochain chapitre est d'évaluer l'activité biologique des molécules utilisées pour le greffage, et s'assurer du maintien de cette activité une fois sur la surface du matériau. L'activité des échantillons fonctionnalisés avec un dépôt d'acide acrylique sera également évaluée.

## Références

- [1] M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, and E. Chiellini, "Chitosan: A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 8, pp. 981–1014, 2011.
- [2] S. Degoutin, M. Jimenez, F. Chai, T. Pinalie, S. Bellayer, M. Vandebossche, C. Neut, N. Blanchemain, and B. Martel, "Simultaneous immobilization of heparin and gentamicin on polypropylene textiles: A dual therapeutic activity," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 102, no. 11, pp. 3846–3854, 2014.
- [3] E. P. Ivanova, J. P. Wright, D. K. Pham, N. Brack, P. Pigram, Y. V. Alekseeva, G. M. Demyashev, and D. V. Nicolau, "A comparative study between the adsorption and covalent binding of human immunoglobulin and lysozyme on surface-modified poly(tert-butyl methacrylate)," *Biomed. Mater.*, vol. 1, no. 1, p. 24, 2006.
- [4] M. Yoshinari, T. Kato, K. Matsuzaka, T. Hayakawa, T. Inoue, Y. Oda, K. Okuda, and M. Shimono, "Adsorption behavior of antimicrobial peptide histatin 5 on PMMA," *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 77B, no. 1, pp. 47–54, 2006.
- [5] D. V. Vezenov, A. Noy, L. F. Rozsnyai, and C. M. Lieber, "Force titrations and ionization state sensitive imaging of functional groups in aqueous solutions by chemical force microscopy," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 8, pp. 2006–2015, 1997.
- [6] A. Baltazar-Y-Jimenez and A. Bismarck, "Surface modification of lignocellulosic fibres in atmospheric air pressure plasma," *Green Chem.*, vol. 9, no. 10, pp. 1057–1066, 2007.
- [7] M. García-Vargas, C. González-Chomón, B. Magariños, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, and E. Bucio, "Acrylic polymer-grafted polypropylene sutures for covalent immobilization or reversible adsorption of vancomycin," *Int. J. Pharm.*, vol. 461, no. 1–2, pp. 286–295, 2014.
- [8] F. Carlsson, P. Linse, and M. Malmsten, "Monte Carlo Simulations of Polyelectrolyte–Protein Complexation," *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, no. 38, pp. 9040–9049, 2001.
- [9] N. Nakajima and Y. Ikada, "Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media," *Bioconjug. Chem.*, vol. 6, no. 1, pp. 123–130, 1995.
- [10] F. Carlsson, E. Hyltner, T. Arnebrant, M. Malmsten, and P. Linse, "Lysozyme Adsorption to Charged Surfaces. A Monte Carlo Study," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 28, pp. 9871–9881, 2004.

- [11] S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J. N. Chazalviel, A. C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, and N. Gabouze, “Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces,” *Langmuir*, vol. 26, no. 2, pp. 809–814, 2009.
- [12] M. Mizuguchi, M. Nara, Y. Ke, K. Kawano, T. Hiraoki, and K. Nitta, “Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Studies on the Coordination of the Side-Chain COO-Groups to Ca<sup>2+</sup> in Equine Lysozyme,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 250, no. 1, pp. 72–76, 1997.
- [13] D. Duday, C. Vreuls, M. Moreno, G. Frache, N. D. Boscher, G. Zocchi, C. Archambeau, C. Van De Weerd, J. Martial, and P. Choquet, “Atmospheric pressure plasma modified surfaces for immobilization of antimicrobial nisin peptides,” *Surf. Coat. Technol.*, vol. 218, pp. 152–161, 2013.
- [14] A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, M. Salmain, and C.-M. Pradier, “Grafting of Lysozyme and/or Poly(ethylene glycol) to Prevent Biofilm Growth on Stainless Steel Surfaces,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 7, pp. 2101–2109, 2009.
- [15] M. Liang, L. Wang, X. Liu, W. Qi, R. Su, R. Huang, Y. Yu, and Z. He, “Cross-linked lysozyme crystal templated synthesis of Au nanoparticles as high-performance recyclable catalysts,” *Nanotechnology*, vol. 24, no. 24, p. 245601, 2013.
- [16] M. Ghasemi, “Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma,” Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, Paris, 2007.
- [17] B. Johnsson, S. Löfås, and G. Lindquist, “Immobilization of Proteins to a Carboxymethyl-dextran-Modified Gold Surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface Plasmon Resonance Sensors,” *Anal. Biochem.*, no. 198, pp. 268–277, 1991.
- [18] L. Guo, C. Campagne, A. Perwuelz, and F. Leroux, “Zeta Potential and Surface Physico-chemical Properties of Atmospheric Air-plasma-treated Polyester Fabrics,” *Text. Res. J.*, vol. 79, no. 15, pp. 1371–1377, 2009.
- [19] P. Slepíčka, A. Vasina, Z. Kolská, T. Luxbacher, P. Malinský, A. Macková, and V. Švorčík, “Argon plasma irradiation of polypropylene,” *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.*, vol. 268, no. 11–12, pp. 2111–2114, 2010.
- [20] A. Řezníčková, Z. Kolská, V. Hnatowicz, P. Stopka, and V. Švorčík, “Comparison of glow argon plasma-induced surface changes of thermoplastic polymers,” *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.*, vol. 269, no. 2, pp. 83–88, 2011.
- [21] P. J. Blackshear, “[12] Systems for polyacrylamide gel electrophoresis,” in *Methods in Enzymology*, vol. 104, W. B. Jakoby, Ed. Academic Press, 1984, pp. 237–255.
- [22] T. Radetic, “Fundamentals of Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive

X-ray Analysis in SEM and TEM,” presented at the NFMC Spring School on Electron Microscopy, University of Belgrad, 2011.

[23] J. Zhang, Q. Chi, S. Dong, and E. Wang, “Ordered arrays of myoglobin adsorbed on the surfactant modified surface by scanning tunneling microscopy,” *Surf. Sci.*, vol. 321, no. 3, pp. L195–L201, 1994.

[24] A. Abbas, D. Vercaigne-Marko, P. Supiot, B. Bocquet, C. Vivien, and D. Guillochon, “Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine,” *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 73, no. 2, pp. 315–324, 2009.

[25] P. J. Potts, “Electron probe microanalysis,” in *A Handbook of Silicate Rock Analysis*, Springer US, 1992, pp. 326–382.

**CHAPITRE IV : ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ  
BIOLOGIQUE DES ÉCHANTILLONS DE  
POLYPROPYLENE FONCTIONNALISÉS AVEC LES  
BIOMOLÉCULES AUX PROPRIÉTÉS  
ANTIBACTÉRIENNES**

## **Introduction**

L'activité antibactérienne des surfaces préparées selon le protocole mis au point au cours de ces travaux est au cœur de ce projet de thèse et en constitue l'objectif principal.

Dans les chapitres précédents, nous avons démontré qu'il était possible de fonctionnaliser des échantillons de polypropylène en immobilisant à la surface, soit de la nisine, soit du lysozyme, grâce à une activation par torche plasma à pression atmosphérique, ou le dépôt d'une couche d'acide acrylique polymérisée par plasma, suivie d'un greffage chimique des molécules, le but étant de conférer à la surface du polymère les propriétés antibactériennes des peptides et protéines sélectionnées. Toutefois, le simple fait de leur présence ne garantit pas les performances du matériau d'un point de vue microbiologique. Relargage des molécules, interactions avec la surface, dénaturation lors de l'immobilisation, inaccessibilité des peptides vis à vis des bactéries, sont autant de freins possibles au maintien de l'activité antibactérienne des biomolécules lors de leur immobilisation ou bien lors du vieillissement ou de l'utilisation du matériau.

Le présent chapitre a pour objectif d'évaluer l'activité biologique des échantillons afin de s'assurer du maintien du caractère antibactérien des peptides une fois immobilisés sur une surface. La stabilité de l'activité antibactérienne des échantillons sera également évaluée après un lavage avec différentes solutions (eau, détergents, milieu de culture), et après un vieillissement à température ambiante.

# 1 Protocole expérimental

## 1.1 Description du protocole

Chaque échantillon est évalué en triplicat, chaque test doit toujours contenir les échantillons suivants parmi les matériaux testés :

- Un échantillon non traité avec une période d'incubation nulle (échantillon nommé  $PP_{t_0}$ )
- Un témoin « négatif » : un échantillon non traité avec une période d'incubation de 24h (échantillon nommé  $PP_{24h}$ )
- Un témoin « positif » dont l'activité antibactérienne est assurée : pour ce projet, il s'agit de polypropylène sur lequel a été réalisé un dépôt d'argent par PVD (Pulvérisation cathodique magnétron effectué au laboratoire), dont le protocole est décrit en annexe.

$PP_{t_0}$  sert de contrôle pour la concentration initiale de bactéries et  $PP_{24h}$  de référence comme témoin négatif, ainsi que de vérification de la validité du test. En effet, si  $PP_{24h}$  présente une concentration finale de bactérie trop faible, le test peut ne pas être valide (voir le paragraphe 1.2 ci-dessous).

De plus, la présence d'un témoin « positif », dont les performances antibactériennes sont avérées, dans chaque lot d'échantillon est importante car elle permet d'évaluer les échantillons fonctionnalisés par rapport à ce témoin, mais elle permet également de s'assurer du bon déroulement du test. En effet, si le témoin positif présente une activité antibactérienne trop faible, cela témoigne d'une trop forte concentration initiale de bactéries. De même, si  $PP_{t_0}$  présente une activité antibactérienne non nulle, cela signifie qu'une partie des bactéries sont mortes durant l'incubation, indépendamment du caractère antibactérien, ou non, des échantillons.

### 1.1.1 Préparation de l'inoculum de bactéries

La souche utilisée, *Staphylococcus epidermidis* (CIP 68.21, Institut Pasteur, Paris), est mise en culture à 37°C pendant une nuit dans une solution de bouillon déshydraté de Trypticase de Soja (TSB - Trypto-Caseine Soja Broth, Bio-Rad, Life Science, USA) stérilisé préalablement par autoclave. A ce stade, la concentration en bactéries, exprimée en CFU/mL (Colony Forming Unit, soit le nombre de colonies de bactéries dénombrables après incubation sur un milieu de culture solide), est d'environ  $10^8$  CFU/mL. Cette mesure est rendue possible en réalisant plusieurs fois un dénombrement bactérien (comptage du nombre de colonies vivantes), comme décrit en 1.1.4 ci-dessous.

Lorsque la culture est prête, elle est diluée dans un milieu de culture (1/500 Nutrient Broth) préparé comme suit : dans 1L d'eau, mélanger 3 g d'extrait de viande (Meat Extract), 10 g de peptone et 5 g de chlorure de sodium, puis diluer 500 fois la solution ainsi préparée, et stériliser par autoclave. La dilution de la culture doit permettre d'obtenir une concentration en bactérie de l'ordre de  $10^6$  CFU/mL, on appelle cette solution *Inoculum*.

Cette dilution doit permettre de contrôler la quantité de bactéries utilisée pour le test, mais également de permettre aux bactéries de survivre grâce au milieu de culture, sans proliférer grâce à la dilution.

### 1.1.2 Inoculation et incubation des échantillons

40µL d'inoculum est déposé au centre de chaque échantillon (2,25 cm<sup>2</sup>), puis recouvert d'un film de polyéthylène (PE) préalablement stérilisé à l'autoclave et découpé aux dimensions de l'échantillon. Le film permet de s'assurer que l'inoculum est réparti régulièrement sur l'ensemble de la surface de l'échantillon, et limite le phénomène d'évaporation pendant l'incubation.

Une fois les échantillons inoculés et recouvert d'un film de PE, ils sont déposés dans des boîtes de Pétri, elles-mêmes disposées dans une boîte refermable contenant un réservoir d'eau afin de maintenir un taux d'humidité élevé et limiter l'évaporation de l'inoculum pendant l'incubation. La boîte est ensuite placée en incubateur à 37°C pendant 24h.

### 1.1.3 Récupération de l'inoculum après incubation

Après incubation, l'inoculum est récupéré en lavant l'échantillon plusieurs fois à l'aide de 3mL de solution saline (NaCl à 0,9%) directement dans la boîte de Pétri. Des dilutions successives sont ensuite réalisées à partir de la solution bactérienne récupérée afin de faciliter le dénombrement. En effet, selon l'activité antibactérienne des échantillons, la concentration de cette solution peut varier de 100 à 10<sup>6</sup> CFU/mL. Au-delà de 10<sup>3</sup> CFU/mL, le dénombrement peut devenir particulièrement long et fastidieux.

### 1.1.4 Dénombrement des bactéries

Le dénombrement des bactéries est l'étape de révélation des résultats du test. C'est à partir de ces données qu'il est possible d'évaluer, comparer et analyser l'activité antibactérienne des échantillons testés.

Un milieu de culture solide est préparé à partir de gélose trypticase de soja déshydratée (TSA - Trypto-Caseine Soja Agar, Bio-Rad, Life Science, USA), et stérilisé par autoclave. À la sortie de l'autoclave, le milieu de culture encore liquide est divisé dans des boîtes de Pétri (environ 10mL par boîte) et réparti de façon homogène sur le fond des boîtes.

Une fois le milieu de culture solidifié au fond des boîtes de Pétri, 100μL de chaque dilution de chaque échantillon est étalé sur la gélose d'une boîte de Pétri, puis mis en incubation, à 37°C, pendant toute une nuit.

Après incubation, les colonies visibles sont décomptées, et la concentration bactérienne sur la surface testée à l'issue de l'incubation, exprimée en CFU/cm<sup>2</sup>, est déterminée par la formule suivante :

$$N_i = \frac{d \times m \times V_1}{S \times V_2}$$

Avec :

N<sub>i</sub> : le nombre de colonies viables par cm<sup>2</sup> pour l'échantillon i

d : le facteur de dilution de la solution saline étalée sur la boîte

V<sub>1</sub> : le volume total (en mL) de la solution saline de récupération

$V_2$  : le volume (en mL) de cette solution saline de récupération, diluée et étalée sur la boîte de Pétri

$S$  : la surface (en  $\text{cm}^2$ ) de l'échantillon

$m$  : la moyenne du nombre de colonies dénombrées sur trois boîtes différentes pour chaque dilution

Les résultats, exprimés en  $\text{CFU}/\text{cm}^2$  peuvent ensuite être convertis en pourcentage de bactéries tuées par le calcul suivant :

$$\%R_i = 1 - \frac{N_i}{N_{PP_{24h}}}$$

Avec :

$\%R_i$  : le pourcentage de bactéries tuées pendant le test de l'échantillon  $i$

$N_{i/PP_{24h}}$  : le nombre de colonies viables par  $\text{cm}^2$  pour l'échantillon  $i/PP_{24h}$

Enfin, on exprime également les résultats en « activité antibactérienne » :

$$A_i = \log(N_{PP_{24h}}) - \log(N_i)$$

Avec :

$A_i$  : l'activité antibactérienne (aussi appelée « réduction de log ») de l'échantillon  $i$

$N_{i/PP_{24h}}$  : le nombre de colonies viables par  $\text{cm}^2$  pour l'échantillon  $i/PP_{24h}$

Les résultats sont généralement présentés sous forme d'histogrammes, présentant  $N_i$ . Les valeurs obtenues pour  $A_i$  et  $\%R_i$  peuvent être présentées sous forme de tableau.

### 1.2 Critères de validité du test

La norme ISO 22196 précise 3 conditions à respecter pour pouvoir considérer le test comme valide :

- 1) L'échantillon  $PP_{10}$  doit respecter la condition suivante :

$$\frac{L_{max} - L_{min}}{L_{moy}} \leq 0,2$$

Avec :

$L_{max}$  : le logarithme décimal du nombre maximum de bactéries comptées parmi les 3 triplicats de  $PP_{t0}$

$L_{min}$  : le logarithme décimal du nombre minimum de bactéries comptées parmi les 3 triplicats

$L_{moy}$  : le logarithme en base 10 du nombre moyen de bactéries comptées sur  $PP_{t0}$

- 2) La concentration moyenne de bactéries dénombrées sur  $PP_{t0}$  doit être comprise entre  $6,2 \cdot 10^3$  CFU/cm<sup>2</sup> et  $2,5 \cdot 10^4$  CFU/cm<sup>2</sup>.
- 3) La concentration moyenne de bactéries dénombrées sur  $PP_{24h}$  doit être supérieure à  $6,2 \cdot 10^1$  CFU/cm<sup>2</sup>.

Le respect de ces critères est primordial pour revendiquer l'efficacité d'un matériau suivant la norme ISO 22196, dans le cadre d'essais réalisés par un établissement habilité. Toutefois, lors de ce projet, nous nous sommes permis de les considérer comme des recommandations, plus particulièrement le critère n°2 sur la concentration bactérienne mesurée sur  $PP_{t0}$ . En effet, alors que les 2 autres conditions à respecter permettent de s'assurer de la représentabilité des résultats, ou du bon déroulement de l'incubation, nous nous sommes permis de moduler la concentration initiale de l'inoculum en fonction des besoins, dépassant parfois la limite haute de recommandation.

## **2 Évaluation de l'activité antibactérienne de polypropylène fonctionnalisé**

### **2.1 Choix de la souche bactérienne**

Afin de mesurer l'activité antibactérienne des échantillons fonctionnalisés selon les méthodes décrites précédemment, la bactérie *Staphylococcus epidermidis* a été choisie comme souche test. Cette bactérie Gram + fait partie de la flore bactérienne de l'épiderme humain, ce qui en fait un candidat potentiel pour la contamination de produits cosmétiques sans conservateurs. Elle n'est pas restrictive au niveau des conditions de croissance, ce qui lui permet de contaminer un grand nombre de milieux, y compris la peau, les plaies et muqueuses, ou encore la surface de matériels médicaux. Bien qu'elle soit le plus souvent non pathogène, certaines souches de *S. epidermidis* sont une cause importante d'infections urinaires, de sinusites, ou d'infections nosocomiales.

### **2.2 Activité des échantillons fonctionnalisés par le protocole standard**

« Protocole standard » désigne les conditions d'activation par plasma identifiées comme optimales dans le chapitre II, suivies par l'immobilisation de nisine ou de lysozyme selon les conditions identifiées dans le chapitre III. Le protocole standard est donc composé des 2 étapes suivantes :

- a) Activation par plasma à 21 kHz, 10 mm de distance, 15 m/min de balayage
- b) Immobilisation de peptides pendant 5 min, pH supérieur à 7,5, et une concentration en EDC et NHS fixée à 5 mmol.L<sup>-1</sup>

Cette expérience regroupe les résultats représentatifs des performances des matériaux fonctionnalisés avec de la nisine et du lysozyme, ainsi que des échantillons de polypropylène dopé avec un additif plastique qui contient des ions argent encapsulés dans des zéolites (Irgaguard®, BASF). La présence de polypropylène contenant cet additif permet de comparer les performances du traitement mis au point durant ce projet avec une solution actuellement disponible pour les fabricants de pièces en matériaux polymères.

La Figure IV.113 présente le nombre de colonies bactériennes dénombrées après incubation. Les résultats pour chaque type d'actif antibactérien n'étant pas issus de la même série d'expériences, les références  $PP_{t0}$  et  $PP_{t24h}$  sont données dans le graphique pour chacune des séries. Les échantillons fonctionnalisés présentent une activité bactéricide significative, l'échantillon fonctionnalisé avec le lysozyme a permis une réduction de 1,6 log, l'Irgaguard® atteint 2,4 log, tandis que la nisine atteint 4,8 log de réduction. Les échantillons recouverts d'argent pur ont bien joué leur rôle de témoin positif, leur comportement, ajouté à celui du polypropylène non traité confirme que le test s'est déroulé correctement et que ces résultats sont valides.

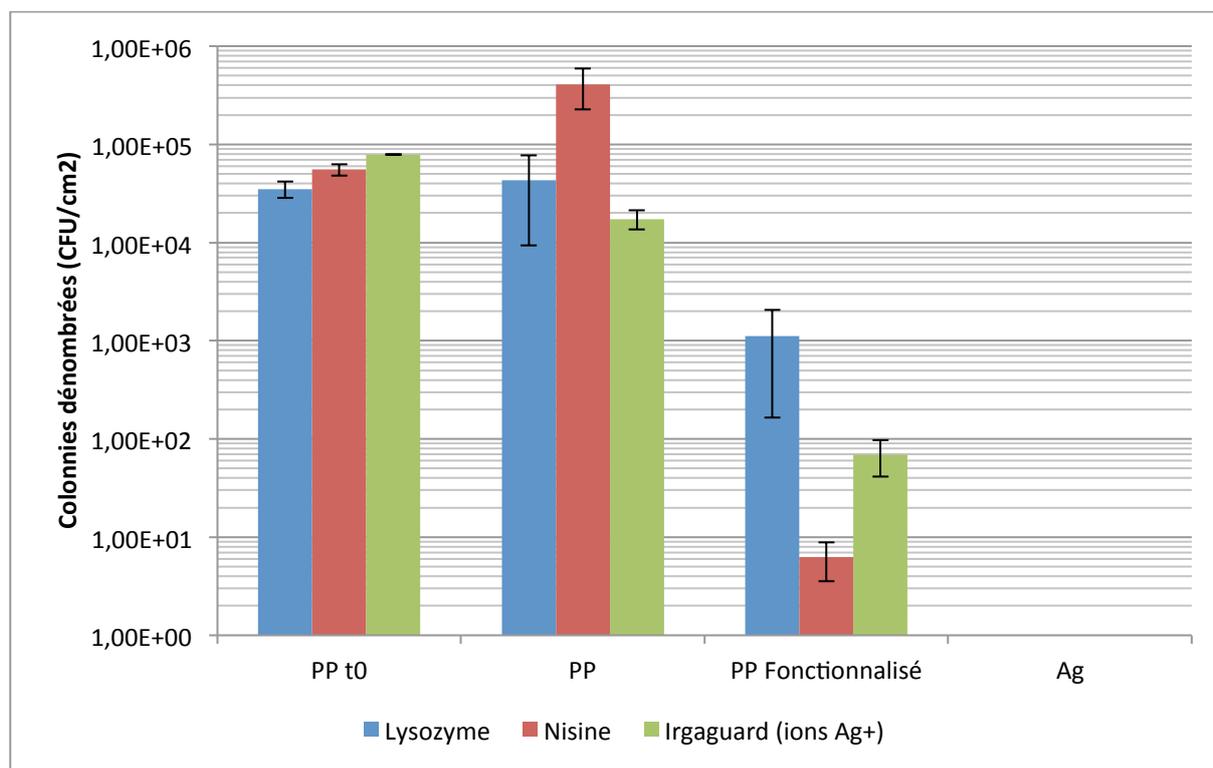


Figure IV.113 – Concentration surfacique de bactéries sur chaque échantillon à l'issue du test ISO 22196. « PP t0 » est le polypropylène non traité dont l'inoculum a été récupéré sans incubation, « PP » est le polypropylène non traité qui a subi une incubation de 24h, « PP fonctionnalisé » est le polypropylène fonctionnalisé avec le lysozyme, la nisine ou l'Irgaguard®. « Ag » correspond au PP recouvert d'un dépôt d'argent par PVD, c'est le témoin positif.

Il est également possible de présenter les résultats sous la forme du pourcentage de bactéries tuées, ce qui est une mesure relative permettant de comparer les activités des différents

échantillons indépendamment de la concentration bactérienne relevée sur le PP non traité après incubation. Ce calcul est présenté dans le Tableau IV.20.

Tableau IV.20 – Concentration bactérienne recensée à la surface des matériaux sondés, et pourcentage de bactéries tuées.

Fonctionnalisation	Concentration bactérienne CFU/cm <sup>2</sup>	% de bactéries tuées
PP non traité*	$1,6 \cdot 10^5 \pm 7,3 \cdot 10^4$	-
Lysozyme	$1,1 \cdot 10^3 \pm 9,5 \cdot 10^2$	97,423%
Nisine	$6,2 \pm 2,7$	99,998%
Irgaguard	$6,9 \cdot 10^1 \pm 2,8 \cdot 10^1$	99,602%
Argent*	0	100,0%

\* la valeur donnée correspond à la moyenne des trois expériences. Elle est donnée à titre informatif et n'a pas servi au calcul des pourcentages.

La nisine affiche de meilleures performances que les autres échantillons, y compris l'irgaguard. Le protocole développé dans les chapitres précédents permet donc d'attribuer à des surfaces de polypropylène des propriétés antibactériennes. Le lysozyme présente également une activité antibactérienne significative, pourtant cette enzyme est reconnue pour ne pas avoir d'effet sur les souches de la famille des *staphylococcus* [1], [2]. Toutefois, ce comportement a déjà été observé [3], en particulier lorsque le lysozyme est immobilisé sur une surface [4], sans pour autant qu'une explication ait pu être avancée.

Les surfaces fonctionnalisées par le biais de l'activation par plasma et l'immobilisation de nisine ou de lysozyme sur une surface ont montré une activité antibactérienne significative contre *S. epidermidis*, en particulier après un greffage de la nisine.

## 2.3 Stabilité de l'activité antibactérienne des échantillons fonctionnalisés

### 2.3.1 Activité des échantillons après lavage avec un détergent

Il a été montré, dans le chapitre III, que l'utilisation de solutions détergentes pour le lavage des échantillons modifiait largement la composition des surfaces fonctionnalisées. L'objectif

de ce paragraphe et de quantifier l'effet de cette modification de la surface issue des lavages par le biais de l'activité antibactérienne.

Des échantillons de polypropylène ont été fonctionnalisés avec de la nisine selon le protocole standard de greffage. Ceux-ci ont ensuite subi un lavage avec une solution de SDS, Tween 20, Tryptocasein Soya Broth (TSB, milieu de culture liquide), ou simplement de l'eau, comme décrit dans le chapitre III.

L'activité antibactérienne est évaluée selon le protocole décrit dans le paragraphe **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** de ce chapitre. Les résultats de l'activité antibactérienne sont exprimés, de façon absolue, en nombre de colonies dénombrées par unité de surface (CFU/cm<sup>2</sup>) sur la Figure IV.114 et, de façon relative, en pourcentage de bactéries tuées dans le Tableau IV.21.

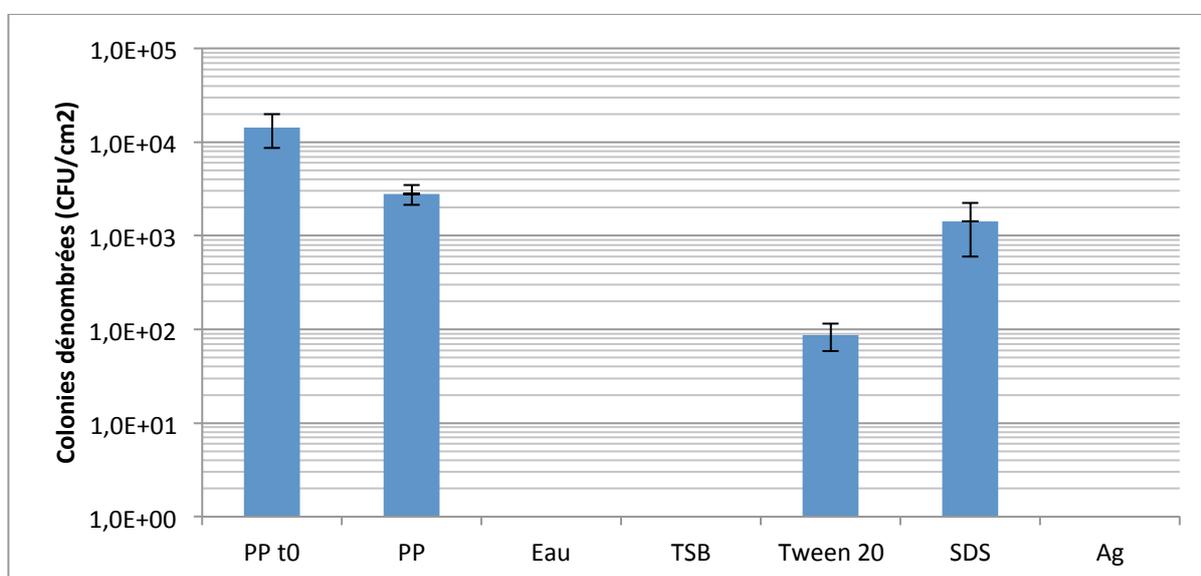


Figure IV.114 – Nombre de colonies bactériennes dénombrées sur des échantillons fonctionnalisés avec de la nisine, et lavés avec différentes solutions référencées en abscisse.

Tableau IV.21 – Concentration bactérienne recensée à la surface des échantillons après le test ISO 22196 en fonction du lavage subit, et pourcentage de bactéries tuées.

<b>Protocoles de rinçage</b>	<b>Concentration bactérienne CFU/cm<sup>2</sup></b>	<b>% de bactéries tuées</b>
<b>PP*</b>	$2,8 \cdot 10^3 \pm 6,7 \cdot 10^2$	-
<b>Eau</b>	0	100,0%
<b>TSB</b>	0	100,0%
<b>Tween 20</b>	$8,7 \cdot 10^1 \pm 2,8 \cdot 10^1$	97,8%
<b>SDS</b>	$1,4 \cdot 10^3 \pm 8,3 \cdot 10^2$	10,8%
<b>Ag*</b>	0	100,0%

\* la valeur donnée correspond à la moyenne de trois expériences. Elle est donnée à titre informatif et n'a pas servi au calcul des pourcentages.

Le lavage à l'eau ou avec le milieu de culture TSB n'a pas modifié le comportement de l'échantillon, ceux-ci ont atteint 100% de bactéries tuées. En revanche, l'utilisation de détergents diminue fortement l'activité antibactérienne. En effet, les échantillons lavés au Tween 20 ont vu leur activité baisser à 97,8% de bactéries tuées, et ceux lavés au SDS ont atteint seulement 10,8%. Les détergents possèdent une plus forte capacité à laver une surface que l'eau pure grâce à leur caractère amphiphile. Il est possible que la diminution de l'activité antibactérienne soit liée à une réduction de la quantité de nisine maintenue à la surface après le lavage.

Toutefois, cela n'explique pas la grande différence d'effet entre le SDS et le Tween 20. La principale distinction entre ces deux espèces chimiques est le caractère non ionique du Tween 20, ce qui réduit fortement sa capacité d'adsorption à la surface en l'absence d'interactions électrostatiques avec la nisine chargée positivement. Lors du lavage, SDS et Tween 20 s'adsorbent à la surface de l'échantillon, masquant ainsi la nisine et protégeant les bactéries de son action. Le SDS étant ionique, une plus grande proportion s'immobilise sur la couche de nisine, masquant ainsi une plus grande quantité de peptides et réduisant d'autant plus l'activité antibactérienne des échantillons fonctionnalisés.

Le rinçage avec des détergents n'est pas une étape nécessaire pour la fonctionnalisation de surfaces, dans le cadre d'une production industrielle. Le comportement observé ici ne représente donc pas un problème pour le procédé. En revanche, ces résultats incitent à

approfondir l'étude sur la stabilité de la fonctionnalisation et du maintien de l'activité antibactérienne, notamment dans le cadre d'une utilisation répétée, ce qui est l'objet du paragraphe suivant.

### 2.3.2 Activité des échantillons après une utilisation répétée

Afin de quantifier la résistance de la fonctionnalisation et de l'activité biologique des échantillons, ceux-ci ont subi consécutivement un test ISO 22196 modifié, puis un test ISO 22196 standard, dans les conditions suivantes :

- Protocole A : les échantillons ont d'abord été soumis à un test ISO 22196 sans bactéries dans lequel le milieu de culture a été remplacé par de l'eau distillée, puis un test ISO 22196 complet avec bactéries, aboutissant au calcul de l'activité
- Protocole B : les échantillons ont d'abord été soumis à un test ISO 22196 sans bactéries, mais en présence du milieu de culture, puis un test ISO 22196 complet avec bactéries, aboutissant au calcul de l'activité

Les résultats sont présentés dans la Figure IV.115, et le Tableau IV.22, ils sont accompagnés d'un échantillon, appelé « Nisine », correspondant à un échantillon fonctionnalisé selon le protocole standard de greffage de la nisine, l'activité est évalué avec un simple test ISO 22196 complet, avec bactéries.

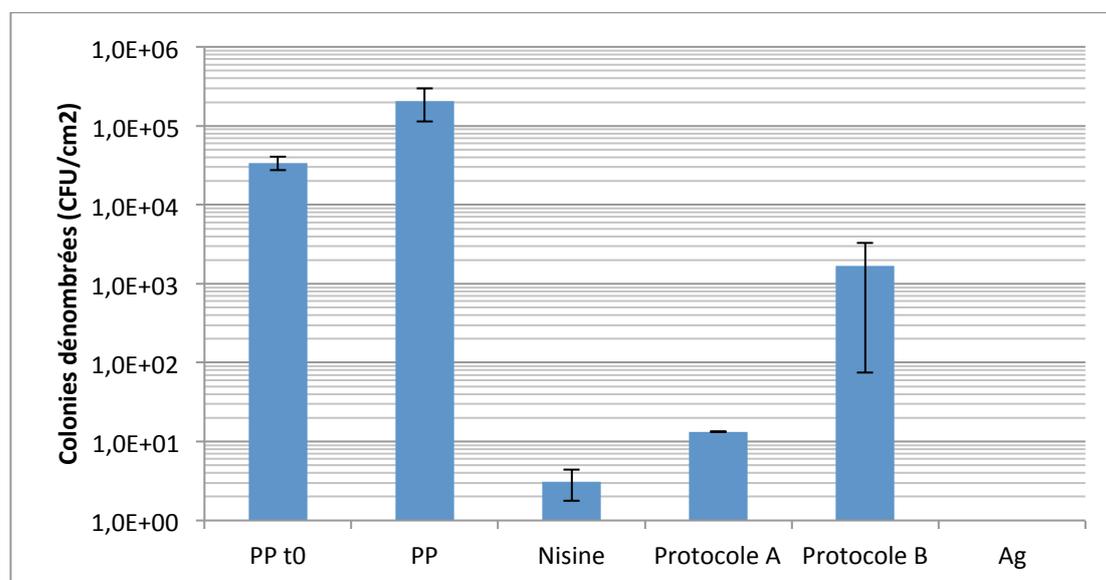


Figure IV.115 – Concentration surfacique de bactéries relevée sur les échantillons après le test ISO 22196.

Tableau IV.22 – Concentration bactérienne et pourcentage de bactéries tuées par les échantillons après un ou deux tests ISO 22196.

<b>Protocoles de test</b>	<b>Concentration bactérienne CFU/cm2</b>	<b>% de bactéries tuées</b>
<b>PP</b>	$2,1 \cdot 10^5 \pm 9,1 \cdot 10^4$	-
<b>Nisine</b>	$3,1 \pm 1,3$	99,998%
<b>Protocole A</b>	$1,3 \cdot 10^1$	99,993%
<b>Protocole B</b>	$1,7 \cdot 10^3 \pm 1,6 \cdot 10^3$	99,183%
<b>Ag</b>	0	100,0%

L'activité antibactérienne des échantillons diminue après deux étapes, cette réduction de l'efficacité est faible lorsque le premier test sans bactérie est effectué avec de l'eau distillée. En revanche, celle-ci est plus importante dans le cas où le test sans bactérie est réalisé avec le milieu de culture préconisé par la norme ISO 22196. La seule différence entre les deux protocoles est la présence de protéines dans le milieu de culture utilisé dans la série « 2 étapes B ». Une explication possible est, une nouvelle fois, l'adsorption de molécules, des protéines présentes dans le milieu de culture, masquant ainsi une partie de la nisine immobilisée sur la surface.

Ces résultats vont dans le sens des observations précédentes, la présence d'une couche de contamination, ici liée à l'adsorption de molécules de détergents ou de protéines issues du milieu de culture, sur la surface diminue l'activité antibactérienne de la surface.

### **2.3.3 Maintien de l'activité antibactérienne des échantillons après vieillissement**

Une série de tests ISO 22196 est effectuée pour tester la stabilité de l'activité biologique des échantillons, les résultats sont présentés dans la Figure IV.116 et la Figure IV.117.

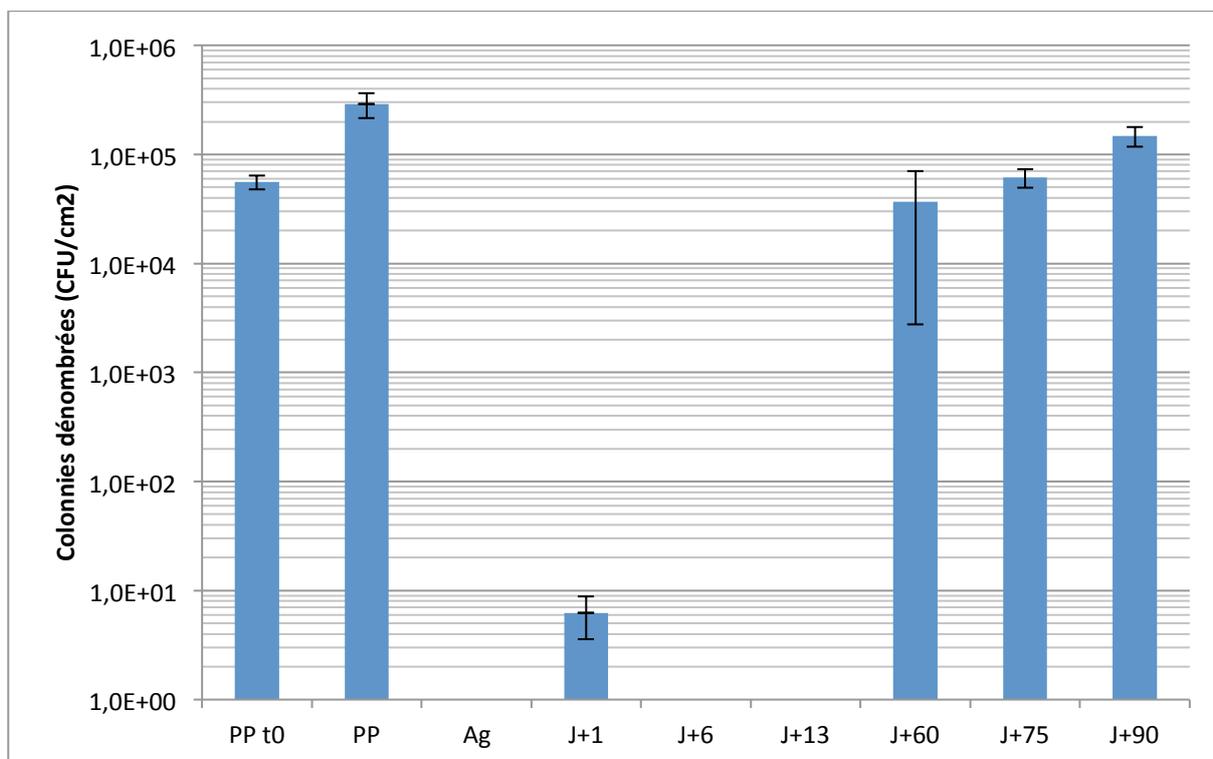


Figure IV.116 – Concentration bactérienne recensée sur les échantillons en fonction de la durée du vieillissement.

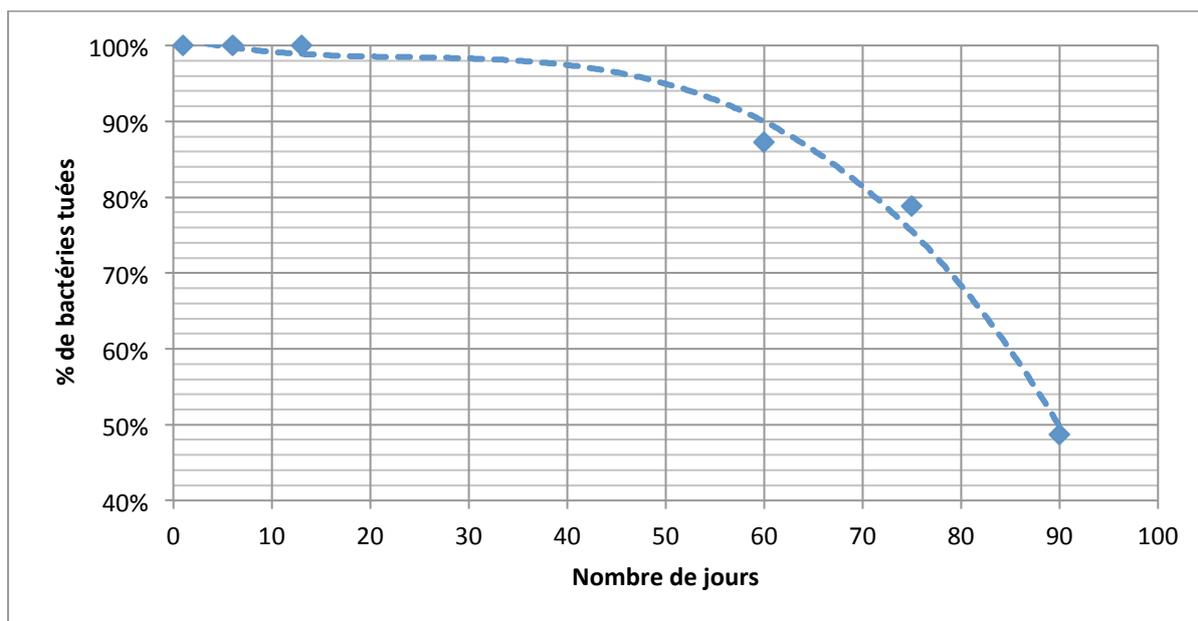


Figure IV.117 – Évolution du pourcentage de bactéries tuées en fonction du vieillissement

L'effet du temps sur l'activité biologique des échantillons est évident. Les performances se maintiennent autour de 100% de bactéries tuées pendant au moins 13 jours, puis une

décroissance rapide de l'activité antibactérienne est observée, jusqu'à atteindre moins de 50% de bactéries tuées à 90 jours.

Cette réduction de l'activité peut provenir d'une désactivation de la nisine à la surface du matériau suite à un changement de conformation, mais également du dépôt progressif d'une couche de contamination depuis l'atmosphère ambiante, comme cela peut s'observer sur la majeure partie des surfaces. Toutefois, le maintien de l'activité sur les 13 premiers jours tend à montrer qu'il ne s'agit pas d'un changement de conformation de la nisine.

Dans le cadre du traitement de systèmes de distribution destinés aux produits cosmétiques sans conservateurs, l'utilisation quotidienne du produit aura très certainement une influence sur la surface du matériau, empêchant notamment le dépôt d'une couche de contamination issue de l'atmosphère. Cette étude permet de montrer que l'activité antibactérienne se maintient pendant plusieurs jours après la fonctionnalisation. Des tests de mise en condition sur pièces réelles sont nécessaires pour mesurer la durée d'action de telles surfaces.

### **2.4 Activité des échantillons fonctionnalisés avec un dépôt d'acide acrylique**

La réalisation d'un dépôt d'acide acrylique polymérisé par plasma permet d'immobiliser des biomolécules à la surface des échantillons de polypropylène grâce aux fonctions carboxyliques qui composent le poly (acide acrylique), comme cela a été décrit dans les chapitres précédents.

L'activité des échantillons traités avec un dépôt d'acide acrylique est évaluée en comparaison avec des échantillons fonctionnalisés grâce à une activation plasma dans l'air, ainsi que l'additif à base d'ions argent Irgaguard®. Les résultats sont présentés dans la Figure IV.118 et le Tableau IV.23.

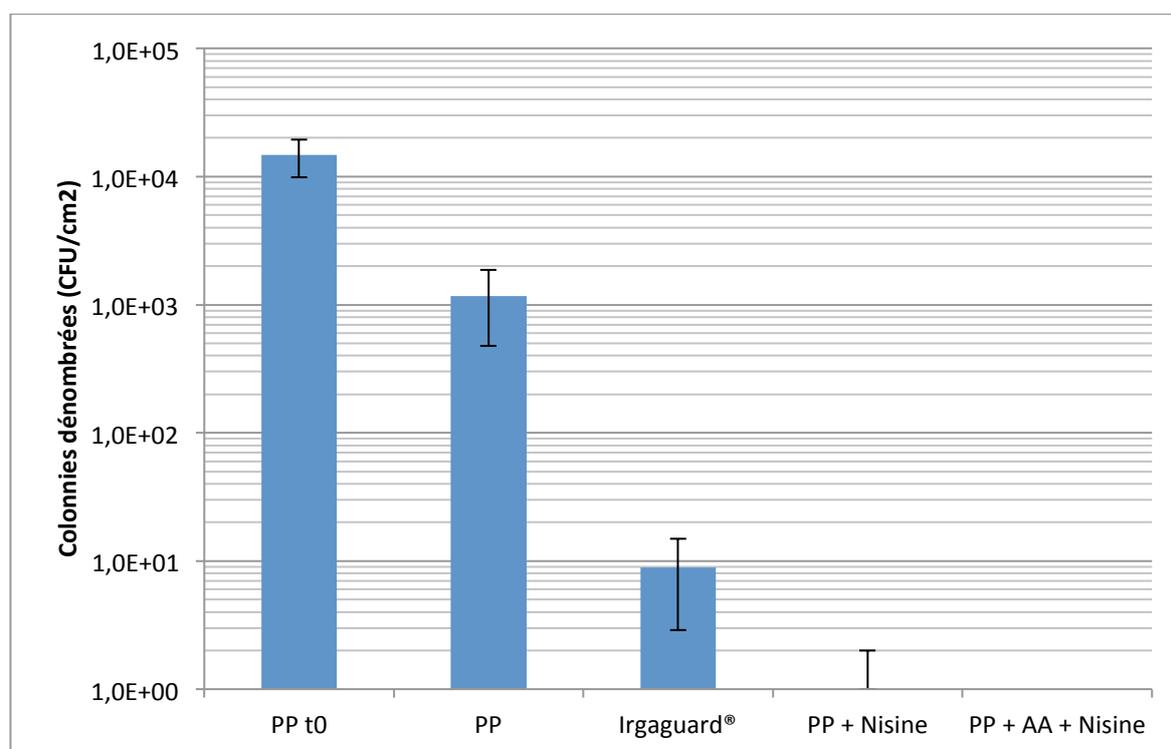


Figure IV.118 – Concentration bactérienne, en surface des échantillons, mesurée suivant le test ISO 22196. « PP + nisine » : échantillon fonctionnalisé par traitement plasma et immobilisation de nisine, « PP + AA + nisine » : échantillon fonctionnalisé avec un dépôt d'acide acrylique et l'immobilisation de nisine sur le dépôt.

Tableau IV.23 – Concentration bactérienne et pourcentage de bactéries tuées, mesurés en test ISO 22196 sur les échantillons fonctionnalisés avec la nisine.

Fonctionnalisations	Concentration CFU/cm <sup>2</sup>	% de bactéries tuées
<b>PP</b>	$1,2 \cdot 10^3 \pm 7,0 \cdot 10^2$	-
<b>Irgaguard®</b>	$8,9 \pm 6,0$	99,242%
<b>PP + nisine</b>	$1,0 \pm 1,0$	99,915%
<b>PP + AA + nisine</b>	0	100,0%

Les échantillons fonctionnalisés, que ce soit avec les ions argent, ou la nisine avec et sans acide acrylique, présentent une activité antibactérienne significative. Toutefois, l'étude sur l'immobilisation de lysozyme et nisine sur le dépôt d'acide acrylique décrit dans le chapitre III a montré que le dépôt était soluble dans l'eau. Une telle performance provenant de l'échantillon fonctionnalisé avec l'acide acrylique et la nisine peut s'expliquer alors par la dissolution de la couche d'acide acrylique durant le test, libérant ainsi la nisine dans le milieu

de culture, et favorisant alors l'action du peptide sur les bactéries. Ce comportement n'est pas recherché, l'objectif de ce projet étant d'obtenir une fonctionnalisation stable, et sans relargage.

### 3 Conclusion

Les procédés décrits dans les chapitres II et III ont permis d'immobiliser des biomolécules sur du polypropylène par le biais de procédés plasma, dans le but de lui conférer des propriétés antibactériennes à la surface. L'activité biologique des échantillons fonctionnalisés est évaluée grâce à un test basé sur la norme ISO 22196, permettant ainsi la comparaison des performances entre les différents échantillons.

Les échantillons fonctionnalisés avec la nisine et le lysozyme ont montré une activité antibactérienne significative sur *Staphylococcus epidermidis*. Le lysozyme atteint des réductions de deux log (facteur de 1/100), soit plus de 97% de bactéries tuées. Ces performances sont très satisfaisantes car la famille des *Staphylococcus* est résistante à l'action du lysozyme. Quant aux échantillons fonctionnalisés avec la nisine, ils obtiennent entre 99,5 et 100% de bactéries tuées, et jusqu'à cinq log de réduction. Ces performances ont été mises en concurrence avec un additif plastique à base d'ions argent encapsulés dans des zéolites, et les échantillons fonctionnalisés avec cet additif ont présenté une activité biologique inférieure (entre 99,2 et 99,6% de bactéries tuées).

Dans le chapitre III, le lavage des échantillons avec différentes solutions, notamment de détergents, a impliqué des modifications dans la composition de la surface des échantillons. L'activité biologique des matériaux lavés a été mesurée afin de faire un lien avec ces modifications. Les échantillons lavés avec les détergents SDS et Tween 20 ont vu leur activité diminuer fortement, en particulier pour le lavage au SDS. Ce comportement est attribué à l'adsorption des tensioactifs à la surface, masquant ainsi les peptides et protégeant les bactéries de leur action antibactérienne, contrairement au cas des lavages à l'eau ou avec un milieu de culture.

Ce phénomène de masquage a également été observé lors de l'évaluation de la stabilité de l'activité. Cette stabilité a été étudiée selon deux axes : la stabilité à la répétition, avec l'évaluation de l'activité après plusieurs tests consécutifs, et la stabilité dans le temps, après un vieillissement de plusieurs dizaines de jours.

L'activité antibactérienne des échantillons a diminué après avoir réalisé au préalable un test d'activité utilisant un milieu de culture sans bactérie, tandis que les échantillons ayant subi un premier test sans bactérie avec de l'eau à la place du milieu de culture.

Enfin, le vieillissement des matériaux provoque une diminution de l'activité à partir d'une durée estimée entre 30 et 40 jours. Cette diminution est probablement due au dépôt d'une couche carbonée de contamination, issue de l'atmosphère, comme cela a pu être observé par XPS dans le chapitre III.

Ce chapitre a permis de montrer que la fonctionnalisation du polypropylène avec le lysozyme ou la nisine permet d'attribuer à la surface un caractère antibactérien. Cette propriété est stable pendant plusieurs dizaines de jours, et se maintient également après lavage des échantillons.

En revanche, l'activité biologique est sensible à la contamination de la surface, notamment lorsque des substances, telles que des détergents (SDS, Tween 20) ou des contaminants atmosphériques, s'adsorbent à la surface, masquant ainsi les biomolécules actives et protégeant les bactéries de leur action.

Enfin, l'utilisation d'un dépôt d'acide acrylique pour immobiliser le lysozyme et la nisine à la surface des échantillons représente une voie intéressante pour assurer la fonctionnalisation sur de nombreux types de matériaux tels que le verre ou les métaux. Il conviendra néanmoins de réussir à obtenir un dépôt résistant au lavage.

## Références

- [1] A. Bera, S. Herbert, A. Jakob, W. Vollmer, and F. Götz, “Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*,” *Mol. Microbiol.*, vol. 55, no. 3, pp. 778–787, 2005.
- [2] A. Bera, R. Biswas, S. Herbert, E. Kulauzovic, C. Weidenmaier, A. Peschel, and F. Götz, “Influence of Wall Teichoic Acid on Lysozyme Resistance in *Staphylococcus aureus*,” *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 1, pp. 280–283, 2007.
- [3] D. Nakimbugwe, B. Masschalck, M. Atanassova, A. Zewdiebosuner, and C. Michiels, “Comparison of bactericidal activity of six lysozymes at atmospheric pressure and under high hydrostatic pressure,” *Int. J. Food Microbiol.*, 2006.
- [4] S. Yuan, D. Wan, B. Liang, S. O. Pehkonen, Y. P. Ting, K. G. Neoh, and E. T. Kang, “Lysozyme-Coupled Poly(poly(ethylene glycol) methacrylate)–Stainless Steel Hybrids and Their Antifouling and Antibacterial Surfaces,” *Langmuir*, vol. 27, no. 6, pp. 2761–2774, 2011.

## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce projet était la mise au point d'un procédé de traitement de surface permettant d'attribuer à un polypropylène des propriétés antibactériennes en immobilisant à sa surface des biomolécules (nisine et lysozyme) possédant les propriétés recherchées. La cible de ce traitement est le système de distribution d'un emballage de produit cosmétique sans conservateur, l'objectif étant de protéger la formule des contaminations à la sortie du flacon. Ce travail s'est articulé en trois axes distincts, chacun faisant appel à des compétences dans des domaines différents, reprenant le parcours du polypropylène suivant les différentes étapes du procédé mis au point durant ce projet.

L'effet du traitement par torche à plasma à la pression atmosphérique des échantillons en polypropylène, utilisé pour introduire des fonctions chimiques de type acide carboxylique, a d'abord été étudié. La caractérisation de la surface du matériau traité a été réalisée par le biais de techniques classiques dans la caractérisation de surface : le calcul de l'énergie de surface, les spectroscopies infrarouge et XPS. Le plasma a également été analysé par spectroscopie d'émission optique.

Le calcul de l'énergie de surface, réalisé à partir des mesures d'angle de contact, a permis de montrer que le traitement rend le matériau plus hydrophile. Le matériau non traité présente une énergie de surface de  $32,7 \text{ mJ/m}^2$ , en revanche, après traitement par plasma à la pression atmosphérique, l'énergie de surface atteint  $50 \text{ mJ/m}^2$ . Ce comportement indique la formation de fonctions chimiques oxygénées.

L'analyse par spectroscopie infrarouge (ATR) a mis en évidence la présence de fonctions oxygénées de type carbonyle ( $\text{C}=\text{O}$ ), grâce à l'apparition de bandes entre  $1500$  et  $1900 \text{ cm}^{-1}$ , en particulier une bande large autour de  $1700 \text{ cm}^{-1}$  correspondant aux fonctions aldéhydes, cétones, esters et acides carboxyliques. Toutefois, ces analyses ont montré que toutes les conditions de traitement par plasma n'étaient pas satisfaisantes pour l'obtention de fonctions carboxyliques à la surface. Des conditions trop douces aboutissant à la formation d'insaturations ( $\text{C}=\text{C}$ ) sur le matériau. De plus, il a été possible d'évaluer la modification de la composition des phases atactiques et isotactiques du polypropylène par infrarouge. Cette

étude a montré que certaines conditions provoquaient une augmentation de la phase isotactique, à cause notamment de l'apport de chaleur au matériau par le plasma.

Les analyses XPS ont confirmé la présence de groupements carboxyliques sur la surface, avec la présence d'une contribution au pic C1s, située à environ 289,1 eV, regroupant esters et acides. D'autres fonctions oxygénées sont également formées au cours du traitement comme C-O ou C-O-C par exemple. Le suivi, par XPS, de la composition du pic C1s des surfaces traitées par plasma, ainsi que l'analyse par OES du plasma, a permis d'identifier les paramètres pour lesquels la teneur en groupements carbonyles est optimisée sur la torche à plasma du laboratoire. Celle-ci est reliée à la présence dans le plasma d'espèces oxygénées, notamment l'oxygène atomique, et les radicaux OH<sup>•</sup>.

Les paramètres identifiés sont :

- Fréquence du signal électrique : 21 kHz
- Plasma Cycle Time : 80%
- Distance torche-substrat : 10mm
- Vitesse de balayage du substrat : 15 m/min

La réaction chimique ciblée pour l'immobilisation des peptides sur la surface est celle entre les acides carboxyliques de la surface, avec les amines présentes sur les molécules, sur les résidus lysine. Toutefois, les analyses effectuées suggèrent la présence d'aldéhydes sur la surface. Ces fonctions chimiques peuvent également réagir avec des amines primaires pour former une imine. Une expérience originale de dérivation chimique avec le 2-chlorobenzoic hydrazide a permis de confirmer la présence des aldéhydes. Dès lors, il est attendu que l'immobilisation des peptides résulte conjointement de la réaction chimique avec les acides carboxyliques et les aldéhydes.

Enfin, dans le but d'enrichir la surface avec des acides carboxyliques, un dépôt d'acide acrylique a été réalisé par torche DBD à la pression atmosphérique. La présence d'une couche d'acide acrylique sur la surface a été confirmée par spectroscopie infrarouge avec la présence d'une bande très intense à 1720 cm<sup>-1</sup>. Toutefois, le dépôt n'est pas stable, notamment au rinçage. Les angles de contact mesurés sur le dépôt ont atteint environ 10° selon les conditions, mais augmentent jusqu'à 80° après rinçage, le polypropylène vierge est mesuré à

environ 90°. Le faible nombre d'expériences menées sur cette technologie durant le projet n'a pas permis d'optimiser le procédé, néanmoins, certains auteurs ont réalisé des dépôts d'acide acrylique stables et résistants au rinçage, ce qui laisse présager la possibilité d'améliorer ce procédé.

La deuxième étape du processus de fonctionnalisation des échantillons est l'immobilisation du lysozyme et de la nisine, avec formation de liaisons covalentes entre la surface et les molécules, avec une activation des groupements carboxyliques avec le N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC), et le N-hydroxysuccinimide (NHS). La caractérisation des surfaces fonctionnalisées est réalisée par spectroscopie IR et XPS.

Dans un premier temps, l'analyse IR a montré que la présence des fonctions chimiques oxygénées est indispensable à l'immobilisation des peptides. En effet, l'étape d'immobilisation a été réalisée sur des échantillons présentant principalement des insaturations ( $C=C$ ,  $1640\text{ cm}^{-1}$ ), mais aucune modification du spectre IR des échantillons n'a été détectée après l'immobilisation. Ce résultat montre que le greffage n'a pas lieu dans ces conditions, mais également que le lavage réalisé permet d'éliminer la majeure partie des molécules adsorbées à la surface. En revanche, lorsque l'échantillon traité par plasma présente des fonctions oxygénées ( $C=O$ ,  $1700\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ ), la présence des peptides à la surface de l'échantillon est caractérisée par l'apparition de deux bandes sur le spectre, une faible à  $1550\text{ cm}^{-1}$  et une intense à  $1650\text{ cm}^{-1}$ , attribuées aux fonctions amides. Ces fonctions chimiques sont présentes entre chaque acide aminé constituant peptides et protéines, mais c'est également la liaison chimique qui relie les biomolécules à la surface. La présence des peptides sur la surface après immobilisation est également mise en évidence par XPS par l'augmentation de la teneur en azote, passant d'environ 2% à près de 10%, et par la détection du soufre, présent dans les résidus cystéine et méthionine. L'oxygène diminue, passant d'environ 25% à environ 15%, suite à la déshydratation consécutive à la réaction de condensation entre les acides carboxyliques de surface et les fonctions amines des biomolécules, mais surtout du recouvrement de la surface par les biomolécules immobilisées.

De plus, la décomposition des bandes C1s et S2p a permis d'observer d'autres marqueurs de la présence des protéines à la surface du matériau. Une contribution à 288,2 eV attribuée à la fonction amide ( $N-C=O$ ) est détectée dans le pic C1s. De même, une contribution à 163,8 eV, sous forme de doublet (S2p 1/2 et S2p 3/2), et attribuée aux liaisons C-S est observée.

L'influence des paramètres du protocole de greffage (nombre d'étapes, pH, concentration des activateurs, durée) est suivie par XPS. Le calcul des ratios O/C, N/C, S/C et S/N a permis de comparer les différentes conditions de greffage, en comparant avec les valeurs obtenues lors de l'analyse XPS du lysozyme commercial pur, et notamment son rapport S/N qui est de 0,062.

La réalisation du greffage en utilisant une seule solution contenant les activateurs et les peptides a permis d'atteindre un ratio S/N de 0,052 contre 0,047 et 0,044 lorsque l'on réalise successivement les étapes d'activation des groupements carboxyliques de surface et le greffage de la biomolécule. La différence n'est pas significative, les trois protocoles permettent donc l'immobilisation de peptides à la surface du polypropylène. Dans le cadre d'un procédé industriel, le protocole en une seule étape sera le plus pertinent.

La durée de mise en contact de la solution avec l'échantillon a également un impact sur la fonctionnalisation. Les rapports S/C et N/C diminuent avec la durée du greffage, or la cinétique de réaction étant rapide, cette tendance est probablement due à la dissolution de la couche de faible cohésion formée lors du traitement par plasma à la pression atmosphérique. La réduction de la durée du procédé est positive dans la perspective du développement d'un procédé industriel.

La concentration optimale en activateurs EDC et NHS a été identifiée à  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , ces conditions ont permis d'obtenir les ratios N/C et S/C les plus proches de ceux du lysozyme. Ce résultat est en accord avec la littérature [1], qui décrit cette concentration comme celle permettant d'obtenir le meilleur rendement d'activation des acides carboxyliques en surface.

Enfin, l'influence du pH de la solution de peptides est également étudiée car ce paramètre influe sur l'état de protonation des fonctions chimiques impliquées dans la réaction, à savoir  $-\text{COOH}$  et  $-\text{NH}_2$ , et donc à la fois sur l'adsorption des biomolécules et sur l'efficacité du greffage covalent. Une augmentation du pH vers des valeurs basiques a tendance à défavoriser l'adsorption des biomolécules sur des surfaces chargées négativement suite à la diminution du nombre des charges positives des chaînes latérales des acides aminés de type lysine. Inversement, une augmentation de pH augmente la charge électronégative de la surface traitée par plasma. De plus, un pH élevé est favorable à la déprotonation de la fonction

amine, augmentant ainsi son pouvoir nucléophile, et favorisant la réaction de couplage covalent. En revanche la réaction d'activation des acides carboxyliques par les carbodiimides est favorisée par une catalyse acide. Ces phénomènes, en compétition les uns avec les autres, réduisent considérablement l'influence du pH. Les résultats obtenus dans ce projet montrent que le pH influence légèrement l'immobilisation, les ratios S/C et N/C présentant des valeurs légèrement plus élevées pour le pH le plus haut étudié (7,5). Néanmoins, ce pH est plus faible que le pKa du couple  $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$  (10,5), ce qui ne garantit pas une grande quantité de fonctions amines déprotonées. Une explication de la faisabilité du greffage malgré cette contrainte est la déprotonation des  $\text{NH}_3^+$  par les  $\text{COO}^-$  n'ayant pas été activés, à proximité de la surface de l'échantillon. Les écarts entre les expériences étant faibles, le contrôle du pH ne représente finalement pas une barrière technique, ce qui contribue au potentiel d'industrialisation du procédé.

L'étude a montré que l'activation par torche plasma à la pression atmosphérique aboutissait à la formation d'aldéhydes à la surface des échantillons, or ces fonctions chimiques sont également capables de réagir avec les amines des peptides. La technique de dérivation chimique des aldéhydes par un hydrazide chloré a été réalisée dans le but de bloquer ces sites afin d'apporter un peu de sélectivité à la réaction. Les résultats démontrent que les aldéhydes sont responsables de l'immobilisation des biomolécules, au même titre que les acides carboxyliques. La quantification de la contribution de l'une ou l'autre des fonctions chimiques est néanmoins très difficile et n'a pas pu être établie au cours de cette thèse.

La fonctionnalisation de surface ainsi obtenue doit permettre de fonctionnaliser des produits dont la durée de vie est de plusieurs mois. L'étude du vieillissement des matériaux est donc primordiale pour s'assurer de la stabilité des biomolécules à la surface des échantillons. L'étude est menée sur trente jours et suivie par XPS. Les résultats montrent que la composition chimique de la surface n'a quasiment pas été modifiée. Seule une légère hausse de la teneur en carbone semble témoigner de la présence d'une couche de contamination organique, issue de l'atmosphère, sur la surface du matériau fonctionnalisé. Cette couche peut réduire l'activité biologique de la surface par masquage des biomolécules actives.

Les échantillons ont également été observés par MEB, et l'analyse des clichés a permis de mettre en évidence une microstructure à la surface du matériau. Cette microstructure, un tapis de petites sphères d'environ 25 nm de diamètre, est probablement due à l'immobilisation des

## CONCLUSION GÉNÉRALE

---

molécules sur l'échantillon, une telle organisation ayant déjà été reportée dans la littérature pour des protéines. Ces observations montrent alors que l'immobilisation est effective sous forme d'une couche non continue, présentant des zones structurées de haute densité surfacique.

Enfin, l'immobilisation a également été réalisée sur un dépôt d'acide acrylique polymérisé par plasma à la pression atmosphérique. Le dépôt présentant une faible résistance au lavage, les essais n'ont pas abouti à une immobilisation efficace, les ratios O/C et N/C étant très faibles. En revanche, du soufre a été détecté, et le ratio S/N possède un ordre de grandeur cohérent avec les résultats précédents, témoignant de la présence de lysozyme sur la surface du dépôt. Cette expérience prouve que l'immobilisation en faible quantité est néanmoins possible sur un dépôt d'acide acrylique.

La dernière étape de l'étude est l'évaluation de l'activité biologique du PP après greffage des biomolécules. Ces résultats sont cruciaux, car l'immobilisation des peptides sur la surface du polypropylène a pour but de conférer au matériau, initialement biologiquement inactif, des propriétés antibactériennes.

L'évaluation de l'activité, réalisée selon la norme ISO 22196, mesure la quantité de bactéries vivantes restantes sur un échantillon, après le dépôt d'une goutte d'inoculum et une période d'incubation de 24h à 37°C. Les résultats sont lus en comparaison avec un témoin positif, un échantillon de polypropylène recouvert d'une couche d'argent déposé par PVD, dont l'activité est très forte, et un témoin négatif qui est le polypropylène non traité.

Les échantillons fonctionnalisés avec la nisine présentent une activité atteignant 100% de bactéries tuées, soit 5 log de réduction du nombre de bactéries vivantes. L'additif plastique commercial Irguard atteignant lui un maximum de 99,6%, soit moins environ 3,5 log de réduction. Cette activité est remarquable, et démontre que la nisine, après immobilisation, confère au matériau une excellente activité antibactérienne.

L'activité des échantillons a été également testée sous différentes conditions, afin d'évaluer la stabilité de cette activité. Les échantillons ont d'abord été rincés, après fonctionnalisation, avec différentes solutions : de l'eau distillée, un milieu de culture, et deux détergents, Tween 20 et SDS. Les échantillons rincés à l'eau et avec le milieu de culture ont démontré une très

## CONCLUSION GÉNÉRALE

---

bonne activité, avec 100% de bactéries tuées. En revanche, l'utilisation de détergents a réduit considérablement l'efficacité du traitement. Le Tween 20 a fait diminuer l'activité à 97,8% de bactéries tuées, tandis que les échantillons rincés au SDS n'ont tué que 10,8% des bactéries en 24h. L'adsorption des molécules de détergent à la surface est probablement responsable de cette perte d'activité, notamment à cause de leur grande capacité à se lier aux protéines. Dès lors, les bactéries sont protégées des peptides par cette couche de détergent. Il n'est pas exclu qu'une partie des biomolécules ne soit qu'adsorbée à la surface après fonctionnalisation, et donc lessivée par l'action des détergents, mais cela n'explique pas la différence importante entre les deux détergents. La différence de comportement des échantillons après le rinçage au Tween 20 et après celui au SDS provient certainement du caractère non ionique du Tween 20, qui diminue sa capacité d'adsorption par rapport au SDS.

Un contact répété de la surface avec une solution aqueuse peut également être source de diminution de l'activité antibactérienne. Ce phénomène a été étudié en réalisant un test ISO 22196 « placebo » (sans bactéries) avec de l'eau ou un milieu de culture, avant le test d'évaluation de l'activité bactéricide proprement dit. L'activité des échantillons diminue lorsque ceux-ci sont lavés une première fois pendant 24 H avant la mise en œuvre du test antibactérien, mais on observe une différence significative entre le test placebo avec de l'eau, qui fait diminuer l'activité de 99,998 à 99,993% de bactéries tuées, et celui avec du milieu de culture, qui diminue l'activité à 99,183% de bactéries tuées.

Enfin, l'évolution dans le temps, sur une période de 90 jours, de l'activité d'échantillons fonctionnalisés avec la nisine a été étudiée pour la première fois. Les échantillons ont été stockés à température ambiante. Les échantillons maintiennent une activité importante (100% de bactéries tuées) pendant au moins 15 jours, puis cette activité diminue jusqu'à atteindre environ 48% de bactéries tuées à 90 jours.

Les observations précédentes (rinçages, utilisation répétée, vieillissement) suggèrent que l'activité des échantillons est très sensible à la contamination de la surface. En effet, la réduction de l'activité antibactérienne peut s'expliquer, dans chacun des cas, par une contamination de la surface (détergents, protéines du milieu de culture, contaminants carbonés présents dans l'air), qui agit comme une couche de protection pour les bactéries, masquant la nisine immobilisée à la surface et l'empêchant ainsi d'agir. Il n'est également pas exclu que

les peptides se dénaturent pendant le vieillissement, réduisant ainsi leur activité antibactérienne.

Enfin, l'activité antibactérienne de polypropylène, fonctionnalisé avec de la nisine immobilisée sur un dépôt d'acide acrylique polymérisé par plasma, a atteint 100% de bactéries tuées. Néanmoins, le manque de stabilité du dépôt au rinçage suggère que tout ou partie de la nisine immobilisée a été relarguée dans le milieu de culture lors de la dissolution du dépôt, participant ainsi à obtenir un tel résultat.

Les travaux menés durant cette thèse ont permis le développement d'un procédé de traitement de surface simple et rapide, basé sur une activation de la surface du polypropylène par un traitement par plasma d'air à la pression atmosphérique suivi d'un greffage chimique en solution de peptides (nisine et lysozyme). Cette fonctionnalisation de la surface permet de lui conférer une activité antibactérienne significative (jusqu'à 100% de bactéries tuées). Le grand nombre d'expériences réalisées est une garantie de la reproductibilité de ces résultats. De plus, le potentiel industriel de ce procédé est réel, celui-ci mettant en œuvre un procédé de traitement de surface par plasma facilement industrialisable, y compris pour un traitement en 3D des échantillons, qui n'utilise pas de précurseur toxique. L'étape de greffage des biomolécules consécutive à cette fonctionnalisation de surface quant à elle utilise un minimum de produits chimiques, à savoir les activateurs des groupements carboxyliques.

Ces observations et résultats ouvrent également de nombreuses perspectives, afin d'améliorer le procédé et la caractérisation des surfaces fonctionnalisées :

- Immobilisation des peptides sur pièces réelles (poussoir, pièce 3D) et évaluation de la performance en test de simulation d'utilisation du produit cosmétique
- Quantification de l'immobilisation : réussir à déterminer le nombre de peptides immobilisés à la surface par unité de surface, grâce à des procédés d'immunodétection par exemple
- Optimisation du procédé de dépôt d'acide acrylique : obtenir un dépôt stable et résistant à l'eau. Cela permettrait d'augmenter considérablement la quantité d'acides carboxyliques à la surface du matériau. Il pourrait également être envisagé de fonctionnaliser tout type de surface (verre, céramique, métaux) en introduisant les acides carboxyliques à la surface grâce au dépôt d'acide acrylique polymérisé par plasma

## CONCLUSION GÉNÉRALE

---

- Vérification de l'hypothèse de la contamination de la surface : évaluer l'activité antibactérienne des échantillons vieillis, après les avoir lavés à l'éthanol par exemple
- Evaluation de l'activité des échantillons sur d'autres souches bactériennes
- Fonctionnalisation des échantillons avec d'autres (poly)peptides antibactériens
- Fonctionnalisation des échantillons avec des molécules présentant d'autres propriétés (antiadhésif, antistatique, etc.)

# ANNEXES

## Méthodes de caractérisation de surface

### Spectroscopie d'émission optique

La spectroscopie d'émission optique est une technique d'analyse des propriétés du plasma basée sur la détection et l'analyse de la lumière émise par le plasma (ultra-violet, infrarouge, visible).

Un plasma froid étant un gaz partiellement ionisé, il contient de nombreuses espèces à un état d'énergie supérieur à leur état fondamental (Figure A.119). Lors de la relaxation de ces espèces, à l'état fondamental, ou à un état intermédiaire entre l'état excité et l'état fondamental, des photons sont émis, dont l'énergie est directement liée à la nature de l'espèce chimique et à la transition énergétique observée.

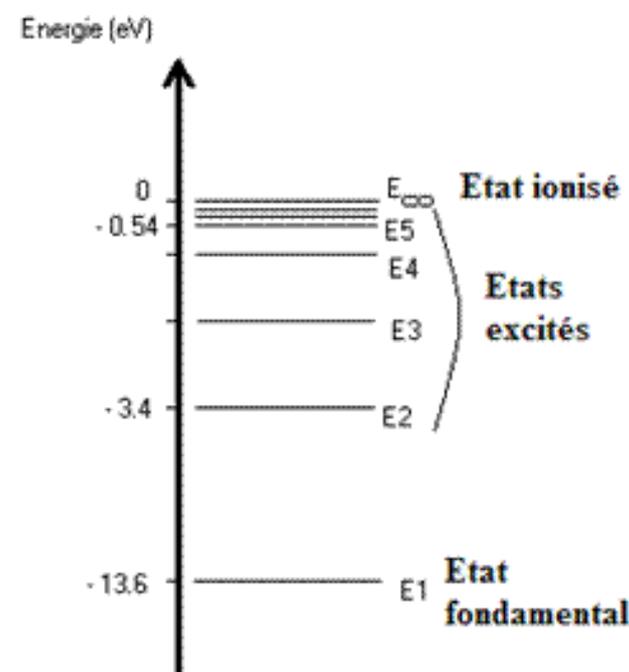


Figure A.119 - Représentation des états électroniques d'un atome ou d'une molécule

On obtient alors un spectre dont chaque raie ou bande correspond à une transition électronique particulière pour un atome ou une molécule particulière. Il est ainsi possible d'identifier les éléments présents dans le plasma grâce aux tables dédiées à l'étude des spectres OES (Zaidel, 1961 [1] et Pearse et Gaydon, 1963 [2]), ce qui permet de suivre

l'évolution de sa composition en fonction des différents paramètres du procédé, ou encore déterminer sa température grâce à de la modélisation [3].

La Figure A.120 présente les spectres OES de jets de plasma d'air et d'azote à la pression atmosphérique. Des bandes sont observés entre 300 et 400 nm, ces signaux correspondent aux transitions du niveau d'énergie  $C^3\Pi_u$  vers le niveau  $B^3\Pi_g$  des molécules de  $N_2$ , également appelé « Second Positive System » (SPS) de l'azote. Les transitions de  $A^2\Sigma^+$  vers  $^2\Pi$  (état fondamental) du radical  $NO^*$ , appelé système  $\gamma$  du radical  $NO^*$  sont observables entre 200 et 300 nm, tandis que la très large bande qui s'étend sur toute la gamme du visible est attribuée au  $NO_2$ . Le système  $\beta$  du radical  $NO^*$ , correspondant aux transitions de  $B^2\Pi$  vers  $X^2\Pi$ , peut également être observé entre 200 et 400 nm, principalement entre 280 et 380 nm.

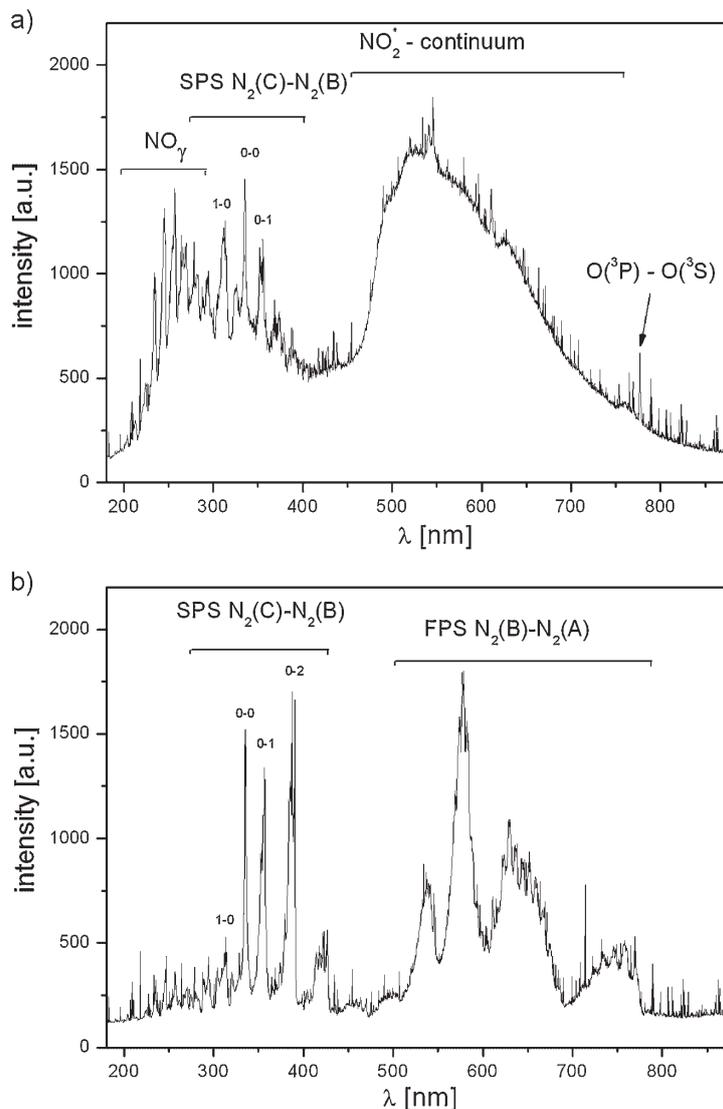


Figure A.120 – Spectres OES de plasmas générés par une torche à plasma à la pression atmosphérique pour (a) un plasma d'air et (b) un plasma d'azote (Lommatzsch, 2007 [4]).

Le montage expérimental permettant la collecte et l'analyse des données est décrit dans la Figure A.121. Il se compose d'une fibre optique, qui transmet les photons du plasma à un spectromètre (Figure A.122), lui-même connecté à un ordinateur par USB. Le spectromètre décompose le faisceau grâce à un réseau dont les caractéristiques déterminent les propriétés et la gamme spectrale de l'appareil. La lumière est ensuite convertie en signal électrique grâce à un détecteur CCD.

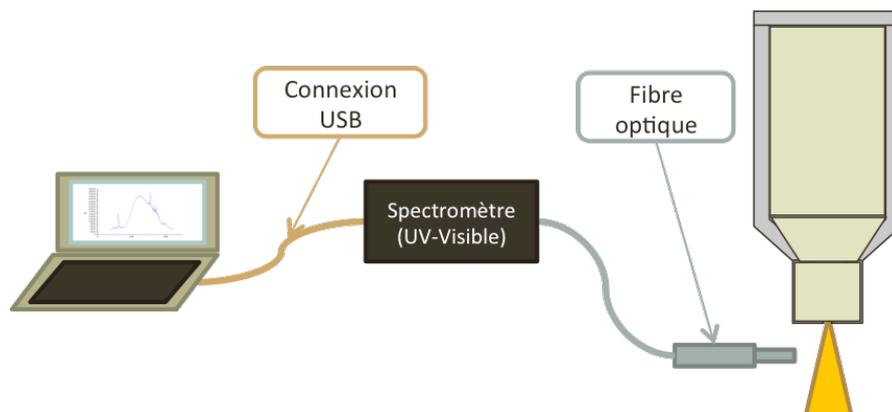


Figure A.121 - Montage expérimental de spectroscopie d'émission optique sur une torche plasma à pression atmosphérique.

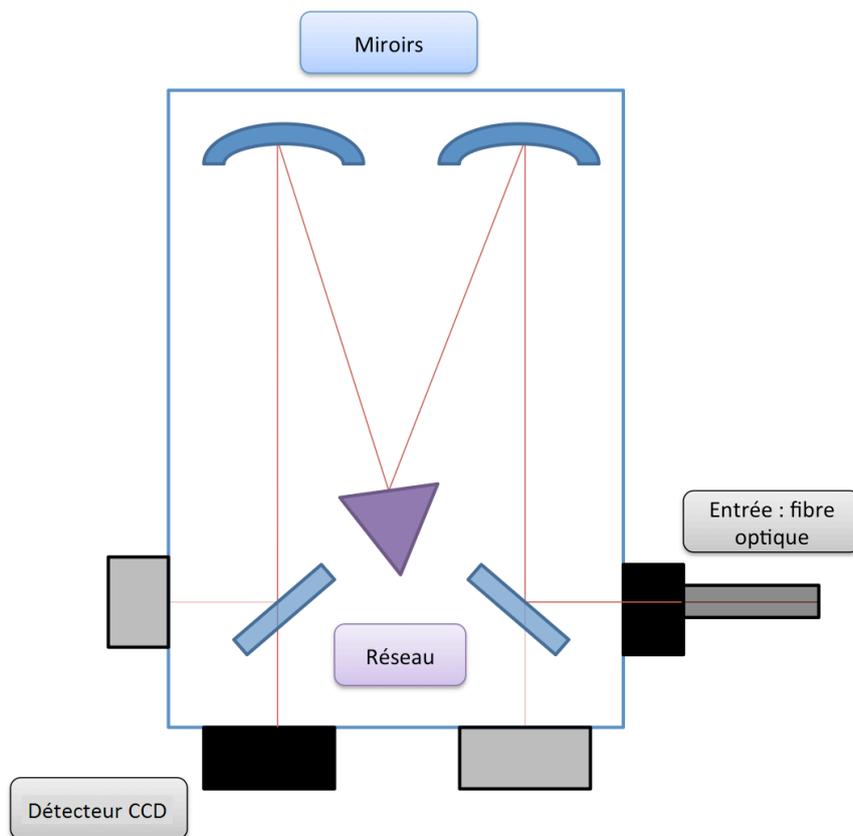


Figure A.122 - Description d'un spectromètre d'émission optique.

La spectroscopie d'émission optique (OES) permet d'identifier les espèces chimiques présentes dans le plasma en fonction des conditions de traitement. Cette approche est particulièrement intéressante car elle peut être utilisée pour l'analyse du plasma et la compréhension des phénomènes à l'origine de la fonctionnalisation. L'OES peut également être utilisée comme « contrôle » dans le cadre d'un procédé en ligne pour s'assurer que la composition du plasma, et donc son effet sur la surface, ne change pas.

Le spectromètre utilisé est un Ocean Optics Maya 2000, avec un réseau d'une densité de 300 traits/mm, une largeur de fente de 25 $\mu$ m et un détecteur de 2048 pixels d'une taille de 14 $\mu$ m, pour une résolution spectrale théorique de 11 Å, assimilée à la largeur des bandes à mi-hauteur (FWHM, Full Width at Half Maximum).

### Méthode d'évaluation de l'énergie de surface d'un matériau

L'adhésion d'une substance sur un matériau polymère est le résultat de forces attractives faibles (principalement de Van de Waals) représentatives de la cohésion des atomes ou molécules entre elles à l'interface entre les deux matériaux ou milieux. L'expression de cette cohésion, qui comprend différentes contributions (Force de Keesom : dipôles permanents ; Force de Debye : dipôle permanent – dipôle induit ; Force de London : dipôles induits), à une interface solide-liquide-vapeur est établie par l'équation d'Young :

$$\gamma_L \cdot \cos\theta = \gamma_S - \gamma_{SL} - \pi_e$$

Où  $\gamma$  est l'énergie libre aux interfaces liquide-vapeur (L), solide-vapeur (S) et solide-liquide (SL), et  $\pi_e$  la pression d'étalement résultant de l'adsorption de vapeur du liquide à la surface du solide, et  $\theta$  l'angle de contact à l'interface solide-liquide-vapeur (Figure A.123).

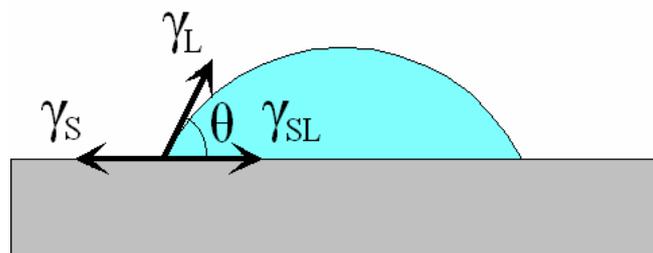


Figure A.123 – Représentation des composantes des forces impliquées dans l'adhésion d'un liquide sur une surface

Le modèle établi par Owens et Wendt (1969) permet, par la mesure de l'angle de contact formé par un liquide par rapport à la surface d'un matériau, de calculer la valeur des différents termes, avec l'hypothèse que  $\pi_e = 0$  [5], l'équation d'Young peut alors s'écrire :

$$\gamma_{SL} + \gamma_L \cdot \cos\theta = \gamma_S$$

Le calcul de l'énergie de surface par mesure d'angles de contact consiste alors à déterminer  $\gamma_S$  grâce à la mesure de l'angle de contact avec des liquides dont le  $\gamma_L$  est connu. L'énergie d'interaction  $\gamma_{SL}$  n'étant généralement pas connue, le modèle d'Owens et Wendt permet de l'estimer en considérant que l'énergie libre se décompose en une somme de 2 termes, la composante polaire  $\gamma_L^p$  et la composante non-polaire ou dispersive  $\gamma_L^d$  :

$$\gamma_L = \gamma_L^d + \gamma_L^p \quad \gamma_S = \gamma_S^d + \gamma_S^p$$

Le modèle se résout grâce à la moyenne géométrique :

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

Les inconnues sont les composantes polaire et dispersive du solide, elles sont obtenues par la mesure d'angle de contact à l'aide de plusieurs liquides dont les composantes sont connues (Tableau A.24). Par régression linéaire de type  $y = ax + b$ , on obtient :

$$x = \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}}$$

$$y = \frac{\gamma_L \cdot (1 + \cos\theta)}{2\sqrt{\gamma_L^d}}$$

Les termes polaires et dispersifs de l'énergie libre de l'interface solide-vapeur, qui composent l'énergie de surface, sont calculables à partir du coefficient directeur et de l'ordonnée à l'origine, eux-mêmes obtenus à partir de la régression linéaire, comme suit :

$$\gamma_S^p = a^2$$

$$\gamma_S^d = b^2$$

L'énergie de surface ainsi calculée permet de connaître l'effet du traitement sur le caractère hydrophile ou hydrophobe du matériau avant et après un traitement par plasma, et donc indirectement sur l'introduction ou non de groupements oxygénés (-OH, C=O, etc.) capables de former des liaisons hydrogènes avec l'eau. Toutefois, ce type de mesure ne permet pas d'obtenir des informations sur la composition de la surface, comme la nature précise et la quantité des groupements chimiques introduits par l'activation par plasma.

Tableau A.24 - Liquides utilisés pour la mesure des angles de contact.  
Les composantes polaires (p) et dispersives (d) sont données en mJ/m<sup>2</sup>.

	<b>Eau</b>	<b>Diiodométhane</b>	<b>Ethylène Glycol</b>	<b>Glycérol</b>
<b><math>\gamma(p)</math></b>	51	0	19	30
<b><math>\gamma(d)</math></b>	21,8	50,8	29,3	34
<b><math>\gamma</math> (mJ/m<sup>2</sup>)</b>	72,8	50,8	48,3	64

### **Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)**

Cette technique, et les interactions rayonnement-matière sur lesquelles elle repose, ont été décrites par Humbert *et al.* (2012, [6]), les principes de base sont présentés dans ce paragraphe.

La spectroscopie infrarouge se base sur l'interaction rayonnement-matière pour analyser un matériau ou une surface. Une partie du matériau à sonder est traversée par un rayonnement lumineux dont l'énergie correspond à la gamme infrarouge (relation énergie – longueur d'onde via la relation de Planck :  $E = h\nu$ ), les molécules constitutives du matériau absorbent alors une partie de l'énergie dont la quantité est particulière pour chaque liaison chimique et chaque phénomène associé à l'absorption de l'énergie : vibration ou rotation des liaisons chimiques. Par exemple, les bandes d'absorption à environ 3000 cm<sup>-1</sup> correspondent aux vibrations d'élongation de liaisons C-H d'une chaîne hydrocarbonée.

Cette méthode permet d'obtenir des spectres dont les pics (en absorption) sont caractéristiques de certaines liaisons chimiques, il est alors possible d'identifier la nature des liaisons chimiques qui composent le matériau (Figure A.124).

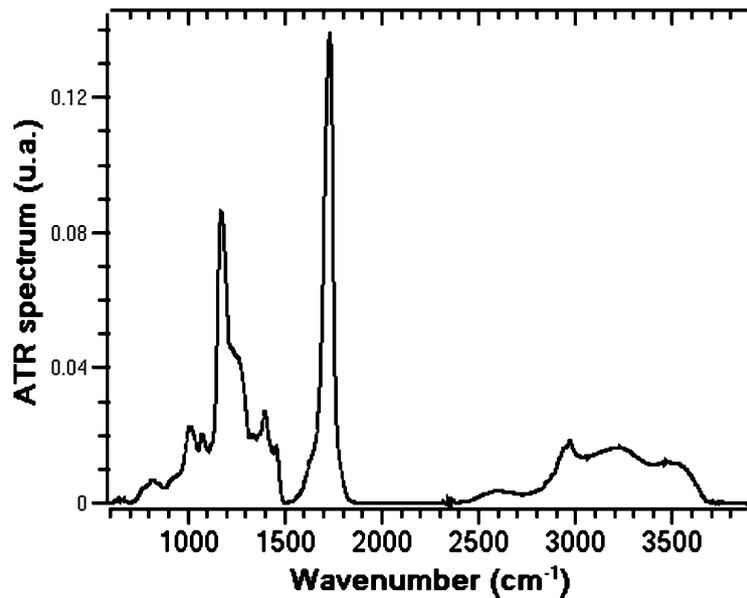


Figure A.124 – Exemple de spectre FTIR : Analyse d'un dépôt d'acide acrylique par plasma à la pression atmosphérique [7].

Il existe deux modes d'analyse par FTIR sur un matériau polymère : Par transmission, ou par ATR (Attenuated Total Reflectance). En transmission, le faisceau infrarouge traverse le matériau, ainsi, le signal récupéré après interaction avec le matériau contient une information sur toute l'épaisseur de l'échantillon analysé. Le spectre reflète alors la composition interne du matériau. En ATR, l'onde lumineuse atteint le matériau en traversant un cristal avec un angle déterminé qui dépend de l'équipement, et va sonder la surface par des ondes évanescentes (Figure A.125). De ce fait, les informations contenues dans le spectre proviennent principalement des couches superficielles du matériau. Pour analyser la composition de surface d'un matériau polymère, la méthode ATR est plus appropriée.

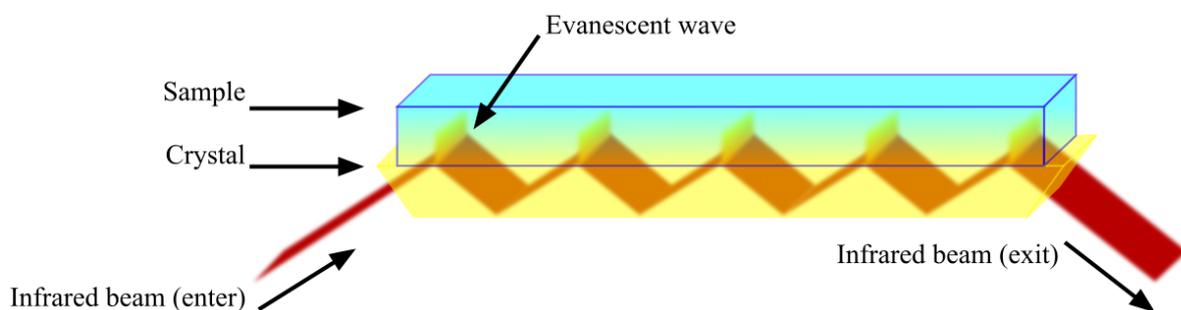


Figure A.125 - Les ondes évanescentes du rayonnement infrarouge en ATR.

## Spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS)

Contrairement à la spectroscopie FTIR, la technique de spectroscopie XPS, décrite par C.S. Fadley [8] ou Briggs [9], ne va pas sonder les déformations des liaisons chimiques grâce à l'énergie d'un faisceau lumineux, mais directement les atomes grâce à un faisceau de rayons X (photons). En effet, l'échantillon est exposé à un flux mono énergétique, provoquant ainsi l'éjection de photoélectrons du cœur du matériau, qui possèdent alors une énergie cinétique définie par la relation :

$$E_{\text{photoelectron}} = h\nu - E_{\text{liaison}}$$

Avec  $E_{\text{photoelectron}}$  l'énergie cinétique du photoélectron émis,  $h\nu$  l'énergie du faisceau (entre 1,2 et 1,5 keV en général), et  $E_{\text{liaison}}$  l'énergie de liaison de l'orbitale atomique d'origine de l'électron.

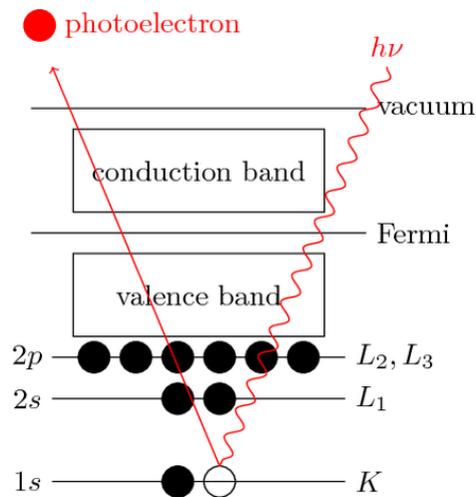


Figure A.126 - Mécanisme d'émission d'un photoélectron pour l'analyse XPS – le calcul de l'énergie cinétique du photoélectron par le spectromètre comprend la différence d'énergie entre l'énergie de Fermi et celle du vide via une constante de travail qui dépend de l'appareil de mesure.

L'énergie cinétique du photoélectron est donc directement liée à l'énergie de son orbitale atomique, ce qui nous permet d'identifier la nature de l'atome sondé mais également les liaisons chimiques dans lesquelles l'atome est impliqué ou son état d'oxydation. De plus, l'intensité du signal (aire sous la courbe) pour chaque élément est directement proportionnelle à la quantité de celui-ci dans le matériau, ce qui permet de quantifier les éléments présents à la surface du matériau. Des facteurs de sensibilité, dépendants du spectromètre utilisé et propre à chaque élément, doivent être appliqués afin d'obtenir des pourcentages atomiques correct (1, 2,98, 1,8 et 1,68 pour, respectivement, C, O, N et S).

Les spectres ainsi obtenus présentent des pics à des énergies distinctes pour chaque espèce chimique détectée (C, N, O, etc.), tel que présenté sur la Figure A.127.

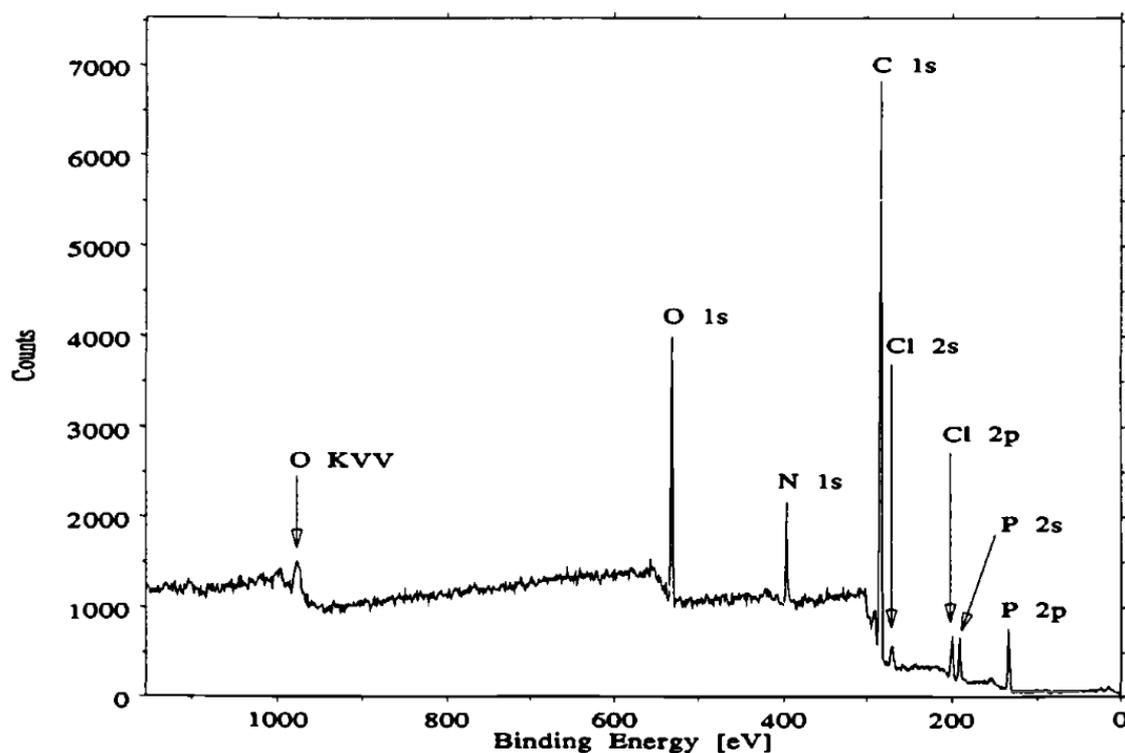


Figure A.127 – Spectre XPS de poly(phenoxyphosphazène) (Briggs, 1998 [9])

Pour chaque élément, la bande correspondante peut être décomposée afin d'identifier les contributions des différentes liaisons chimiques dans lesquelles sont impliqués les atomes. Le ratio des aires des compositions permet de calculer le pourcentage de chaque type de liaison covalente, pour chaque type d'atome détecté (Figure A.128). Cette décomposition doit respecter certaines conditions, notamment la largeur à mi-hauteur doit être identique pour toutes les contributions d'un élément chimique. Il est ainsi possible d'identifier les groupements chimiques existants à la surface, ce qui est très utile au moment d'analyser des surfaces fonctionnalisées, pour s'assurer du bon déroulement du procédé, notamment dans le cas de l'immobilisation de peptides.

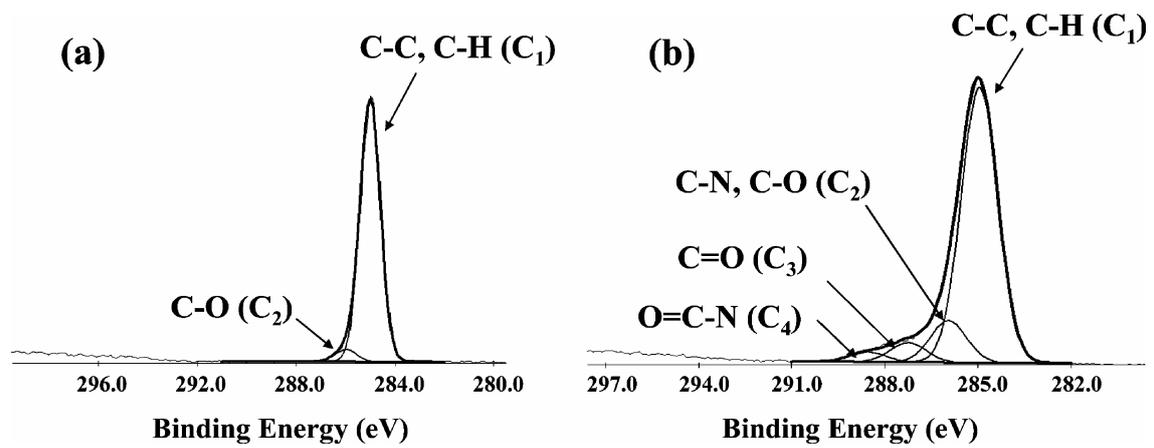


Figure A.128 - Décomposition du pic du carbone C1s. (a) Polyéthylène vierge, (b) Polyéthylène traité par plasma d'ammoniaque à basse pression [10]

La spectroscopie photoélectronique à rayons X permet de sonder des profondeurs très faibles, jusqu'à 10 nm environ pour des matériaux polymères, ce qui rend cette technique particulièrement pertinente pour l'analyse de l'extrême surface de polymères [9], [11].

## **Purification de la nisine par chromatographie liquide haute pression/performance (HPLC)**

La HPLC est une technique de séparation des composés présents dans une solution. Dans ce procédé, la solution contenant les molécules à séparer est injectée dans une colonne de chromatographie, un tube contenant une « phase stationnaire » composé de silice qui peut être fonctionnalisée en fonction du type de chromatographie que l'on souhaite réaliser. La solution est injectée dans le circuit puis poussée dans la colonne grâce à la circulation d'un solvant sous pression, la « phase mobile ». Les éléments sont alors séparés en fonction de leur taille, ou de leur polarité par exemple. Le choix de la colonne dépend alors du type de séparation que l'on souhaite faire. La composition de la phase mobile peut varier au cours de la séparation, on parle alors de « gradient ». Cela permet, par exemple, de séparer les éléments polaires hydrophiles des éléments polaires hydrophobes par application d'un gradient sur un mélange eau/éthanol. Sinon, on parle de mode isocratique. Un spectromètre UV est couplé à l'appareil, permettant ainsi de suivre l'évolution de la séparation en repérant les espèces qui sortent de la colonne par l'apparition d'un pic d'absorption [12].

L'objectif de cette expérience est de séparer la nisine contenu dans la préparation commerciale Nisaplin®, qui contient 2,5% de nisine et des débris de protéines.

Pour ce projet, la chromatographie réalisée est dite de « phase inverse », c'est-à-dire que des chaînes alkyles apolaires sont greffées sur la silice de la colonne. La longueur des chaînes peut varier, dans notre cas il s'agit d'une colonne de type C4 – phase inverse, donc les chaînes alkyles possèdent 4 carbones. La phase inverse est une méthode qui permet de bien séparer les protéines. L'éluant est un mélange eau-acétonitrile (MeCN), chaque solvant contenant 0,1% de acide trifluoroacétique (TFA). L'ajout de TFA dans l'éluant permet aux molécules polaires comme les peptides d'être retenues en formant des paires d'ions avec les acides aminés chargés positivement. Le débit de l'éluant est de 5mL/min, avec un programme défini comme suit :

- De 0 à 10 minutes : H<sub>2</sub>O 90% et MeCN 10%
- De 10 à 40 minutes : gradient jusqu'à 100% de MeCN
- De 40 à 45 minutes : gradient jusqu'à 10% de MeCN et 90% de H<sub>2</sub>O
- De 45 à 50 minutes : H<sub>2</sub>O 90% et MeCN 10%

En sortie de colonne, le détecteur analyse deux longueurs d'ondes :

- 254 nm : les protéines et la nisine absorbent, tous les éléments devraient apparaître sur le spectre
- 280 nm : les cycles aromatiques absorbent à cette longueur d'onde, or la nisine n'en contient pas. Si un pic apparaît à 254 nm mais pas à 280 nm, il est probable que ce soit la nisine

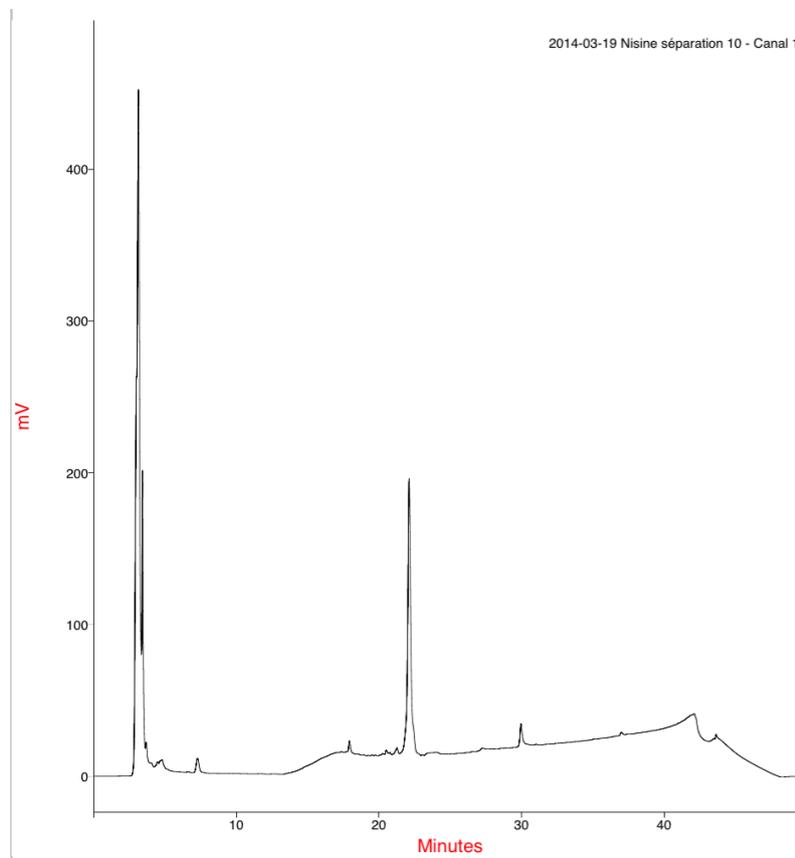


Figure A.129 – Chromatogramme d'une solution de Nisaplin® par HPLC

Le pic repéré à environ 22 minutes a été analysé par spectroscopie de masse et présente une masse identique à celle de la nisine. Celle-ci a pu être séparée par HPLC préparative afin d'être greffée sur les échantillons fonctionnalisés par plasma.

## Dépôt de couches minces d'argent par procédé de sputtering magnétron

Le sputtering magnétron (pulvérisation cathodique magnétron) est un procédé de type PVD (Physical Vapor Deposition) assisté par plasma, utilisé pour réaliser des dépôts de  $\text{TiO}_2$ , ou d'argent par exemple [13], [14].

Dans un réacteur à basse pression, le gaz plasmagène, généralement de l'argon, est introduit entre les 2 électrodes afin de créer le plasma, à l'aide d'un courant continu (DC) ou d'un courant de radiofréquence (RF) (Figure A.130). L'électrode haute tension est une cible constituée du métal à déposer, ici l'argent. Un champ électromagnétique intense permet de confiner les électrons à proximité de la cible, augmentant ainsi les collisions avec les éléments gazeux autour de la cible. Les ions d'argon accélérés par le champ électrique viennent percuter la cible, provoquant une évaporation d'une partie de la cible. Les éléments éjectés de la cible se déposent ensuite sur le substrat placé sur la contre-électrode.

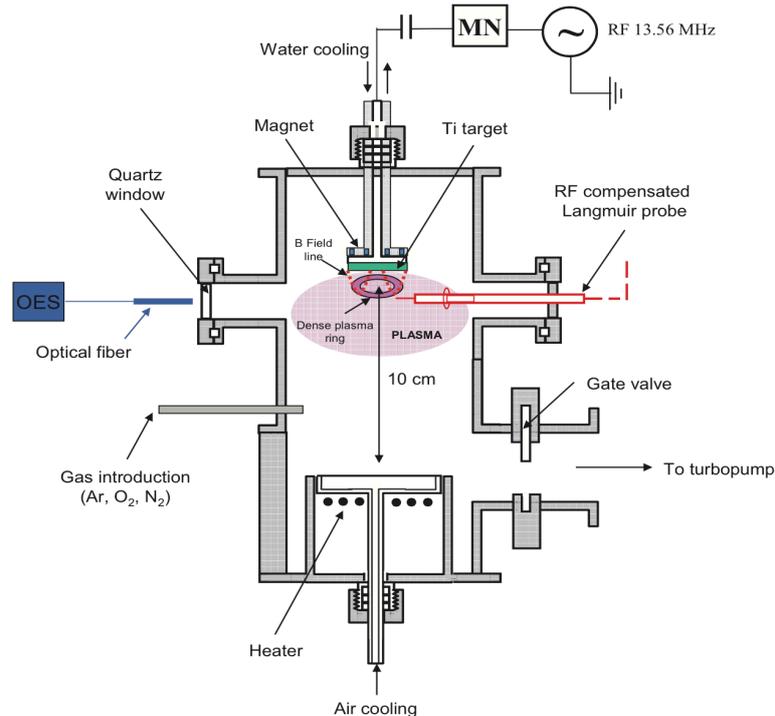


Figure A.130 – Représentation d'un système de dépôt par sputtering magnétron [15]

Le dépôt d'argent sur les échantillons en polypropylène a été obtenu avec une puissance de 70W, un flux d'argon de 50 sccm, une pression de travail d'environ  $7.10^{-3}$  mbar (5 mTorr), pendant 1h à température ambiante (Figure A.131).

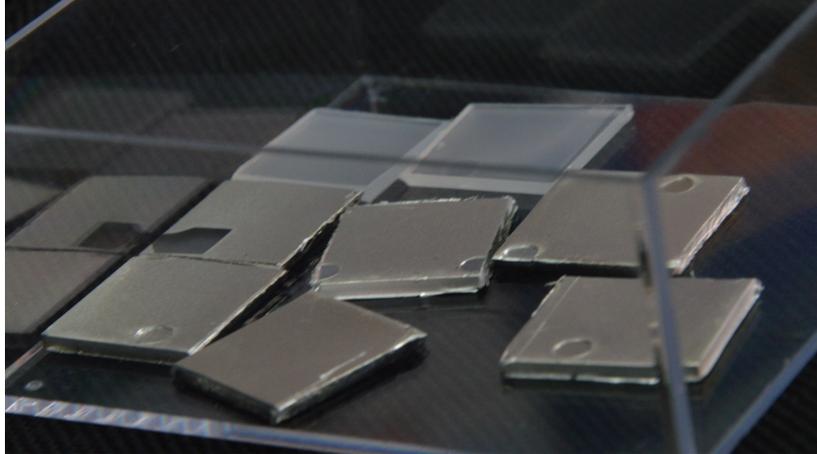


Figure A.131 – Échantillons de polypropylène après dépôt d'argent par sputtering magnétron. En arrière plan, deux échantillons ne présentant pas de dépôt à leur surface. Ils ont conservé leur aspect initial, légèrement translucide.

## Références

- [1] V. K. P. & S. M. R. A. N. Zaidel, *Tables of Spectrum Lines*. 1961.
- [2] R. W. B. Pearse and A. G. Gaydon, *The identification of molecular spectra*. London: Chapman & Hall, 1963.
- [3] D. Ben Salem, J. Pulpytel, F. Pillier, A. Pailleret, and F. Arefi-Khonsari, “Amorphization and Polymorphism Modification of Polyamide-6 Films via Open-Air Non-Equilibrium Atmospheric Pressure Plasma Jet Treatment,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 11, no. 10, pp. 961–973, Oct. 2014.
- [4] U. Lommatzsch, D. Pasedag, A. Baalman, G. Ellinghorst, and H.-E. Wagner, “Atmospheric Pressure Plasma Jet Treatment of Polyethylene Surfaces for Adhesion Improvement,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 4, no. S1, pp. S1041–S1045, 2007.
- [5] D. K. Owens and R. C. Wendt, “Estimation of the surface free energy of polymers,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 13, no. 8, pp. 1741–1747, 1969.
- [6] B. Humbert, J.-Y. Mevellec, J. Grausem, M. Dossot, and C. Carteret, “Spectrométrie d’absorption dans l’infrarouge,” in *Techniques de l’ingénieur*, 2012, p. p2850.
- [7] O. Carton, D. Ben Salem, S. Bhatt, J. Pulpytel, and F. Arefi-Khonsari, “Plasma Polymerization of Acrylic Acid by Atmospheric Pressure Nitrogen Plasma Jet for Biomedical Applications,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 9, no. 10, pp. 984–993, 2012.
- [8] C. S. Fadley, “Basic Concepts of X-ray Photoelectron Spectroscopy,” in *Electron Spectroscopy: Theory, Techniques and Applications*, Academic Press., vol. 2, C.R. Brundle & A.D. Baker, 1978.
- [9] D. Briggs, *Surface analysis of polymers by XPS and static SIMS*. Cambridge, U.K.; New York: Cambridge University Press, 1998.
- [10] M. Ghasemi, M. J. G. Minier, M. Tatoulian, M. M. Chehimi, and F. Arefi-Khonsari, “Ammonia Plasma Treated Polyethylene Films for Adsorption or Covalent Immobilization of Trypsin: Quantitative Correlation between X-ray Photoelectron Spectroscopy Data and Enzyme Activity,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, no. 34, pp. 10228–10238, Sep. 2011.
- [11] P. Cadman, G. Gossedge, and J. D. Scott, “The determination of the photoelectron escape depths in polymers and other materials,” *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–6, 1978.
- [12] S. Ahuja and M. Dong, Eds., *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, Volume 6*, 1 edition. Amsterdam; Boston: Academic Press, 2005.

- [13] N. Maréchal, E. Quesnel, and Y. Pauleau, "Silver thin films deposited by magnetron sputtering," *Thin Solid Films*, vol. 241, no. 1–2, pp. 34–38, Apr. 1994.
- [14] H. Fakhouri, J. Pulpytel, W. Smith, A. Zolfaghari, H. R. Mortaheb, F. Meshkini, R. Jafari, E. Sutter, and F. Arefi-Khonsari, "Control of the visible and UV light water splitting and photocatalysis of nitrogen doped TiO<sub>2</sub> thin films deposited by reactive magnetron sputtering," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 144, pp. 12–21, Jan. 2014.
- [15] H. Fakhouri, "Thin film deposition of pure and doped TiO<sub>2</sub> by RF magnetron sputtering for visible light photocatalytic and optoelectronic applications," Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2011.