



HAL
open science

Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma

Claire Saulou-Berion

► **To cite this version:**

Claire Saulou-Berion. Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma. Microbiologie et Parasitologie. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 2009. Français. NNT: . tel-01562895

HAL Id: tel-01562895

<https://agroparistech.hal.science/tel-01562895>

Submitted on 17 Jul 2017

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Ingénieries Microbienne et Enzymatique*

Présentée et soutenue par *Claire SAULOU*
Le 9 Décembre 2009

Titre :

*Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides
de films nanocomposites avec inclusions d'argent,
déposés sur acier inoxydable par procédé plasma*

JURY

Jean-Marc GHIGO
Paul ROUXHET
Patrick CHOQUET
Bernard DESPAX
Alain BERGEL
Muriel MERCIER-BONIN

Chef de laboratoire, Institut Pasteur, Paris
Professeur émérite, UCL, Louvain-la-Neuve
Directeur d'unité, CRP G. Lippmann, Belvaux
Directeur de recherche, CNRS, LAPLACE, Toulouse
Directeur de recherche, CNRS, LGC, Toulouse
Chargée de recherche, INRA, LISBP, Toulouse

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Président
Directrice de thèse

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries de Toulouse*

Unité de recherche : *Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés
UMR5504 CNRS/INSA, UMR792 INRA/INSA*

Collaboration avec le Laboratoire Plasma et Conversion d'Energie de Toulouse - UMR5213 CNRS/UPS

Directeur(s) de Thèse : *Muriel Mercier-Bonin*

Rapporteurs : *Jean-Marc Ghigo, Paul Rouxhet*



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Ingénieries Microbienne et Enzymatique*

Présentée et soutenue par *Claire SAULOU*
Le 9 Décembre 2009

Titre :

*Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides
de films nanocomposites avec inclusions d'argent,
déposés sur acier inoxydable par procédé plasma*

JURY

Jean-Marc GHIGO
Paul ROUXHET
Patrick CHOQUET
Bernard DESPAX
Alain BERGEL
Muriel MERCIER-BONIN

Chef de laboratoire, Institut Pasteur, Paris
Professeur émérite, UCL, Louvain-la-Neuve
Directeur d'unité, CRP G. Lippmann, Belvaux
Directeur de recherche, CNRS, LAPLACE, Toulouse
Directeur de recherche, CNRS, LGC, Toulouse
Chargée de recherche, INRA, LISBP, Toulouse

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Président
Directrice de thèse

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries de Toulouse*

Unité de recherche : *Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés*
UMR5504 CNRS/INSA, UMR792 INRA/INSA

Collaboration avec le Laboratoire Plasma et Conversion d'Energie de Toulouse - UMR5213 CNRS/UPS

Directeur(s) de Thèse : *Muriel Mercier-Bonin*

Rapporteurs : *Jean-Marc Ghigo, Paul Rouxhet*

REMERCIEMENTS

La thèse est une tranche unique de vie, tant l'engagement qu'elle demande est à la hauteur de l'intensité qu'elle procure, des apprentissages qu'elle suscite et des rencontres qu'elle permet. A l'issue de cette grande aventure scientifique et humaine qu'a été pour moi le doctorat, je souhaiterais tout d'abord remercier sincèrement le Professeur Paul ROUXHET de l'Unité de Chimie des Interfaces à l'Université Catholique de Louvain-La-Neuve (Belgique) et le Docteur Jean-Marc GHIGO de l'Unité de Génétique des Biofilms à l'Institut Pasteur, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche et de discuter des résultats et des interprétations exposés. J'adresse également mes remerciements au Docteur Patrick CHOQUET du Centre de Recherche Public G. Lippmann de Belvaux (Luxembourg) et au Docteur Alain BERGEL du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse, pour leur participation au jury de cette thèse et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

J'ai débuté ma thèse avec l'idée enthousiasmante de participer à un projet interdisciplinaire, au croisement de plusieurs domaines scientifiques. Les nombreuses collaborations initiées préalablement et au cours de ces trois années de thèse constituent une richesse majeure de ce travail. Ces échanges m'ont beaucoup appris, incontestablement sur un plan technique et méthodologique, mais également au niveau d'une prise de recul et d'une ouverture scientifique vers les différentes communautés impliquées.

Ainsi, je remercie M. Nic LINDLEY, directeur du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP), et M. Christian LAURENT, directeur du Laboratoire Plasma et Conversion d'Energie (LAPLACE), pour m'avoir accueillie dans leurs unités de recherche. Merci également à Philippe SCHMITZ et Patrice RAYNAUD pour leur intégration au sein, respectivement, des équipes "Transfert-Interfaces-Mélange" et "Matériaux et Procédés Plasma".

Je tiens ensuite à exprimer toute ma reconnaissance et à remercier très chaleureusement Muriel MERCIER-BONIN, ma directrice de thèse, pour son humanité, sa grande implication dans ce projet et son enthousiasme de chaque instant. Auprès de Muriel et grâce à son encadrement consciencieux et à sa rigueur scientifique, j'ai pu progresser et apprendre ce qu'est le métier de chercheur. Merci à elle pour sa disponibilité, son soutien, ses conseils pertinents et ses encouragements tout au long de ces trois années.

J'adresse également toute ma gratitude et mes remerciements amicaux à Bernard DESPAX et à Patrice RAYNAUD, du LAPLACE. Quel plaisir de découvrir le monde des plasmas à vos côtés !

Merci beaucoup à Bernard pour ses explications et sa patience lors de l'apprentissage du procédé de dépôt et pour l'interprétation des résultats obtenus avec les techniques de science des matériaux, qui ne m'étaient pas familières de prime abord. Merci également pour les nombreuses discussions partagées, aussi bien sur les différents aspects de ma thèse que sur ceux de la vie en général.

Un grand merci également à Patrice, pour son dynamisme et sa motivation au quotidien et pour avoir initié cette collaboration avec Muriel, à l'origine du projet ANR "Biopleasure". Merci à lui pour ses encouragements et sa bonne humeur communicative, ainsi que pour m'avoir fait connaître les différents partenaires du projet européen "Napolyde", ce qui fut pour moi une expérience très riche.

Ma reconnaissance va également à tous les partenaires du projet ANR "Biopleasure". Ce fut (et ça l'est toujours !) passionnant et instructif de participer à cette collaboration avec vous et d'élargir mon champ de connaissances lors de nos échanges.

Ainsi, je tiens à remercier Philippe MARCUS, Sandrine ZANNA et Chun WANG, du Laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces de Paris, pour la réalisation et l'interprétation des analyses XPS, ToF-SIMS et ICP-MS. La compétence, la disponibilité et les conseils de Sandrine concernant la physico-chimie des surfaces m'ont été d'une aide très précieuse : merci beaucoup pour les conversations téléphoniques et pour les explications apportées à mes nombreuses questions.

Merci également à Philippe SCHMITZ pour les échanges constructifs concernant l'hydrodynamique en chambre à écoulement et le traitement d'images.

J'adresse aussi mes remerciements à Francis CHASSAGNE, Audrey ALLION et Mélanie BOMBA, du Centre de Recherche d'Arcelor-Mittal à Isbergues, pour la visite du site de production et l'initiation à la microscopie à épifluorescence. L'efficacité et la sympathie d'Audrey et Mélanie font de cette expérience un très bon souvenir.

Enfin, un merci tout particulier à Nathalie LEBLEU, qui nous a rejoint sur le projet : c'est également un réel et grand plaisir de travailler auprès de toi, de bénéficier de ton expérience et de ton soutien et de partager nos discussions, aussi bien scientifiques que personnelles (encore félicitations pour la p'tite "boute" et sa mèche rebelle !). Bonne chance pour la suite (pro et perso) !

Ma thèse m'a amenée à travailler dans différents laboratoires et je voudrais dire un grand merci à Bruno PAYRE et Isabelle FOURQUAUX, du Centre de Microscopie Electronique Appliqué à la Biologie de Toulouse, à Frédéric JAMME, Paul DUMAS et Alain BULEON du Synchrotron SOLEIL de Gif-sur-Yvette (les souvenirs sur SMIS sont pour moi inoubliables), ainsi qu'à Frédéric CANDAUDAP du Laboratoire des Mécanismes et Transfert en Géologie de Toulouse. L'ensemble des résultats obtenus grâce à leur compétence et à leur disponibilité ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Mes remerciements vont également aux stagiaires qui ont travaillé sur ce projet : Fuensenta et Rayenne.

Je remercie cordialement les membres de l'équipe TIM et plus largement du LISBP, pour leurs réponses à mes questions scientifiques et de vie pratique au laboratoire, et plus particulièrement Christophe, Christine, Nathalie D., Nathalie C., Pascal, Sébastien, Marie-Pierre, Myriam, Muriel C.B., Valérie, Brice, Hélène et Michel. J'associe à ces remerciements les secrétaires, qui nous facilitent la vie au quotidien. Un grand merci également aux membres de l'équipe MPP pour leur accueil et leurs conseils dès que besoin (c'est-à-dire souvent !) : merci donc à Messaoud, Alain, Benoît S., Cédric, Hubert, Richard, Yvan, les Nicolas, Louison, Maria, Raphaël, Simon, Kremena, Isabelle, Christina et Aref.

Le mot « merci » est bien court pour exprimer ma profonde reconnaissance à Claude MARANGES, tout d'abord en tant qu'enseignant et de directeur des études au GBA, puis en tant que collègue et surtout ami, que j'estime énormément. Donc, « considérable » merci pour ta disponibilité (à toute épreuve), ton écoute (patient), ta gentillesse (inénarrable), ton soutien (tellement important), tes réponses, tes questions (et oui, aussi !) et tes conseils avisés, sans oublier tes incorrigibles blaguounettes (c'est bien toi qui a la "palme", Caesar !).

J'adresse mes profondes amitiés aux doctorants et post-doctorants du LISBP que j'ai eu le plaisir de côtoyer au labo et en-dehors : Gaëlle, Marie, Fabien, Emilie, Mathieu A., Nathalie, Lamia, Vincent, Sandra, Julien P., Jan, Romain, Estelle, Béragère, Naziha, Sirichai, Yannick, Julie, Julien C., Yuri, Clémentine, Yoann, Maëlle, Laurence, Mathieu M., Claudia, Jillian, Abril, César. Une "spéciale" dédicace à chacun de vous (sans développer car je vais allégrement dépasser le nombre de pages alloué !) ...

De grands merci à Emilie, Delphine, Laurie et Elodie, qui ont été (sont et seront, j'espère) de véritables amies et des piliers sans faille pendant ces trois années. Merci de m'avoir sorti la tête de la paillasse (les mercredis entre filles, les mails et les retours à la Pom' !), d'être présentes pour les bons et moins bons moments et de m'avoir toujours écoutée et encouragée. Un merci spécial à ma "sincou" Sophie : tu es pour moi plus qu'une sœur. J'adresse également toute mon amitié à Anne, Amandine, Barbara, Christelle, Bénédicte, Léa et Vivien (mon parrain), pour nos retrouvailles, épisodiques mais que je sais durables. Merci à tous pour nos nombreuses séances de "papotages", qui m'apportent tant !

Je souhaiterais adresser un colossal merci à mes parents : merci pour votre amour, pour votre soutien inégalable et votre réconfort en tout instant, pour votre écoute et pour la joie que me procure nos coups de fils et nos moments en famille. Merci de croire en moi, parfois plus que moi-même. Je souhaite ici vous témoigner très sincèrement et du fond du cœur toute mon affection et ma reconnaissance, qui dépassent bien largement le cadre de cette thèse.

De gros bisous à mes grands-mères préférées et aux membres de ma famille...

"Last but not least" : un énorme merci à Manu, mon Kudu, pour m'avoir soutenue (et supportée) lors des hauts et des bas inhérents à la thèse, et plus particulièrement lors de la période de rédaction. Merci également à tous les membres de la famille Bérion pour leur accueil joyeux et bienveillant. Manu, merci pour cet équilibre que tu m'apportes, pour ces moments ensemble qui sont si chers à mes yeux et pour ces nombreuses aventures et découvertes vécues en dehors du labo. Je suis pleinement heureuse de partager ce nouveau projet avec toi et de construire au quotidien notre vie à deux, présente et future.

"Il y a tant à apprendre les uns des autres..."

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
INDEX DES FIGURES	9
INDEX DES TABLEAUX	14
VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE	15
INTRODUCTION GENERALE	19
ETAT DE L'ART	24
CHAPITRE I - L'ADHESION MICROBIENNE AUX SURFACES : UN PHENOMENE MULTIFACTORIEL PROVOQUANT DE NOMBREUX IMPACTS NEGATIFS DANS LES SECTEURS AGRO-ALIMENTAIRE ET BIOMEDICAL	25
INTRODUCTION	25
I - L'ADHESION AUX SURFACES SOLIDES : PREMIERE ETAPE DE LA FORMATION DES BIOFILMS	25
II - PARAMETRES INFLUENÇANT L'ADHESION DES MICROORGANISMES AU SUPPORT	27
A - FACTEURS LIES AU SUPPORT	27
1 - Contamination	27
2 - Film conditionnant	27
3 - Nature chimique de la surface	28
4 - Rugosité et micro-topographie	28
5 - Charge de surface	29
6 - Hydrophobie de surface	30
B - FACTEURS LIES AU MICROORGANISME	31
1 - Concentration et interactions microbiennes	31
2 - Composition biochimique et structure moléculaire de la surface microbienne	31
3 - Caractéristiques physico-chimiques de la surface cellulaire	33
4 - Phase de croissance et état physiologique	34
5 - Adaptation phénotypique des microorganismes adhérents	34
C - FACTEURS LIES A L'ENVIRONNEMENT	35
1 - Temps de contact	35
2 - Caractéristiques du milieu	35
3 - Conditions hydrodynamiques	37
III - IMPACTS NEGATIFS LIES A L'ADHESION MICROBIENNE DANS L'INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE ET LE DOMAINE BIOMEDICAL	38
A - CONTAMINATIONS MICROBIENNES DES SURFACES EN INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE	38
B - PROBLEMES LIES A LA CONTAMINATION DES SURFACES DANS LE DOMAINE MEDICAL	40
CONCLUSION	43

CHAPITRE II – ACIER INOXYDABLE AISI 316L	44
INTRODUCTION	44
I – STRUCTURE DE LA SURFACE DE L’ACIER INOXYDABLE AUSTENITIQUE	44
A – GENERALITES ET COMPOSITION CHIMIQUE DE L’ACIER AUSTENITIQUE	44
B – CORROSION DES ACIERS INOXYDABLES ET FILM PASSIF	45
C – CONTAMINATION DU FILM PASSIF EN SURFACE DES ACIERS INOXYDABLES	46
II – L’ACIER INOXYDABLE AUSTENITIQUE : MATERIAU DE PREDILECTION POUR DE NOMBREUSES APPLICATIONS	48
A – UTILISATION DE L’ACIER INOXYDABLE DANS L’INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE	48
B – UTILISATION DE L’ACIER INOXYDABLE DANS LE DOMAINE BIOMEDICAL	48
CONCLUSION	49
CHAPITRE III – MODIFICATION DES SURFACES D’ACIER INOXYDABLE : ELABORATION DE SURFACES ANTI-ADHESIVES	51
INTRODUCTION	51
I – DEFINITION D’UN PLASMA ET DIFFERENTS MODES DE GENERATION	52
II – AVANTAGES DES PROCEDES PLASMA	55
III – APPLICATION DES PROCEDES PLASMA A L’ELABORATION DE SURFACES D’ACIER INOXYDABLE ANTI-ADHESIVES	56
A – TRAITEMENTS DE SURFACE	56
B – IMPLANTATION IONIQUE	57
C – DEPOT DE COUCHES MINCES PAR PROCEDE PLASMA	57
CONCLUSION	59
CHAPITRE IV – MISE AU POINT DE SURFACES BIOCIDES	60
INTRODUCTION	60
I – SURFACES BIOCIDES ELABOREES PAR PROCEDES PLASMA	60
II – REVETEMENTS ANTIMICROBIENS A BASE D’ARGENT	62
A – REVETEMENTS DE SURFACE CONTENANT DES COMPOSES METALLIQUES	62
B – ELABORATION DE REVETEMENTS ANTIMICROBIENS CONTENANT DE L’ARGENT	62
1 – Mécanismes d’action des ions Ag ⁺	63
2 – Résistance des microorganismes aux ions Ag ⁺	69
3 – Conception de revêtements de surface contenant de l’argent	70
C – DEPOT PAR PE-CVD/BOMBARDEMENT IONIQUE DE FILMS MINCES COMPOSITES CONTENANT DE L’ARGENT	75
CONCLUSION	76

CHAPITRE V – ENJEUX LIES A L’UTILISATION DU « NANO-ARGENT »	77
INTRODUCTION	77
I – ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES NANOPARTICULES D’ARGENT	77
II – LES NANOPARTICULES D’ARGENT : BENEFICES ET RISQUES	79
A – BENEFICES DE L’UTILISATION DE PRODUITS CONTENANT DES NANOPARTICULES D’ARGENT	80
1 – Prévention des infections dans le domaine biomédical	80
2 – Applications dans le domaine agro-alimentaire et le traitement de l’eau	81
3 – Autres applications : hygiène et désinfection	82
B – IMPACTS NEGATIFS DE L’ARGENT SUR L’HOMME ET L’ENVIRONNEMENT	83
1 – Effets néfastes de l’argent sur l’Homme	83
2 – Conséquences de la dissémination de l’argent dans l’environnement	85
3 – La réglementation européenne	86
CONCLUSION	88
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE	90
TECHNIQUES ET METHODES EXPERIMENTALES	93
I – CONDITIONS DE CULTURE ET PREPARATION DES SUSPENSIONS MICROBIENNES	94
A – CULTURE DE <i>S. CEREVISIAE</i>	94
B – CULTURE DE <i>S. AUREUS</i>	95
C – CULTURE D’ <i>E. COLI</i>	95
D – ÉVALUATION DU CARACTERE HYDROPHOBE ET DES PROPRIETES ACIDE/BASE DE LEWIS DES BACTERIES PAR LA METHODE MATS	96
II – ACIER INOXYDABLE AISI 316L ET PROCEDURES DE NETTOYAGE	97
A – ACIER INOXYDABLE AISI 316L	97
B – PROTOCOLES DE TRAITEMENT DE SURFACE DE L’ACIER INOXYDABLE AISI 316L	97
1 – Nettoyages chimiques	97
2 – Bombardement de la surface d’acier inoxydable par plasma d’argon	97
C – CARACTERISATION DES SURFACES D’ACIER INOXYDABLE VIERGE	101
1 – Rugosité	101
2 – Composition chimique de la surface par spectroscopie XPS	101
3 – Angle de contact avec l’eau	103
III – ELABORATION DES FILMS MINCES PAR PROCEDE PLASMA	103
A – SYNTHESE DES DEPOTS NANOCOMPOSITES PAR PROCEDE PLASMA	103
1 – Principe général de la méthode de dépôt	103
2 – Paramètres opératoires de contrôle	105
B – CONTROLE <i>IN SITU</i> DU PROCEDE DE DEPOT PAR SPECTROSCOPIE D’ÉMISSION OPTIQUE	106
C – DESCRIPTION DU PROTOCOLE DE DEPOT ET DES CONDITIONS OPERATOIRES	107
1 – Dépôts nanocomposites	107
2 – Dépôts de matrice organosiliciée	111
3 – Dépôts de matrice avec ajout d’oxygène dans le plasma	111

IV – CARACTERISATION DES FILMS OBTENUS PAR PROCÉDE PLASMA	112
A – MESURE DE L'ÉPAISSEUR DES REVÊTEMENTS	112
1 – Profilométrie	112
2 – Ellipsométrie	112
B – DETERMINATION DE LA TOPOGRAPHIE DE SURFACE DES DÉPÔTS	113
1 – Observation de la morphologie de surface par Microscopie Electronique à Balayage	113
2 – Caractérisation de la rugosité de surface par profilométrie	113
C – CARACTERISATION DE LA STRUCTURE ET DE LA COMPOSITION INTERNE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION (MET) COUPLÉE A UNE ANALYSE DISPERSIVE EN ENERGIE (EDS)	113
1 – Microscopie Electronique en Transmission	113
2 – Analyse par Spectroscopie Dispersive en Energie des rayons X	114
D – DETERMINATION DE LA COMPOSITION ET DES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES DÉPÔTS	114
1 – Evaluation de la composition et de la structure chimique par spectroscopie XPS	114
2 – Etude de la structure chimique par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) en transmission et spectroscopie Raman	115
3 – Détermination du profil de composition élémentaire par spectroscopie de masse d'ions secondaires (SIMS), couplée à une analyse par temps de vol (ToF)	118
4 – Evaluation du caractère hydrophile/hydrophobe de la surface des dépôts	119
E – ÉVALUATION DE LA CINÉTIQUE DE RELARGAGE D'ARGENT PAR IMMERSION DES DÉPÔTS NANOCOMPOSITES EN MILIEU AQUEUX	119
V – DETERMINATION PAR METHODE HYDRODYNAMIQUE DES PROPRIETES ANTI-ADHESIVES DES FILMS NANOCOMPOSITES VIS-A-VIS DE <i>S. CEREVISIAE</i>	120
A – DESCRIPTION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL	120
B – DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE DE DETACHEMENT	123
VI – DETERMINATION DES PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES FILMS NANOCOMPOSITES SUR LES MICROORGANISMES D'ETUDE	125
A – ÉVALUATION DES PROPRIETES BIOCIDES DES DÉPÔTS SUR <i>S. CEREVISIAE</i>	125
1 – Tests en conditions statiques	125
2 – Analyse des levures par microspectroscopie infrarouge, sous une source de rayonnement Synchrotron	128
3 – Observation de l'ultra-structure des levures par Microscopie Electronique en Transmission et analyse élémentaire par Spectroscopie Dispersive en Energie	131
B – ÉVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES DÉPÔTS NANOCOMPOSITES SUR <i>S. AUREUS</i> ET <i>E. COLI</i>	133
VII – EVOLUTION DES PROPRIETES ANTI-ADHESIVES ET BIOCIDES DES FILMS NANOCOMPOSITES SUITE A UNE PROCEDURE DE VIEILLISSEMENT : CORRELATION AVEC LEURS CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES	134
RESULTATS ET DISCUSSION	136
CHAPITRE I – CARACTERISATION DE L'ADHESION DES LEVURES SUR L'ACIER INOXYDABLE MODIFIE : COMPARAISON DES DIFFERENTS TRAITEMENTS DE SURFACE	137
I – CARACTERISATION DES SURFACES D'ACIER INOXYDABLE APRES TRAITEMENT	138

A – INFLUENCE DES TRAITEMENTS DE SURFACE SUR LA COUCHE DE CONTAMINATION ET LE FILM PASSIF	138
1 – Couche de contamination	138
2 – Couche passive	142
B – INFLUENCE DES TRAITEMENTS DE SURFACE SUR L'HYDROPHILIE/HYDROPHOBIE	144
II – EVALUATION DE L'ADHESION DES LEVURES SUR LES DIFFERENTES SURFACES TRAITÉES	146
CONCLUSION	150
CHAPITRE II – CARACTERISATION DES DEPOTS NANOCOMPOSITES	152
I – INFLUENCE DE LA PRESSION DE HMDSO SUR LA COMPOSITION DU DEPOT NANOCOMPOSITE	152
A – RELATION ENTRE LA VALEUR DE T_{ON} ET LA PRESSION DE HMDSO DANS LE REACTEUR	152
B – CONTROLE EN LIGNE DU PROCEDE DE DEPOT PAR SPECTROSCOPIE D'ÉMISSION OPTIQUE	154
II – CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DES DEPOTS	157
A – ÉPAISSEUR DES DEPOTS	157
B – TOPOGRAPHIE ET MORPHOLOGIE DE SURFACE DES DEPOTS	159
C – STRUCTURE INTERNE DES DEPOTS NANOCOMPOSITES	162
III – CARACTERISATION DE LA COMPOSITION, DE LA STRUCTURE ET DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES DEPOTS NANOCOMPOSITES	166
A – ANALYSES DE LA COMPOSITION ET DE LA STRUCTURE PHYSICO-CHIMIQUE DE SURFACE DES DEPOTS PAR SPECTROSCOPIE XPS	166
1 – Etude du dépôt A	168
2 – Etude du dépôt I	170
3 – Etude des dépôts nanocomposites B à H : influence de la présence d'argent	172
B – ANALYSES DE LA COMPOSITION DES DEPOTS NANOCOMPOSITES PAR SPECTROSCOPIES FTIR ET RAMAN	182
1 – Composition et structure chimique du dépôt A	182
2 – Composition et structure chimique du dépôt I	186
3 – Influence de la présence d'argent sur la structure chimique des dépôts nanocomposites	188
C – ANALYSES DU PROFIL DE COMPOSITION ELEMENTAIRE DES DEPOTS PAR SPECTROSCOPIE ToF-SIMS	193
D – ÉVALUATION DU CARACTERE HYDROPHILE/HYDROPHOBE DE LA SURFACE DES DEPOTS	197
1 – Caractérisation de la mouillabilité de surface dépôt A	197
2 – Evaluation de la nature hydrophile/hydrophobe du dépôt I	198
3 – Détermination de la polarité de surface des dépôts nanocomposites B à H	199
CONCLUSION	200
CHAPITRE III – CARACTERISATION DES PROPRIETES ANTI-ADHESIVES ET ANTIMICROBIENNES DES DEPOTS NANOCOMPOSITES	202
I – EVALUATION DE L'EFFICACITE ANTI-ADHESIVE ET BIOCIDES DES DEPOTS NANOCOMPOSITES SUR <i>S. CEREVISIAE</i>	202
A – CARACTERISATION DE L'ADHESION DES LEVURES SUR LES DIFFERENTS DEPOTS PAR METHODE HYDRODYNAMIQUE	202
1 – Propriétés anti-adhésives de la matrice organosilicée et du dépôt silicié inorganique	202
2 – Evaluation de l'effet anti-adhésif des dépôts nanocomposites	208
3 – Conclusion	210

B – DETERMINATION DE L'ACTIVITE BIOCIIDE DES DEPOTS NANOCOMPOSITES SUR <i>S. CEREVISIAE</i>	211
II – COMPREHENSION DU MECANISME D'ACTION DE L'ARGENT SUR <i>S. CEREVISIAE</i>	
PAR CONTACT AVEC LES DEPOTS NANOCOMPOSITES	216
A – EVALUATION DE L'IMPACT DE L'ARGENT RELARGUE PAR LES DEPOTS NANOCOMPOSITES SUR LA COMPOSITION DES LEVURES PAR MICROSPECTROSCOPIE FTIR EN RAYONNEMENT SYNCHROTRON	216
B – EVALUATION DES MODIFICATIONS CELLULAIRES INDUITES PAR L'ARGENT ET LOCALISATION DE L'ARGENT AU SEIN DES LEVURES	223
1 – Observation de l'ultra-structure des levures par MET	223
2 – Evaluation qualitative de la présence d'argent au sein des levures par EDS	226
III – EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES DEPOTS NANOCOMPOSITES SUR <i>S. AUREUS</i> ET <i>E. COLI</i> : COMPARAISON DE L'EFFICACITE BIOCIIDE ENTRE LES TROIS MICROORGANISMES D'ETUDE	230
A – CARACTERISATION DU CARACTERE HYDROPHILE/HYDROPHOBE DES BACTERIES PAR METHODE MATS	230
B – DETERMINATION DES PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES DEPOTS NANOCOMPOSITES SUR LES BACTERIES MODELES	231
1 – Evaluation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de <i>S. aureus</i> MW2	231
2 – Caractérisation des propriétés biocides sur <i>E. coli</i> K12 MG1655	232
C – COMPARAISON DE L'EFFICACITE BIOCIIDE DES DEPOTS NANOCOMPOSITES SUR LES TROIS MODELES D'ETUDE	233
CONCLUSION	236
CHAPITRE IV – INFLUENCE DE L'UTILISATION REPETEE DES DEPOTS NANOCOMPOSITES SUR LEURS PROPRIETES ANTI-ADHESIVES ET ANTIMICROBIENNES	240
I – EVOLUTION DE L'EFFICACITE ANTI-ADHESIVE DES DEPOTS NANOCOMPOSITES D	241
II – EVOLUTION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES DEPOTS NANOCOMPOSITES D	243
III – CARACTERISTIQUES DES DEPOTS NANOCOMPOSITES D EVALUEES APRES UTILISATION : CORRELATION AVEC L'EVOLUTION DES PROPRIETES ANTI-ADHESIVES ET BIOCIDES	245
A – EVOLUTION DE LA TOPOGRAPHIE DES DEPOTS	245
B – EVALUATION DE LA COMPOSITION ET DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE SURFACE DES DEPOTS NANOCOMPOSITES APRES VIEILLISSEMENT	246
1 – Caractérisation XPS des dépôts après utilisation	246
2 – Evolution de la quantité d'argent en surface du dépôt D lors d'une immersion de courte durée en solution saline (NaCl 0,15 M)	250
3 – Evaluation du caractère hydrophile/hydrophobe de la surface des dépôts après utilisation	251
C – MORPHOLOGIE ET STRUCTURE CHIMIQUE INTERNE DU DEPOT NANOCOMPOSITE D APRES VIEILLISSEMENT EN CONDITIONS STATIQUES DANS LA SOLUTION SALINE	252
D – DETERMINATION DU PROFIL DE COMPOSITION EN EPAISSEUR PAR TOF-SIMS, SUITE A UNE IMMERSION PROLONGEE DE 60 JOURS EN SOLUTION SALINE	256
E – CONCLUSION RELATIVE AUX MECANISMES DE VIEILLISSEMENT DES DEPOTS NANOCOMPOSITES	259
CONCLUSION	261

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	264
BIBLIOGRAPHIE	271
ANNEXES	296
ANNEXE 1 – PRINCIPE DE LA PHOTO-EMISSION ET DE LA SPECTROSCOPIE XPS	297
ANNEXE 2 – PRINCIPE DE L'ANALYSEUR A TEMPS DE VOL (TOF)	299
ANNEXE 3 – FORMATION DU RAYONNEMENT SYNCHROTRON DANS L'ACCELERATEUR D'ELECTRONS SOLEIL (GIF-SUR-YVETTE)	300

INDEX DES FIGURES

Figure 1.	Modèle de formation d'un biofilm sur une surface solide (d'après Filloux et Vallet, 2003).....	26
Figure 2.	Photographie en microscopie électronique à balayage de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (d'après Carr, 2005).	40
Figure 3.	Photographie en microscopie électronique à balayage de <i>Staphylococcus aureus</i> (d'après Carr, 2005).	41
Figure 4.	Photographie en microscopie électronique à balayage d' <i>Escherichia coli</i> (source : Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH, 2005).	42
Figure 5.	Structure et composition de la surface des aciers inoxydables austénitiques.....	47
Figure 6.	Evolution du nombre de publications annuelles concernant l'utilisation des procédés plasma pour rendre les surfaces des matériaux (polymères, céramiques, acier inoxydable) anti-adhésives. Recherche réalisée sur « Web of Science » en septembre 2009, avec les mots-clés « plasma », « coating » et « anti-fouling ».....	52
Figure 7.	Photographies a) d'un plasma naturel : la foudre, et b) d'un plasma d'argon dans un réacteur de laboratoire.....	52
Figure 8.	Photographies du réacteur plasma radiofréquence : (A) vue générale de l'ensemble du dispositif ; (B) vue du réacteur plasma et (C) vue de l'intérieur du réacteur (partie supérieure).	98
Figure 9.	Schéma du réacteur plasma radiofréquence en cours de fonctionnement pour réaliser le bombardement d'ions argon sur les échantillons d'acier inoxydable.	100
Figure 10.	Représentation schématique de l'analyse XPS.....	102
Figure 11.	Structure moléculaire de l'hexaméthylsiloxane.	103
Figure 12.	Schéma récapitulatif du principe de dépôt par procédé plasma RF du film composite, constitué de nanoparticules d'argent incluses dans la matrice organosiliciée.....	104
Figure 13.	Schéma du cycle de pulsations du débit de HMDSO.....	105
Figure 14.	Exemple de spectre d'émission optique de la phase plasma lors du procédé de synthèse du dépôt nanocomposite.....	107
Figure 15.	Schéma récapitulatif du protocole de synthèse des dépôts nanocomposites par procédé plasma (consignes et paramètres suivis au cours du procédé).	108
Figure 16.	Schéma de principe et états de polarisation de la lumière lors d'une mesure d'épaisseur par ellipsométrie à modulation par polariseur tournant.	112
Figure 17.	Préparation de l'échantillon pour l'observation par Microscopie Electronique en Transmission.	114
Figure 18.	Modes de vibration d'une molécule.	116
Figure 19.	Principe de la spectroscopie Raman.	117
Figure 20.	Principe de l'analyse ToF-SIMS.	118

Figure 21.	Schéma représentant a) une vue éclatée de la chambre à écoulement cisailé, b) le canal d'écoulement, c) photographie de la chambre fixée sur la platine du microscope et de l'orifice d'injection des microorganismes et d) l'ensemble du dispositif permettant de réaliser les expériences de détachement.	122
Figure 22.	Schéma de présentation d'une expérience de détachement de <i>S. cerevisiae</i> : a) durée des paliers appliqués, b) exemple de photographies à l'issue de trois paliers pour lesquels un détachement significatif des levures a été observé sur le dépôt D, c) profil de détachement et mode de détermination des valeurs de $\tau_{p\ 2\%}$, $\tau_{p\ 50\%}$ et $\tau_{p\ 90\%}$	124
Figure 23.	Protocole du test d'évaluation des propriétés biocides des dépôts nanocomposites sur <i>S. cerevisiae</i>	126
Figure 24.	Protocole d'analyse de <i>S. cerevisiae</i> en microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, sur la ligne SMIS du Synchrotron SOLEIL.	130
Figure 25.	Spectre XPS général de la surface d'acier inoxydable de référence (nettoyage acétone/éthanol).	139
Figure 26.	Spectre de haute résolution du niveau de cœur C 1s, obtenu par analyse XPS de la surface d'acier inoxydable de référence (nettoyage acétone/éthanol).	139
Figure 27.	Epaisseurs des couches de contamination et couches passives des différents échantillons d'acier inoxydable.	140
Figure 28.	Angles de contact avec l'eau mesurés sur les surfaces d'acier inoxydable après les différents traitements.	144
Figure 29.	Profils de détachement obtenus pour les levures <i>S. cerevisiae</i> BY4741 préalablement adhérentes aux surfaces d'acier inoxydable traitées (NaCl 0,15 M).	146
Figure 30.	Représentation schématique des mécanismes d'interaction possibles entre <i>S. cerevisiae</i> et la surface d'acier inoxydable 316L, dans la solution saline.	148
Figure 31.	Mécanisme d'interaction entre une cellule et l'acier inoxydable 316L (selon Mei <i>et al.</i> , 2009).	150
Figure 32.	Coupons d'acier inoxydable AISI 316L vierge et recouverts des différents dépôts nanocomposites.	153
Figure 33.	Evolution de la pression de HMDSO dans le réacteur en fonction de la valeur de T_{ON} (durée d'injection du précurseur).	154
Figure 34.	Evolution de l'intensité des raies d'émission optique Ar, H β et Ag en fonction de la pression de HMDSO dans le réacteur.	155
Figure 35.	Photographies en Microscopie Electronique à Balayage de la surface des dépôts A, B, E et H.	159
Figure 36.	Photographies en Microscopie Electronique en Transmission du dépôt nanocomposite D (a : échelle = 20 nm et b : échelle = 5 nm).	162
Figure 37.	Analyse par Spectroscopie Dispersive en Energie (EDS) de la section amincie du dépôt nanocomposite D, réalisée simultanément à l'observation en MET.	163

Figure 38.	Répartition en taille des nanoparticules d'argent, après traitement de l'image du dépôt nanocomposite D obtenue en MET (logiciel AnalySIS [®] AUTO).	164
Figure 39.	Agrandissement de l'image en MET du dépôt D (Figure 36 b), permettant de visualiser l'arrangement des atomes d'argent en plans cristallins.....	165
Figure 40.	Spectre XPS général du dépôt A.	168
Figure 41.	Spectres de haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p obtenus par analyse XPS du dépôt A.....	168
Figure 42.	Spectre XPS général du dépôt I de matrice synthétisé avec ajout d'oxygène dans le plasma (HMDSO/O ₂ : 1/10).	170
Figure 43.	Spectre XPS général du dépôt nanocomposite D.....	172
Figure 44.Spectres de haute résolution des niveaux de cœur Ag 3d, Si 2p, C 1s et O 1s et du pic Auger obtenus par analyse XPS du dépôt nanocomposite D.	173
Figure 45.	Evolution de la concentration atomique en argent des dépôts nanocomposites A à H, déterminée par spectroscopie XPS, en fonction du rapport d'intensité des pics d'émission de l'argent (546,55 nm) et de l'argon (549,59 nm).	175
Figure 46.	Spectres du niveau de cœur Si 2p des dépôts A (a) et B (b).	178
Figure 47.	Superposition des spectres du niveau de cœur C 1s, enregistrés pour les dépôts A, B, C, E, F, G et H.	179
Figure 48.	Evolution des rapports atomiques C/Si, C(284,4 eV)/Si, C(286,5 eV)/Si et O/Si.	181
Figure 49.	Spectre FTIR en transmission du dépôt A, synthétisé sur un coupon de silicium intrinsèque.	183
Figure 50.	Spectre Raman du dépôt A, synthétisé sur un coupon d'acier inoxydable.	185
Figure 51.	Spectre FTIR en transmission du dépôt I, synthétisé sur un coupon de silicium intrinsèque, en ajoutant de l'oxygène au précurseur organosilicié.	186
Figure 52.	Spectres FTIR en transmission des dépôts nanocomposites A à H (quantité d'argent croissante), synthétisés sur des coupons de silicium intrinsèque.....	188
Figure 53.	Agrandissement de la zone comprise entre 400 et 2000 cm ⁻¹ des spectres FTIR en transmission des dépôts nanocomposites A à H.	189
Figure 54.	Spectre Raman des dépôts nanocomposites A, B et D, synthétisés sur des coupons d'acier inoxydable.	191
Figure 55.	Profils en épaisseur des ions négatifs Ag ⁻ , Si ⁻ , SiO ⁻ , O ⁻ , C ⁻ , FeO ⁻ et CrO ⁻ , obtenus par analyse ToF-SIMS avec des ions Bi ⁺ , pour les dépôts B et G.	194
Figure 56.	Profils de détachement obtenus pour les levures <i>S. cerevisiae</i> BY4741 préalablement adhérees à la surface d'un coupon d'acier inoxydable vierge nettoyé par acétone/éthanol (●), à la surface d'un coupon recouvert du dépôt A de matrice SiC _x O _y H _z (○) et à la surface d'un coupon recouvert du dépôt I de matrice SiO _x (▼)...	203

- Figure 57. Photographies en microscopie optique des levures *S. cerevisiae* BY4741 initialement adhérees (1^{ère} ligne) et restant adhérees après l'application d'une contrainte de cisaillement de 1 Pa (2^{ème} ligne), sur la surface d'un coupon d'acier inoxydable vierge nettoyé par acétone/éthanol (a), du dépôt A de matrice organosiliciée (b) et du dépôt I de matrice siliciée (c).....205
- Figure 58. Profils de détachement obtenus pour les levures *S. cerevisiae* BY4741 préalablement adhérees à la surface d'un coupon d'acier inoxydable vierge nettoyé par acétone/éthanol (●) et à la surface des coupons recouverts des dépôts A (○), B (▼), C (▲) et D (■) (NaCl 0,15 M).209
- Figure 59. Rapport entre le nombre d'UFC et le nombre de levures récupérées après 24 h de contact avec l'acier inoxydable et les dépôts A, B et D, en solution saline.212
- Figure 60. Cinétique de relargage de l'argent par le dépôt nanocomposite C, évaluée par ICP-MS jusqu'à 28 jours d'exposition dans de l'eau osmosée.214
- Figure 61. Spectres FTIR bruts des levures *S. cerevisiae*, au niveau de la région 1800 – 800 cm⁻¹, enregistrés sur les échantillons (a), (b), (c), (d) et (e). Les décalages des bandes amide I et amide II dans le cas des levures après contact avec le dépôt nanocomposite (e), par rapport aux levures « contrôle » viables (b) et aux levures « contrôle » mortes (a), sont indiqués sur la figure.218
- Figure 62. Liaison peptidique indiquant le mouvement d'étirement (« stretching ») de la liaison C=O (bande amide I) et le mouvement de déformation (« bending ») de la liaison N–H (bande amide II).....219
- Figure 63. Dérivées secondes des spectres FTIR obtenus sur les échantillons (a), (b), (c), (d) et (e), dans la région de la bande amide I (1700-1580 cm⁻¹).....220
- Figure 64. Représentation graphique du résultat de l'ACP présentant la dispersion des spectres en dérivées secondes dans la gamme de nombres d'onde 1700-1580 cm⁻¹ (*i.e.*, bande amide I), selon les composantes principales CP1 et CP2.....221
- Figure 65. Photographies en MET de coupes ultrafines (~ 90 nm d'épaisseur) de *S. cerevisiae* BY4741.224
- Figure 66. Cartographie de la composition cellulaire de *S. cerevisiae* BY4741 par MET-EDS : (i) levures après 24 h en suspension dans la solution saline (NaCl 0,15 M) ; (ii) levures après 2 h d'exposition à une concentration létale de AgNO₃ (2 mM, dans de l'eau osmosée) ; (v) levures après 24 h de contact avec le dépôt nanocomposite D en solution saline. La colonne de gauche correspond à la photographie des levures en MET. Les colonnes suivantes correspondent à l'analyse par EDS des éléments N, S, P et Ag.227
- Figure 67. Résultats des tests effectués par méthode MATS sur les bactéries *S. aureus* et *E. coli*, prélevées en phase stationnaire de croissance.230

Figure 68.	Rapport entre le nombre d'UFC et le nombre de bactéries <i>S. aureus</i> MW2 récupérées après 4 h de contact avec l'acier inoxydable et le dépôt nanocomposite D, en solution saline (NaCl 0,15 M).	231
Figure 69.	Rapport entre le nombre d'UFC et le nombre de bactéries <i>E. coli</i> K12 MG1655 récupérées après 4 h de contact en solution saline (NaCl 0,15 M) avec l'acier inoxydable et le dépôt nanocomposite D.....	232
Figure 70.	Composition et structure de la paroi des bactéries à Gram négatif (d'après Corvec, 2009).....	233
Figure 71.	Composition et structure de la paroi des bactéries à Gram positif (d'après Corvec, 2009).....	234
Figure 72.	Composition et structure pariétale des levures (d'après Martin-Yken <i>et al.</i> , 2002).	235
Figure 73.	Profils de détachement obtenus pour les levures <i>S. cerevisiae</i> BY4741 préalablement adhérees à la surface d'un coupon recouvert du dépôt nanocomposite D : première utilisation (●) et seconde utilisation (○) du dépôt (NaCl 0,15 M).....	241
Figure 74.	Rapport entre le nombre d'UFC et le nombre de levures <i>S. cerevisiae</i> BY4741, récupérées après 24 h de contact avec le dépôt A de matrice organosiliciée et le dépôt nanocomposite D, lors de chaque utilisation (NaCl 0,15 M).	243
Figure 75.	Photographie en MET d'une coupe ultrafine de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 après 24 h de contact avec le dépôt nanocomposite D utilisé pour la seconde fois.	244
Figure 76.	Photographies en MEB du dépôt nanocomposite D natif, après une expérience de détachement réalisée en chambre à écoulement cisailé et après un test de toxicité.	245
Figure 77.	Spectres de haute résolution des niveaux de cœur et pic Auger obtenus par analyse XPS du dépôt nanocomposite D après une première expérience de détachement.	246
Figure 78.	Evolution de la composition du dépôt nanocomposite D (ratios atomiques de C/Si, O/Si, Ag _{métal} /Si et Ag _{oxydé} /Si), avant et après utilisation en chambre à écoulement cisailé ou en test de toxicité.	247
Figure 79.	Photographies en MET du dépôt nanocomposite D : natif et vieilli 15 jours en solution saline (NaCl 0,15 M). Les deux photographies sont réalisées à la même échelle.....	252
Figure 80.	Analyses par spectroscopie EDS du dépôt nanocomposite D : a) natif et b) vieilli 15 jours en solution saline (NaCl 0,15 M).....	254
Figure 81.	Spectres Raman du dépôt nanocomposite D natif et vieilli 15 jours en solution saline (NaCl 0,15 M).....	255
Figure 82.	Profils en épaisseur des ions négatifs Ag ⁻ , Si ⁻ , O ⁻ , SiO ⁻ , C ⁻ , FeO ⁻ et CrO ⁻ , obtenus par ToF-SIMS, pour le dépôt nanocomposite B natif (a) et après 60 jours d'immersion dans la solution saline (NaCl 0,15 M) (b).....	257
Figure 83.	Schéma de principe de la photo-émission.....	297
Figure 84.	Schéma de principe de l'accélérateur d'électrons Synchrotron SOLEIL.....	300

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1.	Principaux paramètres influençant l'adhésion des microorganismes aux surfaces.	27
Tableau 2.	Composition de l'acier inoxydable austénitique AISI 316L (source : Euro Inox).	45
Tableau 3.	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de différentes bactéries à Gram positif et à Gram négatif, traitées par de la sulfadiazine d'argent (d'après Yin <i>et al.</i> , 1999).	66
Tableau 4.	Effet multi-factoriel des ions Ag ⁺ sur les cellules procaryotes et eucaryotes.	67
Tableau 5.	Exemples de technologies dédiées à la synthèse de revêtements de surface contenant de l'argent.	72
Tableau 6.	Domaines d'application de produits contenant des nanoparticules d'argent.	82
Tableau 7.	Paramètres opératoires (consignes et <i>paramètres suivis</i>) utilisés pour la synthèse des dépôts par procédé plasma.	110
Tableau 8.	Résumé des traitements réalisés pour modifier les surfaces d'acier inoxydable.	138
Tableau 9.	Composition de la couche de contamination présente en surface des échantillons d'acier inoxydable après les différents traitements.	140
Tableau 10.	Composition de la couche passive des échantillons d'acier inoxydable après les différents traitements.	142
Tableau 11.	Paramètres opératoires (consignes et <i>paramètres suivis</i>) choisis pour l'étude de l'influence de la pression de HMDSO dans le réacteur sur la composition des dépôts nanocomposites.	153
Tableau 12.	Epaisseur de quatre dépôts synthétisés par procédé plasma.	157
Tableau 13.	Rugosité arithmétique de la surface des cinq dépôts A, B, E, H et I, déterminée par profilométrie optique.	161
Tableau 14.	Composition des dépôts nanocomposites (concentrations atomiques en Ag, Si, C et O et rapports atomiques Ag/Si, C/Si et O/Si) déterminée par spectroscopie XPS.	167
Tableau 15.	Angle de contact avec l'eau déionisée, déterminée par la méthode de la goutte posée sur les dépôts A à I.	197
Tableau 16.	Nombre de levures initialement adhérees (N ₀) sur les différentes surfaces et contraintes de cisaillement nécessaires au détachement de 2% ($\tau_{p\ 2\%}$), 50% ($\tau_{p\ 50\%}$) et 90% ($\tau_{p\ 90\%}$) des cellules initialement adhérees.	204
Tableau 17.	Nombre de levures initialement adhérees (N ₀) sur les différentes surfaces et contraintes de cisaillement nécessaires au détachement de 2% ($\tau_{p\ 2\%}$), 50% ($\tau_{p\ 50\%}$) et 90% ($\tau_{p\ 90\%}$) des cellules initialement adhérees.	208
Tableau 18.	Nombre de levures initialement adhérees (N ₀) à la surface du dépôt nanocomposite D et contraintes de cisaillement $\tau_{p\ 2\%}$, $\tau_{p\ 50\%}$ et $\tau_{p\ 90\%}$ pour chaque utilisation.	241
Tableau 19.	Evolution du contenu et de l'état d'oxydation de l'argent en surface du dépôt nanocomposite D, au cours de 6 h d'immersion dans la solution saline.	250

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

Liste des publications

Saulou C., B. Despax, P. Raynaud, S. Zanna, P. Marcus, M. Mercier-Bonin (2009). Plasma-engineered polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of microbial adhesion, *Solid State Phenomena*, 151, 95-100.

Saulou C., B. Despax, P. Raynaud, S. Zanna, P. Marcus, M. Mercier-Bonin (2009). Plasma deposition of organosilicon polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of microbial adhesion, *Applied Surface Science*, doi: 10.1016/j.apsusc.2009.04.118.

Saulou C., B. Despax, P. Raynaud, S. Zanna, P. Marcus, M. Mercier-Bonin (2009). Plasma-mediated modification of austenitic stainless steel : application to the prevention of yeast adhesion, *Plasma Processes and Polymers* (acceptée pour publication en juillet 2009).

Saulou C., F. Jamme, C. Maranges, I. Fourquaux, B. Despax, P. Raynaud, P. Dumas, M. Mercier-Bonin (2009). A synchrotron FTIR spectromicroscopy of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to plasma-deposited nanosilver-containing coating, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (soumise et révisée).

Zanna S., C. Saulou, M. Mercier-Bonin, B. Despax, P. Raynaud, A. Seyeux, P. Marcus (2009). Ageing of plasma-mediated coatings with embedded silver nanoparticles on stainless steel: an XPS and ToF-SIMS investigation, *Applied Surface Science* (soumise).

Liste des communications

Présentations orales

* : orateur

Bedjaoui M.*, **Saulou C.**, Guillemot G., Mercier-Bonin M., Despax B., Raynaud P., PECVD nanosilver embedded in organosilicon matrix for prevention of microbial adhesion, 16th European Conference on Chemical Vapor Deposition (EuroCVD-16), 16-21 septembre 2007, La Hague (Pays-Bas)

Saulou C.*, Ingénierie des surfaces par procédé de dépôt plasma : application à la prévention de l'adhésion microbienne, 1ères Journées des Jeunes Chercheurs du Réseau PNIR - Biofilms (Programme National à Implantation Régionale), 5-6 novembre 2007, Paris (France)

Despax B.*, **Saulou C.**, Bedjaoui M., Raynaud P., Guillemot G., Mercier-Bonin M., Archambeau C., LePen C., Choquet P., Silver nanoparticle-containing polysiloxane films for prevention of microbial colonization, ITFPC 2007 - Innovations on Thin Films Processing and Characterization, 20 novembre 2007, Nancy (France)

Raynaud P.*, **Saulou C.**, Guillemot G., Mercier-Bonin M., Despax B., Plasma-engineered polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of fungal biofilm formation, 3rd Nanotechnology Transfer Executive Summit in Europe, 3-4 décembre 2007, Paris (France)

Saulou C.*, Despax B., Raynaud P., Zanna S., Marcus P., Mercier-Bonin M., Plasma-engineered polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of microbial adhesion, E-MRS Fall Meeting - European Materials Research Society, 15-19 septembre 2008, Varsovie (Pologne)

Saulou C.*, Despax B., Raynaud P., Zanna S., Marcus P., Mercier-Bonin M., Plasma deposition of organosilicon polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of microbial adhesion, NAPOLYDE Workshop « Current trends in nanostructured polymer and sol-gel thin films », 15-19 septembre 2008, Varsovie (Pologne)

Saulou C.*, Ingénierie des surfaces par procédé de dépôt plasma : application à la prévention de l'adhésion microbienne, Journée Scientifique FERMaT – Fédération pour l'Étude des Réacteurs et la Maîtrise des Transferts, 7 octobre 2008, Toulouse (France)

Despax B.*, **Saulou C.**, Mercier-Bonin M., Raynaud P., Zanna S., Marcus P., LePen C., Choquet P., Deposits of silver nanoparticle-containing plasma polymer – Prevention of biological surface contamination, ISPC 19 – 19th International Symposium on Plasma Chemistry, 26-31 juillet 2009, Bochum (Allemagne)

Zanna S.*, Wang C., Despax B., Raynaud P., **Saulou C.**, Mercier-Bonin M., Seyeux A., Marcus P., Plasma-mediated nanosilver-containing coating on stainless steel for the prevention of fungal biofilms : an aging investigation using XPS and ToF-SIMS, EUROCORR 2009 – European Corrosion Congress, 6-11 septembre 2009, Nice (France)

Posters

Bedjaoui M., **Saulou C.**, Guillemot G., Mercier-Bonin M., Despax B., Raynaud P., PECVD nanosilver embedded in organosilicon matrix for prevention of microbial adhesion, 16th European Conference on Chemical Vapor Deposition (EuroCVD-16), 16-21 septembre 2007, La Hague (Pays-Bas)

Saulou C., Despax B., Raynaud P., Zanna S., Marcus P., Mercier-Bonin M., Plasma-engineered stainless steel to prevent biofilm formation in medical and agro-food applications, 4th ASM Conference on Biofilms – American Society of Microbiology, 25-29 mars 2007, Québec (Canada)

Saulou C., Bedjaoui M., Guillemot G., Despax B., Raynaud P., Mercier-Bonin M., Plasma-engineered polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of fungal biofilm formation, CIP 2007 – 16th International Colloquium on Plasma Processes, 4-8 juin 2007, Toulouse (France)

Saulou C., Despax B., Raynaud P., Zanna S., Marcus P., Mercier-Bonin M., Plasma-engineered stainless steel for prevention of microbial adhesion in medical and agro-food applications, III Biofilm International Conference, 6-8 octobre 2008, Munich (Allemagne)

Lebleu N., **Saulou C.**, Saria R., Allion A., Nouaille S., Portais J.-C., Despax B., Raynaud P., Mercier-Bonin M., Prevention of biofilm on stainless steel: evaluation of anti-adhesive and antimicrobial properties of silver nanocomposite thin films, EUROBIOFILMS 2009 - 1st European Congress on Microbial Biofilms, 2-5 septembre 2009, Rome (Italie)

INTRODUCTION GENERALE

Les biofilms sont définis comme des écosystèmes complexes et dynamiques, constitués d'une communauté de microorganismes (vivants et morts), adhérents entre eux et à une surface réceptrice. Au sein du biofilm, les cellules sont englobées dans une matrice extracellulaire, composée essentiellement de protéines, de polysaccharides et de sels, leur offrant une protection face aux variations des conditions environnementales (pH, température), aux agents antimicrobiens, aux produits chimiques de nettoyage et de désinfection et aux mécanismes de défense immunitaire de leur hôte. Il est aujourd'hui admis que cette organisation constitue le mode de vie naturel et privilégié des organismes unicellulaires.

Les biofilms résultent de l'adhésion, puis du développement des microorganismes (bactéries, champignons, algues, protozoaires) sur les surfaces, naturelles ou artificielles, exposées à des environnements humides non stériles. Ils sont donc ubiquitaires et présentent de nombreux aspects positifs. Ils assurent notamment des fonctions physiologiques primordiales, aussi bien pour les végétaux (phénomènes de symbiose par colonisation de la surface des racines et des feuilles) que pour les organismes vivants supérieurs au sein desquels ils garantissent la protection contre les pathogènes (tractus intestinal, appareil urogénital). Par ailleurs, leurs propriétés sont mises à profit dans les procédés de fermentation, la dégradation de substances polluantes dans les sols, le traitement des effluents gazeux ou la biolixiviation des métaux (stations d'épuration).

Cependant, la colonisation microbienne des surfaces est de plus en plus souvent identifiée comme la source de problèmes industriels et sociétaux sévères, dans des domaines très divers. Ce phénomène est ainsi à l'origine d'une diminution des rendements et d'une augmentation des coûts de production dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques, notamment en raison de la corrosion des matériaux d'équipement (« biocorrosion »), de l'encrassement des échangeurs de chaleur ou encore du colmatage des membranes de filtration. D'autres secteurs, tels que l'industrie papetière, l'industrie textile ou les installations d'aquaculture, sont concernés par la contamination microbienne des surfaces et cherchent à mettre en œuvre des stratégies efficaces pour la limiter.

Le développement microbien sur les surfaces est également à l'origine d'importants problèmes de santé publique. Ainsi, la présence de contaminants biologiques sessiles (*i.e.*, adhérents au support) dans les réseaux de distribution d'eau potable, les circuits de refroidissement et les systèmes de ventilation et de climatisation, peut favoriser la survenue et le développement de pathogènes (ex. : *Legionella*), qui sont ensuite disséminés dans l'environnement.

Les industries agro-alimentaires (*e.g.* laiteries, brasseries, salaisonneries) sont également confrontées à l'adhésion des microorganismes sur les parois des équipements (cuves, canalisations, pompes), malgré des procédures de nettoyage/désinfection systématiques. Ces microorganismes peuvent non seulement entraîner la dégradation prématurée des équipements et l'altération des propriétés organoleptiques des produits en cours de fabrication, mais également favoriser le développement de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Selon un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire, 1095 foyers de TIAC ont été déclarés en 2007 à la Ddass et à la

Direction des Services Vétérinaires, correspondant à 11440 cas. Environ 7% de ces infections ont conduit à une hospitalisation avec 5 cas mortels avérés. Les principaux agents bactériens sont *Staphylococcus aureus* (25,6%), *Salmonella* spp. (23,4%), *Bacillus cereus* (10,4%) et *Clostridium perfringens* (10,0%).

En milieu hospitalier, les microorganismes peuvent coloniser les surfaces des instruments chirurgicaux et des dispositifs implantables (prothèses, stents, valves cardiaques) et percutanés (cathéters), mais aussi les équipements et les murs des salles d'intervention. Ils sont à l'origine d'infections au niveau des tissus corporels (poumons, voies oto-rhino-laryngologiques, dents, tractus urogénital, etc.), provoquent des réactions de rejet de greffes et sont également impliqués dans certaines maladies nosocomiales. En outre, les biofilms issus de ce développement microbien constituent de véritables réservoirs pour les organismes pathogènes, leur permettant de persister dans le milieu, ce qui cause des infections potentiellement sévères.

Dans le cadre de cette problématique, l'amélioration de la sécurité alimentaire ou médicale est nécessairement couplée à la maîtrise de l'hygiène des surfaces solides en contact avec les milieux biologiques. Les stratégies curatives, basées sur l'application de procédures de nettoyage/désinfection ou l'utilisation massive d'agents antibiotiques, s'avèrent souvent inefficaces du fait de la résistance accrue des microorganismes sous forme de biofilms, et même néfastes pour l'environnement et la santé humaine (*i.e.*, émergence de souches microbiennes multi-résistantes). Le développement d'approches préventives, ciblées sur les phases précoces de la formation du biofilm, constitue donc une alternative intéressante. Le processus de « bio-adhésion », qui constitue la première étape de la colonisation microbienne, dépend notamment de la nature et des caractéristiques physico-chimiques de la surface solide. Ainsi, de nombreux travaux de recherche se focalisent sur la conception de matériaux ou de traitements de surface innovants, afin de prévenir ou, tout du moins, de contrôler cette étape d'adhésion initiale. Face aux exigences grandissantes des consommateurs, à une réglementation de plus en plus stricte et dans le but de garantir la santé des personnes, l'élaboration de surfaces anti-adhésives et/ou antimicrobiennes constitue l'un des enjeux majeurs de l'industrie agro-alimentaire et du domaine biomédical.

C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon travail de thèse, dont l'objectif est de mettre au point un traitement de surface de l'acier inoxydable austénitique, combinant une efficacité anti-adhésive à des propriétés antimicrobiennes vis-à-vis de différents microorganismes cibles (eucaryote/procaryote, bactéries à Gram positif/Gram négatif), représentatifs des applications visées. Parmi les nombreuses techniques développées dans l'optique de prévenir la colonisation microbienne (*e.g.* adsorption de molécules, immobilisation covalente d'enzymes, procédés « sol-gel »), les procédés basés sur les plasmas « froids » présentent des potentialités très intéressantes pour modifier les surfaces (*e.g.* traitement en une seule étape, fiable et reproductible, applicable à

tous les matériaux, pour un coût faible et un impact environnemental réduit). Le procédé mis en œuvre dans notre travail est basé sur le couplage de la polymérisation par plasma d'un monomère organosilicié et de la pulvérisation d'une cible d'argent par bombardement ionique. L'objectif est de moduler les caractéristiques physico-chimiques de la surface d'acier inoxydable, par la formation d'un film « barrière » vis-à-vis de l'adhésion microbienne, et d'incorporer simultanément l'agent biocide, sous forme de nano-inclusions d'argent, afin d'éradiquer les microorganismes parvenant à interagir avec la surface. L'optimisation des propriétés des films minces nanocomposites ainsi synthétisés (résistance mécanique, teneur en argent, caractéristiques physico-chimiques) a été réalisée grâce à caractérisation approfondie et quasi-exhaustive, d'une échelle macroscopique à une échelle atomique.

L'étude s'est ensuite focalisée sur l'évaluation et la quantification des propriétés anti-adhésives et antimicrobiennes des dépôts. Une partie du travail a également été dédiée à la compréhension fine des effets observés sur les microorganismes, dans l'optique de définir les mécanismes mis en jeu. L'originalité de ce travail de thèse réside dans l'amplitude et la complémentarité des techniques d'analyse mises en œuvre, permettant de corrélérer les caractéristiques physiques et physico-chimiques des films nanocomposites à leur efficacité anti-adhésive et biocide et d'appréhender de manière rigoureuse leur action préventive sur la colonisation microbienne.

La littérature relative aux contaminations des surfaces par les levures étant moins étendue que celle concernant la colonisation bactérienne, la stratégie adoptée a été testée dans un premier temps sur un microorganisme eucaryote, *Saccharomyces cerevisiae*. Cette levure est capable d'adhérer et de coloniser de nombreuses surfaces plastiques (ex. : polystyrène, polypropylène, silicone), ainsi que l'acier inoxydable austénitique, principal matériau d'équipement dans le secteur industriel, également utilisé pour la conception d'outils chirurgicaux et d'implants. Elle est impliquée dans la contamination de produits alimentaires, notamment de boissons non alcoolisées et fermentées, et constitue de ce fait une cible spécifique dans la réglementation relative aux procédures de nettoyage et de désinfection des équipements industriels. L'étude de *S. cerevisiae* présente également un intérêt du point de vue du secteur biomédical, du fait de sa parenté génétique avec la levure pathogène *Candida albicans*. En effet, les stratégies mises en œuvre sur *S. cerevisiae* pourraient être extrapolées à *C. albicans*. La conservation des fonctions cellulaires chez les organismes eucaryotes font de *S. cerevisiae* un système expérimental de référence, très utilisé en recherche fondamentale pour l'étude des processus cellulaires et moléculaires communs aux eucaryotes.

Dans l'objectif d'évaluer puis de comparer l'efficacité de notre approche sur des modèles procaryotes, une étude a également été réalisée sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, bactéries à Gram positif et à Gram négatif, respectivement. *S. aureus* constitue l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus* et représente un problème majeur de santé publique. Germe opportuniste et ubiquitaire, cette bactérie est responsable d'intoxications alimentaires, dont les

vecteurs les plus courants sont la viande et les crèmes glacées. Elle est également à l'origine de nombreuses pathologies (pneumonies, infections des voies urinaires, etc.) et constitue l'un des principaux agents microbiens provoquant des infections nosocomiales. En outre, cette bactérie présente la capacité d'adhérer aux surfaces des cathéters et d'autres dispositifs implantables, ainsi qu'à l'acier inoxydable. L'implication de *S. aureus* dans des infections potentiellement graves justifie le choix de ce microorganisme comme modèle pour la mise en œuvre de stratégies destinées à combattre la colonisation bactérienne. *E. coli* représente, quant à lui, le modèle de référence chez les organismes procaryotes, d'un point de vue fondamental. En termes applicatifs, certaines souches sont reconnues comme des sources de contamination, notamment dans l'industrie agro-alimentaire. En effet, ce microorganisme peut adhérer à l'acier inoxydable et se développer dans les aliments mal stérilisés, tels le lait, les plats cuisinés ou la viande. Cette bactérie est donc considérée comme une cible pour l'élaboration de traitements destinés à limiter son développement sur les surfaces. Certaines souches, comme *E. coli* O157:H7, sont pathogènes et leur développement sur la surface des dispositifs médicaux implantables entraîne des complications sévères pour le patient, nécessitant un retrait de l'implant et un traitement antibiotique adapté. Ainsi, les stratégies mises au point sur cette bactérie à Gram négatif pourront ensuite être adaptées aux espèces impliquées dans la contamination des produits alimentaires ou les infections nosocomiales.

Notre choix s'est également orienté sur ces trois microorganismes, en raison des spécificités de structure et de composition de leur paroi. En effet, la paroi, élément le plus externe de la cellule, détermine les propriétés de surface (charge, hydrophobie, porosité) et constitue la structure qui entre directement en contact avec le support solide. Sa composition et son architecture diffèrent en fonction du microorganisme considéré (eucaryote/procaryote, bactérie à Gram positif / bactérie à Gram négatif). Il est donc intéressant d'étudier des souches représentatives de chaque classe microbienne, et plus précisément d'évaluer et de comparer leur adhésion aux surfaces modifiées et leur résistance à l'agent biocide utilisé, afin de déterminer l'influence de leurs propriétés intrinsèques sur ces mécanismes.

La réalisation de ce projet nécessitait une approche interdisciplinaire incluant plusieurs domaines scientifiques, comme la microbiologie, la physico-chimie, la physique, la mécanique des fluides, ainsi que l'utilisation de techniques d'observation et d'analyse à des échelles complémentaires (du macroscopique au moléculaire), aussi bien pour la caractérisation et l'optimisation des films nanocomposites que pour l'étude et la compréhension des réponses microbiennes. Ce travail de thèse a donc été mené en coopération avec différents partenaires, dans le cadre du projet ANR « Biopleasure » (2007-2010).

ETAT DE L'ART

CHAPITRE I – L'ADHESION MICROBIENNE AUX SURFACES : UN PHENOMENE MULTIFACTORIEL PROVOQUANT DE NOMBREUX IMPACTS NEGATIFS DANS LES SECTEURS AGRO-ALIMENTAIRE ET BIOMEDICAL

Introduction

L'adhésion microbienne aux surfaces solides constitue l'étape initiale de la formation des biofilms, comme nous le décrivons dans la première partie de ce chapitre. Ce processus est régi par de nombreux facteurs, liés à la fois aux caractéristiques des microorganismes, du support et de l'environnement aqueux. L'influence des paramètres les plus significatifs, répertoriés dans la littérature, sera exposée dans la deuxième partie. En effet, la compréhension et la maîtrise de leurs effets sur l'adhésion s'avèrent essentiels, dans l'optique de concevoir des stratégies efficaces de contrôle de la colonisation microbienne, *via* la prévention de l'attachement ou l'amélioration de l'élimination des microorganismes. L'adhésion et le développement des bactéries et des levures sur les surfaces solides peuvent être à l'origine de graves conséquences dans différents secteurs, tels le domaine biomédical et chirurgical, l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire, ou le traitement de l'eau et des effluents. Par conséquent, la recherche dédiée à la conception de stratégies préventives ou curatives constitue un secteur en plein essor.

I – L'adhésion aux surfaces solides : première étape de la formation des biofilms

Pour de nombreuses espèces bactériennes et fongiques, le processus de formation d'un biofilm se déroule en plusieurs étapes successives (Figure 1). En quelques minutes, des composés organiques (fragments protéiques et osidiques) et des éléments minéraux (sels) sont adsorbés sur la surface. Ce mélange complexe est appelé film conditionnant. Puis, des microorganismes planctoniques, se déplaçant grâce à leurs flagelles ou transportés à proximité de la surface par mouvement brownien ou par sédimentation, adhèrent de manière réversible à cette surface « conditionnée », principalement par des liaisons chimiques non covalentes (liaisons électrostatiques, hydrophobes, de van der Waals et acide/base de Lewis). Lorsque ces liaisons sont maintenues pendant un laps de temps suffisant, de nouveaux mécanismes chimiques et physiques se mettent en place et les rendent permanentes et irréversibles. L'attachement des cellules à la surface induit en effet une cascade de changements physiologiques, conduisant dans la plupart des cas à la production de substances exopolymériques (EPS, principalement composées de protéines et de polysaccharides), qui constituent la matrice extracellulaire protectrice et augmentent la capacité d'ancrage des microorganismes à la surface. L'adhésion devient alors irréversible avec, de

ce fait, un accroissement de l'énergie mécanique nécessaire pour rompre les liaisons mises en jeu. Enfin, le biofilm se développe et acquiert une structure tridimensionnelle complexe : les microorganismes se multiplient par divisions cellulaires, communiquent *via* des molécules signal (« quorum sensing ») et orientent leur métabolisme afin de s'adapter à leur état sessile. Cette étape est fortement influencée par les conditions environnementales (température, humidité, pH, nature de la surface). Le biofilm mature se développe jusqu'à atteindre une épaisseur parfois millimétrique. Suite à certains stress, tels des carences nutritionnelles ou des modifications physico-chimiques de l'environnement, des microorganismes, individuels ou groupés au sein de fragments, peuvent retourner à l'état planctonique et coloniser d'autres surfaces. Un cycle de croissance et de dispersion cellulaire s'établit ainsi, favorisant la dissémination des microorganismes et la prolifération des pathogènes.

L'adhésion initiale des microorganismes au support constitue donc une étape cruciale dans le développement ultérieur des biofilms. Par conséquent, les stratégies visant à limiter, voire inhiber cette phase précoce constituent une approche pertinente pour prévenir la colonisation microbienne des surfaces solides.

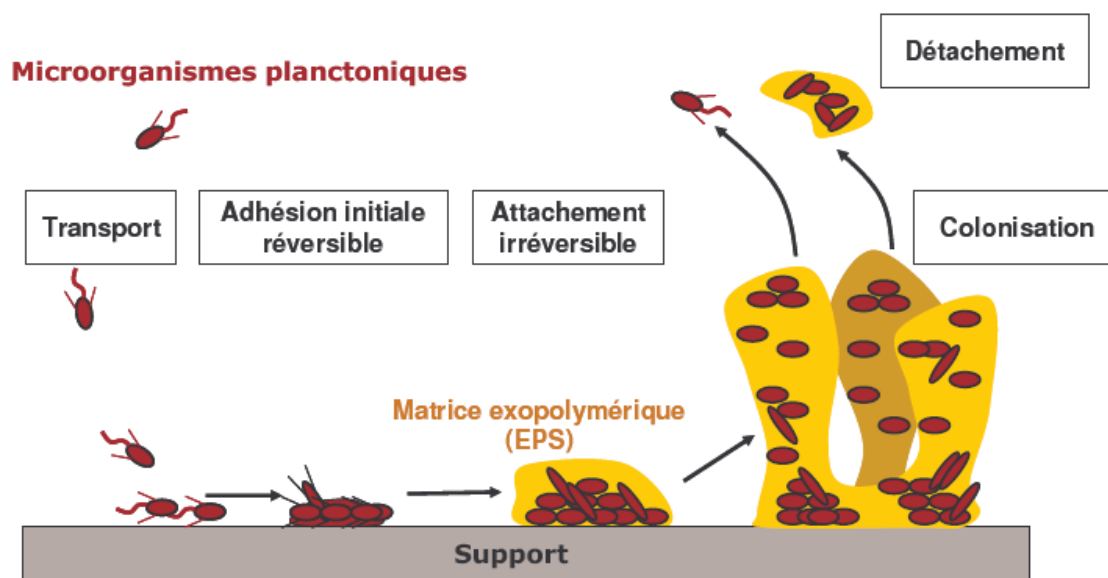


Figure 1. Modèle de formation d'un biofilm sur une surface solide (d'après Filloux et Vallet, 2003).

II - Paramètres influençant l'adhésion des microorganismes au support

L'étude des facteurs impliqués dans l'adhésion initiale des microorganismes aux supports fait l'objet d'une partie importante de la littérature dans le domaine. Il est aujourd'hui reconnu que de multiples paramètres, liés à la fois au microorganisme, à la surface solide et au milieu environnant, influencent cet attachement initial (Palmer *et al.*, 2007). Le poids relatif de ces caractéristiques biologiques, métaboliques, physiques et chimiques dépend de la souche microbienne étudiée. Cependant, ces facteurs doivent être considérés avec attention, afin de développer des stratégies efficaces pour prévenir la colonisation microbienne. L'influence des paramètres les plus significatifs, synthétisée dans le Tableau 1, est développée ci-après.

Tableau 1. Principaux paramètres influençant l'adhésion des microorganismes aux surfaces.

Facteurs liés au support	Facteurs liés au microorganisme	Facteurs liés à l'environnement
Contaminations organiques	Concentration microbienne	Temps de contact
Film conditionnant	Espèce	Température
Nature chimique de la surface	Composition et structure de la surface cellulaire	Force ionique et nature des sels
Rugosité et « micro-topographie »	Caractéristiques physico-chimiques de la surface microbienne (hydrophobie, charge)	pH
Charge de surface	Phase de croissance (état physiologique)	Présence de macromolécules, de surfactants et d'éléments nutritifs
Hydrophobie	Adaptation phénotypique	Conditions hydrodynamiques

A – Facteurs liés au support

1 – Contamination

Une surface solide est systématiquement recouverte d'une couche de contamination organique, du fait de la pollution atmosphérique (Rouxhet et Mozes, 1990 ; Compère *et al.*, 2001 ; Landoulsi *et al.*, 2008). Après avoir été nettoyées, les surfaces telles que le verre, les plastiques ou les matériaux métalliques sont enclines à se re-contaminer afin d'acquérir un état thermodynamiquement stable (diminution de leur énergie de surface).

2 – Film conditionnant

Tout matériau exposé à un milieu aqueux est inévitablement contaminé par des macromolécules (ex. : protéines, polysaccharides) et des composés inorganiques (sels, minéraux) dissous dans le milieu, qui viennent s'adsorber à la surface dès les premières minutes suivant l'immersion. Cet assemblage de molécules à l'interface solide/liquide, appelé « film conditionnant », entraîne une

modification significative des caractéristiques physiques et chimiques du support (rugosité, hydrophobie, charge) et influence positivement ou négativement l'adhésion microbienne (Donlan, 2002 ; Beloin *et al.*, 2008). Bien que certaines études aient reporté une diminution, probablement due à la compétition entre les microorganismes et les protéines présentes dans le fluide pour l'accrochage aux sites de liaison de la surface (Fletcher, 1976 ; Parker *et al.*, 2001), la plupart des auteurs s'accordent sur la nécessité de cette couche « primaire » pour favoriser l'ancrage microbien.

De plus, lorsque les microorganismes sont détachés d'une surface par contraintes mécaniques ou hydrodynamiques, des constituants de leur membrane ou de leur paroi peuvent rester adhérents au support et favoriser un attachement microbien ultérieur (Donlan, 2002).

3 – Nature chimique de la surface

Le type de surface rencontré par les microorganismes impacte fortement le développement du biofilm, notamment la première étape d'adhésion. Ainsi, Gristina *et al.* (1987) ont montré que *Staphylococcus epidermidis* adhère préférentiellement aux matériaux polymériques et *S. aureus* aux métaux, en raison des différences de composition chimique et de la polarité de ces surfaces. Par ailleurs, parmi plusieurs sutures chirurgicales résorbables, celles fabriquées en polydioxanone présentent une affinité faible vis-à-vis de l'adhésion des bactéries *E. coli* et *S. aureus*, par rapport aux sutures en Dexon® (Chu and Williams, 1984). Ceci est également valable dans le cas des levures. En effet, Gallardo-Moreno *et al.* (2004) ont établi une relation entre la nature polaire du support et le type d'interactions agissant sur l'adhésion initiale des levures *C. parapsilosis*. Bien d'autres exemples de la littérature tendent à prouver l'importance de la nature chimique du support dans le processus d'adhésion (Zanna *et al.*, 2005 ; Götzinger *et al.*, 2007). Toutefois, il est difficile de discriminer ce facteur des nombreux autres paramètres mis en jeu (rugosité, charge de surface) et d'identifier clairement la part de chacun d'eux.

4 – Rugosité et micro-topographie

La rugosité du support est l'un des paramètres les plus discutés dans la littérature. En effet, il semble que l'adhésion microbienne peut être influencée positivement ou négativement, selon la topographie de la surface (rugosité, largeur et profondeur des « micro-crevasses », présence de rayures) et la taille du microorganisme. Ainsi, pour certains auteurs, la présence de fissures et de « micro-crevasses » augmente l'aire de contact et peut favoriser l'adhésion en protégeant les microorganismes, notamment les bactéries, des phénomènes de cisaillement hydrodynamique et des agents chimiques de désinfection (Pedersen, 1990 ; McAllister *et al.*, 1993 ; Lecleroq-Perlat et Lalande, 1994 ; Arnold et Bailey, 2000). Une étude de Jullien *et al.* (2002) suggère que la « micro-topographie » d'une surface d'acier inoxydable évite le détachement des microorganismes « protégés » dans les trous et les éraflures, ce qui permet une reprise plus rapide de la colonisation, une fois le nettoyage terminé. De même, Whitehead *et al.* (2005) ont montré que des

surfaces de titane, présentant des trous de taille similaire ou supérieure à celle des bactéries *S. aureus* (diamètre $\sim 0,5-1 \mu\text{m}$) et *Pseudomonas aeruginosa* ($1 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$), ainsi que des cellules filles de levures *C. albicans* (diamètre $\sim 2 \mu\text{m}$), offrent une meilleure rétention. Pour d'autres auteurs, la rugosité n'a pas d'influence sur l'initiation du biofilm (Vanhaecke *et al.*, 1990 ; Rodriguez *et al.*, 2008) et celui-ci se forme inévitablement après une période de temps plus ou moins longue. Ainsi, Flint *et al.* (2000) n'ont observé aucune corrélation entre la rugosité arithmétique d'une surface d'acier inoxydable AISI 304L (R_a compris entre $0,5$ et $3,3 \mu\text{m}$) et l'attachement de staphylocoques thermo-résistants. Ils ont toutefois mis en évidence une adhésion maximale pour une valeur de R_a égale à $0,9 \mu\text{m}$, suggérant un piégeage des microorganismes du fait de leur taille. Enfin, selon d'autres études, la présence de rugosités réduit la surface de contact entre le support et le microorganisme (*i.e.*, lorsque la taille de ce dernier est plus importante que la rugosité du support), favorisant le détachement cellulaire (Boulangé-Petermann *et al.*, 1997). Cependant, les différences existant dans la définition du paramètre « rugosité », l'échelle de rugosité étudiée, les méthodes de mesures utilisées, les espèces microbiennes testées, ainsi que la variabilité des supports et des techniques d'évaluation de l'adhésion rendent très difficile la mise en évidence de l'influence de ce paramètre de manière « universelle » (Verran and Boyd, 2001 ; Flint *et al.*, 2000). Il est toutefois admis que les surfaces polies retardent l'adhésion initiale des microorganismes (Arnold et Bailey, 2000). Par conséquent, la réglementation en vigueur dans les industries laitières (DIN 11480, 1992) oblige les industriels à employer de l'acier inoxydable présentant une rugosité arithmétique inférieure à $0,8 \mu\text{m}$ (Flint *et al.*, 2000).

5 – Charge de surface

Plusieurs études ont permis d'établir que la charge de surface des matériaux joue un rôle important lors de l'adhésion cellulaire. Cette propriété est contrôlée par la force ionique et le pH du milieu suspendant (Behrens *et al.*, 2001, Rijnaarts *et al.*, 1999 ; Palmer *et al.*, 2007).

Mozes *et al.* (1987) ont étudié l'adhésion de deux microorganismes (*S. cerevisiae* et *Acetobacter acetii*) sur des supports de charge variée : le verre, différents polymères (polypropylène, polystyrène, chlorure de polyvinyle et polyméthylméthacrylate) et deux métaux, l'acier inoxydable et l'aluminium. Une partie des échantillons de verre et de polymères a été traitée par une solution d'ions ferriques, permettant de diminuer la charge négative du matériau, voire même de l'inverser. L'étude a été réalisée dans un milieu de faible force ionique ($1 \mu\text{M}$). Dans le cas du verre et des polymères non traités, aucune adhésion n'a été mise en évidence, quel que soit le pH testé (*i.e.*, 3 ou 5-6). Au contraire, un attachement significatif a été observé sur ces surfaces préalablement traitées par adsorption d'ions Fe^{3+} . En outre, les deux microorganismes ont fortement adhéré sur les supports métalliques dans les mêmes conditions de pH. A pH = 6, l'adhésion de *S. cerevisiae* est moins importante sur l'acier inoxydable (point isoélectrique = 7) que sur l'aluminium (pI = 9). En effet, à cette valeur de pH, l'acier inoxydable est peu chargé alors que l'aluminium est chargé positivement, ce qui se traduit par une interaction forte avec la levure, chargée négativement à ce

pH ($pI = 2,5$). Sur la base de ces résultats, les auteurs ont conclu que l'adhésion microbienne est essentiellement contrôlée par des interactions électrostatiques. Il faut toutefois rappeler que ces expériences ont été réalisées dans des conditions de très faible force ionique ($1 \mu M$), ce qui favorise ce type d'interactions. En effet, dans les milieux de faible force ionique, peu de contre-ions sont disponibles pour interagir avec la surface du matériau. L'épaisseur de la double couche ionique est importante et un phénomène de répulsion a lieu avec les microorganismes chargés négativement au pH considéré (Husmark et Rönner, 1990). Au contraire, dans les milieux de force ionique élevée, la double couche ionique est comprimée, ce qui provoque une diminution des répulsions électrostatiques.

Il est ici clairement mis en évidence que la charge de surface du matériau et du microorganisme, ainsi que le pH et la force ionique du milieu suspendant, doivent être pris en compte de manière globale pour expliquer l'adhésion. Ces paramètres sont liés et leur influence sur l'adhésion sera détaillée dans les paragraphes II-B-3 et II-C-2.

6 – Hydrophobie de surface

L'adhésion des cellules aux surfaces solides dépend de l'hydrophobie du matériau, en regard de celle des microorganismes, et des caractéristiques du milieu suspendant (Pringle and Fletcher, 1983 ; Bos *et al.*, 1999 ; An and Friedman, 1998 ; Bruinsma *et al.*, 2001). La plupart des études, réalisées dans des domaines d'applications divers, ont montré que les microorganismes adhèrent plus difficilement aux matériaux hydrophiles (ex. : verre, métaux), présentant une forte affinité pour l'eau et les solvants polaires, qu'aux matériaux hydrophobes (ex. : polyéthylène, polystyrène, Téflon).

Dans le cas des surfaces hydrophiles, des liaisons hydrogènes s'établissent entre les molécules d'eau du milieu et les groupements fonctionnels polaires ou chargés du support solide. Ceci provoque un phénomène de « répulsion hydrophile » avec la surface microbienne, si celle-ci est hydrophile, du fait de l'existence d'une couche d'eau liée aux surfaces et organisée en réseau. Au contraire, un support hydrophobe est inerte vis-à-vis des molécules d'eau, qui ont tendance à s'en éloigner. Dans le cas où ces molécules sont confinées entre deux surfaces hydrophobes (support et microorganisme), leur mouvement moyen en direction de la solution aqueuse favorise le rapprochement des surfaces, ce qui se traduit par un phénomène « d'attraction hydrophobe ».

Ces interactions non électrostatiques polaires (ou interactions acide-base au sens de Lewis) et apolaires (liées aux forces de Lifshitz-van der Waals) entre surfaces solides et particules colloïdales, ainsi que les interactions électrostatiques attractives ou répulsives, liées aux charges surfaciques (cf. paragraphe II-A-5), sont décrites dans la théorie DLVO étendue, exposée par van Oss *et al.* (1986). Cette théorie a réconcilié la théorie DLVO de Derjaguin et Landau (1941), et Verwey et Overbeek (1948), qui prend en compte les interactions électrostatiques et les interactions non électrostatiques apolaires, avec l'approche thermodynamique (Busscher *et al.*, 1984), qui

considère uniquement les interactions non électrostatiques polaires et apolaires. Toutefois, ces approches sont valables pour des particules colloïdales rigides, présentant une surface homogène, et s'avèrent donc difficilement extrapolables aux microorganismes, caractérisés par une surface molle et hétérogène (*i.e.*, présence de flagelles, pili, protéines, etc.). Pour prendre en compte ces hétérogénéités locales, aussi bien au niveau de la surface du support solide que de celle des microorganismes, la microscopie à force atomique (AFM) constitue un outil puissant, qui permet une caractérisation chimique à l'échelle nanométrique.

B – Facteurs liés au microorganisme

1 – Concentration et interactions microbiennes

Plus la concentration microbienne augmente, plus le nombre de cellules adhérentes est important, jusqu'à ce que la surface soit entièrement recouverte (Piette et Idziak, 1992).

En outre, la présence de colonisateurs primaires sur une surface peut faciliter la survenue d'autres microorganismes (Beloin *et al.*, 2008). Ce phénomène, appelé « co-agrégation » a été mis en évidence chez des bactéries de la cavité buccale adhérant à la dentition (Whittaker et Klier, 1996). D'autres études ont démontré l'existence de cette coopération dans les secteurs agro-alimentaire (Trachoo et Brooks, 2005) et biomédical (el-Azizi et Khardori, 1999 ; Adam *et al.*, 2002).

2 – Composition biochimique et structure moléculaire de la surface microbienne

La composition biochimique et l'architecture de la surface cellulaire (présence de protéines, de fimbriae, de flagelles, d'exopolymères, de peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif, de lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif ou de phospho-mannoprotéines chez les levures) contribuent à l'adhésion des microorganismes aux supports. Par exemple, les fimbriae contiennent une forte proportion d'acides aminés hydrophobes, ce qui conduit à l'établissement d'interactions hydrophobes avec le matériau (Donlan, 2002). Les flagelles permettent à la bactérie d'être mobile et semblent jouer un rôle important dans les premières étapes de l'adhésion en contrecarrant les forces de répulsion électrostatique (Pratt et Kolter, 1998). Les lipopolysaccharides (LPS) constituant la paroi des bactéries à Gram négatif, et plus précisément la partie glucidique (antigène O) de ces LPS, confèrent à la cellule des propriétés hydrophiles. De ce fait, des mutants de *P. fluorescens* incapables de produire des LPS adhèrent en plus grand nombre sur un support hydrophobe (Williams et Fletcher, 1996). Les curli et les pili de type F d'*E. coli* sont directement impliqués dans les toutes premières étapes de l'adhésion bactérienne (Beloin *et al.*, 2008). Les acides téichoïques, composants spécifiques des bactéries à Gram positif, semblent également exercer un effet sur l'adhésion des bactéries à Gram positif, bien qu'ils confèrent à la cellule une charge de surface négative. En effet, Gross *et al.* (2001) ont démontré qu'un mutant de *S. aureus*, dont les acides téichoïques ne comportent pas de D-alanine, était incapable d'adhérer au

polystyrène, en raison de l'accroissement de la charge négative de surface par rapport à la souche sauvage.

Des protéines de surface, fréquemment appelées « adhésines », sont également fortement impliquées dans l'adhésion aux supports (Flint *et al.*, 1997), par l'intermédiaire d'interactions spécifiques ou de la mise en place d'interactions hydrophobes dues à la composition de la protéine. Ainsi, Cucarella et ses collaborateurs (2001) ont identifié chez *S. aureus* une protéine de paroi appelée BAP (« Biofilm Associated Protein »). Ils ont démontré que les bactéries produisant cette protéine adhéraient fortement à des surfaces plastiques (polystyrène, chlorure de polyvinyle), alors que des mutants déficients pour cette protéine adhéraient peu aux deux surfaces testées.

D'autres polymères présents à la surface des bactéries, notamment les polysaccharides, sont eux aussi impliqués dans l'attachement initial (Atabek et Camesano, 2007).

Les polymères excrétés par les bactéries (EPS) induisent, quant à eux, un renforcement de l'adhésion au support, la rendant irréversible. Ainsi, Long et ses collaborateurs (2009) ont démontré l'influence positive de la production d'EPS sur l'adhésion de quatre bactéries (*E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. et *Bacillus subtilis*) à une surface de silice, quel que soit la nature de la solution saline (*i.e.*, NaCl ou CaCl₂) et la force ionique du milieu (1 à 100 mM, pH = 6).

Chez les levures, de nombreuses glycoprotéines présentes en surface jouent le rôle d'« adhésines ». Ainsi, la protéine Eap1 (« Epithelial Adhesin Protein »), présente sur la paroi de la levure *C. albicans*, a été particulièrement étudiée. Elle participe à l'adhésion des levures aux cellules épithéliales de manière spécifique et au polystyrène (Li et Palecek, 2003 ; Li *et al.*, 2007). D'autres « adhésines » de *C. albicans*, nommées Als (pour « Agglutinin-Like Sequence »), sont impliquées dans l'agrégation cellulaire, le développement des biofilms et dans l'adhésion aux cellules épithéliales (Dranginis *et al.*, 2007). Hasan *et al.* (2009) ont démontré que la virulence de *C. albicans* était directement liée à sa capacité à adhérer aux surfaces et à former des biofilms, qui protègent les cellules des traitements antifongiques et des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte. Par conséquent, les « adhésines » sont impliquées de manière indirecte dans la pathogénicité de *C. albicans*. Chez *S. cerevisiae*, la protéine Flo11p, dont l'expression est régulée par la protéine Flo8, est impliquée dans la croissance sous forme de pseudo-hyphes (Lo et Dranginis, 1998), la croissance invasive (formation d'un tapis cellulaire) et la formation d'un biofilm sur une surface de polystyrène (Reynolds et Fink, 2001). Flo11p présente des homologies de séquences avec la protéine Eap1 de *C. albicans* (Epstein et Nicholson, 2006). D'autres « adhésines » de *S. cerevisiae*, les agglutinines α et β , induisent la formation d'un tapis cellulaire par cette levure (Dranginis *et al.*, 2007).

La composition et la structure des parois bactériennes et fongiques, spécifiques de chaque espèce, évoluent en fonction des conditions environnementales et de la phase de croissance. Ainsi, l'influence respective des différents éléments évoqués ci-dessus varie continuellement.

3 – Caractéristiques physico-chimiques de la surface cellulaire

En regard des propriétés physico-chimiques du matériau, l'hydrophobie et la charge de la surface cellulaire jouent un rôle prépondérant lors de l'étape d'adhésion. Comme exposé au paragraphe précédent, ces deux propriétés sont liées à la composition de la paroi cellulaire (Palmer *et al.*, 2007), ainsi qu'aux conditions de culture et à l'âge de la culture (An et Friedman, 1998).

L'hydrophobie de surface des microorganismes est fréquemment déterminée par la méthode MATH (« Microbial Adhesion To Hydrocarbons »), par mesure de l'angle de contact avec des solvants non polaire (ex. : hexadécane) ou par chromatographie d'interaction hydrophobe. Une hydrophobie importante est souvent corrélée à une forte adhésion, notamment aux surfaces hydrophobes comme les plastiques (McEldowney et Fletcher, 1986), par l'intermédiaire de forces d'attraction hydrophobe (pour revue : An et Friedman, 1998 ; Donlan, 2002). Zita et Hermansson (1997) ont corrélé l'hydrophobie de la surface d'*E. coli* à leur attachement à des flocs dans un procédé de traitement des eaux usées. Concernant les levures, Brugnoni *et al.* (2007) ont également démontré l'existence d'une corrélation entre le caractère hydrophobe de la surface de cellules isolées de jus de pomme et leur adhésion à l'acier inoxydable, dans un milieu de force ionique suffisamment élevée (23 mM) pour inhiber les interactions électrostatiques.

La charge de surface des cellules est déterminée par la mesure de la mobilité électrophorétique. Comme dans le cas des supports solides (cf. paragraphe II-A-5), le pH du milieu, par son influence sur le nombre de groupements chimiques dissociés (carboxyles, phosphates, amines, etc.) présents en surface, intervient dans l'intensité des forces d'interaction électrostatique. Par conséquent, l'adhésion des cellules est favorisée lorsque leur charge de surface est nulle, c'est-à-dire lorsque le pH du milieu est proche du point isoélectrique (pI) du microorganisme, comme démontré par Husmark et Rønner (1990) et Hamadi *et al.* (2005). Le pI de la plupart des bactéries à Gram positif et à Gram négatif est compris entre 2 et 4 (Harden et Harris, 1953). Il en est de même pour les levures (Mozes *et al.*, 1987 ; Mercier-Bonin *et al.*, 2004). Au pH physiologique (~ 7), les microorganismes présentent donc une charge de surface négative (pour revue : An et Friedman, 1998 ; Palmer *et al.*, 2007). De ce fait, des phénomènes de répulsion électrostatique ont lieu avec les supports de charge négative à ce pH, comme par exemple le verre (Gu et Li, 2000), le Téflon (Jucker *et al.*, 1996) ou l'acier inoxydable (Kallay *et al.*, 1994 ; Brugnoni *et al.*, 2007). Comme dans le cas des surfaces inertes, la concentration en sels dans le milieu influence également la charge surfacique des cellules (Poortinga *et al.*, 2002). Les phénomènes de répulsion électrostatique sont favorisés dans les solutions de faible force ionique (Husmark et Rønner, 1990) et moins importants dans les milieux de force ionique élevée. Ainsi, Vernhet et Bellon-Fontaine (1995) ont démontré l'absence d'interactions électrostatiques entre des levures *S. cerevisiae* et une surface de verre dans une solution de KNO_3 à 0,06 M (pH non précisé).

L'influence de la force ionique et du pH du milieu environnant sur l'adhésion microbienne sera développée dans le paragraphe II-C-2.

Les techniques exposées dans ce paragraphe pour évaluer l'hydrophobie et la charge des surfaces cellulaires sont des méthodes macroscopiques globales, basées sur des estimations inadaptées aux microorganismes. Elles ne prennent notamment pas en compte les hétérogénéités locales liées à la présence des nombreux composés pariétaux (flagelles, pilis, fibrilles, protéines, polysaccharides, etc.). Comme évoqué précédemment, les caractéristiques physico-chimiques de la surface cellulaire, à l'échelle nanométrique, peuvent être quantifiées *in situ* par microscopie à force atomique (spectroscopie de force chimique). Cette technique permet également de mesurer la force d'interaction entre le microorganisme et la surface testée, en milieu liquide. Des travaux récents décrivent et mettent en œuvre cette analyse, qui nécessite l'adsorption physique de la cellule sur la pointe AFM, sans dénaturer sa structure pariétale (pour revue : Dufrêne, 2002).

4 – Phase de croissance et état physiologique

Comme évoqué précédemment, la composition de la paroi cellulaire, élément en contact avec le milieu extérieur, ainsi que les propriétés physico-chimiques de la surface évoluent en fonction de l'étape de croissance et de l'état physiologique de la cellule (Palmer *et al.*, 2007). Ainsi, Sharon et ses collaborateurs (2005) ont évalué l'influence de la phase de croissance d'*E. coli* K12 (phase exponentielle / phase stationnaire) sur la présence de macromolécules en surface, les caractéristiques physico-chimiques (hydrophobie, charge) et l'adhésion résultante à une surface de quartz. Ils ont observé un attachement plus important des cellules en phase stationnaire de croissance, attribué à une forte hétérogénéité de la charge de surface permettant une diminution globale des forces de répulsion électrostatique avec le support. Les auteurs suggèrent que les macromolécules impliquées sont les protéines pariétales et les lipopolysaccharides. Ces résultats corroborent ceux de Chen et Strevett (2001), qui ont étudié l'adhésion de différentes bactéries (*E. coli*, *P. fluorescens*, *B. subtilis*) à des milieux poreux en fonction de leur phase de croissance (exponentielle, stationnaire et déclin). Ils ont déterminé que les bactéries en phase stationnaire de croissance étaient les plus adhésives, du fait de la diminution de l'énergie libre d'interaction entre les microorganismes et le support (*i.e.*, augmentation de la valeur négative), qui favorise l'attraction entre les deux entités. Cette diminution de l'énergie libre d'interaction est liée à l'augmentation de la composante donneur d'électrons de la surface des microorganismes, elle-même causée par des modifications de la structure chimique de la paroi (*i.e.*, augmentation de la quantité de groupements fonctionnels C–OH ou COO⁻, évaluée par spectroscopie infrarouge).

5 – Adaptation phénotypique des microorganismes adhésifs

L'adhésion à la surface réceptrice engendre chez le microorganisme une perception différente de son environnement (Ghigo, 2003). Des gènes spécifiques sont alors surexprimés ou sous-exprimés selon les nouveaux besoins de la cellule. Ainsi, les gènes codant pour les flagelles sont inhibés, du fait de l'état sessile du microorganisme (Kuchma et O'Toole, 2000). Au contraire, l'expression des gènes impliqués dans la communication (« quorum sensing »), dans la production d'EPS, de

protéines pariétales ou dans certaines voies métaboliques augmente (Prigent-Combaret *et al.*, 1999 ; O'Toole *et al.*, 2000). Les microorganismes sessiles développent donc des caractéristiques phénotypiques très différentes de celles des cellules planctoniques. Par conséquent, l'ensemble des facteurs cellulaires listés dans les paragraphes précédents ne sont pas figés et sont susceptibles d'évoluer lors de l'attachement initial du microorganisme à la surface (Donlan, 2002).

C – Facteurs liés à l'environnement

1 – Temps de contact

L'augmentation du temps de contact entre le microorganisme et le support induit un renforcement des liaisons établies (Nejadnik *et al.*, 2008). En utilisant la technique de microscopie à force atomique, Mei *et al.* (2009) ont démontré une augmentation de la force de liaison de deux souches de *Streptococcus* à une surface d'acier inoxydable 316 avec le temps de contact. Ce renforcement important (facteur 4) se produit sur une période d'environ 30 s en l'absence de film conditionnant, alors qu'elle s'établit sur une durée de l'ordre de 60 s lorsque la surface est recouverte de salive. Les auteurs attribuent cette différence au fait que, dans le cas de l'acier inoxydable vierge, des forces d'interaction attractives et non spécifiques s'établissent entre les microorganismes et la surface conductrice de l'acier inoxydable, *via* des mécanismes de transfert de charges. Au contraire, la salive constitue un film non conducteur, qui retarde l'établissement de la liaison.

2 – Caractéristiques du milieu

Comme annoncé précédemment, de nombreuses caractéristiques du milieu influencent les interactions entre les cellules et la surface solide, par exemple sa nature, sa viscosité ou sa température, mais également la force ionique, la nature des sels et le pH, ou encore la présence de détergents ou d'éléments nutritifs.

2.1 – Température du fluide

La température du milieu environnant influence la colonisation microbienne, car la croissance cellulaire est maximale pour une température dite optimale, spécifique à chaque microorganisme. Pompermayer *et al.* (2000) ont ainsi montré que l'adhésion d'*E. coli* au polypropylène était plus importante à 30°C qu'à 12°C. De plus, Gallardo-Moreno et ses collaborateurs (2004) ont souligné l'importance de réaliser les expériences d'adhésion à une température proche de la température optimale de croissance, car ce paramètre peut influencer les caractéristiques physico-chimiques (charge, hydrophobie) de la surface des cellules.

2.2 – Force ionique et nature des sels

De nombreuses études ont prouvé l'influence de la force ionique du milieu sur l'adhésion microbienne, par l'intermédiaire des interactions électrostatiques établies entre le microorganisme et le support (Bos *et al.*, 1999 ; Poortinga *et al.*, 2002). En effet, la charge de surface du matériau et des cellules est influencée par la concentration en sels dans le milieu suspendant. Ainsi, Piette et Idziak (1992) ont observé un accroissement de l'adhésion de *P. fluorescens* avec l'augmentation de la force ionique de 10 à 100 mM. De même, Guillemot *et al.* (2006) ont montré que l'adhésion de la levure *S. cerevisiae* sur un support de verre est plus importante pour une force ionique de 150 mM qu'à 1,5 mM. Ceci s'explique par la diminution des forces de répulsion électrostatique entre le microorganisme et la surface, due à la réduction de l'épaisseur de la double couche ionique.

La nature des sels présents dans le milieu (mono- ou polycationiques) influence également les interactions microorganismes/surface, du fait de la capacité différente de neutralisation des charges négatives de la surface cellulaire (Fletcher, 1988 ; Piette et Idziak, 1992).

2.3 – Influence du pH

Le pH du milieu environnant a une influence sur la croissance des cellules, mais également sur leurs propriétés physico-chimiques de surface, comme exposé au paragraphe II-B-3. La valeur du pH a également un impact sur la charge de surface du support, notamment dans le cas des métaux comme l'acier inoxydable, pour lequel l'état d'oxydation dépend du pH (Palmer *et al.*, 2007).

2.4 – Présence de macromolécules, de surfactants et d'éléments nutritifs

Comme mentionné précédemment, une surface solide exposée à un milieu non stérile est systématiquement recouverte d'une couche de macromolécules, qui modifie ses propriétés physico-chimiques et influence l'adhésion des microorganismes (Rouxhet et Mozes, 1990 ; Compère *et al.*, 2001).

La présence de surfactants (détergents comme le Tween, le SDS ou le RBS) modifie les interfaces solide/liquide et microorganisme/liquide, ce qui influence l'adhésion et le détachement des cellules, comme mentionné par McEldowney et Fletcher (1986). En outre, de nombreux microorganismes relarguent des composés appelés « biosurfactants », dont l'adsorption aux surfaces inertes et aux surfaces des autres cellules modifie leurs propriétés physico-chimiques (Bos *et al.*, 1999). Ainsi, Valle *et al.* (2006) ont démontré que plusieurs souches d'*E. coli* exprimant des capsules de groupe II, notamment la souche uropathogène CFT073, excrètent un polysaccharide capsulaire, hydrophile et chargé négativement, qui limite l'adhésion au verre et la formation de biofilms par de nombreuses bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*) et à Gram négatif (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*).

Enfin, la présence d'éléments nutritifs, comme le carbone et l'azote desquels dépend le métabolisme microbien (notamment la synthèse des composés pariétaux), a une influence sur les propriétés de la surface cellulaire (Strevett et Chen, 2003), donc sur l'adhésion initiale. Reynolds et Fink (2001) soulignent qu'une diminution de la concentration en glucose dans le milieu provoque une augmentation de l'adhésion de *S. cerevisiae* à des surfaces plastiques, car les conditions environnementales sont, dans ce cas, peu favorables à la croissance sous forme planctonique.

Les microorganismes peuvent également obtenir des nutriments ou des éléments nécessaires à leur croissance, en provenance de la surface solide après dégradation (composés organiques issus des plastiques, cations métalliques issus de la (bio-)corrosion d'acier ou d'autres métaux (Mansfeld, 2007)).

3 – Conditions hydrodynamiques

La vitesse du fluide influence l'épaisseur de la couche limite au niveau de l'interface matériau/liquide. Lorsque le régime d'écoulement est laminaire ou faiblement turbulent, cette couche limite est épaisse et l'adhésion des microorganismes dépend de leur capacité à la pénétrer (mobilité, taille des cellules, vitesse de l'écoulement) (Donlan, 2002). Le mouvement Brownien, la gravité ou des mouvements de convection peuvent favoriser l'adhésion initiale des microorganismes (Palmer *et al.*, 2007).

Lorsque le régime est turbulent, les nombreux tourbillons peuvent faciliter le contact entre les cellules et la surface (Palmer *et al.*, 2007 ; Nejadnik *et al.*, 2008). Toutefois, la diminution de l'épaisseur de la couche limite hydrodynamique réduit le temps d'interaction entre la cellule et le support, empêchant l'établissement de liaisons suffisamment fortes pour permettre un attachement irréversible (Palmer *et al.*, 2007). De plus, une forte contrainte de cisaillement appliquée au niveau de l'interface solide/liquide peut induire le détachement des cellules (Mercier-Bonin *et al.*, 2004 ; Guillemot *et al.*, 2006 ; Nejadnik *et al.*, 2008).

En conclusion, l'adhésion microbienne sur les surfaces, qu'elles soient biologiques ou inertes, est un phénomène multifactoriel qui évolue constamment dans le temps et met en jeu de nombreux paramètres inhérents au support, aux microorganismes et au milieu suspendant. La maîtrise de l'ensemble de ces paramètres est un challenge, aussi bien pour les industriels que pour les professionnels du milieu biomédical, domaines dans lesquels la colonisation microbienne des surfaces est à l'origine d'impacts particulièrement négatifs.

III - Impacts négatifs liés à l'adhésion microbienne dans l'industrie agro-alimentaire et le domaine biomédical

Les microorganismes peuvent adhérer sur toutes les interfaces. L'industrie agro-alimentaire et le domaine biomédical sont les secteurs dans lesquels la colonisation microbienne provoque les répercussions les plus préjudiciables pour les équipements et les personnes.

A – Contaminations microbiennes des surfaces en industrie agro-alimentaire

Dans l'industrie agro-alimentaire, les microorganismes font partie intégrante des matières premières utilisées en production. L'un des enjeux majeurs de ce secteur consiste à fournir des denrées de qualité aux consommateurs, tout en assurant la sécurité sanitaire des aliments. C'est pourquoi le contrôle du développement microbien est essentiel dans ce type d'industrie. Ainsi, des procédures de nettoyage et de stérilisation en place (NEP et SEP) sont réalisées (Jullien *et al.*, 2002), consistant à faire circuler de l'eau chaude, additionnée ou non de détergents et/ou d'agents désinfectants. Toutefois, de nombreux microorganismes sont capables de se fixer aux surfaces en contact avec les aliments (Carpentier and Cerf, 1993; Briandet *et al.*, 1999; Fonnesbech Vogel *et al.*, 2001) et de rester viables après les NEP-SEP, du fait de leur résistance accrue aux produits chimiques. Ils persistent et se développent au sein de l'équipement. Cette contamination peut induire une dégradation des installations, due à la biocorrosion, et un encrassement des membranes, cuves ou conduites. En outre, les cellules remises en suspension lors des phases de production peuvent être à l'origine de la dégradation des propriétés du produit ou rendent l'aliment impropre à la consommation, au risque même de générer des toxi-infections alimentaires.

Jespersen et Jakobsen (1996) ont répertorié un nombre important de bactéries à Gram positif et à Gram négatif, responsables de la dégradation de la bière lors de sa fabrication. D'autres travaux ont dressé l'inventaire d'infections alimentaires causées par différentes espèces de *Salmonella* (Torok *et al.*, 1997), *B. cereus* (Ehling-Schulz *et al.*, 2004), *Clostridium perfringens* (Maslanka *et al.*, 1999), *Campylobacter jejuni* (Trachoo *et al.*, 2002), *Listeria monocytogenes* et *P. fluorescens* (Takeuchi *et al.*, 2000).

S. aureus est l'un des principaux agents responsables de toxi-infections alimentaires (ex. : gastro-entérites), liées à la sécrétion d'entérotoxines par le microorganisme (Gorman *et al.*, 2002 ; Jorgensen *et al.*, 2005). La contamination peut survenir lors de la préparation des produits (jambon, lait, fromage, crème glacée), car *S. aureus*, microorganisme ubiquitaire et commensal de l'Homme, est capable de coloniser puis de croître dans de nombreux aliments (du fait de la large gamme de température, de pH et de force ionique permettant sa croissance) (Le Loir *et al.*, 2003). De plus, *S. aureus* présente la capacité d'adhérer à l'acier inoxydable (Knowles et Roller, 2001). C'est pourquoi cette bactérie fait partie d'un groupe de microorganismes pathogènes cibles, dans la

norme européenne établissant les règles de test des désinfectants dans les industries agro-alimentaires (European Standards for Suspension and Surface Tests for Disinfectants CEN/TC216 – European Committee for Standardization, 1995).

La bactérie à Gram négatif *E. coli* O157:H7 est également responsable de nombreux problèmes d'hygiène et de santé publique (Takeuchi et Frank, 2000). Les aliments, à l'origine de la transmission de ce microorganisme pathogène à l'Homme, sont les viandes de bœuf (Griffin et Tauxe, 1991) et de poulet (Ahmed *et al.*, 1995), le fromage (Arocha *et al.*, 1992), le salami (McDonald *et al.*, 2004), la salade (Tauxe, 1997) et les pommes ou produits dérivés (Burnett *et al.*, 2000). La capacité d'adhésion d'*E. coli* à l'acier inoxydable a été démontrée (Faille *et al.*, 2003 ; Ryu *et al.*, 2004) et cette bactérie a été utilisée comme modèle pour étudier les mécanismes de croissance au sein de communautés microbiennes sessiles (Schembri *et al.*, 2003). Selon Lebert *et al.* (2007), *E. coli* peut être considérée comme une cible dans l'industrie agro-alimentaire, pour la conception de traitements limitant son développement sur les surfaces.

Les levures sont également des contaminants de denrées alimentaires (Loureiro et Querol, 1999), car elles peuvent survivre dans des conditions de stress environnementaux (faible température, pH acide, présence d'acides faibles et de conservateurs, pression osmotique élevée) et résistent mieux aux procédés de stérilisation industriels que les bactéries (Deak, 2007). Des études ont ainsi été menées dans le but d'identifier les espèces fongiques responsables de la dégradation des produits alimentaires (jus de fruits, pâte d'amande, viande, fromage, olives, vin, sauce, etc.) (Loureiro, 2000 ; Combina *et al.*, 2007).

La contamination par des levures concerne notamment l'industrie des boissons non alcoolisées. Ainsi, des levures du genre *Candida*, *Saccharomyces* et *Hanseniaspora* ont été retrouvées dans les jus d'orange, de citron et de pomme pasteurisés (Arias *et al.*, 2002). En outre, Combina et ses collaborateurs (2007) ont récemment mis en évidence la présence de *Zygosaccharomyces rouxii* dans des concentrés de jus de raisin élaborés en Argentine, dont l'altération était visible à l'œil nu (présence de gaz). Les levures les plus fréquemment isolées de boissons contaminées sont *Saccharomyces* et *Candida* (Loureiro et Querol, 1999).

Dans le cas des boissons fermentées et alcoolisées, il est très difficile de distinguer les levures assurant la fermentation de celles ayant une activité préjudiciable sur les produits (Jespersen et Jakobsen, 1996). Dans l'industrie du vin, les levures sont rarement considérées comme néfastes pendant le processus de fermentation, mais plutôt lors de l'embouteillage, du stockage et de la période de maturation (Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2003). Lors de la fermentation de la bière, des levures dites « sauvages » (*Saccharomyces* d'une autre espèce que *cerevisiae*, *Candida* spp., *Pichia* spp.) peuvent être retrouvées dans la boisson après l'étape de filtration ou d'embouteillage et entraîner la formation de dépôt ou la détérioration de la saveur de la bière (Deak, 2007).

De nombreux autres aliments sont également affectés par une flore d'altération fongique, comme les volailles (Hinton *et al.*, 2002), les viandes (bœuf, salami, pâté, jambon, bacon (Samelis et

Sofos, 2003)), les poissons ou crustacés (Bagge-Ravn *et al.*, 2003), les œufs ou les produits laitiers (Deak, 2007).

S. cerevisiae est impliquée dans la contamination d'aliments (Bagge-Ravn *et al.*, 2003) et de boissons (Han *et al.*, 1999 ; Jespersen *et al.*, 2000 ; Brugnoni *et al.*, 2007) en cours de fabrication, induisant une altération des qualités organoleptiques des produits, ainsi que des pertes économiques importantes. Une adhésion forte et spécifique de cette levure sur l'acier inoxydable AISI 316L, par comparaison à d'autres matériaux (verre, polypropylène, polystyrène), a été reportée par Guillemot *et al.* (2006). Moore *et al.* (2000) ont mis en évidence une résistance marquée des levures adhérees à une surface d'acier inoxydable face aux procédures de désinfections à l'ozone, par rapport aux bactéries. Ceci peut s'expliquer par l'épaisseur de leur paroi (100-200 nm), qui forme une barrière protectrice retardant la pénétration des agents chimiques biocides jusqu'à la membrane cytoplasmique (Walker, 1998). Ce microorganisme a donc été ciblé spécifiquement lors de la définition et du développement des procédures de nettoyage et de désinfection des installations industrielles (Bagge-Ravn *et al.*, 2003).

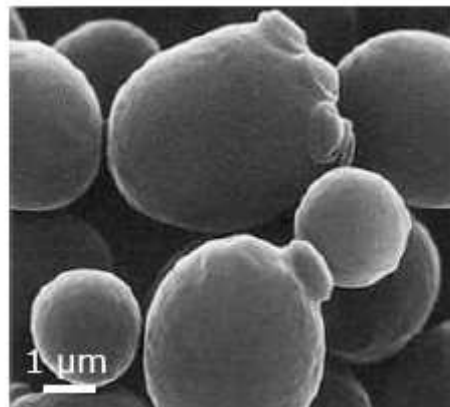


Figure 2. Photographie en microscopie électronique à balayage de *S. cerevisiae* (d'après Carr, 2005).

B – Problèmes liés à la contamination des surfaces dans le domaine médical

En France, les infections nosocomiales, c'est-à-dire contractées pendant un séjour dans un établissement de santé, ont une prévalence de 7,5%. La colonisation de la surface des implants, des cathéters ou des salles d'intervention par les biofilms bactériens et /ou fongiques est à l'origine d'environ 60% des infections nosocomiales, qui induisent des milliers de décès par an en France. Ces contaminations représentent donc une complication majeure des actes chirurgicaux, notamment lors de la pose d'implants (prothèses, valves cardiaques, stents, dispositifs orthopédiques) ou de dispositifs percutanés (cathéters urinaires, voie veineuse centrale) et

peuvent entraîner de graves pathologies, obligeant à retirer l'implant ou provoquant le décès du patient (Everaert *et al.*, 1998 ; Nichols et Raad, 1999 ; Schierholz et Beuth, 2001).

Par exemple, *S. aureus*, organisme commensal de l'Homme présent sur la peau et dans les fosses nasales, est une cause importante d'infections nosocomiales, notamment de pathologies localisées suppurées (furoncles, panaris, érysipèle), d'infections des os (ostéomyélites), de l'appareil respiratoire (pneumonies), du cœur (endocardites) et des voies urinaires, voire même de septicémies chez les sujets à risques (ex. : patients immunodéprimés). Son pouvoir pathogène résulte de la sécrétion d'enzymes (coagulase, fibrinolysine, phosphatase, protéase, etc.), qui provoquent des lésions au niveau des tissus de l'organisme et confère à la bactérie son pouvoir invasif, et de la production d'entérotoxines (staphylolysines, leucocidines) responsables de sa toxicité. *S. aureus* possède une grande capacité à donner des mutants résistants aux antibiotiques, comme la méticilline (SARM, qui est la souche de *S. aureus* la plus répandue en France dans le milieu hospitalier (Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, Institut de Veille Sanitaire, France, juin 2006)), la vancomycine (SARV), la pénicilline ou la tétracycline. Certaines souches sont même multi-résistantes aux antibiotiques. De plus, *S. aureus* est capable d'adhérer aux surfaces des cathéters et d'autres dispositifs implantables (von Eiff, 1999), ce qui fait de ce microorganisme un des pathogènes les plus impliqués dans les infections nosocomiales.

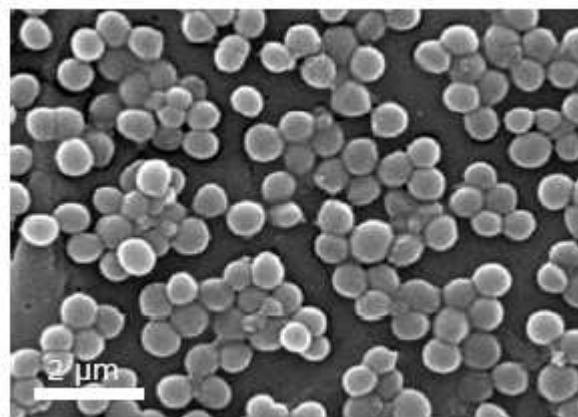


Figure 3. Photographie en microscopie électronique à balayage de *Staphylococcus aureus* (d'après Carr, 2005).

D'autres études portent sur la bactérie à Gram négatif *P. aeruginosa*. Par exemple, Smith et Hunter (2008) ont récemment étudié des isolats cliniques de *P. aeruginosa*, en suspension et après croissance sur différents matériaux rencontrés en milieu hospitalier (acier inoxydable, verre, polyéthylène et Téflon). Ils ont soumis les bactéries sous formes planctonique et sessile à trois agents biocides couramment utilisés lors des soins (chlorure de benzalkonium, chlorhexidine et triclosane), puis ont évalué leur viabilité. Ils ont ainsi démontré que les bactéries adhérentes n'étaient

sensibles à aucun des trois produits testés, contrairement aux bactéries planctoniques, confirmant des mécanismes de résistance accrue sous forme sessile.

Parmi les bactéries à Gram négatif, *E. coli* peut provoquer des infections suite à la pose de sondes ou de cathéters, car la bactérie crée un foyer infectieux en colonisant la surface des implants. Certaines souches, comme *E. coli* O157:H7, présentent un caractère pathogène et sont à l'origine d'infections intestinales (gastro-entérites) et extra-intestinales (Doyle, 1991), d'infection urinaires (Farrell *et al.*, 2003), de méningites ou de septicémies (Kaper *et al.*, 2004).

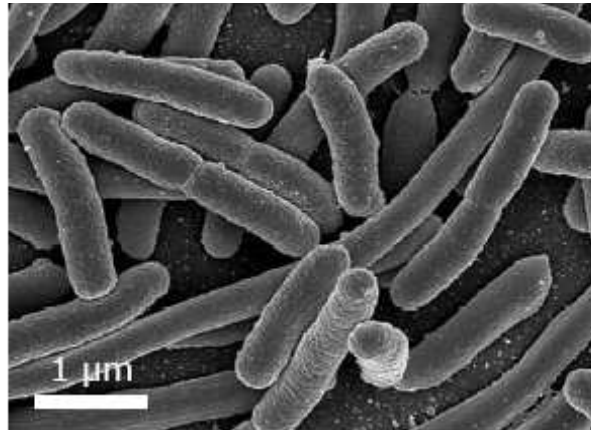


Figure 4. Photographie en microscopie électronique à balayage d'*Escherichia coli* (source : Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH, 2005).

Les recherches consacrées aux espèces fongiques à l'origine de pathologies nosocomiales sont plus rares que celles dédiées aux organismes procaryotes, excepté dans le cas de la levure pathogène *C. albicans* (Chandra *et al.*, 2001 ; Ramage *et al.*, 2001), la plus fréquemment isolée (Haynes, 2001) et à l'origine d'infections superficielles, de pneumonies, de pathologies des voies urinaires et de septicémies. Selon Douglas (2003), dans la majorité des cas, l'infection provoquée par *C. albicans* implique la colonisation préalable de la surface des cathéters ou des implants. Il a été démontré que l'adhésion de *C. albicans* aux surfaces est directement liée à sa virulence (Hasan *et al.*, 2009). L'éradication de l'infection nécessite quasiment de manière systématique le retrait de l'implant. Le taux de mortalité dû à ces infections est par ailleurs élevé (35%). De manière analogue aux bactéries, *C. albicans* est plus résistant aux agents antifongiques lorsqu'elle est adhérente à une surface (Chandra *et al.*, 2001). D'autres levures du genre *Candida* sont répertoriées comme source d'infections nosocomiales (Hazen, 1995), comme par exemple *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ou *C. guilliermondii*.

Les champignons filamenteux du genre *Aspergillus* provoquent également des infections graves chez les patients immunodéficients (par exemple, ceux en attente d'une greffe de moelle osseuse ou d'une transplantation d'organes). En milieu hospitalier, ils peuvent être présents dans les systèmes de ventilation, les réseaux d'eau, l'air non filtré, les poussières ou les plantes

ornementales (Anaissie *et al.*, 2002). Les cas d'infections provoquées par *Aspergillus* spp. sont encore peu nombreux, mais ce microorganisme est identifié comme très virulent : il provoque de graves broncho-pneumonies, des thromboses, des embolies pulmonaires ou des hémorragies cérébrales (Fridkin et Jarvis, 1996).

Bien que les infections dues à *S. cerevisiae* soient rares en comparaison de l'ensemble des infections fongiques, le nombre d'études rapportant l'implication de ce microorganisme dans des infections humaines n'a cessé d'augmenter dans les années 1990 (Enache-Angoulvant et Hennequin, 2005). En outre, cette levure est considérée comme un pathogène émergent (Hazen, 1995 ; Murphy et Kavanagh, 1999). En appliquant les recommandations de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), Lass-Flörl *et al.* (2008) ont récemment démontré que *S. cerevisiae* n'était pas éradiquée par les antifongiques testés (dont l'amphotéricine B), contrairement aux sept espèces de *Candida* utilisées dans l'étude. De plus, Reynolds et Fink (2001) concluent que *S. cerevisiae*, parce que son génome est entièrement séquencé et que l'on dispose d'outils moléculaires fiables, constitue un modèle intéressant pour l'étude de l'adhésion des levures et la mise au point de nouvelles thérapies antifongiques. En outre, cette levure est capable d'adhérer aux surfaces plastiques, comme le polystyrène, le polypropylène et le chlorure de polyvinyle (Reynolds et Fink, 2001) ou le polyméthacrylate de méthyle et le silicone (Chandra *et al.*, 2001), entrant dans la confection des biomatériaux (sondes, cathéters, ciment de prothèses, etc.).

Conclusion

Les bactéries et les levures vivent en grande majorité sous forme de biofilms. La formation de ces écosystèmes complexes repose sur l'adhésion initiale des microorganismes au support, processus multi-factoriel influencé par les caractéristiques physiques et chimiques des deux surfaces et par le milieu dans lequel les cellules et le matériau ont été ou sont exposés. La colonisation microbienne des surfaces est à l'origine de la dégradation des équipements industriels, de toxi-infections alimentaires et, dans des cas plus graves, d'infections nosocomiales dues à la contamination des dispositifs implantables par des microorganismes devenant résistants aux traitements antimicrobiens. Les impacts négatifs liés à l'adhésion microbienne, illustrés dans ce chapitre, démontrent la nécessité d'empêcher, ou du moins de limiter, ce processus sur les surfaces utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et le domaine biomédical, comme l'acier inoxydable austénitique.

CHAPITRE II – ACIER INOXYDABLE AISI 316L

Introduction

L'intérêt des aciers inoxydables réside dans leurs nombreuses caractéristiques de résistance mécanique (dureté, résilience, résistance à la déformation). Un avantage majeur de ces matériaux est leur résistance à la corrosion et à l'oxydation à chaud, due à la présence en surface d'une couche protectrice, appelée film « passif », constituée majoritairement d'oxydes et d'hydroxydes de fer et de chrome. Leur coût d'élaboration reste relativement modéré, du fait de l'abondance naturelle du minerai de fer. Enfin, les aciers sont pratiquement entièrement recyclables.

Toutes ces caractéristiques font de l'acier inoxydable un matériau de prédilection pour de multiples applications, aussi bien pour l'usage courant que pour les technologies de pointe : équipements ménagers, coutellerie, horlogerie, industries automobiles, papetières, chimiques, pharmaceutiques, pétrolières, agro-alimentaires, équipements maritimes, nucléaires, aéronautiques, etc. En 2008, le marché de l'acier inoxydable représentait au total 28 millions de tonnes, tous produits confondus (source : Euro Inox). Depuis 1985, la consommation mondiale augmente en moyenne de 5,5% par an.

Parmi les nombreuses nuances d'aciers inoxydables, l'acier austénitique AISI 316L est le constituant le plus fréquent des équipements de l'industrie agro-alimentaire (cuves, tanks, fermenteurs, canalisations). Il est également utilisé dans le domaine biomédical pour la fabrication d'outils chirurgicaux (aiguilles, scalpels, etc.) et d'implants temporaires, notamment en chirurgies orthopédique et cardiaque. Dans le présent chapitre, nous nous intéresserons à ce type d'acier austénitique et à son utilisation dans les deux secteurs évoqués. Nous décrirons également des exemples de contaminations bactériennes et fongiques de l'acier 316L, en lien avec ses caractéristiques (rugosité, film passif, couche de contamination).

I – Structure de la surface de l'acier inoxydable austénitique

A – Généralités et composition chimique de l'acier austénitique

L'acier est un alliage constitué d'au moins deux éléments : le fer et le carbone (dans des proportions comprises entre 0,008% et 2,11% en masse). Ce matériau présente de nombreux avantages (résistance aux efforts et aux chocs, dureté), mais également un inconvénient majeur : il se corrode. C'est au début du XX^{ème} siècle que Monnartz (1911) a mis en évidence l'influence du taux de chrome des alliages sur leur résistance à la corrosion. Ainsi, les aciers dits « inoxydables » sont additionnés d'au moins 12% de chrome, pourcentage qui leur confère la résistance à la

corrosion (voir partie I-B). Ils doivent contenir moins de 1,2% de carbone, pour éviter la formation de carbures, source de corrosion.

Il existe trois catégories principales d'acier inoxydable : les alliages ferritiques, les alliages martensitiques et alliages austénitiques (ou alliages « fer-chrome-nickel »). Les aciers inoxydables austénitiques sont les plus employés (60% de la production d'aciers inoxydables en 2007), en raison de leur grande résistance à la corrosion et à l'abrasion, de leurs caractéristiques mécaniques intéressantes, de leur longévité et de leur prix réduit. En effet, la présence de nickel dans ce type d'acier améliore les propriétés mécaniques du matériau, notamment sa ductilité (aptitude à la déformation), ainsi que la résistance à la corrosion, en participant à la formation de la couche « passive » par oxydation ($2 \text{ Ni} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ NiO}$). D'autres éléments (molybdène, manganèse, silicium, titane, niobium, tungstène, vanadium) sont ajoutés dans le but d'améliorer les propriétés de l'acier austénitique, notamment leur résistance à la corrosion et leur stabilité à température élevée. Parmi les nombreuses nuances d'aciers inoxydables austénitiques, on trouve l'acier AISI 316L (AISI pour « American Iron and Steel Institute » et L pour « low-carbon »), dont la composition est présentée dans le Tableau 2.

Tableau 2. Composition de l'acier inoxydable austénitique AISI 316L (source : Euro Inox).

	Fe	Cr	Ni	Mo	Mn	Si	C	Cu, Co, N	S	P
% massique	63,5-70	16-18	10,5-13	2-2,5	1-2	0,5-1	< 0,03	Traces	< 0,03	< 0,04

B – Corrosion des aciers inoxydables et film passif

En milieu aqueux ou humide, les métaux et les alliages métalliques ne sont pas stables chimiquement et subissent des phénomènes de corrosion, liés dans la majorité des cas à un processus électrochimique (réactions d'oxydo-réduction). A l'exception des métaux nobles comme l'or, la surface des métaux est toujours oxydée. Si cette couche de corrosion est soluble dans le milieu aqueux environnant, le processus se propage progressivement jusqu'au cœur du matériau par un mécanisme de formation/dissolution de la couche d'oxydes. Au contraire, si la couche de corrosion est peu soluble et reste en surface sous forme solide, elle ralentit, voire inhibe, le phénomène de corrosion. Cette couche de corrosion est alors appelée « film passif » ou « couche de passivation ».

C'est sur ce principe que repose le caractère « inoxydable » des aciers austénitiques. En effet, le chrome présent en surface de l'alliage réagit avec le dioxygène de l'atmosphère. Les oxydes et hydroxydes de chrome ainsi formés (Cr_2O_3 et $\text{Cr}(\text{OH})_3$) constitue une couche dense et non poreuse, qui gêne la diffusion de l'oxygène et le transfert d'électrons nécessaires à l'oxydation (Landoulsi *et al.*, 2008). Cette couche « passive » mesure 1 à 3 nanomètres d'épaisseur (Olsson et

Landolt, 2003). Lorsqu'elle est endommagée, par exemple par abrasion, elle se renouvelle seule et spontanément en présence d'oxygène ou d'humidité.

Le film passif de l'acier austénitique est un mélange d'oxydes et d'hydroxydes de chrome et de fer, enrichi en chrome par rapport au cœur du matériau (Maurice *et al.*, 1996). Cet enrichissement en chrome est dû au fait que cet élément est le plus fortement oxydable (Landolt, 1990). De plus, les oxydes de chrome sont moins solubles que les oxydes et hydroxydes de fer. Enfin, la mobilité du chrome est plus faible, comparée à celle du fer (Houmard *et al.*, 2007 ; Landoulsi *et al.*, 2008). Le film passif contient très peu d'oxydes de nickel, comme démontré notamment par Compère et ses collaborateurs (2001). En revanche, l'oxydation sélective du fer et du chrome provoque un enrichissement en nickel juste en dessous de l'interface métal/couche passive (Dabosi, 1994). Grâce à des analyses réalisées par Spectroscopie de Photoélectrons émis par rayons X (XPS), plusieurs auteurs ont démontré que la couche passive de l'acier inoxydable AISI 316L présente une structure en « bicouches » : une couche interne constituée principalement d'oxydes de chrome anhydres et une couche externe comprenant des oxydes et hydroxydes de fer, et subissant une importante dissolution (McDonald *et al.*, 1992 ; Dabosi, 1994).

Différents travaux ont démontré l'influence du pH sur la composition chimique du film passif : en milieu acide, la couche externe est constituée de $\text{Cr}(\text{OH})_3$ (De Vito et Marcus, 1992), alors qu'en milieu basique, elle est composée d'oxydes et d'hydroxydes de fer (Abreu *et al.*, 2004) car leur dissolution est moins importante dans ce cas.

La nature métallique de l'acier inoxydable, et plus particulièrement la composition de son film passif, participent de manière importante à l'adhésion des microorganismes (Flint *et al.*, 2000). En effet, la présence d'oxydes et d'hydroxydes de fer et de chrome au sein du film passif est à l'origine de la charge de surface de l'acier inoxydable, à un pH donné (Bren *et al.*, 2004). Or, il a été démontré que la charge de surface influençait l'adhésion microbienne dans des milieux de force ionique faible, favorisant les interactions de type électrostatique (Mozes *et al.*, 1987). Ercal *et al.* (2001) ont démontré que les métaux comme le fer et le chrome de la couche passive étaient capables de partager leurs électrons, permettant la formation de liaisons covalentes avec les groupements sulfhydryles des protéines. Zanna et ses collaborateurs (2005) ont mis en évidence l'existence d'interactions directes et spécifiques entre des protéines modèles (albumine de sérum bovin – BSA) et la couche passive de l'acier inoxydable 316L, plus particulièrement les ions Mo^{6+} .

C – Contamination du film passif en surface des aciers inoxydables

Les métaux et les oxydes métalliques sont des matériaux présentant une énergie de surface élevée. C'est le cas des aciers inoxydables austénitiques, du fait de la présence d'oxydes et d'hydroxydes métalliques constituant le film passif (Mantel et Wightman, 1994). Des analyses XPS en incidence rasante, permettant d'évaluer la composition de l'extrême surface de l'acier, révèlent

la présence d'une couche de contamination organique polluant la surface du film passif. Cette contamination, principalement composée d'hydrocarbures et d'oxygène (Landoulsi *et al.*, 2008), induit une diminution de l'énergie de surface, la rendant plus stable thermodynamiquement. Elle provient de l'adsorption d'espèces organiques présentes dans l'atmosphère ambiante (Rouxhet et Mozes, 1990) lors de la fabrication du matériau, des différentes étapes de traitement (laminage, polissage, décapage, passivation) ou encore après nettoyage de la surface (Mantel *et al.*, 1995 ; Compère *et al.*, 2001).

Comme mentionné par Houmard et ses collaborateurs (2007), la plupart des études modélisent la couche de contamination organique par un film uniforme et homogène, ce qui permet d'évaluer son épaisseur (de l'ordre de quelques Angströms à quelques dizaines d'Angströms selon les traitements et contaminations subis). En réalisant des analyses XPS par résolution angulaire, permettant d'observer les variations de la composition chimique des couches plus internes du matériau (5-10 nm) jusqu'aux couches de l'extrême surface (quelques Angströms), ces auteurs ont proposé un autre modèle, représentant la couche de contamination sous forme d'îlots. Selon les auteurs, ce nouveau modèle permet de réaliser une étude plus détaillée et d'expliquer de manière plus réaliste les données expérimentales obtenues (Houmard *et al.*, 2007).

Plusieurs travaux utilisant l'XPS, la microscopie à force atomique (AFM) ou la spectroscopie de masse d'ions secondaires, couplée à une analyse par temps de vol (ToF-SIMS) ont mis en évidence l'influence de la procédure de préparation et de nettoyage de l'acier inoxydable austénitique sur la composition de sa couche de contamination (Compère *et al.*, 2001), sur son énergie de surface (Boulangé-Petermann *et al.*, 1993), et par conséquent sur l'établissement d'un film conditionnant lors de son immersion (Compère *et al.*, 2001). Néanmoins, quelle que soit la procédure de nettoyage employée (acétone/éthanol, hexane, détergent), la contamination organique des surfaces d'acier inoxydable reste inévitable (Compère *et al.*, 2001 ; Guillemot *et al.*, 2006 ; Adoue *et al.*, 2007) et peut être un facteur facilitant la formation du film conditionnant, par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes.

Au vu de ces différentes informations, il est possible de représenter la surface d'acier inoxydable selon le schéma présenté sur la Figure 5.

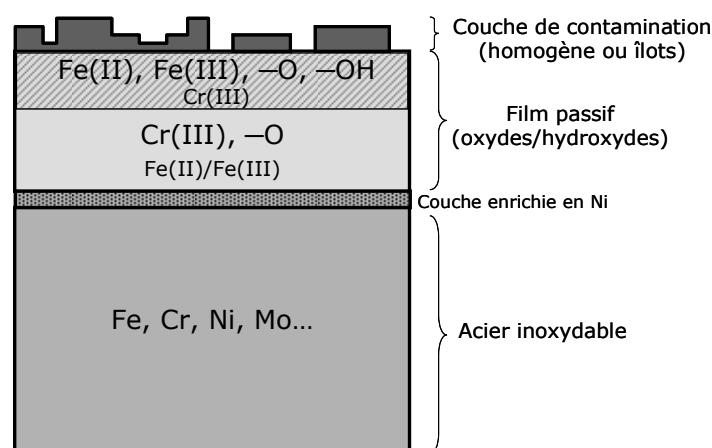


Figure 5. Structure et composition de la surface des aciers inoxydables austénitiques.

II – L'acier inoxydable austénitique : matériau de prédilection pour de nombreuses applications

A – Utilisation de l'acier inoxydable dans l'industrie agro-alimentaire

Grâce à leurs propriétés, les aciers inoxydables austénitiques constituent le principal matériau des équipements agro-alimentaires (Clayton et Olefjord, 2002), plus particulièrement les nuances 304 et 316. Du fait de leur résistance à la corrosion, aux détergents et aux produits désinfectants, ils peuvent subir l'entretien, les séquences de nettoyage en place répétées et les procédures de stérilisation en voie humide et en voie sèche (Holah et Gibson, 2000). Leur utilisation est tout à fait compatible avec les conditions de pression, de température et de pH imposées lors de la fabrication des produits alimentaires. Leur grande résistance mécanique, associé à une longévité avérée et un coût relativement réduit en font un matériau idéal pour la réalisation de cuves, de conduites, de pompes, d'échangeurs thermiques, de tanks de stockage, d'outils de découpe, etc.

Or, malgré les procédures drastiques de nettoyage et de désinfection, ces équipements peuvent être contaminés par une flore bactérienne et fongique très diversifiée (Bagge-Ravn *et al.*, 2003 ; Jullien *et al.*, 2002). A titre d'exemple, Flint *et al.* (2000) ont observé la colonisation de surfaces d'acier inoxydable austénitique 304L et 316L par des bactéries isolées de l'industrie laitière. Briandet *et al.* (1999) ont montré que *L. monocytogenes* adhère à l'acier inoxydable dans des conditions de croissance (4°C, présence d'acide lactique), rencontrées dans de nombreuses applications agro-alimentaires (ex. : lait, viande). Brugnoni *et al.* (2007) ont enfin démontré l'adhésion de levures à l'acier austénitique 304L, matériau usuel des industries de production de jus de pomme, dans des conditions statiques mimant le stockage dans des tanks.

B – Utilisation de l'acier inoxydable dans le domaine biomédical

Les instruments chirurgicaux et médicaux (scalpels, aiguilles), ainsi que de nombreux dispositifs implantables comme les valves cardiaques, les pacemakers, les stents (endoprothèses vasculaires et urétrales), les dispositifs de fixation osseux (plaques, vis, broches), les prothèses (articulaires, orthopédiques) ou le matériel d'orthodontie (implants dentaires, appareils de contention) sont constitués d'acier inoxydable austénitique 316L (Newson, 2002). Son utilisation pour ce type d'application est spécifiée par les normes NF EN ISO 7153-1, 5832-1 et 5832-9.

Dans le cas des outils médicaux et chirurgicaux, ce matériau présente de nombreuses propriétés intéressantes : résistance à la corrosion, facilité de nettoyage et de stérilisation, « usinabilité » (pièces de petite taille et de forme complexe), longévité et coût raisonnable (recyclage possible). De plus, il est possible de polir le matériau jusqu'à obtenir une finition de surface « miroir »,

appréciée des médecins et des patients (aspect « propre »). Un procédé de polissage mécanique suivi d'un électro-polissage permet d'atteindre une rugosité de l'ordre du nanomètre, ce qui facilite le nettoyage et minimise les risques de corrosion.

L'acier inoxydable est considéré comme un matériau biocompatible, en raison de sa résistance à la corrosion (pas de relargage de nickel en l'absence de corrosion (Linden *et al.*, 1985)). Cet alliage est donc fréquemment utilisé pour fabriquer des dispositifs implantables. Toutefois, les caractéristiques des différents fluides corporels (sang, lymphe, salive), comme par exemple la concentration en chlorure, peuvent initier un phénomène de corrosion localisée (relargage de Cr^{3+} et Cr^{6+}), nécessitant un suivi rigoureux et régulier des implants et un retrait au bout de 6 à 12 mois. L'utilisation d'acier inoxydable austénitique est donc restreinte à la fabrication d'implants non permanents ou de matériel à usage unique (aiguilles, scalpels).

L'acier inoxydable 316L présente néanmoins une excellente tenue mécanique (résistance à l'usure due aux frottements, ductilité et élasticité). De plus, sa résistance aux forces de traction et de rotation et son « usinabilité » en font un matériau de choix pour la conception d'implants orthopédiques (vis, broches), pour la chirurgie osseuse et pour la fabrication d'outillages chirurgicaux (fraises, mèches) (Disegi et Eschbach, 2000). Pour prévenir le phénomène de corrosion et améliorer la biocompatibilité, l'acier inoxydable est parfois recouvert d'un mince film d'or ou traité par un procédé de nitruration (Bordjih *et al.*, 1996).

Tout comme dans le cas des industries agro-alimentaires et malgré les procédures drastiques de stérilisation et de désinfection (matériau, patient, personnel et salles d'opération), les implants et outils chirurgicaux peuvent être colonisés par des microorganismes lors de l'intervention proprement dite ou dans les jours suivants (Khardori et Yassien, 1995 ; Stocks et Janssen, 2000). Les conséquences peuvent être graves pour la santé du patient (inflammations, septicémies, dysfonctionnements de la prothèse) et nécessitent dans la majorité des cas un retrait de l'implant et un traitement antibiotique ou antifongique. Ainsi, van der Borden et ses collaborateurs (2004) rapportent la contamination de fixations orthopédiques percutanées, permettant la réparation de fractures et la reconstruction osseuse, par *S. epidermidis*, présent en temps normal sur la peau. Ce type d'infection a conduit, dans les cas les plus extrêmes, à des ostéomyélites et à la destruction de l'os et des tissus adjacents. Les surfaces d'acier inoxydable peuvent également être contaminées par des levures. Par exemple, *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis* sont responsables de 2 à 10 % des endocardites des valves cardiaques et d'environ 4,5 % des infections de pacemakers.

Conclusion

Les caractéristiques physiques de l'acier inoxydable austénitique (rugosité, micro-topographie), ainsi que sa nature métallique et la présence d'un film passif et d'une couche de contamination en

extrême surface, influencent les caractéristiques physico-chimiques du matériau (énergie de surface, charge) et par conséquent, jouent un rôle sur l'adhésion des microorganismes, dans des domaines aussi diversifiés que les industries agro-alimentaires (laiteries, brasseries, boulangeries et boucheries industrielles, raffineries) et le secteur biomédical (hygiène des personnes, dispositifs implantables, champs opératoires). Des traitements destinés à modifier les surfaces (équipements, outils chirurgicaux, implants, etc.), pour empêcher l'adhésion microbienne, constituent une stratégie intéressante pour l'ensemble de ces applications.

CHAPITRE III – MODIFICATION DES SURFACES D'ACIER INOXYDABLE : ELABORATION DE SURFACES ANTI-ADHESIVES

Introduction

Le passage des microorganismes de l'état planctonique à l'état sessile, phase précoce de la formation d'un biofilm, représente une étape cible dans la prévention de la colonisation des surfaces. Nous avons également compris que l'adhésion microbienne dépend de nombreux facteurs liés au milieu environnant, aux microorganismes et au matériau solide. Dans la plupart des cas, il n'est pas possible d'agir sur les caractéristiques du milieu suspendant (fluides corporels, matrice alimentaire, eaux usées) ou sur les propriétés de surface des nombreux microorganismes présents. Par conséquent, la stratégie la plus couramment employée pour prévenir la colonisation microbienne consiste à élaborer des surfaces anti-adhésives, c'est-à-dire à modifier les propriétés de surface du matériau (rugosité, énergie de surface, charge, nature chimique) pour empêcher les interactions spécifiques et non-spécifiques entre microorganismes et support. De nombreux procédés, très divers, sont mis en œuvre dans cette optique sur les surfaces d'acier inoxydable austénitique, pour des applications dans le domaine biomédical et l'industrie agro-alimentaire. Ainsi, des revêtements de surface, constitués de macromolécules comme des enzymes (Parkar *et al.*, 2004 ; Minier *et al.*, 2005), des « biosurfactants » sécrétés par des bactéries (Busscher *et al.*, 1996 ; Meylheuc *et al.*, 2006) ou des polymères (ex. : polyéthylène glycol, polyéthylène oxyde) formant une sorte de « brosse » moléculaire (Brooks et Flint, 2008), sont synthétisés sur l'acier inoxydable par immobilisation covalente, adsorption ou « greffage », et inhibent l'adhésion bactérienne. Un autre type de procédé, basé sur les techniques « sol-gel » et réalisé en voie humide (« wet-coating »), consiste à modifier les propriétés physico-chimiques de la surface de l'alliage, en la recouvrant d'un film mince polymérisé (quelques nanomètres à quelques micromètres) et transparent, qui ne modifie pas l'aspect visuel du matériau ni ses caractéristiques intrinsèques (Rosmaninho *et al.*, 2007). La technologie du « placage chimique » (ou « electroless plating »), procédé auto-catalytique ne nécessitant pas l'apport d'énergie électrique, constitue une autre méthode pour réduire l'adhésion microbienne. Ainsi, l'une des techniques les plus courantes est le dépôt de couches de nickel-phosphore sur le matériau solide (Zhao *et al.*, 2005 ; Zhao et Liu, 2006).

Un ensemble de procédés, basé sur l'utilisation des plasmas, se développe de manière exponentielle depuis une dizaine d'années, comme illustré sur la Figure 6, et s'avère extrêmement intéressant pour modifier les propriétés de surface des matériaux, notamment celles de l'acier inoxydable, et les rendre anti-adhésives.

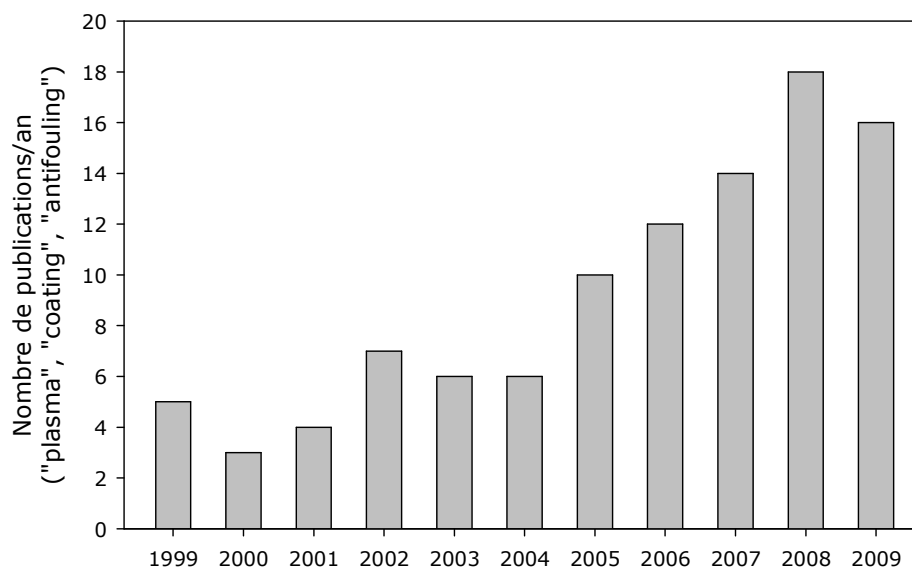


Figure 6. Evolution du nombre de publications annuelles concernant l'utilisation des procédés plasma pour rendre les surfaces des matériaux (polymères, céramiques, acier inoxydable) anti-adhésives.

Recherche réalisée sur « Web of Science » en septembre 2009, avec les mots-clés « plasma », « coating » et « anti-fouling ».

I – Définition d'un plasma et différents modes de génération

Le plasma est un état de la matière, au même titre que « solide », « liquide » ou « gaz », qui constitue 99,5% de l'univers (exemple Figure 7 a). C'est un milieu ionisé, donc conducteur de l'électricité, et globalement neutre. Il est constitué d'un mélange de particules neutres (atomes, molécules), d'ions positifs (atomes ou molécules ayant perdu un ou plusieurs électrons), d'ions négatifs, d'électrons et de radicaux libres. Ces nombreuses espèces excitées et/ou ionisées interagissent au sein du plasma, qui constitue un environnement chimique très réactif. Lorsque ces espèces retombent dans leur état initial, un rayonnement électromagnétique est émis, d'où une lueur caractéristique (Figure 7 b).



Figure 7. Photographies a) d'un plasma naturel : la foudre, et b) d'un plasma d'argon dans un réacteur de laboratoire.

Les plasmas dits « chauds » sont des milieux gazeux de très forte densité et totalement ionisés, c'est-à-dire composés exclusivement d'ions et d'électrons, qui interagissent constamment entre eux sans jamais pouvoir former un atome ou une molécule stable. Ils se caractérisent par des énergies très importantes. Du fait du grand nombre de collisions, les températures (donc les énergies) des différentes espèces présentes dans le milieu sont uniformisées et peuvent atteindre un à plusieurs millions de degrés. Le plasma est en équilibre thermodynamique. Les représentants les plus connus de cette catégorie sont les étoiles, et notamment le Soleil. Ces plasmas « chauds » constituent la très grande majorité des plasmas de l'univers. Par opposition, les plasmas qui n'atteignent pas ces températures colossales sont qualifiés de plasmas « froids ».

Il existe deux grandes catégories de plasmas « froids » :

- les plasmas thermiques : la pression du gaz dans le réacteur est relativement élevée et peut être de l'ordre de la pression atmosphérique (10^4 - 10^6 Pa). Du fait de cette pression importante, les collisions entre électrons et particules sont nombreuses, donc le plasma est fortement ionisé, bien qu'il puisse subsister des neutres. Dans ces plasmas, l'ionisation est essentiellement un phénomène thermique, dû aux collisions élastiques (*i.e.*, les libres parcours moyens des différentes espèces sont trop faibles pour produire un état d'ionisation par collisions inélastiques directes). Dans certains cas, les plasmas thermiques sont à l'équilibre thermodynamique, ce qui signifie que les électrons et les autres espèces présentes dans le milieu ont tous une énergie élevée, donc une température importante, qui peut atteindre plusieurs dizaines de milliers de degrés. Ces plasmas sont donc loin d'être froids, mais sont dénommés ainsi en raison de leur énergie très inférieure à celle des plasmas « chauds » ;
- les plasmas hors équilibre thermodynamique : ils sont réalisés sous des pressions réduites (environ 1 à 10^4 Pa) et sont donc appelés « plasmas basse pression ». Dans ces conditions, le libre parcours moyen des particules est très long et la transmission d'énergie (*i.e.*, ionisation) ne peut se produire que par collision inélastiques des électrons avec les autres espèces. Or, les électrons sont peu nombreux (densité électronique faible par rapport à la densité des neutres, c'est-à-dire les atomes et les molécules), donc le nombre de collisions est faible. De plus, ces électrons ne présentent pas une énergie suffisamment élevée (en raison de leur masse infinitésimale) pour provoquer l'ionisation de l'ensemble des neutres. Ces plasmas se caractérisent donc par un faible taux d'ionisation. En raison du nombre peu important d'interactions, seuls les électrons sont portés à haute température (de l'ordre de 10^4 °C), alors que les autres particules (ions, radicaux, fragments de molécules, neutres) restent à une température proche de l'ambiante. C'est pourquoi ces plasmas constituent des systèmes hors équilibre thermodynamique.

Remarque : certaines décharges non thermiques sont générées à pression atmosphérique. Elles peuvent être produites dans des conditions particulières, en présence de métastables

(i.e., espèces excités à très longue durée de vie), et mettent en jeu des mécanismes proches des décharges de Townsend, luminescentes et couronnes (Naudé *et al.*, 2005 ; Alexandrov et Hitchman, 2005).

Les plasmas hors équilibre thermodynamique sont les plus fréquemment employés dans le secteur industriel (microélectronique, automobile, métallurgie, plasturgie, optique) et dans les différents domaines de recherche associés. En effet, la grande majorité des espèces présentes (sauf les électrons) ont une énergie faible, ce qui évite l'échauffement global du milieu. Il est donc possible d'appliquer ces procédés aux substrats thermosensibles, comme les plastiques. De plus, des substrats difficiles à modifier par des techniques chimiques, comme les aciers inoxydables, peuvent être traités aisément par ces technologies.

La génération d'un plasma nécessite un apport d'énergie extérieur (chauffage intense, bombardement par des particules, champ électromagnétique ou électrique) et de nombreuses sources existent (laser, plasma d'arc, décharge électrique). Dans la majorité des cas, les plasmas « techniques » sont produits par excitation d'un gaz plasmagène, introduit dans le réacteur à une pression donnée, grâce à une décharge électrique (application d'une différence de potentiel entre deux électrodes). La décharge correspond à une conversion rapide de l'énergie électrique en énergie cinétique. Dans le cas des plasmas hors équilibre thermodynamique, les électrons sont quasiment les seules particules mises en mouvement, en raison de leur faible masse par rapport à celle des autres espèces. Le transfert d'énergie s'effectue ensuite par collisions inter-particulaires, conduisant à l'excitation et/ou à l'ionisation des atomes et des molécules. Les électrons issus de cette dissociation vont à leur tour provoquer des ionisations et excitations, si leur énergie cinétique est suffisante (phénomène « d'avalanches électroniques »). Les ions positifs, accélérés vers l'électrode négative, permettent l'éjection d'électrons secondaires, qui vont également participer au processus d'ionisation. Cette émission d'électrons secondaires permet l'entretien permanent du processus et on parle de décharge « auto-entretenu ».

La décharge électrique peut être obtenue de diverses manières :

- par un système sans électrode, sous un champ électromagnétique variable (différentes fréquences) : plasma à résonance cyclotronique magnétique (ECR), décharge héliçon ;
- par un système avec électrodes sous un champ électrique qui peut être continu ou alternatif : décharges couronnes à pression atmosphérique (« corona discharges »), décharges luminescentes (« glow discharges ») à basse pression. L'utilisation d'un courant alternatif permet de minimiser l'accumulation de charges électriques au niveau des électrodes. Dans ce cas, il existe différentes fréquences de travail :
 - o basses fréquences (Hz - kHz) ;
 - o radiofréquence (typiquement 13,56 MHz), à couplage inductif ou capacitif ;

- micro-ondes (typiquement 2,45 GHz)

Si la décharge alimentée en courant continu ou radiofréquence est accompagnée d'un champ magnétique permettant de confiner les électrons, la décharge est de type « magnétron ».

Ces différents modes de génération des plasmas ont largement été utilisés dans des procédés de traitement de surface variés (bombardement, gravure, implantation ionique, dépôt de revêtement), adaptés aux secteurs ciblés : aéronautique, microélectronique, automobile, dispositifs optiques, science des matériaux. Depuis une dizaine d'années, on observe une diversification du champ d'application, avec une augmentation considérable de la mise en œuvre des procédés « plasma » pour modifier les surfaces des plastiques, céramiques ou métaux, dans l'optique de limiter voire d'empêcher toute colonisation microbienne.

II – Avantages des procédés plasma

Les procédés plasma permettent de modifier à façon les propriétés des supports (physico-chimiques, physiques et mécaniques) et/ou de fonctionnaliser les surfaces de manière spécifique, tout en conservant les propriétés intrinsèques du matériau d'origine. De plus, les revêtements de surface obtenus sont homogènes du fait de la nature du plasma (milieu gazeux ionisé). Ce sont des techniques simples à mettre en œuvre, fiables et reproductibles, avec un coût réduit. Elles sont applicables à tout type de matériau (métaux, polymères, céramiques) et à des géométries complexes. Des analyses réalisées en ligne permettent d'évaluer le fonctionnement du procédé, qui peut être contrôlé précisément par la gestion des paramètres extérieurs (Brétagnot *et al.*, 2006). De plus, l'adaptation à l'échelle industrielle est possible dans la plupart des cas.

Les procédés basés sur les plasmas, qualifiés de « dry processes », présentent des avantages significatifs par rapport aux techniques chimiques classiques (procédés en voie humide, « placage chimique »), comme des besoins minimes en précurseurs et de faibles rejets (liquides, gazeux) dans l'environnement, d'où un impact environnemental réduit et peu de risques de toxicité.

L'ingénierie des surfaces par procédé plasma est notamment parfaitement adaptée à la conception de biomatériaux, car les revêtements obtenus sont stériles, biocompatibles et faciles à nettoyer (Chu *et al.*, 2002 ; Legeay *et al.*, 2006).

III – Application des procédés plasma à l'élaboration de surfaces d'acier inoxydable anti-adhésives

Comme mentionné précédemment, les techniques basées sur les plasmas peuvent être mises en œuvre pour une large gamme d'applications (pour revue : Chu *et al.*, 2002 ; Brooks et Flint, 2008). Mais la diversité des méthodes et des matériaux ciblés est telle que nous avons choisi de nous focaliser sur les procédés les plus fréquemment utilisés et appliqués à l'acier inoxydable, dans le but de rendre cette surface anti-adhésive vis-à-vis des contaminations microbiennes.

A – Traitements de surface

Les technologies plasma peuvent être utilisées en amont ou en aval de l'étape principale. Ainsi, la surface d'acier inoxydable est parfois activée par bombardement ionique, afin de créer des liaisons radicalaires « pendantes » avant le dépôt d'un revêtement ou le greffage covalent de molécules d'intérêt. Les gaz les plus couramment utilisés pour réaliser un bombardement ionique sont l'hélium, l'argon, l'azote, l'oxygène ou encore l'ammoniac. Zhang *et al.* (2001) ont ainsi testé le bombardement préalable par plasma d'argon de surfaces d'acier inoxydable silylées, afin de les activer pour une polymérisation de poly(éthylène glycol)méthacrylate. Les dépôts obtenus ont permis de réduire l'adsorption de γ -globuline et d'albumine de sérum bovin (BSA) par rapport aux surfaces d'acier vierge. Néanmoins, cette technique d'activation de surface reste plus fréquemment utilisée dans le cas des polymères, pour fonctionnaliser les supports par des groupements amines, carboxyles, hydroxyles ou aldéhydes, permettant le greffage de molécules bioactives, comme des enzymes ou des anticorps (Siow *et al.*, 2006).

Les traitements par plasma sont également mis en œuvre après l'étape principale, comme par exemple un dépôt « sol-gel », pour renforcer la structure du revêtement synthétisé et éviter toute dégradation. On parle alors de « cross-linking ». Dong et ses collaborateurs (2005) ont introduit la technologie plasma à différentes étapes de leur procédé : des surfaces d'acier austénitique 304 ont tout d'abord été nettoyées et activées par plasma d'oxygène dans une décharge radiofréquence (RF). Puis un dépôt de polyéthylène glycol (PEG) a été synthétisé par « wet-coating ». Enfin, les revêtements ont immédiatement été traités par plasma d'argon, pour former des liaisons chimiques stables et empêcher toute solubilisation en milieu aqueux. Les auteurs ont alors validé expérimentalement les propriétés anti-adhésives des dépôts ainsi obtenus vis-à-vis de *L. monocytogenes* par rapport au matériau non modifié.

B – Implantation ionique

L'implantation d'ions par immersion plasma consiste à introduire, par effet mécanique, des ions sous la surface d'un matériau (polymère, métal ou alliage). Pour cela, un substrat conducteur est immergé dans un plasma et des impulsions négatives à haute tension (plusieurs kV) lui sont appliquées. Les ions positifs présents dans le plasma sont alors accélérés vers la surface du substrat où ils sont implantés. Cette technique, dérivée des procédés d'implantation ionique classiques, est adaptée au traitement des pièces de forme plus complexe en un temps réduit, car le plasma entoure entièrement l'échantillon. L'implantation d'ions à la surface d'un métal modifie ses propriétés mécaniques, optiques ou magnétiques et permet également de moduler son énergie de surface, lui conférant des caractéristiques anti-adhésives accrues envers les microorganismes. Ce procédé a été testé par Zhao *et al.* (2008) pour modifier l'acier inoxydable 316L par implantation d'ions N^+ , O^+ et SiF^{3+} . Les surfaces implantées avec des ions SiF^{3+} , présentant l'énergie de surface la plus faible, ont permis une réduction maximale de l'adhésion de *S. epidermidis* et *S. aureus*, par rapport à l'acier non traité.

C – Dépôt de couches minces par procédé plasma

Les techniques de dépôt de films minces par procédé plasma sont parmi les plus couramment employées pour modifier la surface d'un matériau, car le revêtement résultant présente des caractéristiques maîtrisées et distinctes de celles du substrat natif :

- le dépôt de couches minces par pulvérisation, appelé PVD pour « physical vapour deposition » : au sein du réacteur plasma, le matériau constituant la cathode (cible solide) est bombardé par des ions très énergétiques issus du plasma. Les atomes ainsi éjectés sont transférés vers le substrat placé sur l'anode, où ils se déposent en se condensant. Ces plasmas sont majoritairement générés à basse pression par décharge RF ou magnétron ;
- le dépôt chimique en phase vapeur, assisté par plasma ou PA-CVD (« plasma assisted-chemical vapour deposition »), ou encore PE-CVD (« plasma enhanced-chemical vapour deposition »). Ce procédé consiste à ioniser un gaz en générant un plasma. Des molécules de précurseur, introduites sous forme gazeuse, sont ensuite activées par collisions avec les électrons du plasma, mis en mouvement sous l'action du champ électrique. Ces réactions d'ionisation et de fragmentation produisent des ions et des radicaux très réactifs, qui sont transportés vers le substrat et s'y adsorbent. Des réactions chimiques de recombinaison et de polymérisation au niveau de la surface conduisent alors à la croissance progressive du dépôt solide. Ces plasmas sont réalisés à basse pression, donc à faible température (20 à 400°C), grâce à une décharge radiofréquence ou micro-ondes. Les précurseurs gazeux, dont les fragments constituent ensuite le dépôt, sont des hydrocarbures, des composés

fluorés, des monomères organiques, organométalliques ou organosiliciés. Les gaz vecteurs ou réactifs fréquemment employés sont l'argon, le néon, l'oxygène, l'azote ou l'hélium.

Ces deux procédés ont été utilisés par Santos *et al.* (2004) sur des surfaces d'acier inoxydable 316L, pour synthétiser des films de carbone à structure diamant (ou DLC pour « diamond-like carbon »), par pulvérisation PVD d'une cible en graphite et par PE-CVD de précurseurs hydrocarbonés C_xH_x . L'efficacité anti-adhésive de ces films minces (épaisseur égale à 2 et 1 μm , respectivement) a ensuite été testée par Rosmaninho *et al.* (2007) vis-à-vis de différents produits issus de l'industrie laitière. Mais aucune diminution significative de l'adsorption de sels et de protéines n'a été observée, par rapport à l'acier non traité. Cette absence d'efficacité, qui n'est pas expliquée par les auteurs, a été retrouvée lors des tests d'adhésion de spores modèles de *Bacillus*.

La polymérisation par plasma réalisée par PE-CVD avec une décharge radiofréquence (RF) constitue une stratégie efficace pour modifier les surfaces et limiter l'adhésion microbienne, comme le démontrent plusieurs études et synthèses bibliographiques (Chu *et al.*, 2002). Denes et ses collaborateurs (2000) ont recouvert des surfaces d'acier inoxydable 304 par des couches minces présentant une structure de type polyéthylène glycol (structure « PEG-like »). A cet effet, différents précurseurs oligomériques ont été introduits dans le réacteur et polymérisés par une décharge plasma RF à couplage capacitif. La structure des films obtenus est constituée de chaînes $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n$, témoin de la fragmentation puis de la recombinaison des oligomères au niveau de la surface de l'échantillon, activée par le plasma. En comparaison avec l'acier inoxydable vierge, une diminution significative de l'adhésion de trois bactéries modèles (*Salmonella typhimurium*, *P. fluorescens*, *S. epidermidis*) a été observée, due à une augmentation de l'hydrophilie de surface.

Un autre type de précurseur, l'hexaméthylsiloxane, a été utilisé par Lehocky et ses collaborateurs (2006) dans un plasma d'azote à pression atmosphérique, pour concevoir des dépôts organosiliciés présentant une énergie de surface inférieure à celle des substrats non traités. L'efficacité anti-adhésive vis-à-vis de *S. cerevisiae* a été démontrée.

A ce stade, il faut souligner que l'hexaméthylsiloxane présente de nombreux avantages par rapport aux précurseurs carbonés. En effet, les films constitués d'une matrice carbonée peuvent être facilement rayés et leur « vieillissement » dû à l'oxydation ou à l'humidité conduit souvent à des altérations, telles la détérioration de la structure ou l'apparition de craquelures et de trous (Despax et Raynaud, 2007). En effet, la présence de nombreuses liaisons carbonées pendantes favorise l'oxydation et rend le réseau polymérique peu stable (Biederman *et al.*, 2000). Au contraire, les dépôts synthétisés à partir de précurseurs organosiliciés sont constitués d'un réseau comportant des liaisons O-Si-C, plus dur et résistant du point de vue mécanique et moins sensible à l'oxydation atmosphérique (Despax et Raynaud, 2007). En outre, l'hexaméthylsiloxane est peu coûteux, chimiquement stable et permet d'atteindre des vitesses de dépôt plus élevées qu'avec

d'autres monomères siliciés (Benitez *et al.*, 2000). Par adjonction d'oxygène, il est possible d'augmenter la dureté et le caractère hydrophile des dépôts, qui présentent alors une composition similaire à celle du verre (« silica-like » ; Prasad *et al.*, 2005).

Conclusion

Comme décrit dans ce chapitre, les procédés basés sur les plasmas, et plus particulièrement les dépôts de couches minces par PE-CVD, constituent une approche pertinente pour modifier les caractéristiques des surfaces solides et notamment l'acier inoxydable, dans le but de prévenir l'adhésion microbienne. Ces technologies, peu polluantes et relativement simples à mettre en œuvre pour un coût réduit, permettent de concevoir en une seule étape des revêtements stables en milieu atmosphérique ou aqueux. L'un des avantages majeurs correspond à la maîtrise des caractéristiques du dépôt grâce à la gestion précise des paramètres opératoires. En plus des études menées sur la conception de surfaces anti-adhésives, de nombreux travaux de recherche portent sur la mise au point de surfaces biocides, inhibant la survie des microorganismes au contact du matériau.

CHAPITRE IV – MISE AU POINT DE SURFACES BIOCIDES

Introduction

Une stratégie largement répandue ces dernières années pour prévenir la contamination microbienne consiste à tuer les microorganismes (espèces pathogènes, flore d'altération) s'approchant de la surface réceptrice ou entrant directement en contact avec elle. L'ajout d'antibiotiques a permis, par exemple, l'obtention de surfaces biocides, par adsorption sur la surface, imprégnation dans une matrice ou fixation par interactions ioniques ou liaisons covalentes (Schierholz et Beuth, 2001). A titre d'illustration, des surfaces d'acier inoxydable ont été recouvertes d'un dépôt d'acide polylactique biodégradable, dans lequel était incorporé un antibiotique (gentamicine et/ou teicoplanine). Les auteurs ont démontré un relargage progressif de l'antibiotique pendant 96h, se traduisant par une activité biocide sur *S. epidermidis* (Gollwitzer *et al.*, 2003). Toutefois, l'émergence de phénomènes de résistance bactérienne aux antibiotiques a rapidement incité les chercheurs à se tourner vers d'autres solutions (pour revue : Kumar et Anand, 1998).

Ainsi, Fu *et al.* (2005) ont fabriqué des films constitués de couches alternées de chitosane et d'héparine par physisorption. L'efficacité anti-adhésive et l'activité biocide de ces surfaces ont été établies *in vitro* sur *E. coli*. Des implants en élastomère de silicone ont été recouverts d'un dépôt « sol-gel » relarguant de l'oxyde nitrique, puis testés *in vivo* chez des rats infectés par *S. aureus* au moment de la pose de l'implant. Les résultats obtenus démontrent une réduction de l'infection bactérienne en présence du revêtement (Nablo *et al.*, 2005). Donelli *et al.* (2006) ont par ailleurs développé une méthode consistant à piéger des molécules de fluconazole dans des réseaux poreux de PEG ou d'albumine adsorbés sur la surface du matériau. L'agent antifongique est ensuite progressivement relargué dans le milieu et empêche la colonisation de la surface par *C. albicans*.

Les procédés basés sur les plasmas permettent également d'appliquer des revêtements antimicrobiens sur les surfaces et présentent des avantages significatifs, comme décrit au Chapitre III. Ainsi, nous allons exposer plusieurs exemples de traitements de surface mettant en œuvre ces technologies. Nous verrons également que les éléments métalliques, et plus particulièrement l'argent, présentent une efficacité avérée en tant qu'agents antimicrobiens. Nous nous intéresserons donc aux différentes technologies permettant de traiter les surfaces avec de l'argent, en relation étroite avec la compréhension de son mode d'action vis-à-vis des microorganismes.

I – Surfaces biocides élaborées par procédés plasma

Certains procédés de fabrication de revêtements antimicrobiens se déroulent en plusieurs étapes successives, parmi lesquelles sont insérées les techniques basées sur les plasmas. C'est le cas par

exemple du procédé d'implantation ionique par immersion dans un plasma, mis au point par Zhang *et al.* (2006 a). Les surfaces de chlorure de polyvinyle (PVC) sont tout d'abord activées et rendues hydrophiles par un plasma d'oxygène généré par une décharge radiofréquence. Les échantillons sont ensuite recouverts d'un agent antimicrobien, le triclosane ou le bronopol, puis subissent un bombardement par plasma d'argon (décharge RF), conduisant à une immobilisation covalente du produit actif dans le matériau. L'activité antibactérienne des dépôts ainsi conçus a été démontrée sur deux microorganismes modèles, *S. aureus* et *E. coli*. Cette technique présente toutefois un inconvénient, car un grand nombre de molécules est fragmenté par le bombardement d'ions argon, provoquant une perte d'activité biocide. De plus, les auteurs ont remarqué une perte d'efficacité après un stockage de 10 jours dans l'atmosphère ambiante, sans expliquer le mécanisme de dégradation impliqué.

Les procédés plasma permettent également une fixation covalente des agents réactifs et évitent leur dispersion immédiate lors de la mise en contact avec le milieu environnant. Ainsi, des furanones ont été greffées de manière covalente sur la surface d'un cathéter, par un procédé en plusieurs étapes (Hume *et al.*, 2004). L'une d'elle a permis de fonctionnaliser la surface avec des groupements amines, en déposant une couche mince d'heptylamine, activé par plasma à 200 kHz. Les auteurs précisent que les furanones ont bien été immobilisées de manière covalente, et pas simplement par physisorption. Les cathéters ainsi traités ont conduit à une réduction de la formation de biofilm par *S. epidermidis* par rapport aux surfaces témoins. Ils ont également été testés *in vivo* par implantation chez des moutons et ont diminué la prévalence des infections, principalement causées par *S. aureus*. Ce procédé est long et délicat à mettre en œuvre, car il combine au total 7 étapes successives, avec pour chacune une caractérisation précise (analyses XPS). Les étapes en amont et en aval du procédé plasma nécessitent une quantité importante de précurseurs et de solvants, et l'une d'elle met en œuvre une irradiation sous lumière ultra-violette. Enfin, le spectre d'agents biocides utilisables est limité et l'immobilisation covalente peut restreindre leur activité par blocage des sites actifs.

Une solution alternative consiste à imposer un relargage progressif du composé actif. Hendricks et ses collaborateurs (2000) ont ainsi élaboré un revêtement à libération contrôlée sur une surface de polyuréthane. Le revêtement est constitué d'un réseau poreux permettant un relargage progressif de l'antibiotique Ciprofloxacine™ à proximité de la surface du biomatériau. La fabrication du dépôt s'effectue en plusieurs étapes : tout d'abord, l'antibiotique est incorporé dans une matrice composée de polyuréthane et de polyéthylène glycol, le premier assurant la tenue mécanique et le second rendant la matrice poreuse. Pour garantir un relargage continu de l'antibiotique, la surface du biomatériau est ensuite recouverte par un film barrière (80 Å) de porosité variable, composé de poly(méthacrylate de butyle) polymérisé par plasma RF. Les tests, réalisés *in vitro* sur la bactérie *P. aeruginosa*, confirment l'efficacité antimicrobienne grâce au relargage de l'antibiotique.

Les métaux nobles constituent une catégorie d'agents antimicrobiens très étudiés en raison de leur efficacité et fournissant une solution alternative à l'utilisation massive d'antibiotiques. La partie suivante est donc dédiée à la description de traitements de surface incorporant des éléments métalliques, et plus spécifiquement de l'argent, ainsi qu'à la description des mécanismes d'action de l'argent ionique sur les microorganismes.

II – Revêtements antimicrobiens à base d'argent

A – Revêtements de surface contenant des composés métalliques

De nombreux éléments métalliques présentent une activité antimicrobienne sur les bactéries et sur les levures, comme par exemple l'or, le platine, l'argent, le cuivre, le nickel, le mercure ou encore le zinc (Wataha *et al.*, 2000 ; Yang et Pon, 2003 ; Chohan *et al.*, 2006). Toutefois, l'or et le platine sont rarement utilisés, en raison de leur coût économique élevé, rédhibitoire pour des applications industrielles. Le mercure est toxique pour l'homme et l'environnement (Clarkson, 1997), le nickel peut induire des réactions allergiques (Uter *et al.*, 2003) et le zinc se caractérise par une activité trop faible (Yang et Pon, 2003). Par conséquent, le cuivre et l'argent focalisent l'essentiel des travaux concernant la synthèse de surfaces métalliques biocides (Chu, 2009). A titre d'exemple, Zhang et ses collaborateurs (2006 b) ont réalisé une implantation de cuivre par immersion plasma de substrats en polyéthylène, pour rendre la surface antibactérienne. Les analyses XPS ont montré que les éléments implantés dans les couches inférieures étaient présents sous forme métallique, alors que les espèces à proximité de la surface ou déposées sur le matériau étaient plutôt oxydées (CuO). L'efficacité biocide des matériaux traités a été démontrée sur *S. aureus* et *E. coli*, révélant une diminution de la viabilité cellulaire de 96,2% et 86,1%, respectivement.

Quelques études ont été menées pour évaluer l'activité antifongique de dépôts contenant du cuivre, réalisés par « wet-coating » (Cioffi *et al.*, 2005) et implantation ionique (Ivanov-Omskii *et al.*, 2000). Toutefois, ce type d'approche reste rare, en regard de la littérature relative aux modèles procaryotes.

B – Elaboration de revêtements antimicrobiens contenant de l'argent

Les propriétés bénéfiques de l'argent pour limiter la propagation des infections et améliorer l'hygiène quotidienne sont connues et utilisées depuis plus de 7000 ans (Lansdown, 2002 a ; Silver *et al.*, 2006). Les Romains employaient le nitrate d'argent, sans en comprendre le mécanisme d'action, pour soigner les blessures, les brûlures et les ulcères (Klasen, 2000). Par la suite, ce composé n'a cessé d'être employé, par exemple comme antiseptique local (ex : l'Argyrol

développé au début du 20^{ème} siècle par Barnes), pour prévenir la contamination de l'eau ou pour éviter les infections oculaires chez les nourrissons par application d'AgNO₃ (Lansdown, 2002 a). Ses qualités antimicrobiennes, attribuées au relargage d'ions Ag⁺, ont été admises dès l'identification des bactéries comme agents responsables d'infections (Klasen, 2000). De nombreux produits à base d'argent, comme des crèmes composées de sulfadiazine d'argent ou des pansements constitués de feuilles d'argent, ont été utilisés jusqu'à la découverte des antibiotiques (Silver *et al.*, 2006). La sulfadiazine d'argent est toujours employée pour le soin des brûlures, car ce produit est actif contre les bactéries à Gram négatif et positif, les champignons, les protozoaires et certains virus, comme mentionné par Balazs *et al.* (2004). L'argent est considéré comme un élément « oligo-dynamique », en raison de son efficacité antimicrobienne pour de très faibles concentrations (de l'ordre de 0,1 à 10 ppm*) (Silver *et al.*, 2006). Selon Schierholz *et al.* (1998), la concentration minimale inhibitrice de la majorité des bactéries à Gram positif et à Gram négatif se situe entre 0,5 et 10 ppm. Une bactérie en présence d'argent ionique, même très dilué, peut contenir jusqu'à 10⁵-10⁷ ions Ag⁺, chiffre du même ordre de grandeur que le nombre d'enzymes présentes dans la cellule (Lansdown, 2002 a). Ce phénomène, appelé « bio-accumulation », explique l'efficacité des ions Ag⁺ à de faibles concentrations (Lansdown, 2002 a).

1 – Mécanismes d'action des ions Ag⁺

L'argent sous forme métallique est inerte. Toutefois, lorsqu'il s'oxyde au contact de l'atmosphère ou d'un environnement humide ($\text{Ag}_{\text{Métal}} \rightarrow \text{Ag}_2\text{O}$), la dissolution de l'oxyde d'argent formé conduit à la libération d'ions Ag⁺. Ces ions présentent un large spectre d'action, aussi bien contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, que les levures, les champignons ou les virus.

Il est important de noter que l'action biocide de l'argent dépend de la quantité d'ions Ag⁺ présents dans le milieu et réellement disponibles pour interférer avec les microorganismes. En effet, de part sa forte réactivité, l'argent peut interagir avec les protéines et les sels du milieu suspendant (ex : formation de AgCl, précipité très peu soluble), ce qui minimise la quantité active vis-à-vis des cellules. La lumière a également une incidence négative sur l'efficacité biocide des ions Ag⁺ (Kierans *et al.*, 1991), car elle provoque la photo-réduction des cations en atomes métalliques (Ag⁰).

En raison de leur complexité, les mécanismes d'action des ions Ag⁺ ne sont pas complètement élucidés à l'heure actuelle et dépendent du genre et de l'espèce du microorganisme considéré. Néanmoins, les principaux sites de liaison et modes d'action sont connus et décrits dans la littérature.

* ppm : partie par million.

Si l'on considère que la densité de l'eau est égale à 1, alors 1 ppm équivaut à 1 mg/L.

1.1 – Activité antibactérienne des ions Ag^+

Les ions Ag^+ , chargés positivement, sont capables d'interagir avec de nombreux groupements chargés négativement (thiols, carboxyles, carbonyles, hydroxyles, phosphates, amines, amides...), composants élémentaires des molécules biologiques (protéines et enzymes pariétales et intracellulaires, acides nucléiques de l'ADN et de l'ARN), ce qui perturbe leur structure et leurs fonctions au sein de la cellule. Ainsi, Liau et ses collaborateurs (1997) ont démontré l'interaction des ions Ag^+ avec les groupements thiols ($-\text{SH}$). Ils ont démontré que les acides aminés (ex : cystéine) ou le glutathion, qui contiennent ce groupement, forment des liaisons avec les ions Ag^+ . Au contraire, les acides aminés ne contenant pas cette fonction chimique (ex : glycine), les acides aminés constitués de ponts disulfure (ex : cystamine) ou les composés contenant du soufre sous forme $-\text{S}-$ n'interagissent pas avec les cations métalliques (Liau *et al.*, 1997). En présence de composés « parasites » contenant des groupements thiols, l'action antibactérienne des ions Ag^+ est réduite, voire inhibée (test sur *P. aeruginosa* et *S. aureus*). Les ions Ag^+ interagissent également avec les groupements amines des acides aminés et des peptides, ainsi qu'avec les fonctions amides des liaisons peptidiques (Ng *et al.*, 2004) et, plus précisément, avec l'oxygène de la fonction carbonyle $\text{C}=\text{O}$. Fox et Modak (1974) ont démontré que les ions Ag^+ interagissent avec les bases des molécules d'ADN et forment un complexe Ag/ADN . Ils se lient également aux groupements phosphates reliant les bases des molécules d'ADN (Feng *et al.*, 2000).

De nombreuses études sont dédiées à la compréhension des mécanismes d'action des ions Ag^+ sur les bactéries. Ainsi, Feng et ses collaborateurs (2000) ont étudié l'effet de l'argent ionique, introduit sous forme de nitrate d'argent, sur deux bactéries modèles : *E. coli* et *S. aureus*. Ils ont pour cela réalisé des observations par microscopie électronique en transmission (MET), couplée à une analyse dispersive en énergie des rayons X (EDS). En comparant des bactéries *E. coli* en début de phase stationnaire de croissance avec des cellules au même stade mais cultivées en présence d' AgNO_3 (10 mg/L), les auteurs ont observé d'importantes modifications de la morphologie cellulaire :

- formation d'une zone très localisée, située au centre du cytoplasme bactérien et correspondant à la condensation de la molécule d'ADN. Selon les auteurs, ce phénomène est un mécanisme de défense de la bactérie face aux ions Ag^+ . Dans ces conditions, l'ADN ne peut pas être répliqué et la bactérie ne peut plus se multiplier ;
- détachement de la membrane cytoplasmique, qui n'est plus solidaire de la paroi ;
- détérioration de la paroi et de la membrane cellulaire (présence de trous) ;
- présence d'agglomérats autour de la paroi cellulaire et dans le cytoplasme, mais pas au niveau de la région centrale. Ces agglomérats sont constitués d'une quantité importante d'argent et de soufre, détectée par EDS. Ceci confirme que les ions métalliques interagissent préférentiellement avec les groupements thiols présents notamment dans les protéines. Par conséquent, l'activité enzymatique de la cellule est inhibée.

Feng *et al.* (2000) ont également observé que les bactéries *S. aureus* sont affectées par le traitement avec AgNO_3 . Néanmoins, leur intégrité cellulaire est conservée (pas de lyse, contrairement à *E. coli*) et les autres modifications restent mineures en regard de celles détectées chez *E. coli*. Selon les auteurs, *S. aureus* présente un mécanisme de défense face aux ions Ag^+ , lié à l'épaisseur de la couche de peptidoglycane, qui empêche la pénétration efficace des ions Ag^+ dans la cellule.

Jung *et al.* (2008) ont démontré l'efficacité antibactérienne d'une solution d'ions Ag^+ (0,2 mg/L), libérés par électrolyse lors du cycle de nettoyage d'une machine à laver de marque Samsung®, sur *S. aureus* et *E. coli* (réduction de la viabilité cellulaire supérieure à 4 log et inhibition de la croissance cellulaire). Ils ont réalisé des observations similaires à celles décrites par Feng *et al.* (2000) : bactéries à Gram positif moins sensibles que bactéries à Gram négatif, modifications importantes de la morphologie cellulaire, présence de « clusters » d'argent à l'extérieur et à l'intérieur des cellules. Leurs résultats démontrent également une altération de l'activité enzymatique intracellulaire. De plus, les ions Ag^+ provoquent un relargage d'ions K^+ , éléments nécessaires au maintien de la pression osmotique interne (Jung *et al.*, 2008).

Les ions Ag^+ agissent également au niveau de la chaîne respiratoire des bactéries. Une étude a été réalisée par méthode électrochimique sur des bactéries *E. coli* en suspension ou immobilisées sur une surface de verre (Holt et Bard, 2005). Dans les deux cas, l'action des ions Ag^+ sur la chaîne respiratoire a été démontrée pour différentes concentrations en AgNO_3 (1,5 et 10 μM). Plus précisément, les ions métalliques interagissent avec les enzymes de la chaîne respiratoire (ex : NADH déshydrogénase) et empêchent le transport des électrons d'un complexe à l'autre de cette chaîne. Les ions Ag^+ provoquent par ailleurs un découplage entre la chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative (donc la synthèse d'ATP), inhibent la force proto-motrice à travers la membrane cellulaire (en la rendant perméable, avec à la clé la perte du gradient de protons) et altèrent la structure et l'activité des protéines impliquées dans le transport transmembranaire, par liaison avec les groupements thiols (Holt et Bard, 2005). L'inhibition de la respiration bactérienne est corrélée à la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) et à une perte de viabilité, donc à un arrêt de la croissance cellulaire. Les auteurs ont également démontré la capacité d'*E. coli* à excréter des ions Ag^+ en présence de glucose, ce qui constitue un mécanisme de défense face à l'agression extérieure. Toutefois, ce processus nécessite l'hydrolyse d'ATP et cesse donc rapidement en raison de la mort cellulaire (Holt et Bard, 2005).

De plus, les interactions entre les ions Ag^+ et les groupements chargés négativement présents sur les parois bactériennes provoquent des dommages structurels majeurs, notamment des trous. Ceci augmente la perméabilité membranaire et facilite la sortie des constituants cellulaires, ainsi

que la pénétration des ions Ag^+ dans la cellule (Piérard-Franchimont *et al.*, 2004). L'ensemble de ces phénomènes conduit à la mort de la bactérie.

Pour conclure cette partie concernant l'activité antibactérienne des ions Ag^+ , le Tableau 3 présente les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des ions issus de la dissolution de la sulfadiazine d'argent, d'après les travaux de Yin *et al.* (1999). Comme mentionné précédemment, les bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*) sont plus sensibles aux ions Ag^+ (*i.e.*, CMI plus faibles) que les bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *S. epidermidis*).

Tableau 3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de différentes bactéries à Gram positif et à Gram négatif, traitées par de la sulfadiazine d'argent (d'après Yin *et al.*, 1999).

Microorganismes	CMI (mg/L)
<i>S. aureus</i>	12,5
<i>S. epidermidis</i>	10,0
<i>E. coli</i>	7,5
<i>K. pneumoniae</i>	5,0
<i>P. aeruginosa</i>	7,5

Le Tableau 4 répertorie les principaux sites et mécanismes d'action des ions Ag^+ sur les bactéries, relevés dans la littérature, et montrent clairement les multiples cibles de ces ions, expliquant leur activité antimicrobienne redoutable.

Tableau 4. Effet multi-factoriel des ions Ag^+ sur les cellules procaryotes et eucaryotes.

Sites d'action	Mécanismes d'action
Paroi cellulaire	Liaison aux protéines de la paroi Formation d'agglomérats sur la paroi Augmentation de la perméabilité (formation de trous) Libération des constituants essentiels de la cellule Altération de la synthèse de la paroi Dysfonctionnement des récepteurs cellulaires
Membrane cytoplasmique	Augmentation de la perméabilité (trous, absence de cohésion avec la paroi) Altération du potentiel membranaire Détérioration de la chaîne de transport d'électrons et interaction avec les enzymes de la chaîne respiratoire => inhibition de la synthèse d'ATP Altération de la synthèse de la membrane
Cytoplasme	Coagulation et condensation des molécules (ADN, ARN) Interaction avec les acides nucléiques et dénaturation Inhibition de la réplication de l'ADN Inhibition de la transcription et de la traduction (interaction avec les ribosomes et inhibition de la synthèse protéique) Inhibition du repliement protéique Déstructuration des protéines intracellulaires Inhibition de l'activité enzymatique (glucose oxydases, déshydrogénases, etc.) Formation d'agglomérats dans le cytoplasme et dans les vacuoles * Modifications structurelles de la membrane nucléaire et des membranes des organites intracellulaires * Liaison avec les mitochondries * Accumulation de radicaux libres (production de ROS => stress oxydatif)

* Dans le cas des organismes eucaryotes inférieurs (levures).

1.2 – Activité antifongique des ions Ag^+

L'analyse des mécanismes d'action des ions Ag^+ sur les levures est moins développée que dans le cas des bactéries (Kierans *et al.*, 1991). Ainsi, dans leur étude sur l'effet d'une solution d'ions Ag^+ libérés par électrolyse lors du cycle de nettoyage d'une machine à laver (Samsung®), Jung *et al.* (2007) ont démontré l'efficacité vis-à-vis de quatre souches eucaryotes (*C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* et *Aspergillus flavus*), sans donner d'explication concernant le mécanisme d'action des ions Ag^+ .

Il apparaît toutefois que les principaux modes d'action, répertoriés pour les bactéries, se produisent également chez les levures, avec des différences dues à la compartimentation interne et à la structure de la paroi fongique (Tableau 4).

L'action de l'argent sur la paroi cellulaire des levures est illustrée par l'étude de Wells *et al.* (1995) sur *C. albicans*. Les ions Ag^+ inhibent de manière irréversible la phosphomannose isomérase, enzyme clé de la synthèse des mannoprotéines pariétales, en se liant à un résidu cystéine (Cys-150). Son altération provoque une augmentation de la perméabilité de la paroi et conduit à la libération de phosphates, glutamines et autres nutriments vitaux pour le microorganisme.

Selon Kierans *et al.* (1991), la structure interne de différentes levures (*Rhodotorula rubra*, *Debaryomyces hansenii*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*), observée par microscopie électronique en transmission, est affectée lorsque les microorganismes sont cultivés en présence d'ions Ag^+ : détachement de la paroi et de la membrane cytoplasmique, destruction des organites intracellulaires, présence d'agglomérats d'argent au niveau de la paroi. Toutefois, très peu d'agglomérats sont détectés à l'intérieur des levures, contrairement aux observations réalisées sur les bactéries (cf. partie I-B-1.1). Des agrégats sont également identifiés dans le milieu gélosé à proximité des levures (Kierans *et al.*, 1991). Des analyses par spectroscopie dispersive en énergie (EDS) démontrent que l'ensemble de ces « clusters » est constitué d'argent métallique et d'une faible quantité d' AgCl et d' Ag_2S . Pour expliquer la présence d'agrégats au niveau de la paroi cellulaire, les auteurs mentionnent le fait que les levures produisent naturellement des substances réductrices, en absence ou en présence d'argent. Ces composés interviennent vraisemblablement dans la réduction d'une partie des ions Ag^+ en Ag^0 , diminuant la concentration d'espèces antimicrobiennes, bien que ce phénomène ne corresponde pas à un mécanisme de protection déclenché en présence d'ions Ag^+ .

Tout comme dans le cas des bactéries, les ions Ag^+ provoquent une altération de la chaîne respiratoire, au niveau des mitochondries des organismes eucaryotes (Yang et Pon, 2003). Ces auteurs ont observé une modification de la morphologie des mitochondries (*i.e.*, fragmentation de leur réseau de structures tubulaires) pour une concentration en ions Ag^+ de 0,16 mM (soit 17 mg/L). Les mitochondries constituent donc une cible privilégiée des ions Ag^+ . De plus, lorsque *S. cerevisiae* est cultivée sur un milieu contenant du glycérol, substrat obligeant la levure à « respirer », l'activité antifongique des ions Ag^+ est plus importante que lorsque les levures se développent sur un milieu à base de glucose (métabolisme fermentaire). Selon Yang et Pon (2003), les ions Ag^+ induisent la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS), provoquant un stress oxydatif dans les cellules (dégradation des lipides, des protéines et de l'ADN). Ces ROS étant générés par différentes réactions enzymatiques, impliquant notamment des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale, Yang et Pon (2003) ont déduit que l'activité des mitochondries contribue à la toxicité des ions Ag^+ sur les levures.

Yang et Pon (2003) ont également déterminé les concentrations minimales inhibitrices des ions Ag^+ , supprimant 90% de la croissance de *S. cerevisiae* ($\text{CMI}_{90\%}$) en milieu riche (extrait de levure/peptone) et en milieu synthétique, contenant différentes sources de carbone (glucose,

glycérol ou raffinose). Pour les trois milieux riches, la $CMI_{90\%}$ est égale à 0,64 mM (soit 69 mg/L). Elle n'est que de 0,005 mM (soit 0,54 mg/L) en milieu synthétique. Ceci s'explique par la présence de nombreux composés dans le milieu riche non défini, qui piègent les ions Ag^+ et réduisent leur action antimicrobienne. Les conditions de culture (exposition ou non à la lumière, croissance sur milieu solide ou liquide) peuvent également influencer sur l'efficacité biocide (Kierans *et al.*, 1991).

2 – Résistance des microorganismes aux ions Ag^+

Contrairement aux antibiotiques, les ions Ag^+ provoquent très rarement l'émergence de résistances de la part des bactéries ou des levures (Gibbins et Werner, 2005), ce qui constitue un avantage majeur. En effet, les cations métalliques agissent de manière concomitante en de nombreux sites de la cellule (Tableau 4). Or, la probabilité qu'un microorganisme subisse des mutations simultanées de toutes ces fonctions critiques en une seule génération est faible. Par conséquent, lorsque la concentration en ions Ag^+ est suffisante, le microorganisme ne peut pas muter avant d'être tué.

Pourtant, certaines études récentes recensent l'existence de souches bactériennes résistantes (Lansdown, 2002 a ; Silver *et al.*, 2006). Ce phénomène de résistance peut être intrinsèque, c'est-à-dire lié aux gènes présents dans le génome du microorganisme (Percival *et al.*, 2005). Il peut également être acquis grâce à des plasmides ou des transposons. En outre, certains microorganismes mettent en place une réponse adaptative après avoir été cultivés en présence d'une concentration sous-létale d'argent et deviennent alors tolérants à l'argent (Percival *et al.*, 2005). Par exemple, *C. albicans* et *S. cerevisiae* sont capables d'accumuler de l'argent provenant du milieu et de survivre, lorsque la concentration est comprise entre 1 et 2 mM (Kierans *et al.*, 1991). En outre, des cultures répétées à ces concentrations rendent les levures tolérantes. Elles peuvent alors se développer à des concentrations d'argent plus importantes (5 mM), normalement létales (Kierans *et al.*, 1991). Ce phénomène de « bio-accumulation » a également été observé chez différentes bactéries (*Pseudomonas sp.*, *E. coli*) (Silver, 2003). Des bactéries résistantes à l'argent ont également été isolées d'environnements où le métal est présent en quantité importante (effluents de photographies, sols de mines d'argent, blessures en cours de soin, etc.). Des mutants d'*E. coli* résistants aux ions Ag^+ , obtenus par sélection en laboratoire, possèdent un mécanisme actif d'excrétion des cations et aucune porine, permettant habituellement l'entrée des ions Ag^+ , n'est détectée dans leur membrane externe (Li *et al.*, 1997). Des gènes codant pour plusieurs protéines, formant un complexe responsable de l'excrétion des ions Ag^+ , ont été mis en évidence chez *E. coli* dans l'ADN chromosomique (Gupta *et al.*, 2001 ; Franke *et al.*, 2003). Des gènes de résistance à l'argent sont également situés dans des plasmides bactériens IncH (Gupta *et al.*, 2001). Ainsi, le plasmide pMG101 contient neuf gènes de résistance à l'argent (Silver, 2003 ; Silver *et al.*, 2006). Ces différents gènes codent pour des protéines appelées Sil, présentes dans la

membrane interne, l'espace périplasmique et la membrane externe, qui forment une pompe à excrétion de cations Ag^+ en échange de protons H^+ .

3 – Conception de revêtements de surface contenant de l'argent

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, l'effet multi-factoriel de l'argent explique son efficacité biocide importante vis-à-vis d'un large spectre de microorganismes. Face à ce constat, de nombreux travaux ont ciblé cet agent antimicrobien comme composant biocide majeur pour l'élaboration de nouvelles surfaces. Dans cette partie, nous allons donc nous intéresser aux diverses méthodologies employées pour synthétiser des revêtements contenant de l'argent (traitements chimiques, dépôts en voie humide appelé « wet-coating », imprégnation, procédé plasma PVD, implantation ionique, etc.). Devant l'étendue de la littérature et l'intérêt porté à cette problématique, nous ne développerons pas une liste exhaustive de l'ensemble des techniques possibles, mais souhaitons plutôt mettre en exergue la diversité des méthodes, des revêtements de surface obtenus et des microorganismes testés. Des exemples illustrant cette diversité sont exposés dans le Tableau 5.

Dans la plupart des études présentées, les procédés plasma sont le plus souvent utilisés comme outil annexe dans les étapes intermédiaires, pour activer ou fonctionnaliser la surface, ou pour renforcer le dépôt réalisé par voie chimique ou par « sol-gel » (Tableau 5). Pourtant, les technologies plasma présentent de nombreuses potentialités, comme décrit au paragraphe II du Chapitre III.

La majorité des applications citées dans le Tableau 5 concernent des revêtements réalisés sur du plastique (PVC, silicone, polystyrène, etc.) ou du verre. Concernant l'acier inoxydable, nous pouvons citer l'exemple du dépôt réalisé par Charlot et ses collaborateurs (2009). Ce revêtement, fabriqué par voie chimique, est constitué d'une alternance de couches de sulfonate de polystyrène (poly-anion) et d'un polymère poly-cationique emprisonnant l'argent sous forme de nanoparticules et de sel (AgCl). L'efficacité antibactérienne due au relargage d'ions Ag^+ a été démontrée sur *E. coli*. D'après les auteurs, le polymère cationique assure une forte adhérence du revêtement sur le substrat d'acier inoxydable et constitue un « réservoir » d'argent qu'il est possible de renouveler à façon. Toutefois, le nombre d'étapes successives nécessaires et, par conséquent, la durée du procédé constituent des limitations pouvant s'avérer rédhibitoires.

Les approches basées sur les techniques de « placage chimique », de bombardement ionique (PVD) et de dépôt assisté par faisceau d'ions conduisent à des dépôts d'argent massifs faiblement adhérents (Bosetti *et al.*, 2002 ; Sardella *et al.*, 2006) et à un contrôle incomplet du relargage d'ions Ag^+ dans le milieu aqueux environnant. Les matériaux composites obtenus par pyrolyse à

vaporisation de flamme, imprégnation et procédés « sol-gel » représentent une alternative pertinente, car ils sont constitués d'agglomérats d'argent englobés dans une matrice, autorisant un relargage progressif et contrôlé. Toutefois, la maîtrise de la taille des « clusters » reste difficile (Sardella *et al.*, 2006). De plus, ces procédés présentent des limitations majeures, dues à la consommation excessive de solvants et de produits chimiques, ainsi qu'aux nombreuses étapes nécessaires.

Ainsi, pour surmonter ces problèmes déjà évoqués au paragraphe I, des procédés basés sur les plasmas et nécessitant une seule étape ont été développés pour synthétiser des matériaux composites contenant de l'argent, essentiellement sous forme de nanoparticules. C'est le cas par exemple de la technique mise au point par Biederman *et al.* (1997) et par Katsikogianni *et al.* (2006) : le couplage d'un bombardement atomique avec un plasma magnétron a permis d'obtenir un revêtement constitué d'une matrice carbonée de type DLC dans laquelle sont incorporés des « clusters » d'argent (Tableau 5). Nous allons maintenant nous focaliser sur un procédé particulièrement novateur, dont le principe général consiste à mettre en œuvre simultanément le bombardement ionique d'une cible d'argent et une décharge plasma radiofréquence, permettant de décomposer par PE-CVD un précurseur organique gazeux. L'objectif est de synthétiser un matériau composite, constitué de particules métalliques englobées dans une matrice organique.

Tableau 5. Exemples de technologies dédiées à la synthèse de revêtements de surface contenant de l'argent.

Nom de la méthode	Référence	Descriptif de la méthode	Microorganismes testés	Résultats des tests	Analyse critique
Méthode chimique : incorporation d'ions Ag ⁺	Balazs <i>et al.</i> (2004)	<ol style="list-style-type: none"> 1) Pré-fonctionnalisation d'une surface de PVC par bombardement RF d'oxygène => augmentation du nombre de groupements esters en surface. 2) Traitement chimique par NaOH => saponification des esters phatiques du PVC (<i>i.e.</i>, présence de groupements COO⁻). 3) Incubation dans une solution d'AgNO₃ => interaction Ag⁺ / COO⁻. 	<p><i>P. aeruginosa</i> (2 souches de laboratoire et 2 souches issues d'isolats cliniques) (en début de phase stationnaire de croissance)</p>	<p>Inhibition totale de l'adhésion bactérienne initiale pour les 4 souches, attribuée au relargage d'ions Ag⁺.</p> <p>Prévention du développement d'un biofilm mature (72h) : diminution de la population bactérienne de 8 log (1 souche).</p>	<p>Procédé en plusieurs étapes. Pas de contrôle de la quantité d'Ag réellement incorporée. Pas d'estimation de la quantité totale d'argent relarguée.</p>
Méthode chimique : incorporation d'ions Ag ⁺	Francolini <i>et al.</i> (2006)	<ol style="list-style-type: none"> 1) Fabrication d'une solution de polyuréthane carboxylée (1 groupement COO⁻ par unité polymérique PEUA) par condensation (deux étapes) ; 2) Traitement de la solution avec AgNO₃ => interaction Ag⁺ / COO⁻ ; 3) Polymérisation => disques PEUA-Ag. 	<p><i>P. aeruginosa</i> <i>S. epidermidis</i></p>	<p>Activité antibactérienne pendant 16 jours consécutifs (évaluée par le test de Kirby Bauer).</p> <p>Inhibition de la croissance bactérienne sur la surface du matériau (observation par MEB).</p>	<p>Procédé en plusieurs étapes.</p>
Dépôt d'un revêtement par « placage chimique » (« electroless plating »)	Gray <i>et al.</i> (2003)	<ol style="list-style-type: none"> 1) Traitement par plasma d'air (décharge micro-ondes, 5 min) => amélioration de l'adhésion du revêtement au substrat. 2) Dépôt du revêtement en argent (structure granulaire, surface recouverte d'agglomérats d'argent de 50-100 nm) sur polyuréthane, par « placage chimique » (solution d'Ag + solution d'agent réducteur). 	<p><i>E. coli</i> (isolat clinique d'infection urinaire) (phase exponentielle de croissance)</p>	<p>Faible activité antibactérienne (moins de 0,5 log), mesurée après adhésion des cellules aux surfaces traitées (pendant 3h).</p> <p>Inhibition de l'adhésion des bactéries aux surfaces traitées (microscopie à épifluorescence).</p>	<p>Mauvaise adhérence du dépôt sur le substrat. Peu de dissolution de l'argent (car ratio surface/volume faible).</p>
Fabrication de nanoparticules d'argent métallique (1-10 nm) englobées dans des nanoparticules de SiO₂ amorphe (~1 µm) par pyrolyse à vaporisation de flamme	Egger <i>et al.</i> (2009)	<ol style="list-style-type: none"> 1) Préparation d'une solution contenant les précurseurs (AgNO₃ et organosilicié) dissous dans un solvant. 2) Vaporisation et combustion de cette solution pour fabriquer le nanomatériau (« flame spray pyrolysis process »). 3) Fabrication d'une plaque de polystyrène par incorporation des nanoparticules de SiO₂ englobant les nanoparticules d'argent. 	<p><i>E. coli</i>, <i>S. aureus</i></p>	<p>Activité antibactérienne (déterminée par incubation des cellules sur la surface) : diminution de la viabilité de <i>E. coli</i> (- 4,4 log) et de <i>S. aureus</i> (- 2,1 log).</p>	<p>Matériau homogène (structure et composition). Nanoparticules d'argent immobilisées => empêche leur relargage direct.</p>

<p>Imprégnation par des nanoparticules d'argent métallique avec CO₂ supercritique</p>	<p>Furno <i>et al.</i> (2004)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Synthèse d'un précurseur organométallique (métal = argent). 2) Dissolution de ce précurseur dans du CO₂ supercritique. 3) Imprégnation du substrat de silicone par perméation du CO₂ supercritique (sous pression) pendant 24h. 4) Exposition du substrat à un flux d'H₂ => décomposition de l'organométallique => distribution homogène des nanoparticules d'argent (diamètre : 10 à 100 nm). 	<p><i>S. epidermidis</i> (milieu de phase exponentielle de croissance)</p>	<p>Efficacité antibactérienne au bout d'1h, persistante (10 jours) même en présence d'un film conditionnant (plasma humain) : déterminée par méthode du disque d'inhibition, par adhésion (1h) des bactéries aux surfaces et sur cellules planctoniques.</p> <p>Activité attribuée au relargage d'ions Ag⁺ (à partir de la surface et du cœur du matériau). Les ions Ag⁺ traversent le film conditionnant, malgré les interactions avec les protéines.</p> <p>Quantification par ICP-MS de l'argent relargué : relargage plus importante dans plasma humain que dans eau déionisée ; relargage important pendant les 3 premiers jours.</p>	<p>Activité antibactérienne faible ou nulle pour les échantillons rincés après imprégnation => grande quantité d'Ag présent en surface mais très faible cohésion.</p> <p>Possibilité de traiter la lumière des cathéters.</p>
<p>Méthode « sol-gel » : dépôt de films minces (~0,5-1 µm) de silice dopés avec de l'argent</p>	<p>Jeon <i>et al.</i> (2003)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Préparation du « sol » par mélange d'un composé organosilicié (tétraéthyl orthosilicate), de nitrate d'argent, d'eau et d'acide nitrique. 2) Dépôt par « wet-coating » sur un substrat de verre. 3) Séchage du revêtement (100°C, 30 min). 4) Traitements thermiques (200, 300, 400, 500 et 600°C, 30 min) : stabilisation chimique du dépôt par une trempe => densification du réseau de SiO₂, réduction de Ag⁺ en Ag métallique et formation d'agglomérats (« clusters »). 	<p><i>S. aureus, E. coli</i> (milieu de phase exponentielle de croissance)</p>	<p>Réduction de la viabilité cellulaire d'environ 5 log après 24h d'adhésion au dépôt, par relargage d'ions Ag⁺.</p>	<p>Procédé en plusieurs étapes (longue durée de préparation).</p> <p>Pas applicable à des matériaux thermosensibles.</p> <p>Difficulté pour maîtriser la taille des agglomérats d'argent.</p> <p>Pas d'estimation de la quantité totale d'argent relarguée.</p>

<p>Dépôt d'un revêtement d'argent métallique assisté par faisceau d'ions (« ion beam assisted deposition »)</p>	<p>Klueh <i>et al.</i> (2000)</p>	<p>Dépôt sur un support de poly(éthylène téréphtalate) d'un film d'argent métallique (épaisseur = 0,3 µm) par procédé PVD (bombardement d'une cible d'argent) couplée à un bombardement ionique du support pour renforcer l'adhérence et la stabilité du film pendant sa croissance.</p>	<p><i>S. epidermidis</i></p>	<p>Ralentissement de la croissance des bactéries planctoniques (test en mode « batch », diminution du taux de croissance d'un facteur 5-6), dû au relargage d'ions Ag⁺.</p> <p>Inhibition de l'adhésion initiale et de la colonisation (test en mode dynamique dans une chambre à écoulement, observation par microscopie à épifluorescence).</p>	<p>Pas d'estimation de la quantité totale d'argent relarguée.</p>
<p>Dépôt d'un alliage titane/argent par PVD</p>	<p>Ewald <i>et al.</i> (2006)</p>	<p>1) Dépôt d'un alliage argent/titane (épaisseur ~ 2 µm) sur support de titane, par procédé PVD (bombardement simultané des deux cibles métalliques dans un plasma d'argon : arc pour le titane et magnétron pour l'argent). 2) Nettoyage physique des dépôts réalisés par bombardement (plasma) d'argon.</p>	<p><i>S. epidermidis</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i> (phase expo. de croissance) Evaluation de la biocompatibilité : ostéoblastes et cellules épithéliales</p>	<p>Réduction de la viabilité cellulaire des bactéries adhérentes pendant 24h (de 30 à 60%). Quantification de l'argent relargué (ICP-MS) : quantité relarguée dépend de la concentration en argent dans le dépôt.</p> <p>Pas de cytotoxicité sur les lignées cellulaires testées.</p>	<p>Composition et structure du dépôt homogènes (car procédé plasma).</p>
<p>Dépôt d'un film DLC dopé à l'argent par plasma d'arc</p>	<p>Kwok <i>et al.</i> (2007)</p>	<p>Dépôt d'un film de carbone à structure diamant (« diamond-like carbon ») dopé avec de l'argent métallique, par pulvérisation plasma d'une cible constituée de graphite et d'argent.</p>	<p><i>E. coli</i> Plaquettes sanguines</p>	<p>Activité antimicrobienne (diminution de la viabilité bactérienne > 98% après 24h au contact du dépôt). Pas d'inhibition de l'adhésion des plaquettes ou de leur activité.</p>	<p>Pas d'explication du mécanisme d'action. Pas de détermination de la quantité totale d'argent relarguée.</p>
<p>Dépôt d'un film DLC/Ag par bombardement atomique</p>	<p>Katsikogianni <i>et al.</i> (2006)</p>	<p>1) Activation de la surface de PVC par bombardement (plasma) d'argon. 2) Dépôt d'un revêtement de carbone à structure diamant (« diamond-like carbon film ») contenant des atomes d'argent (épaisseur ~ 0,1 µm), par plasma de C₂H₂ et bombardement atomique d'une cible d'Ag (« atom beam/magnétron sputtering »).</p>	<p><i>S. epidermidis</i> (1 souche de laboratoire et 1 souche d'isolat clinique)</p>	<p>Réduction du nombre de bactéries adhérentes (expériences d'adhésion en chambre à écoulement radial). Activité antibactérienne des ions Ag⁺ relargués par le dépôt.</p>	<p>Dépôt homogène, de faible épaisseur. Technique permettant de combiner les propriétés du film DLC (dureté, résistance à l'usure, biocompatibilité) et l'activité biocide de l'argent.</p>

C – Dépôt par PE-CVD/bombardement ionique de films minces composites contenant de l'argent

La technique basée sur le couplage PE-CVD/bombardement ionique dans un plasma froid, pour produire des films minces composites, constitués de métal inclus dans une matrice, a été mise au point il y a plus de 25 ans (Despax et Flouttard, 1989 ; Despax *et al.*, 1990). Comme mentionné par Sardella *et al.* (2006) puis Hlidek *et al.* (2008), différents revêtements de ce type ont ainsi été décrits dans la littérature : Ag/DLC, Ag/C:H:N, Ag/Si:C:H:N, Ag/PTFE, Ag/Si:C:O:H, Ag/TiO₂ (Borras *et al.*, 2008). Ainsi, Despax et Raynaud (2007) ont mis au point une technique de dépôt d'un film mince Ag/SiC_xO_yH_z (épaisseur ~ 250 nm), réalisé par bombardement d'ions argon sur une cible d'argent, couplé à la fragmentation/polymérisation d'un précurseur organosilicié, l'hexaméthylidisiloxane, par PE-CVD dans une décharge radiofréquence (RF). Toutefois, ces différents revêtements étaient à l'origine dédiés à des applications en microélectronique, en aéronautique ou pour la confection de film barrière empêchant les phénomènes d'oxydation (Hlidek *et al.*, 2008).

L'extrapolation de ces procédés dans l'optique d'obtenir des revêtements antimicrobiens a débuté avec les travaux de Balazs *et al.* (2005) et Sardella *et al.* (2006). Ces auteurs ont évalué l'activité antibactérienne de différents supports (chlorure de polyvinyle, polyéthylène et silicium) recouverts d'un film contenant des nanoparticules d'argent isolées et englobées dans une matrice d'oxyde de polyéthylène (dépôts Ag/PEO). La technique de dépôt (*i.e.*, décharge plasma RF, configuration du réacteur, gaz vecteur) est identique à celle décrite par Despax et Flouttard (1989), mais le précurseur organique diffère. En effet, la matrice PEO a ici été sélectionnée, en raison de son caractère hydrophile, de sa faible toxicité et de sa biocompatibilité (Balazs *et al.*, 2005). Le film mince ainsi obtenu (épaisseur : 50 à 200 nm) est constitué de nanoparticules métalliques (diamètre de l'ordre de 2 à 10 nm) englobées dans la matrice PEO.

Différents paramètres opératoires (puissance RF, pression dans le réacteur, ratio des flux de gaz), permettent de moduler la composition du film (caractère « PEO », quantité d'argent), *via* le contrôle de la fragmentation du précurseur et du bombardement de la cible d'argent. D'autres caractéristiques, comme la taille des agglomérats d'argent et l'hydrophilie/hydrophobie du dépôt (due à la présence de fonctions CH₂-CH₂-O) dépendent également des conditions expérimentales. Les effets anti-adhésif et biocide de ces dépôts ont été évalués par Balazs *et al.* (2005) : les tests ont été réalisés sur quatre souches de *P. aeruginosa* et une inhibition de la colonisation bactérienne a été observée quel que soit le contenu en argent du revêtement. Ces résultats ont été confirmés par Sardella *et al.* (2006) avec *S. epidermidis*. L'activité antibactérienne observée est liée au relargage d'ions Ag⁺ dans le milieu aqueux, par oxydation et érosion progressive des nanoparticules d'argent (Sardella *et al.*, 2006). Les résultats de l'analyse réalisée par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) montrent que la quantité d'Ag⁺ libérée, liée au

contenu en argent initial du dépôt, est maximale pendant les 3 à 6 premiers jours, période considérée comme critique pour la survenue d'infections bactériennes.

La difficulté majeure de ce procédé réside dans la nécessité de trouver un équilibre correct entre le bombardement ionique de la cible métallique et la fragmentation du précurseur (Favia *et al.*, 2000). En effet, un fort bombardement permet d'obtenir une quantité d'argent importante dans le revêtement, mais provoque également la décomposition quasi-totale du groupement d'oxyde d'éthylène ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), à l'origine des caractéristiques « répulsives » du dépôt. Par conséquent, l'efficacité anti-adhésive vis-à-vis des bactéries est moindre (Sardella *et al.*, 2005). Au contraire, un bombardement trop faible conduit à un recouvrement total de la cible d'argent par les fragments de précurseur et de ce fait, à un revêtement ne contenant pas d'argent. Nous verrons dans cette étude que ce compromis peut être atteint en utilisant un débit de précurseur pulsé, comme préconisé par Despax et Raynaud (2007).

Conclusion

L'abondance de la littérature, illustrée par les nombreux exemples exposés dans ce chapitre, prouve l'intérêt porté à la conception de surfaces biocides dans le but de prévenir la colonisation microbienne. Les avantages avérés des procédés plasma par rapport aux méthodes chimiques ou aux techniques « sol-gel » démontrent l'apport de ces technologies pour atteindre l'objectif visé. La majorité des applications recensées dans la littérature portent sur la modification par plasma de matériaux polymériques à visée biomédicale (cathéters vasculaires et urinaires, implants). Les procédés plasma peuvent néanmoins être appliqués à d'autres substrats plus difficiles à modifier, comme l'acier inoxydable. Comme nous l'avons par ailleurs décrit dans ce chapitre, l'argent ionique constitue un agent antimicrobien efficace vis-à-vis d'un large spectre de microorganismes, en raison de son action simultanée en différents sites des cellules. Ainsi, différents procédés basés sur les technologies plasmas ont été développés, en utilisant l'argent comme composant biocide. Parmi eux, le couplage du **procédé PE-CVD**, permettant la polymérisation par plasma d'une matrice organique, avec le **bombardement de la cible métallique** par un flux d'ions issus du plasma, constitue une stratégie efficace pour déposer un film mince composite et **combinaison un effet anti-adhésif à l'activité antimicrobienne de l'argent**. Cette approche s'avère intéressante pour prévenir la colonisation microbienne sur de longues durées, car les propriétés anti-adhésives ont fréquemment tendance à s'atténuer, du fait de la formation inévitable d'un film conditionnant en surface des supports, lorsqu'ils sont immergés en milieu non stérile.

Les évolutions actuelles et les applications déjà réalisées dans le domaine tendent à promouvoir l'incorporation d'argent sous forme de nanoparticules dans les revêtements de surface, en raison notamment de leur forte réactivité. Il nous a donc semblé crucial, à ce stade de l'étude, de présenter les enjeux liés à cette technologie en plein essor au niveau mondial.

CHAPITRE V – ENJEUX LIES A L'UTILISATION DU « NANO-ARGENT »

Introduction

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser plus particulièrement à l'activité antimicrobienne de l'argent sous forme de nanoparticules, ainsi qu'aux nombreux produits dérivés, destinés à des applications très variées (pansements, revêtement d'implants médicaux, traitement de l'eau, hygiène, etc.). Ces produits et équipements représentent un marché économique en plein essor et les technologies permettant leur fabrication ne cessent de se développer, comme nous l'avons vu au Chapitre IV. Nous discuterons également des controverses engendrées par l'utilisation croissante des nanoparticules d'argent et des suspicions d'effets néfastes pour l'Homme et son environnement.

I – Activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent

Il existe de très nombreuses méthodes pour synthétiser des agglomérats d'argent de taille nanométrique, en suspension ou emprisonnées dans une matrice ou un revêtement de surface (voir Chapitre IV, partie II-B-3 et II-C). Actuellement, de nombreux travaux se focalisent sur l'étude des nanoparticules d'argent, afin d'évaluer leur propriétés antimicrobiennes et de déterminer leur(s) mécanisme(s) d'action.

Les nanoparticules d'argent métallique représentent un « réservoir » d'ions Ag^+ , permettant de conserver une activité antimicrobienne pendant un laps de temps plus long que dans le cas d'une inclusion sous forme de sels (Sardella *et al.*, 2006). Selon Gibbins et Werner (2005), l'argent ionique est actif pour une courte période, de l'ordre de quelques jours, alors que les nanoparticules d'argent peuvent libérer des ions jusqu'à 100-200 jours en fonction de leur quantité et de la nature de la matrice. Les ions Ag^+ sont progressivement libérés par oxydation de la surface des particules métalliques lors de l'exposition à l'air ou à un milieu humide, puis dissolution de l'oxyde d'argent dans le milieu environnant (phénomène de « leaching »). En raison de leur aire spécifique élevée, le potentiel de relargage d'ions Ag^+ par les nanoparticules est important (Morones *et al.*, 2005 ; Egger *et al.*, 2009). Par conséquent, les nanoparticules d'argent sont plus réactives que l'argent massif (Pal *et al.*, 2007). Le relargage d'ions Ag^+ contribue donc à l'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent et les mécanismes d'action décrits précédemment (Chapitre IV, partie II-B-1) expliquent en partie leurs propriétés biocides (Lansdown, 2002 a).

Les nanoparticules d'argent peuvent toutefois présenter une efficacité antimicrobienne propre, en raison de leur taille et de leur forme. Elles peuvent interagir avec la paroi du microorganisme, puis pénétrer dans la cellule en « évitant » les mécanismes de défense appliqués aux particules de taille

plus importante, pour ensuite interférer avec les constituants cellulaires (ADN, protéines, enzymes).

Sondi et Salopek-Sondi (2004) ont démontré l'activité bactéricide de nanoparticules d'argent en suspension (diamètre : 12 ± 4 nm) sur *E. coli* en milieu gélosé, pour des concentrations de l'ordre de 10 à 50 mg/L. En utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB), ils ont observé une altération de la paroi cellulaire (formation de « trous » dans la membrane externe). Les auteurs ont également mis en évidence une accumulation de nanoparticules d'argent dans l'épaisseur de la membrane cellulaire. Ces altérations de la structure pariétale entraînent une augmentation de la perméabilité, conduisant à la libération des constituants cellulaires, à la dérégulation des phénomènes de transport et, par suite, à la mort d'une fraction de la population bactérienne. Des expériences réalisées en suspension démontrent que des bactéries réussissent tout de même à se multiplier et que la présence des nanoparticules d'argent induit seulement un retard de croissance. Ceci est dû au fait que les nanoparticules d'argent sont progressivement séquestrées par les composés issus de la lyse cellulaire et ne sont plus disponibles pour interagir avec les autres bactéries. Par microscopie électronique en transmission, les auteurs ont également observé la pénétration de nanoparticules à l'intérieur des cellules.

D'autres études démontrent également que les nanoparticules d'argent perturbent les fonctions cellulaires, comme la respiration (Morones *et al.*, 2005). Elles sont capables de pénétrer à l'intérieur de bactéries à Gram négatif, comme *E. coli* (Morones *et al.*, 2005 ; Raffi *et al.*, 2008), et interagissent avec différents groupements biologiques (thiols, phosphates, etc.). Toutefois, Morones *et al.* (2005) soulignent le fait qu'aucun mécanisme de protection par condensation de l'ADN n'a lieu dans des cellules *E. coli* traitées avec des nanoparticules d'argent, contrairement à ce qui est observé pour des bactéries traitées avec AgNO_3 (comparaison avec les résultats de Feng *et al.*, 2000 ; voir Chapitre IV, paragraphe II-B-1). Ceci constitue une différence importante dans le mode d'action de l'argent en fonction de sa structure (ionique vs. nanoparticules).

Kim *et al.* (2007) ont étudié l'activité antimicrobienne de nanoparticules d'argent (diamètre ~ 10 nm) sur *E. coli*, *S. aureus* et sur une souche de levure, en milieu gélosé (méthode du disque d'inhibition). Les auteurs suggèrent que l'action biocide des nanoparticules est liée à la présence de radicaux libres générés en surface, qui endommagent la membrane lipidique des cellules. Les résultats obtenus sur les trois microorganismes testés montrent que *E. coli* est plus sensible que la levure, elle-même plus sensible que *S. aureus*.

Zeng *et al.* (2007) ont étudié l'efficacité antimicrobienne de nanoparticules d'argent, incluses dans une matrice organique, sur *E. coli* et *C. albicans* : les CMI de ces deux microorganismes en milieu gélosé sont 14 et 28 mg/L, respectivement. Ces résultats démontrent que les levures sont moins sensibles aux nanoparticules que les bactéries à Gram négatif.

Une étude récente (Yang *et al.*, 2009) a mis en évidence une interaction directe entre les nanoparticules d'argent et l'ADN génomique chez *E. coli*. Les auteurs ont aussi démontré que la présence de nanoparticules d'argent augmente d'un facteur 3 la fréquence de mutation du génome d'*E. coli* (*i.e.*, la fréquence de mutation passe de $1,08 \cdot 10^{-6}$ pour l'échantillon contrôle à $3,14 \cdot 10^{-6}$ en présence de nanoparticules d'argent de diamètre 30-50 nm). Toutefois, le taux d'erreur de réplication observé dans cette étude reste très faible et ne permet pas d'expliquer à lui-seul l'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent (Yang *et al.*, 2009). De plus, cette étude montre que les ions Ag^+ issus de la dissolution d' $AgNO_3$ provoquent également une augmentation de la fréquence de mutations. Néanmoins, l'influence négative des nanoparticules métalliques sur la fidélité de réplication pose problème pour des applications éventuelles à plus grande échelle. Les risques potentiels des nanoparticules d'argent pour la santé et l'environnement seront discutés dans la partie II-B.

Plusieurs travaux démontrent que l'activité des nanoparticules dépend de leur taille. Ainsi, Morones *et al.* (2005) ont observé que seules les nanoparticules d'argent dont le diamètre est compris entre 1 et 10 nm interagissent avec différentes bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholera* et *S. typhus*) en inhibant la viabilité cellulaire (CMI = 75 mg/L). Une étude récente de Pal *et al.* (2007) chez *E. coli* démontre également le rôle joué par la forme : les nanoparticules en forme de pyramides triangulaires, dont la base est un plan cristallin {111} de densité atomique élevée, présentent la toxicité la plus élevée par rapport à leurs homologues sphériques ou sous forme de bâtonnets.

En conclusion, les nanoparticules d'argent présentent une activité biocide à large spectre, due au relargage progressif et contrôlé d'ions Ag^+ , mais aussi une efficacité propre par interaction directe avec les cellules. Comme nous allons le voir dans la partie suivante, les produits contenant des nanoparticules d'argent sont de plus en plus nombreux et diversifiés, ce qui soulève de nombreux questionnements scientifiques et éthiques.

II – Les nanoparticules d'argent : bénéfiques et risques

Les composés à base d'argent ionique sont utilisés dans de nombreux secteurs, notamment le domaine biomédical (soins des blessures, brûlures, ulcères, escarres, grâce aux crèmes comme la Silvazine (Lansdown, 2002 a)), l'hygiène (crèmes, compléments alimentaires, etc.) ou le traitement de l'eau (Klasen, 2000).

Depuis la fin des années 1990, l'utilisation de nanoparticules d'argent colloïdales connaît un essor extrêmement important, en raison de leur réactivité élevée et de leur capacité à libérer progressivement, et de manière contrôlée et durable, les ions Ag^+ . La production mondiale de

« nano-argent » est d'environ 500 tonnes/an, selon Mueller et Nowack (2008). En 2004, le marché européen des produits et équipements contenant de l'argent a été estimé à 30 tonnes environ et les prévisions évaluent une augmentation à 110-230 tonnes en 2010 (Blaser *et al.*, 2008). En 2005, l'institut de Médecine (IOM) de Washington a dénombré 526 produits contenant de l'argent colloïdal, commercialisés par 264 compagnies. On assiste donc à une véritable explosion du marché économique des produits contenant des nanoparticules d'argent.

Dans cette partie, nous allons tout d'abord exposer les principaux domaines d'utilisation des produits à base de « nano-argent » et les bénéfices de leur utilisation pour la santé, l'hygiène des personnes, le traitement de l'eau ou encore la préservation des aliments. Dans une seconde partie, nous aborderons les polémiques engendrées par l'utilisation croissante et de plus en plus systématique de ces produits et les nombreuses interrogations concernant les risques pour les êtres humains et l'environnement (faune et flore).

A – Bénéfices de l'utilisation de produits contenant des nanoparticules d'argent

1 – Prévention des infections dans le domaine biomédical

L'utilisation la plus répandue de l'argent sous forme de nanoparticules correspond aux pansements et aux différents soins employés dans le domaine médical. Des pansements dits « argentiques » contiennent des nanoparticules d'argent colloïdales, adsorbées sur leur surface (Ip *et al.*, 2006). C'est le cas par exemple des pansements Acticoat[®], commercialisés par Smith & Nephew (Yin *et al.*, 1999), Actisorb Silver[®] (Johnson and Johnson), Silverlon[®] (Argentum Medical) ou Hansaplast[®] (Lansdown, 2002 a ; Silver *et al.*, 2006). Ces produits ont prouvé leur efficacité antimicrobienne contre différentes bactéries à Gram positif et négatif (Ip *et al.*, 2006) et les levures (Holder *et al.*, 2003). De plus, selon certains auteurs, l'argent participerait à la guérison anticipée des blessures (Lansdown, 2002 b). Les bénéfices thérapeutiques de ces pansements ont été évalués *in vivo* sur des modèles animaux (Wright *et al.*, 2002) et par des essais cliniques (Demling et DeSanti, 2002). Ils sont aujourd'hui couramment utilisés avec succès dans les hôpitaux et centres de soins (Silver *et al.*, 2006). En outre, leurs applications et retraits quotidiens sont moins douloureux pour le patient que les crèmes et, contrairement au nitrate d'argent, leur utilisation ne provoque pas d'irritations (Ip *et al.*, 2006).

Comme mentionné précédemment dans le Chapitre IV relatif à l'ingénierie des surfaces, des cathéters urinaires, vasculaires et péritonéaux ont été fabriqués à partir de polymères imprégnés d'argent sous forme métallique ou oxydée, afin de prévenir la formation de biofilms bactériens (pour revue : Silver, 2003). Bien que la plupart des travaux réalisés avec ces cathéters aient démontré leur activité antimicrobienne, et par conséquent, une réduction des coûts

d'hospitalisation (Rupp *et al.*, 2004), certaines études soulèvent le problème d'une efficacité relativement faible *in vivo* (pour revue : Darouiche, 1999).

D'autres produits dérivés sont également employés dans le domaine médical. Des masques chirurgicaux contenant des nanoparticules d'argent ont été fabriqués et testés (Li *et al.*, 2006) : ils présentent une efficacité antibactérienne sur *E. coli* et *S. aureus* et ne provoquent pas d'allergie ni d'irritation chez les sujets les ayant portés pendant 1h.

Alt et ses collaborateurs (2004) ont étudié un ciment pour os (NanoSilver), constitué de polyméthylmétacrylate contenant des particules d'argent métallique (diamètre : 5 à 50 nm). Ils ont démontré *in vitro* son activité biocide contre des bactéries adhérentes (*S. epidermidis* et *S. aureus* résistantes à la pénicilline), ainsi que l'absence de cytotoxicité envers des fibroblastes et des ostéoblastes.

La compagnie AcryMed a par ailleurs mis au point une technologie appelée SilvaGard™, qui consiste à recouvrir les surfaces des dispositifs médicaux (implants orthopédiques et stents en acier inoxydable, cathéters et drains en plastique, pansements en nylon ou en polyester, etc.) avec des nanoparticules d'argent, par une méthode en voie humide (« wet-coating »). Les surfaces d'acier inoxydable, constituant les dispositifs de fixation des fractures, peuvent également être recouvertes d'un dépôt contenant des nanoparticules d'argent (Darouiche, 1999).

2 – Applications dans le domaine agro-alimentaire et le traitement de l'eau

L'argent est employé dans l'industrie alimentaire pour éviter les contaminations microbiennes et prévenir l'apparition d'un goût métallique. Des équipements en argent sont utilisés pour la manipulation d'huiles essentielles, de sirops et de jus de fruits (Smith et Zysk, 1987).

Des compléments alimentaires contenant de l'argent sont actuellement vendus en Chine et au Japon (ex : comprimés Jin Tan). A Mexico, un colloïde d'argent appelé Microdyn® est vendu en supermarché pour prévenir la contamination des légumes et entre dans la composition des filtres des circuits d'acheminement d'eau potable (Silver *et al.*, 2006).

Des boîtes plastiques pour le stockage de denrées alimentaires, contenant des nanoparticules d'argent, sont commercialisées par la société Blue Moon Goods LLC (Fresh Box Silver™) et la société A-DO Global Company. Lohrer *et al.* (2008) ont mis au point un film alimentaire plastique dans lequel sont incorporées des particules en phosphate de calcium biodégradable (diamètre : 20-50 nm) portant des nanoparticules d'argent (diamètre : 1-2 nm). Les microorganismes se présentant à proximité du film dégradent les particules de phosphate de calcium, pour assimiler les minéraux nécessaires à leur croissance, ce qui permet la libération progressive d'ions Ag⁺. Les propriétés biocides de ce film ont été démontrées sur *P. aeruginosa* et *C. albicans*, sans qu'il soit possible de reproduire la même efficacité sur *S. aureus* et *A. niger*.

Les nanoparticules d'argent sont également utilisées pour empêcher le développement d'agents infectieux, notamment les *Legionella*, dans les circuits de distribution d'eau potable (Silver, 2003). Différents travaux démontrent l'efficacité antimicrobienne de filtres de polyuréthane, de céramique ou de charbon actif contenant ces nanoparticules (pour revue : Sharma *et al.*, 2009). Zodrow et ses collaborateurs (2009) ont imprégné des membranes de filtration en polysulfone avec des nanoparticules d'argent. Ces membranes ont provoqué une réduction de la viabilité d'*E. coli* de 2 log, une inhibition de la croissance de *P. mendocina* et ont également favorisé l'élimination de virus. Des systèmes de purification de l'eau de consommation, dont les membranes de filtration sont imprégnées de nanoparticules d'argent, sont commercialisés par les sociétés Brita[®], Aquapure[®] ou Kinetico[®].

De manière similaire, des systèmes de filtration de l'air contiennent des nanoparticules d'argent, incorporées dans le charbon actif composant la membrane (pour revue : Sharma *et al.*, 2009).

3 – Autres applications : hygiène et désinfection

Le Tableau 6 expose un inventaire non exhaustif des domaines pour lesquels sont développés et commercialisés des produits contenant des nanoparticules d'argent et montre la diversité des applications actuelles.

Tableau 6. Domaines d'application de produits contenant des nanoparticules d'argent.

Catégories	Produits	Remarques
Vêtements et textiles	Fibres et fils (SilverSTAT [®]), contenant des nanoparticules d'argent (Yeo et Jeong, 2003) Chaussettes, tenue de sport (Polartec [®] Power Dry [®] ; Meryl Skinlife [®] ; Eclectic Silver), baskets (Adidas [®] , Polartec [®]) Serviettes de toilette, linge de literie, sac de couchage, matelas (SpringAir)	Applications : - retarder le développement de bactéries et de champignons ; - éviter les mauvaises odeurs ; - empêcher l'adhésion des pollens responsables d'allergies.
Hygiène des personnes	Déodorants (Shiseido), savon (Nanogist – Nanover [™]), gel bactéricide pour les mains, dentifrice (Chine) Produits cosmétiques (Japon) Spray pour chaussures (Simplicity) Sièges des toilettes publiques (Toto – Japon)	
Equipements électroménagers * (certains appareils ne sont plus en vente actuellement)	Machines à laver le linge* (Samsung Electronics - SilverWash [®] ; Sharp), Lave-vaisselle (Samsung, Hitachi) Réfrigérateurs* (Samsung Electronics) Aspirateurs (LG Electronics, Daewoo, Polti) Climatisation* (Samsung)	Principe : libération d'ions Ag ⁺ à partir d'argent métallique grâce à un courant électrique
Technologies	Ordinateurs, PDA (Samsung – technologie SilverNano [®]) Combinés téléphoniques, calculatrice, clavier d'ordinateurs (technologie Amenitop [®] – Japon)	Amenitop [®] (gel de silice contenant du thiosulfate d'argent), mélangé au plastique lors de la fabrication
Désinfection des surfaces	Peintures murales, revêtements de sol, revêtement de murs extérieurs pour la construction (Atheco-BioiniNature [®]) Revêtement de surfaces d'acier inoxydable pour équipements médicaux, industries agro-alimentaires ou pharmaceutiques (Engineered nanoProducts Germany)	Applications : pour les personnes allergiques aux désinfectants habituels

B – Impacts négatifs de l'argent sur l'Homme et l'environnement

L'utilisation des pansements et des crèmes « argentiques » ne fait pas débat, car leur emploi est peu fréquent, limité dans le temps et restreint à un individu donné, avec des bénéfices thérapeutiques avérés. En revanche, l'exploitation commerciale des produits « nano-argent » explose à l'heure actuelle, avec des répercussions importantes dans notre quotidien. Or, les informations indiquées sur ces produits sont peu nombreuses et peu précises et aucun label n'existe réellement (Silver *et al.*, 2006). De plus, dans certains cas, le terme « nano-argent » semble être uniquement un argument « marketing », car l'argent n'est en réalité pas présent sous forme nanoparticulaire. Par conséquent, de nombreuses questions se posent : ces produits/équipements peuvent-ils s'avérer toxiques ? quel est le service réel rendu pour la santé ? quel est l'impact sur l'environnement ? Comme nous l'avons vu au paragraphe I de ce chapitre, les nanoparticules libèrent des ions Ag^+ . Il nous a donc semblé important de nous intéresser à la fois aux conséquences de ces ions et des nanoparticules d'argent sur les êtres humains et l'environnement.

1 – Effets néfastes de l'argent sur l'Homme

La plupart des études démontrent que l'argent ionique n'induit pas de conséquences négatives pour l'être humain, aux concentrations requises pour obtenir une activité antimicrobienne (Lansdown, 2002 a ; Gibbins et Werner, 2005 ; Rai *et al.*, 2009). Toutefois, lorsque l'argent ionique est appliqué sur une lésion corporelle sous forme de crème ou de pansements, il se lie à la sueur, au sébum et aux protéines présentes. Il peut ensuite passer dans la circulation sanguine, ce qui se traduit par une augmentation de la concentration en argent dans le sérum. Selon certains auteurs, il est alors excrété dans les urines et les fèces en 2 à 5 jours, alors que d'autres chercheurs ont montré une bio-accumulation de granules métalliques dans différents organes : le foie, les reins, l'intestin, les glandes surrénales et, dans de rares cas, la moelle épinière (pour revue : Lansdown, 2002 b ; Drake et Hazelwood, 2005). L'impact de l'argent ionique est également évalué sur des lignées cellulaires de mammifères. Selon Lansdown (2002 b), les résultats sont contradictoires, car certaines études concluent que les ions Ag^+ ne sont pas cytotoxiques aux concentrations antimicrobiennes, alors que d'autres travaux démontrent un effet toxique sur des kératinocytes, des fibroblastes (Poon et Burd, 2004) et des cellules immunitaires.

L'une des conséquences négatives de l'argent ionique pour l'Homme est l'argyrie (ou argyrose, du grec « argyros » qui signifie argent), qui correspond à la coloration bleu-gris de la peau (ex : visage, bras, mains, base des follicules des cheveux, ongles), des yeux et des muqueuses (lèvres, gencives). Elle est permanente et peut être localisée ou étendue à plusieurs parties du corps (Drake et Hazelwood, 2005 ; Silver *et al.*, 2006). Ce phénomène est dû au dépôt et à l'accumulation dans les couches de l'épiderme de granules d'argent métallique ou de précipités de

sulfate d'argent, qui noircissent par photo-réduction à la lumière. L'argyrie peut être causée par l'administration d'une quantité excessive de produits contenant de l'argent ionique ou colloïdal par voie orale ou parentérale, par ingestion volontaire (compléments alimentaires, comprimés anti-tabac, personnes souffrant de troubles psychiatriques) ou par l'utilisation d'aiguilles d'acupuncture en argent (Lansdown, 2002 b ; Silver *et al.*, 2006 ; Rai *et al.*, 2009). La quantité d'argent incriminée n'est pas connue avec précision, mais elle est estimée à 1 g en une fois ou 8 g sur plusieurs années (rapport de l'« Environmental Protection Agency – USA », 1991 révisé en 2003 : Silver, CASRN 7440-22-4). Cette complication est très rare et aucun cas n'a été répertorié avec la nouvelle génération de pansements contenant des nanoparticules d'argent au lieu des sels (Lansdown, 2002 b). En outre, l'argyrie constitue un problème esthétique, mais ne provoque pas de maladies ni le décès du patient (Silver *et al.*, 2006). Selon le rapport de l'EPA, la dose orale de référence de l'argent (ionique), qui correspond à une estimation de l'exposition limite quotidienne tout au long de la vie n'induisant pas d'effet nocif, est égale à $5 \pm 3 \mu\text{g}/\text{kg corporel}/\text{jour}$. Certaines personnes, notamment celles travaillant en contact direct avec le métal, peuvent présenter une hypersensibilité ou une allergie à l'argent, comme c'est le cas avec de nombreux autres composés chimiques.

L'argent sous forme de nanoparticules peut pénétrer dans le corps humain par différentes voies (Panyala *et al.*, 2008). Après ingestion ou contact dermique en présence d'une lésion cutanée, les nanoparticules métalliques peuvent se retrouver dans la circulation sanguine et/ou lymphatique et s'accumuler dans les organes, comme les ions Ag^+ (Sharma *et al.*, 2009). Une étude *in vivo* sur des rats a démontré que l'ingestion par voie orale d'une dose supérieure à 300 mg/kg de nanoparticules d'argent pendant 28 jours entraîne des lésions au niveau du foie et une accumulation dans de nombreux tissus, sans toutefois avoir de conséquences négatives sur la moelle osseuse (Kim *et al.*, 2008).

Les nanoparticules peuvent également être présentes dans l'air (« nano-aérosols »). Dans ce cas, leur dangerosité vient principalement de leur forme et de leur taille, car elles peuvent être facilement inhalées et interagir avec les voies respiratoires, puis cardiovasculaires (Takenaka *et al.*, 2001). Des travaux récents, réalisés sur des cultures cellulaires et des modèles animaux, ont démontré la présence et la persistance de nanoparticules d'argent dans les poumons, le cerveau et d'autres organes, notamment le foie et les reins (pour revue : Sharma *et al.*, 2009). Ces nanoparticules peuvent alors générer des espèces oxygénées réactives (ROS), à l'origine d'un stress oxydatif avec impact au niveau pulmonaire. Ainsi, l'inhalation de nanoparticules d'argent ($0,7\text{-}2,9 \cdot 10^6$ particules/ cm^3) pendant 90 jours (6h/jour) par des rats de laboratoire a provoqué une inflammation des alvéoles pulmonaires (Sung *et al.*, 2008).

De nombreux travaux se focalisent sur l'influence de l'argent sous forme de nanoparticules sur les cellules de mammifères. Certaines de ces études n'ont répertorié aucun impact négatif (Alt *et al.*, 2004), alors que d'autres ont mis en évidence une cytotoxicité sur différentes lignées

(kératinocytes, fibroblastes, neutrophiles, monocytes, leucocytes, cellules du foie, cellules endothéliales, cellules germinales), qui se traduit par une perte d'identité cellulaire, une réduction de la capacité de prolifération et des modifications de la structure des organites et du noyau cellulaire (pour revue : Rai *et al.*, 2009).

Les quantités de nanoparticules d'argent utilisées dans les différentes expériences exposées ici sont très importantes et ne reflètent pas les niveaux auxquels les êtres humains sont pour le moment confrontés (Hussain et Schlager, 2009). Néanmoins, certains auteurs (Sharma *et al.*, 2009 ; Rai *et al.*, 2009) s'alarment de l'utilisation de plus en plus importante et systématique du « nano-argent », car ils estiment que les informations concernant ces nouveaux produits et matériaux sont actuellement insuffisantes et trop parcellaires pour s'assurer de leur innocuité ou déterminer de réels seuils de dangerosité. La recherche concernant l'impact des nanoparticules d'argent sur la santé humaine est actuellement en plein essor, dans l'optique de combler ces manques et de répondre plus précisément aux nombreuses interrogations.

2 – Conséquences de la dissémination de l'argent dans l'environnement

L'utilisation croissante de produits contenant des nanoparticules d'argent peut conduire à un relargage massif dans l'environnement, notamment les milieux aquatiques (impact sur les poissons, invertébrés, phyto- et zooplancton, algues) et les sols (effets potentiellement néfastes sur les bactéries et les plantes). Une étude écotoxicologique, réalisée sur des poissons-zèbres, a démontré une accumulation des nanoparticules d'argent (5-46 nm) dans les tissus des embryons à chaque étape du développement, conduisant soit à une croissance normale soit à des déformations, voire même à la mort des poissons, en fonction de la quantité de nanoparticules présentes (Lee *et al.*, 2007). La concentration critique déterminée par ces auteurs est égale à 5 mg/L, ce qui correspond à une valeur très élevée par rapport aux niveaux détectés à l'heure actuelle dans les milieux aquatiques.

De plus, les ions Ag^+ sont toxiques pour les poissons car ils inhibent l'activité branchiale (Panyala *et al.*, 2008). D'autres travaux ont été réalisés sur des invertébrés (crustacés, bivalves) : les ions Ag^+ affectent les fonctions de croissance et de reproduction. Toutefois, en eaux douces ou dans le milieu maritime, les ions Ag^+ se complexent avec les ions Cl^- , SO_4^{2-} et S^{2-} , formant des précipités très peu solubles. Par conséquent, la biodisponibilité de l'argent est fortement réduite.

Les nanoparticules d'argent provoquent une réduction de la viabilité cellulaire de bactéries du sol, comme par exemple les bactéries dénitrifiantes, qui jouent un rôle majeur dans la fixation de l'azote, l'élimination des nitrates, la dégradation des composés organiques et l'établissement de symbiose avec les plantes (Panyala *et al.*, 2008). Ces bactéries sont également présentes dans les usines de traitement de l'eau et l'altération de leur activité par les nanoparticules d'argent provoque des effets négatifs sur l'ensemble de l'écosystème (Choi *et al.*, 2008). Les nanoparticules peuvent provenir d'origines très diverses. Par exemple, Benn *et al.* (2008) ont montré que des ions

Ag⁺ et des nanoparticules d'argent (diamètre : 10-500 nm) étaient libérées lors du lavage de trois types de chaussettes commerciales sur les six testés, avec au passage une perte des propriétés antimicrobiennes et anti-odeurs, malgré la revendication publicitaire. Les eaux de lavage sont ensuite évacuées vers les stations d'épuration. Selon les tests réalisés en laboratoire par Benn *et al.* (2008), ces stations sont capables d'éliminer la totalité des particules libérées et même une concentration 3000 fois supérieure. Néanmoins, dans ce cas, la concentration d'argent dans les boues résultant du traitement des eaux usées serait telle (5 mg/L) qu'elle empêcherait leur épandage agricole. Un problème identique se pose avec les lave-vaisselle et les lave-linge libérant des ions Ag⁺ dans les eaux. Ceci a provoqué de nombreuses protestations concernant leur commercialisation aux Etats-Unis et en Europe et entraîné le retrait de ces équipements de la vente dans certains pays.

Pour démontrer que le débat sur la question est très loin d'être clos, il faut souligner que d'autres études prônent l'absence d'effets réellement néfastes des nanoparticules sur l'environnement terrestre et aquatique. Ainsi, Mueller et Nowack (2008) ont modélisé les flux de nanoparticules d'argent évacués dans les eaux usées suisses, afin d'estimer les quantités libérées dans l'environnement. Leurs prévisions montrent que les quantités de « nano-argent » seraient égales à $4,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\text{m}^3$ dans l'air, 0,08 $\mu\text{g}/\text{L}$ dans l'eau et 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans le sol, en cas d'émissions importantes. Ces concentrations restent très inférieures aux seuils de toxicité et les auteurs concluent que les risques sont faibles pour les écosystèmes terrestres et aquatiques, dans l'hypothèse où les boues de stations d'épuration ne sont pas disséminées sur les sols. Toutefois, ces chercheurs ont pris en compte dans leurs calculs uniquement les flux de nanoparticules et ont omis la présence additionnelle d'argent sous forme ionique relargué par d'autres voies, qui peut également engendrer une pollution importante.

De même, Blaser *et al.* (2008) ont estimé les quantités d'ions Ag⁺ libérés par les nanoparticules présentes dans les textiles et les plastiques. Ils ont conclu que les quantités devraient être 10 à 100 plus importantes que les valeurs prédites pour entraîner des conséquences néfastes sur le fonctionnement des stations de traitement de l'eau. Néanmoins, ils n'excluent pas un effet sur les écosystèmes aquatiques, dû à l'enfouissement du « nano-argent » dans les sédiments et à son relargage ultérieur. Là-encore, l'étude restreinte à un domaine d'application ne permet pas d'appréhender la problématique dans toute sa globalité.

3 – La réglementation européenne

Pour le moment, les produits contenant des nanoparticules d'argent, comme tous les matériaux issus des nanotechnologies, sont testés avec des protocoles identiques à ceux classiquement établis. Or, ces tests sont inadaptés car ils ne prennent pas en compte les spécificités physiques et chimiques de tels produits. Le Parlement européen a d'ailleurs voté le 24 avril 2009 un rapport qui conteste les déclarations de la Commission européenne (« Regulatory Aspects of Nanomaterials »,

juin 2008) affirmant que la législation actuellement en vigueur couvre les risques liés aux nanomatériaux.

A l'heure actuelle, tout produit revendiquant une activité antimicrobienne est soumis à la réglementation européenne dite « biocide » (directive du Parlement Européen et du Conseil n° 98/8/CE du 16 février 1998, modifiée par la directive n° 2006/50/CE du 29 mai 2006). Cette directive concerne la mise sur le marché des produits biocides, qu'elle définit comme étant les substances « destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles ». Ces produits ne peuvent être mis sur le marché en France qu'après évaluation préalable par un institut (INERIS, INRS, Afssa...), puis autorisation par le Ministre de l'Ecologie et du Développement Durable.

Le Parlement européen souligne la nécessité de mettre en place des tests spécifiques et adaptés aux nanomatériaux et demande une révision de la législation, afin de garantir une application sûre des produits contenant des nanoparticules. Cette nouvelle législation pourrait passer par une révision de la directive REACH (« Registration, Evaluation, and Authorization of Chemicals ») sur les produits biocides. La réglementation REACH correspond à une démarche d'analyse bénéfices/risques sous contraintes socio-économiques. Mais elle ne prend pas en compte la taille des particules pour l'évaluation des risques. Selon Philippe Hubert de l'INERIS, aucune analyse bénéfices/risques n'a encore été menée pour les produits contenant ces nanoparticules (présentation du Nanoforum du CNAM – 2 avril 2009).

Cette nouvelle législation est pour le moment difficile à mettre en œuvre, car les données concernant l'impact des nanoparticules d'argent sur la santé humaine et l'environnement sont parcellaires et contradictoires. Les recherches dans ce domaine doivent donc être approfondies, notamment en termes d'évaluations des risques réels et du cycle de vie du nanomatériau, pour permettre une prise de décision éclairée.

La Direction Générale de la Santé (DGS) a mandaté les différentes agences sanitaires françaises (Afssa, Afsset, Afssaps, InVS), afin de recenser les produits et équipements commercialisés en France contenant des nanoparticules, puis de procéder à une évaluation bénéfices/risques. Une identification préalable de tous les produits dans le cadre législatif avant leur mise sur le marché s'avère indispensable, ainsi qu'une information claire du consommateur au niveau de l'étiquetage. En France, la Commission Nationale du Débat Public a été saisie pour lancer une réflexion nationale à propos des nanomatériaux à partir de l'automne 2009.

Pour information, la législation américaine concernant les produits ou équipements contenant des nanoparticules d'argent et revendiquant une activité biocide correspond à la loi FIFRA (« Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act »), en application depuis novembre 2006. Ces produits et matériaux sont considérés comme des pesticides aux Etats-Unis. Ils doivent être déclarés à l'Agence de Protection de l'Environnement (EPA) et le fabricant doit fournir des preuves scientifiques de l'absence d'impact négatif sur la santé et l'environnement. LA FDA (« Food and

Drug Administration ») réglemente les aliments, additifs et emballages alimentaires, médicaments, équipements médicaux et produits cosmétiques et d'hygiène contenant des nanomatériaux. Elle a émis un rapport en juillet 2007 (« Nanotechnology Task Force Report »), qui recense la totalité des produits et équipements commercialisés aux Etats-Unis contenant des nanoparticules d'argent.

Au vu du développement croissant de l'utilisation des nanoparticules d'argent, dans des produits du quotidien, comme pour des applications plus spécifiques et ponctuelles, notamment dans le domaine biomédical, la législation doit être fréquemment adaptée pour permettre l'emploi raisonné de ces nanomatériaux, tout en garantissant la sécurité des êtres humains et de l'environnement.

A titre d'illustrations, de très nombreux sites internet concernant les nanomatériaux, et plus particulièrement les nanoparticules d'argent, peuvent être consultés. En voici une liste non exhaustive :

- "Project on emerging nanotechnologies", du Centre Woodrow Wilson International : www.nanotechproject.org/
- Compte-rendu du projet PEN15 sur l'impact des technologies « nano-argent » sur l'environnement (septembre 2008) : <http://www.nanotechproject.org/publications/archive/silver/>
- Communication de la Commission européenne sur les nanotechnologies (2008) : http://ec.europa.eu/nanotechnology/pdf/comm_2008_0366_en.pdf
- Rapport du Parlement européen (24 avril 2009) : <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//TEXT+TA+P6-TA-2009-0334+0+DOC+XML+V0//FR>
- Dossier de l'INRS sur les nanomatériaux : <http://www.inrs.fr/dossiers/nanomateriaux.html>
- Site Vivagora répertoriant les cycles du Nanoforum (CNAM) : <http://www.vivagora.org/spip.php?rubrique28>

Conclusion

Les nanoparticules d'argent se caractérisent par une activité antimicrobienne qui perdure dans le temps, en raison du relargage progressif d'ions Ag^+ . Ces ions attaquent simultanément de multiples sites dans la cellule (ADN, ARN, protéines, enzymes, chaîne respiratoire, mitochondries), conduisant à une inactivation irréversible des fonctions physiologiques essentielles, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Les nanoparticules présentent également une efficacité propre, due à leurs spécificités physiques (taille, forme) et chimiques (réactivité de surface). Elles

provoquent des modifications structurelles et fonctionnelles des parois et membranes cellulaires et pénètrent à l'intérieur de la cellule, entraînant des dommages irréversibles.

Les bénéfices apportés par les matériaux contenant des nanoparticules d'argent sont indéniables dans le domaine médical et l'hygiène des personnes. Néanmoins, les informations relatives à la toxicité à long terme de ces composés sur la santé humaine et les écosystèmes terrestres et aquatiques sont actuellement insuffisantes et même contradictoires. Par conséquent, des études (*in vivo* et pas seulement *in vitro*) doivent être menées afin d'évaluer plus précisément les risques potentiels liés à une utilisation massive et inconsidérée (chaussettes, équipements électroménagers, etc.).

La multiplication et la diversification des applications liées au « nano-argent » nécessitent de rester vigilant, sans être pour autant alarmiste. Des débats polémiques ont lieu actuellement entre les défenseurs d'une utilisation adaptée et raisonnée des nanoparticules d'argent, pour bénéficier de leurs propriétés antimicrobiennes, et les opposants se préoccupant de leur impact dans le futur. De nombreuses associations exigent l'application du principe de précaution. Dans leur grande majorité, les chercheurs souhaitent, eux, approfondir les études scientifiques pour obtenir des données plus précises et des statistiques fiables sur les nanomatériaux. Cela démontre l'engouement suscité par ce champ d'application vaste et diversifié, aussi bien parmi les dirigeants politiques, les instances de législation et la communauté scientifique, que dans l'ensemble de la société civile.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Au vu des données de la littérature, les biofilms fongiques et bactériens sont à l'origine de problèmes de santé publique dans des secteurs diversifiés tels que l'industrie agro-alimentaire ou le domaine biomédical et chirurgical et induisent des pertes économiques non négligeables. La nécessité de lutter contre la colonisation des surfaces dans ces secteurs stratégiques justifie l'intérêt croissant pour le domaine de recherche dédié à l'amélioration de l'hygiène des surfaces. L'acier inoxydable 316L, principal matériau d'équipement dans les industries agro-alimentaires, utilisé également pour la fabrication d'outils et d'implants chirurgicaux, constitue un support de prédilection pour l'adhésion et le développement des microorganismes. Dans le cadre de cette problématique, la maîtrise de l'hygiène de l'acier inoxydable se révèle un enjeu primordial pour assurer la sécurité des personnes, la conservation des produits et la durée de vie des équipements.

Les biofilms étant très difficiles à éradiquer une fois formés, une stratégie préventive, visant à limiter l'adhésion des microorganismes à l'acier inoxydable et à éliminer ceux réussissant à entrer en contact avec la surface, constitue une approche pertinente et prometteuse. Dans cette optique, un travail interdisciplinaire a été entrepris avec pour objectifs de :

- (i) mettre au point un traitement de surface sur l'acier inoxydable 316L, combinant une efficacité anti-adhésive à des propriétés antimicrobiennes, en s'appuyant sur les potentialités des procédés de dépôt plasma ;**
- (ii) évaluer, comprendre et comparer les mécanismes à l'origine de l'efficacité anti-adhésive et biocide des traitements de surface réalisés, sur un panel de souches (levures, bactéries à Gram positif et à Gram négatif) de caractéristiques (propriétés de surface, structure pariétale, réactivité) différentes.**

Dans ce projet, la levure *S. cerevisiae* a été choisie comme modèle d'étude eucaryote, en raison de sa capacité à adhérer fortement à l'acier inoxydable 316L, de son identification en tant que source de contamination de produits alimentaires et de sa parenté génétique avec le pathogène fongique *C. albicans*, permettant l'extrapolation de la stratégie développée au domaine biomédical. Afin de comparer l'efficacité de l'approche adoptée sur des organismes procaryotes, une étude a également été menée avec *S. aureus* et *E. coli*, en raison de leur implication dans le développement de nombreuses pathologies (infections nosocomiales, toxi-infections alimentaires). Les trois microorganismes ont également été sélectionnés du fait de leurs différences de structure et de composition pariétale.

L'étude de ces modèles microbiens a été réalisée au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP), dans l'équipe « Transfert, Interface, Mélange », en sollicitant en interne les compétences des équipes « Physiologie Microbienne des Eucaryotes Inférieurs » et « Génie du Métabolisme des Procaryotes ». De plus, ces travaux ont été en partie réalisés dans le

cadre du projet ANR « Biopleasure » (2007-2010), intitulé « Plasma-surface engineering for biofilm prevention », regroupant le LISBP, le Laboratoire Plasma et Conversion d'Énergie (LAPLACE) de Toulouse, reconnu pour son expertise dans la modification des surfaces par procédé plasma, le Laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces (LPCS) de Paris, spécialisé dans la physico-chimie des surfaces, et un partenaire industriel, Arcelor-Mittal (Isbergues). La démarche envisagée est donc pluridisciplinaire et met en œuvre des compétences dans des domaines diversifiés, comme la microbiologie, la physico-chimie des surfaces, la physique ou encore la mécanique des fluides. La caractérisation approfondie, menée aussi bien sur les microorganismes que sur les surfaces solides, d'une échelle macroscopique à une échelle atomique, constitue un atout pour la compréhension précise des phénomènes observés et confère au travail exposé ici toute son originalité.

En se basant sur les données reportées dans la littérature et les travaux réalisés précédemment au LISBP (Guillemot *et al.*, 2006), la première approche adoptée a consisté à traiter l'acier inoxydable par voie chimique (décapage dans un mélange peroxyde d'hydrogène/acide sulfurique) ou physique (bombardement ionique), dans le but de modifier sa composition de surface et ses caractéristiques physico-chimiques (**Chapitre I**). L'efficacité de ces différents traitements vis-à-vis de l'adhésion de *S. cerevisiae* a ensuite été quantifiée *in vitro* par méthode hydrodynamique. Cette méthode est basée sur l'observation *in situ* du détachement des microorganismes, préalablement adhérents aux différentes surfaces traitées, grâce à l'utilisation d'une chambre à écoulement cisailé, permettant d'opérer dans des conditions hydrodynamiques et physico-chimiques contrôlées. Dans ce type de dispositif, les cellules ne sont pas soumises à une interface liquide-air et, par conséquent, à des forces de capillarité dont l'action peut s'avérer préjudiciable à l'analyse fine du comportement bio-adhésif. La circulation du fluide en continu permet de « mimer » les conditions opératoires mises en œuvre dans de nombreux procédés industriels. Les profils de détachement obtenus ont été corrélés aux caractéristiques topographiques et physico-chimiques des supports natifs ou modifiés, par le couplage de différentes techniques d'analyse de surface (profilométrie, spectroscopie XPS, méthode de la goutte posée).

Les traitements chimiques et physiques des surfaces d'acier inoxydable ainsi définis n'empêchant pas l'adhésion de *S. cerevisiae*, une seconde approche a été mise en œuvre suite aux travaux de thèse de G. Guillemot (Guillemot *et al.*, 2008). Cette nouvelle stratégie a consisté à recouvrir la surface d'acier inoxydable par un revêtement nanocomposite, dans le but de combiner une efficacité anti-adhésive à une activité antimicrobienne. Pour atteindre l'objectif fixé, les revêtements ont été synthétisés en une seule étape, basée sur un procédé original de dépôt par plasma froid, couplant la polymérisation par PE-CVD d'hexaméthylsiloxane gazeux à la pulvérisation d'une cible d'argent par bombardement ionique (**Chapitre II**). Le film ainsi déposé est constitué d'une matrice organosiliciée, dont les propriétés physico-chimiques sont contrôlées à

façon (caractère polaire/apolaire), et dans laquelle sont incluses des nanoparticules d'argent, dotées d'une forte réactivité antimicrobienne. Le procédé de dépôt, mis en œuvre au LAPLACE, semble être parmi les méthodes les plus fiables permettant la synthèse de nanomatériaux composites par procédé plasma sous des conditions contrôlées. Une caractérisation complète de la topographie de surface, de l'organisation interne (taille et forme des nanoparticules), ainsi que de la composition et de la structure chimique (nature de la matrice, contenu en argent) des dépôts a été réalisée par un large spectre de techniques d'analyse, mises en œuvre conjointement au LAPLACE et au LPCS.

Les caractéristiques morphologiques, structurales et physico-chimiques des dépôts ont ainsi pu être corrélées à leurs propriétés anti-adhésives et antimicrobiennes, évaluées au LISBP sur les trois microorganismes d'étude (**Chapitre III**). Les expériences menées en chambre à écoulement cisailé sur *S. cerevisiae* ont permis de déterminer les dépôts présentant une affinité minimale pour les levures et de comprendre les mécanismes à l'origine de cette efficacité anti-adhésive. En parallèle, les propriétés antimicrobiennes des dépôts ont été évaluées par mise en contact direct avec les microorganismes et détermination du taux de survie en milieu gélosé. L'activité antifongique a pu être attribuée au relargage d'ions Ag^+ , quantifié par ICP-MS, ces ions étant issus de l'oxydation puis de la dissolution des nanoparticules localisées en extrême surface. L'hypothèse d'une libération directe de nanoparticules a également été formulée, suite à l'observation des levures par Microscopie Electronique en Transmission. Les investigations menées sur les levures planctoniques ont confirmé que l'activité biocide reste localisée à proximité de la surface.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de l'argent libéré sur les levures, une analyse par microspectroscopie FTIR à l'échelle de la cellule unique a été réalisée au Synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette), avec une résolution sub-cellulaire. Cette étude, la première dans le domaine, a été corrélée à l'observation des levures par Microscopie Electronique en Transmission, couplée à une analyse par Spectroscopie Dispersive en Energie, permettant l'identification et la localisation des modifications induites par le contact avec le dépôt nanocomposite.

L'efficacité antimicrobienne a également été évaluée sur les deux souches bactériennes. La comparaison des résultats obtenus a permis d'approfondir la compréhension des effets observés en relation avec les caractéristiques des microorganismes, dans l'optique d'étendre le champ d'application potentiel des dépôts nanocomposites.

Pour achever cette caractérisation quasi-exhaustive des dépôts synthétisés, la stabilité de leurs propriétés anti-adhésives et antimicrobiennes a été étudiée en renouvelant les expériences de détachement et les tests de toxicité sur les dépôts après leur première utilisation (**Chapitre IV**). Les évolutions observées ont été corrélées aux modifications des caractéristiques physico-chimiques et structurales des dépôts. Cette analyse du comportement à long terme des films nanocomposites après « vieillissement » est originale par rapport à d'autres travaux menés dans ce domaine, qui sont souvent restreints à la seule étude des revêtements de surface à l'état natif.

TECHNIQUES ET METHODES EXPERIMENTALES

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord décrire les conditions de culture des trois microorganismes modèles utilisés pour l'étude et les caractéristiques des coupons d'acier inoxydable 316L. Puis, nous exposerons les protocoles des différents traitements de surface et des procédés de dépôt par plasma réalisés sur l'acier inoxydable, ainsi que les techniques de caractérisation mises en œuvre à l'issue de ces procédures. Enfin, nous détaillerons les méthodes d'évaluation des propriétés anti-adhésives et biocides des surfaces sur les différents microorganismes modèles et l'influence de l'utilisation répétée des dépôts synthétisés par plasma sur leur efficacité pour prévenir la colonisation microbienne. Ce chapitre a pour objectif de rappeler le principe des méthodes d'analyse utilisées, d'exposer la mise en œuvre expérimentale et d'expliquer les principales informations qui peuvent être déduites, afin de comprendre leur utilité pour notre étude. Les aspects théoriques de certaines techniques sont détaillés dans la partie Annexe.

I – Conditions de culture et préparation des suspensions microbiennes

A – Culture de *S. cerevisiae*

La souche modèle choisie pour cette étude est *S. cerevisiae* BY4741, dont le génotype est *MATa his3Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0* (Brachmann *et al.*, 1998). Les levures sont cultivées en milieu YPD (extrait de levure : 1% m/v (Biokar Diagnostics), glucose anhydre : 2% m/v (Rectapur™, Prolabo®) et Bacto™Peptone : 1% m/v (Difco Laboratories)), à 30°C, sous une agitation de 100 rpm. Une pré-culture en mode batch est tout d'abord réalisée sur 16 h, en erlenmeyer bafflé de 500 mL contenant 100 mL de milieu YPD, à partir de quelques colonies prélevées sur boîte de Pétri (YPD + 1,5% m/v d'agar, Biokar Diagnostics). Cette étape de pré-culture permet de travailler sur des suspensions standardisées et de réduire la durée de la phase de latence, c'est-à-dire l'adaptation du microorganisme d'un milieu solide à un milieu liquide. Une culture de 200 mL de milieu YPD placés en erlenmeyer bafflé de 1L est ensuiteensemencée à partir de la pré-culture, à une densité optique à 620 nm ($DO_{620 \text{ nm}}$) initiale de 0,8. Les levures sont prélevées après 48h de culture, stade correspondant à la phase stationnaire de croissance ($DO_{620 \text{ nm}} \sim 30$, soit une concentration cellulaire finale d'environ $2 \cdot 10^8$ UFC/mL), après vérification de l'absence de contamination par observation au microscope optique et contrôle de la viabilité par coloration au bleu de méthylène. Les cellules sont collectées par centrifugation pendant 3 min à 13000 rpm et température ambiante (Microcentrifuge MC-13, Millipore), lavées deux fois puis resuspendues dans une solution saline (NaCl 0,15 M, pH \sim 6,5). Pour les essais, la suspension cellulaire est diluée pour atteindre une $DO_{620 \text{ nm}}$ égale à 4, soit environ $2,5 \cdot 10^7$ UFC/mL.

B – Culture de *S. aureus*

La souche étudiée est *S. aureus* MW2. C'est un SARM, également résistante aux antibiotiques appartenant à la classe des β -lactamines, comme la pénicilline, mais est sensible à la vancomycine. Ce microorganisme a été isolé en 1998 dans le Dakota du Nord (USA). Son génome a été entièrement séquencé et annoté en 2002 (Baba *et al.*, 2002).

Le milieu de culture utilisé est le « Tryptic Soya Broth » (TSB, 3% m/v ; AES Laboratoire). Une pré-culture (mode batch) est tout d'abord réalisée, en inoculant un erlenmeyer non bafflé de 100 mL, contenant 20 mL de TSB, avec un cryotube[†] de 0,5 mL. La pré-culture est ensuite incubée pendant 5 à 6 heures à 37°C sous une agitation de 100 rpm. Un erlenmeyer de culture non bafflé et contenant 36 mL de TSB est ensuiteensemencé à une densité optique théorique à 580 nm ($DO_{580\text{ nm}}$) égale à $5 \cdot 10^{-7}$. Pour cela, une première dilution à une $DO_{580\text{ nm}}$ théorique de $5 \cdot 10^{-4}$ est réalisée en mélangeant 100 mL de TSB à un volume défini de pré-culture. Puis, trois dilutions au 1/10 sont successivement effectuées. Les conditions de culture sont identiques à celles de la pré-culture. Les bactéries sont prélevées en phase stationnaire de croissance, soit après 15 h de culture ($DO_{580\text{ nm}} \sim 8$). L'absence de contamination est vérifiée par observation au microscope optique et étalement sur milieu gélosé (TSA, 4% m/v ; AES Laboratoire). Les cellules sont collectées par centrifugation (5 min, 5000 rpm, 4°C, centrifugeuse Biofuge-pico Heraeus), puis lavées deux fois dans une solution saline (NaCl 0,15 M, pH $\sim 6,5$). Pour les expérimentations, la suspension cellulaire est diluée pour atteindre une $DO_{580\text{ nm}}$ égale à 2, soit environ $1,5 \cdot 10^9$ UFC/mL.

C – Culture d'*E. coli*

La souche étudiée est *E. coli* K12 MG1655, bactérie non-pathogène (Bachmann, 1996) dont le génome a été séquencé et annoté par Blattner *et al.* (1997).

Dans le cas d'*E. coli*, les pré-cultures et cultures sont réalisées en milieu de Luria-Bertani (LB : tryptone 1% m/v (Biokar Diagnostics), extrait de levure 0,5% m/v (Biokar Diagnostics), NaCl 1% m/v (NormapurTM, Prolabo[®])). Le milieu gélosé (LBA) est obtenu en ajoutant 1,5% m/v d'agar (Biokar Diagnostics) au milieu LB. Un cryotube de 1 mL est mélangé à 40 mL de milieu LB, contenus dans un erlenmeyer non bafflé de 100 mL. Cette pré-culture est placée à 37°C, sous une agitation de 100 rpm, pour 2 à 3 heures. Un erlenmeyer de 500 mL, contenant 100 mL de milieu LB, est ensuiteensemencé à une $DO_{580\text{ nm}}$ initiale égale à 0,2. Cette culture est incubée (37°C, agitation = 100 rpm) pendant 18 heures. Les bactéries sont ensuite récupérées en phase stationnaire de croissance ($DO_{580\text{ nm}} \sim 6$). Une observation au microscope optique et des étalements sur milieu gélosé (LBA) permettent de s'assurer de l'absence de contamination. Les cellules sont collectées par centrifugation (5 min, 5000 rpm, 4°C, centrifugeuse Biofuge-pico

[†] Un cryotube correspond à la suspension cellulaire prélevée en phase exponentielle de croissance, diluée dans du glycérol pur (4 vol. de suspension / 1 vol. de glycérol), puis stockée à -80°C pour conservation.

Heraeus), lavées deux fois dans une solution saline (NaCl 0,15 M, pH ~ 6,5), puis diluées pour atteindre une $DO_{580\text{ nm}}$ égale à 2, soit environ 2.10^9 UFC/mL.

D – Evaluation du caractère hydrophobe et des propriétés acide/base de Lewis des bactéries par la méthode MATS

La méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvents) est une méthode de partition, basée sur la comparaison de l'affinité d'un microorganisme pour un solvant monopolaire et un solvant non polaire (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Le solvant monopolaire peut être acide (accepteur d'électrons) ou basique (donneur d'électrons), mais ces deux solvants doivent posséder une composante de Lifshitz-van der Waals similaire à celle du solvant non polaire qui leur est associé. Deux paires de solvants ont ainsi été choisies :

- le chloroforme, solvant acide avec une composante basique négligeable (van Oss, 1996) et l'hexadécane, n-alcane apolaire (Vernhet et Bellon-Fontaine, 1995 ; van Oss, 1996), permettent de déterminer le caractère donneur d'électrons de la souche ;
- l'acétate d'éthyle, solvant fortement basique (van Oss, 1996) et le décane, n-alcane apolaire permettent de déterminer le caractère accepteur d'électrons de la souche.

Le caractère hydrophobe (ou hydrophile) est révélé par l'affinité des microorganismes pour les solvants apolaires (*i.e.*, hexadécane et décane).

Expérimentalement, les suspensions bactériennes, prélevées en phase stationnaire de croissance et lavées deux fois dans la solution saline (NaCl 0,15 M), sont préparées à une $DO_{400\text{ nm}}$ environ égale à 0,8 (soit environ $2,5.10^8$ UFC/mL et $1,5.10^8$ UFC/mL pour *S. aureus* et *E. coli*, respectivement). Dans un tube à hémolyse, 0,4 mL de solvant sont ajoutés à 2,4 mL de suspension cellulaire. Le mélange est agité manuellement pendant 10 s, puis « vortexé » pendant 2 min. Il est ensuite laissé au repos pendant 15 min pour permettre la séparation complète des deux phases. Puis un échantillon de 1 mL de la phase aqueuse est prélevé pour la mesure de la densité optique à 400 nm. Le pourcentage d'affinité des bactéries pour chaque solvant est ensuite calculé grâce à l'Équation 1 :

Équation 1
$$\text{Affinité (\%)} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100$$

où A_0 et A sont les densités optiques à 400 nm de la suspension bactérienne avant et après contact avec le solvant, respectivement. Les tests sont réalisés en triplica, sur trois cultures indépendantes.

Le caractère hydrophile/hydrophobe et les propriétés donneur/accepteur d'électrons de la surface des levures, prélevées en phase stationnaire de croissance et suspendues dans la solution saline (NaCl 0,15 M), ont été évalués précédemment, selon le protocole décrit ci-dessus (Guillemot *et al.*, 2007).

II – Acier inoxydable AISI 316L et procédures de nettoyage

A – Acier inoxydable AISI 316L

La surface solide étudiée est l'acier inoxydable austénitique AISI 316L (Goodfellow SARL), de composition théorique Fe/Cr18/Ni10/Mo3 (qualité « medical grade ») et ayant subi un polissage « miroir » afin de minimiser la rugosité de surface. Des coupons de différentes dimensions ont été utilisés, pour les expériences en chambre à écoulement cisailé (longueur = 25,2 mm, largeur = 6,3 mm et épaisseur = 0,9 mm) et pour les tests de toxicité et la caractérisation des surfaces (longueur = 10 mm, largeur = 10 mm et épaisseur = 0,9 mm).

Afin d'étudier l'influence de la rugosité du substrat d'acier inoxydable sur l'adhérence des dépôts synthétisés par procédé plasma, une partie des coupons a été polie mécaniquement. Cette étape a été réalisée avec une meuleuse/polisseuse (Grinder/Polisher, Buehler SARL – Metaserv), en utilisant successivement différents papiers abrasifs SiC de grains de plus en plus fins (Struers A/S – MD Plan™), puis une pâte au diamant de 3 µm, jusqu'à obtenir un poli « optique » (rugosité de l'ordre du nanomètre).

B – Protocoles de traitement de surface de l'acier inoxydable AISI 316L

1 – Nettoyages chimiques

Deux modes de nettoyage chimique des coupons d'acier inoxydable ont été testés :

(i) Un nettoyage doux, consistant à immerger les coupons dans un mélange acétone/éthanol (50/50, v/v) (Fluka, Sigma-Aldrich/Normapur, Prolabo®) pendant 5 minutes, puis à les rincer dans trois bains successifs d'eau osmosée à 50°C et dans cinq bains d'eau osmosée à température ambiante (Guillemot *et al.*, 2006) ;

(ii) Un nettoyage drastique par trempage dans un mélange d'acide sulfurique (H₂SO₄) et d'eau oxygénée (H₂O₂) (50/50, v/v) (Normapur, Prolabo®) pendant 2 minutes, puis rinçage sous un flux d'eau déionisée pendant 3 minutes.

A l'issue de ces rinçages, les coupons sont séchés pendant 1 heure sous une hotte à flux vertical (Cytosafe 2000, Faster).

2 – Bombardement de la surface d'acier inoxydable par plasma d'argon

Les coupons d'acier inoxydable ont également été traités par bombardement d'ions argon dans un plasma, en utilisant une décharge asymétrique radiofréquence (RF) de 13,56 MHz. Le dispositif employé au LAPLACE (Figure 8 A, B et Figure 9) est constitué d'une chambre cylindrique en acier inoxydable d'un diamètre de 30 cm, équipée d'ouvertures de pompage et d'alimentation en gaz et

d'une fenêtre d'observation (Despax et Raynaud, 2007). Les parois du réacteur sont reliées à la terre. Deux électrodes planes et parallèles sont présentes dans le réacteur (Figures 8 B et C). L'électrode supérieure, d'un diamètre de 10 cm, est couplée au générateur électrique RF à travers un adaptateur d'impédance LC, permettant de maximiser la puissance transmise. Elle est placée à 3,5 cm au-dessus d'une électrode d'acier inoxydable de 12 cm de diamètre, électriquement reliée à la terre. Les échantillons sont fixés sur l'électrode RF par du scotch double-face (trois coupons, de dimensions 25,2 mm x 6,3 mm x 0,9 mm, par campagne expérimentale).

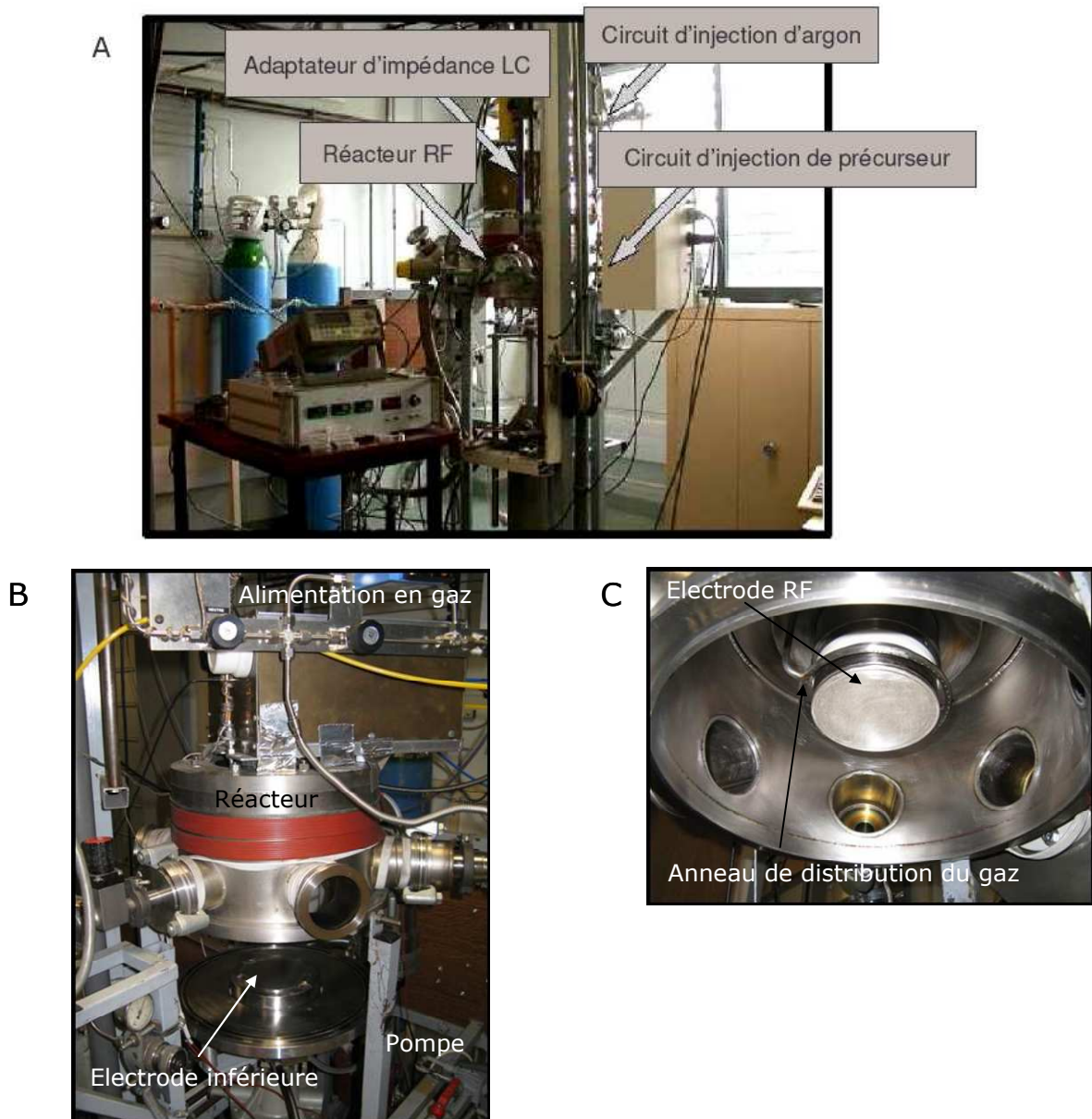


Figure 8. Photographies du réacteur plasma radiofréquence : (A) vue générale de l'ensemble du dispositif ; (B) vue du réacteur plasma et (C) vue de l'intérieur du réacteur (partie supérieure).

Le réacteur est placé sous vide primaire (pression résiduelle de l'ordre de 0,1 Pa) puis secondaire (pression résiduelle inférieure à 10^{-4} Pa), pour éliminer l'humidité et les contaminants de l'atmosphère ambiante. L'enceinte est ensuite placée sous un vide primaire (pression résiduelle inférieure à $6 \cdot 10^{-2}$ Pa), pour effectuer le bombardement. Une injection d'argon de pureté 99,9995% (Alphagaz™) est réalisée en continu. L'équilibre entre le flux d'argon injecté et le débit de pompage permet d'atteindre une pression d'équilibre à l'intérieur du réacteur. Cette pression d'argon, mesurée par une jauge MKS Baratron, est maintenue égale à 5,33 Pa tout au long du procédé.

Deux conditions de bombardement ont été testées : une puissance incidente de 5 W (condition I) ou 10 W (condition II), correspondant respectivement à une tension d'auto-polarisation ($V_{\text{bias sup}}$) de -210 V et -320 V, est appliquée au niveau de l'électrode supérieure. Le champ électrique ainsi créé dans l'espace inter-électrodes provoque l'ionisation des atomes d'argon. En raison de l'asymétrie de la décharge (électrodes de diamètres différents), les ions Ar^+ sont accélérés et attirés vers l'électrode supérieure, provoquant un bombardement à forte énergie des échantillons d'acier inoxydable. La durée du traitement est fixée à 20 minutes.

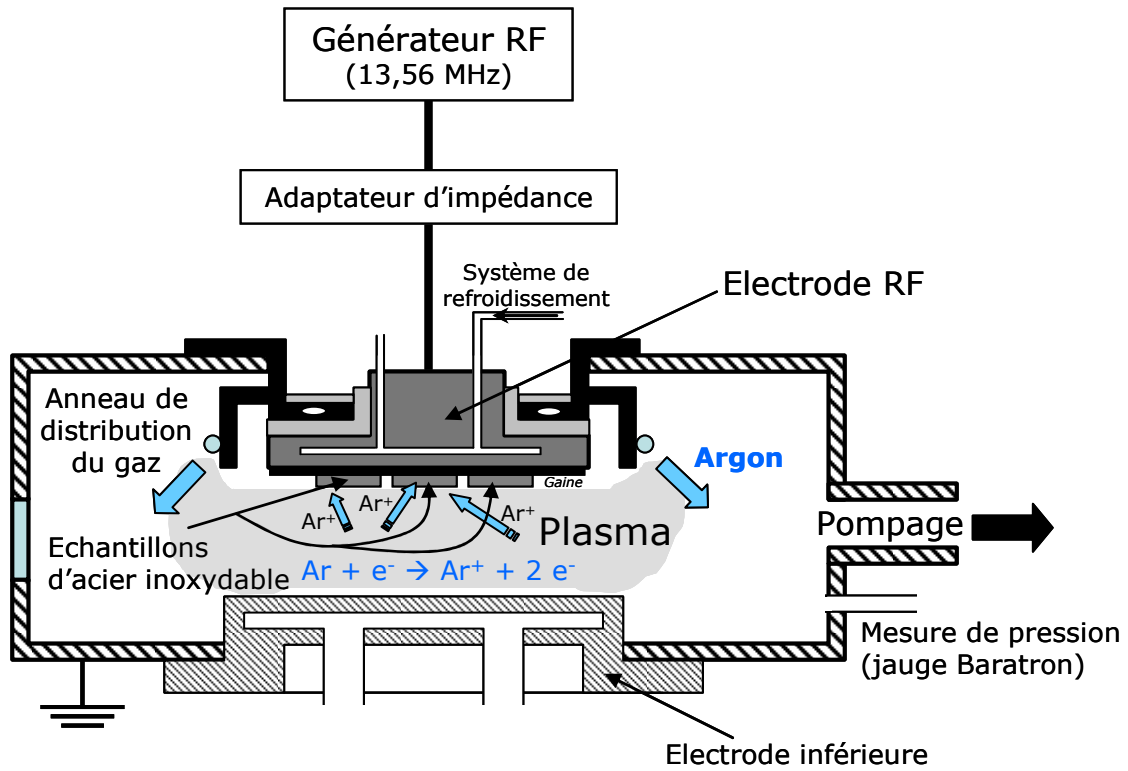


Figure 9. Schéma du réacteur plasma radiofréquence en cours de fonctionnement pour réaliser le bombardement d'ions argon sur les échantillons d'acier inoxydable.

C – Caractérisation des surfaces d’acier inoxydable vierge

1 – Rugosité

La rugosité moyenne arithmétique (R_a) des surfaces d’acier inoxydable AISI 316L a été déduite des mesures réalisées par profilométrie optique (KLA Tencor Alphastep IQ) au LAPLACE.

La profilométrie optique permet d’obtenir la topographie tridimensionnelle d’un échantillon, grâce à une pointe en diamant se déplaçant verticalement au contact de la surface et latéralement sur une distance choisie et à une vitesse définie. La position en hauteur de la pointe génère un signal analogique, converti ensuite en signal numérique, lui-même analysé afin de déduire la rugosité arithmétique de la surface. Cette technique présente plusieurs avantages : pas de préparation préalable de l’échantillon, simplicité et rapidité d’acquisition, résolution verticale élevée ($\sim 10 \text{ \AA}$), mesure non destructive.

Les valeurs données correspondent à la moyenne de 5 mesures, chacune étant réalisée sur une longueur de 500 μm , à une vitesse de 10 $\mu\text{m/s}$ et une « force » appliquée par la pointe égale à 12,5 mg.

2 – Composition chimique de la surface par spectroscopie XPS

La composition chimique ainsi que l’épaisseur de la couche de contamination et de la couche d’oxydes/hydroxydes de l’acier inoxydable traité selon les trois protocoles ont été déterminées par spectroscopie de photo-électrons induits par rayons X (XPS), également nommée ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis). Cette technique a été mise en œuvre au LPCS (ENSCP). Les coupons ont été envoyés au LPCS pour analyse sous atmosphère azotée, afin d’éviter au maximum les re-contaminations atmosphériques.

La spectroscopie XPS est une technique d’analyse chimique des surfaces (Briggs, 1996), et même d’extrême surface car la profondeur d’analyse est inférieure à 12 nm (Figure 10). Elle est basée sur la détection du nombre d’électrons éjectés de la surface suite à une irradiation par des rayons X, et sur la mesure de l’énergie cinétique de ces photo-électrons. L’énergie cinétique est liée à l’énergie de liaison de l’électron. Celle-ci est caractéristique d’un niveau de cœur donné (couche électronique : 1s, 2s, 2p, 3s, etc.) pour un atome donné. Elle permet donc d’identifier l’atome d’où provient l’électron. Ainsi, la spectroscopie XPS permet de déterminer la composition de la surface (pourcentages atomiques de tous les éléments, sauf He et H). Elle renseigne également sur l’environnement chimique des éléments présents, c’est-à-dire les liaisons engagées par ces atomes, ainsi que leur degré d’oxydation. Elle est non destructive et applicable à tous les matériaux. Le principe détaillé de cette technique est exposé en Annexe 1.

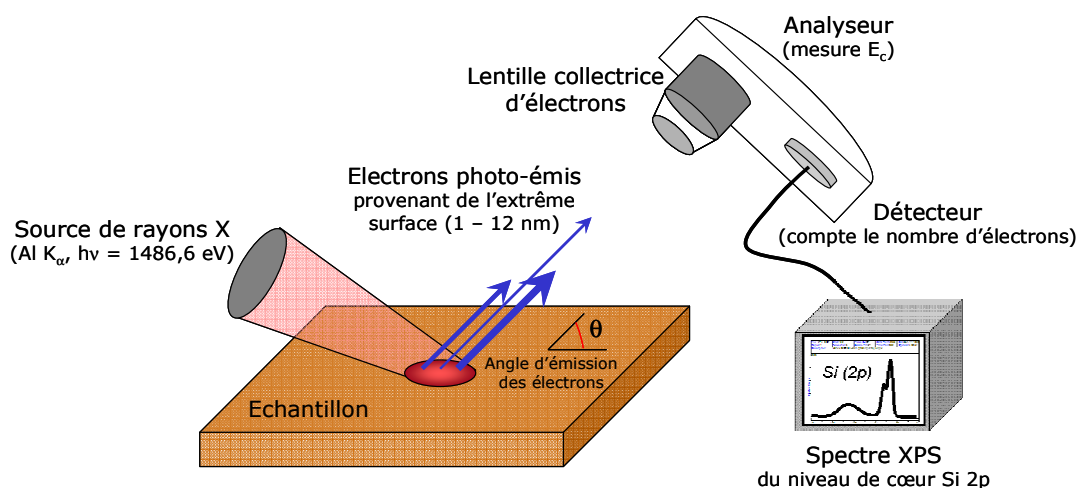


Figure 10. Représentation schématique de l'analyse XPS.

Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre Thermo Electron Escalab 250, équipé d'une source de rayons X monochromatique Al K_{α} ($h\nu = 1486,6$ eV, diamètre du spot d'analyse = 500 μm). Le travail de sortie du spectromètre, ϕ , est déterminé par calibration de l'énergie de liaison d'un des niveaux principaux d'un solide de référence, l'or (énergie de liaison de Au $4f_{7/2} = 84,1$ eV). L'angle d'analyse des photo-électrons par rapport à la surface de l'échantillon (θ) a été fixé à 90° .

Le spectre sur la gamme complète des énergies de liaison, appelé spectre général, est enregistré à une énergie de passage de 100 eV. Les spectres de haute résolution, représentant les photo-électrons caractéristiques des niveaux de cœur étudiés, sont enregistrés à une énergie de passage de 20 eV. Dans le cas de l'acier inoxydable vierge, les niveaux de cœur suivants ont été plus particulièrement analysés :

- Fe 2p, Cr 2p, Mo 3d, Ni 2p, car ces différents éléments sont les principaux constituants de l'acier inoxydable ;
- C 1s, O 1s, pour évaluer la présence de contaminations organiques.

Pour déduire la composition chimique des surfaces, les valeurs des libres parcours moyens des électrons, déterminées par Tanuma *et al.* (1994), et des sections efficaces de photo-ionisation, référencées par Scofield (1976), ont été utilisées.

La décomposition des spectres de haute résolution, consistant à déterminer, dans une enveloppe spectrale complexe, la répartition des signaux élémentaires représentant les photo-électrons caractéristiques d'une orbitale, d'un atome et d'un environnement chimique donné, a été réalisée avec le logiciel Advantage de la société Thermo Electron.

En supposant une couche de contamination organique et une couche passive (oxydes/hydroxydes) homogènes et continues (Zanna *et al.*, 2005), leur épaisseur a été déduite à partir de l'intensité du pic C 1s et des intensités relatives des pics correspondant aux métaux et aux oxydes/hydroxydes, respectivement.

3 – Angle de contact avec l'eau

Le caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces d'acier inoxydable ayant subi les différents nettoyages a été déterminé par la méthode de la goutte posée, à l'aide d'un goniomètre disponible au LAPLACE (Digidrop, Contact Angle Meter – GBX Scientific Instruments), couplé à une caméra et à un logiciel de capture et d'analyse d'images (logiciel WinDrop⁺⁺).

Une goutte d'eau déionisée (2 μL) est déposée à l'aide d'une seringue sur la surface de l'échantillon. L'angle de contact à l'interface entre l'eau et le substrat (θ_{eau}) permet d'estimer la mouillabilité de ce dernier. Une surface est généralement considérée comme hydrophobe à partir d'une valeur seuil de θ_{eau} égale à 90° . Les résultats indiqués correspondent à la moyenne d'au moins 5 mesures de l'angle de contact pour chaque échantillon.

III – Elaboration des films minces par procédé plasma

Les films nanocomposites ont été réalisés par le procédé plasma froid décrit au Chapitre IV de la partie bibliographique (Despax et Flouttard, 1989 ; Despax *et al.*, 1990 ; Despax et Raynaud, 2007), couplant la polymérisation d'un précurseur organosilicié avec le bombardement d'une cible d'argent. Cette technique de dépôt a été mise en œuvre au LAPLACE.

A – Synthèse des dépôts nanocomposites par procédé plasma

1 – Principe général de la méthode de dépôt

Le procédé de dépôt, basé sur la technique PE-CVD, utilise la combinaison d'une pulvérisation cathodique (cathode = cible d'argent) et de la décomposition/polymérisation de la molécule organosiliciée : l'hexaméthylidisiloxane (HMDSO) (Figure 11). Ces deux processus sont réalisés simultanément, dans une décharge asymétrique radiofréquence (RF) (fréquence du signal électrique = 13,56 MHz) d'un mélange gazeux argon-HMDSO.

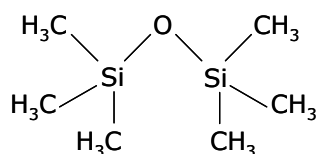


Figure 11. Structure moléculaire de l'hexaméthylidisiloxane.

Le réacteur employé pour réaliser les dépôts nanocomposites est le même que celui mis en œuvre pour le bombardement des surfaces d'acier inoxydable par des ions Ar^+ (cf. partie II-B-2), mais la configuration expérimentale est différente (Figure 12). En effet, les échantillons (9 coupons de dimensions 25,2 mm x 6,3 mm x 0,9 mm et un coupon de dimensions 10 mm x 10 mm x 0,9

mm) sont ici placés sur l'électrode inférieure, qui constitue donc l'électrode porte-substrats. L'électrode supérieure est la cible en argent métallique pur, couplée au générateur RF. Le réacteur est placé sous vide primaire. L'argon (gaz vecteur) et le HMDSO (précurseur) sont mélangés dans une chambre intermédiaire, puis injectés dans le réacteur au niveau d'un anneau d'injection des gaz, situé autour de l'électrode RF.

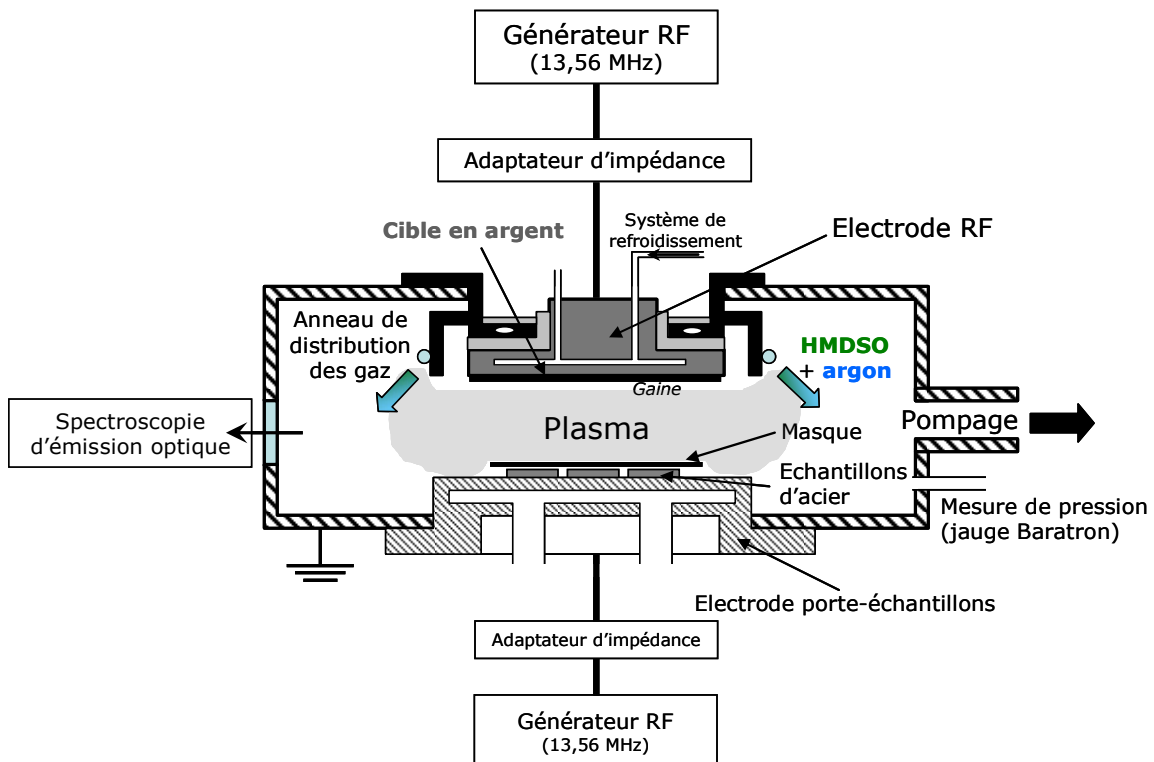


Figure 12. Schéma récapitulatif du principe de dépôt par procédé plasma RF du film composite, constitué de nanoparticules d'argent incluses dans la matrice organosiliciée.

La décharge radiofréquence est amorcée entre les deux électrodes. Les électrons, présents dans l'enceinte et accélérés par la décharge, ionisent les atomes d'argon ($\text{Ar} + e^- \rightarrow \text{Ar}^+ + 2 e^-$) et décomposent le HMDSO en différents fragments $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ (radicaux neutres, ions), par cassure des liaisons covalentes de la molécule. En raison de l'asymétrie des électrodes (électrodes de diamètres différents), les ions Ar^+ sont attirés et accélérés vers l'électrode supérieure (au niveau de la gaine), provoquant un bombardement à forte énergie de la cible d'argent. En transférant une partie de leur quantité de mouvement, ils permettent l'éjection des atomes d'argent présents en surface de la cible (pulvérisation). Ces atomes diffusent dans l'espace inter-électrodes et se fixent sur les parois, en particulier sur les échantillons placés sur l'électrode inférieure reliée à la terre. Simultanément, les fragments $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ viennent se déposer et polymériser sur les parois du réacteur, sur l'électrode cible d'argent et sur la surface des échantillons. Les fragments déposés sur l'électrode supérieure sont alors également pulvérisés par les ions Ar^+ du plasma. L'équilibre atteint au niveau de l'électrode supérieure, entre la couverture partielle de la cathode par le dépôt

organosilicié et la pulvérisation, permet d'obtenir une composition particulière du milieu plasma. Le mélange d'atomes d'argent et de fragments $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$, qui se dépose simultanément sur les échantillons d'acier, forme ainsi le film composite, constitué de nanoparticules d'argent englobées dans la matrice polymérique.

2 – Paramètres opératoires de contrôle

La maîtrise du débit d'argon permet de gérer le processus de pulvérisation de l'argent, par rapport à la polymérisation du HMDSO. En effet, lorsque le mélange gazeux est riche en argon, le phénomène de pulvérisation est important, conduisant à une augmentation de la fraction d'argent dans le dépôt.

En outre, la tension d'auto-polarisation ($V_{\text{bias sup}}$), liée à la puissance incidente de la décharge RF (notée P_i), permet de contrôler la composition du matériau nanocomposite. En effet, pour une tension inter-électrodes élevée, l'énergie des électrons présents dans la décharge est plus importante, ce qui augmente le nombre d'atomes d'argent éjectés de la cible et la fragmentation du précurseur HMDSO.

Le HMDSO est introduit dans la décharge suivant un débit pulsé, avec un cycle de pulsations contrôlable, permettant d'ajuster avec précision la quantité de HMDSO décomposée (Figure 13). Le HMDSO est injecté pendant une durée T_{ON} , au cours de laquelle se produit préférentiellement la couverture de la cible d'argent. Au contraire, T_{OFF} correspond à la phase d'arrêt de l'injection et favorise la pulvérisation. Lorsque la valeur de T_{ON} est faible, la quantité de HMDSO injectée dans la décharge est faible. Par conséquent, le processus de polymérisation est moindre et la pulvérisation de la cible d'argent est intense. Cela conduit à une augmentation du contenu en argent dans le dépôt.

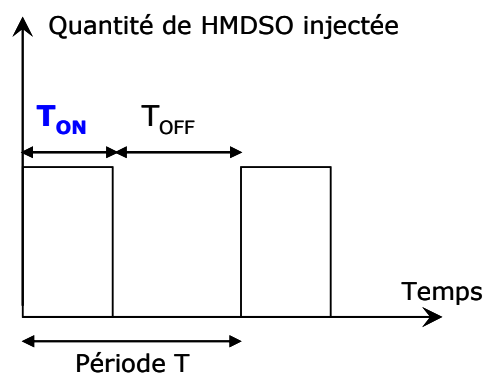


Figure 13. Schéma du cycle de pulsations du débit de HMDSO.

Une faible fluctuation de la pression dans le réacteur est observée pendant l'injection du HMDSO. La pression de HMDSO (P_{HMDSO}) est alors définie comme la différence entre la pression maximale mesurée lors de l'injection du mélange argon + HMDSO et la pression mesurée lors de l'injection d'argon seul.

Dans le cadre de notre étude, le débit d'argon est fixé à une valeur identique pour tous les dépôts (*i.e.*, 2,8 sccm[‡]). L'électrode porte-échantillon est polarisée à -40 V, valeur également maintenue constante pour l'ensemble de notre étude. Les **paramètres opératoires variables** permettant de moduler la composition du dépôt sont :

- la **pression de HMDSO (P_{HMDSO})**, traduisant la quantité de précurseur présente dans le réacteur et contrôlée par la **valeur de T_{ON}** ;
- la **tension d'auto-polarisation ($V_{\text{bias sup}}$)** (liée à la puissance incidente P_i) de l'électrode RF.

B – Contrôle *in situ* du procédé de dépôt par Spectroscopie d'Emission Optique

De manière à contrôler la composition du milieu plasma tout au long du procédé de synthèse des dépôts, une analyse de la lumière émise par le plasma est effectuée par Spectroscopie d'Emission Optique (OES) dans une gamme comprise entre 300 et 650 nm. Cette mesure est réalisée *in situ* à travers une fenêtre d'observation en verre et une fibre optique positionnée en face de la décharge (Figure 14). La fibre optique est reliée à un monochromateur Chromex (distance focale = 0,25 m ; réseau 600 traits/mm), couplé à un détecteur (Princeton Instrument OMA) et à un logiciel d'acquisition (Winspec) permettant l'enregistrement des spectres.

Afin de visualiser précisément le processus de pulvérisation de l'argent par rapport à la décomposition/polymérisation du précurseur organosilicié, la gamme de longueur d'onde est restreinte entre 480 et 550 nm (Figure 14). En effet, dans cette plage, les raies d'argent (546,55 et 520,91 nm) et d'argon (549,59 nm), correspondant respectivement à la présence d'ions/atomes d'argent et d'ions/atomes d'argon, ainsi que la transition de H_{β} (486,13 nm) liée à la dissociation du HMDSO, sont facilement détectées et identifiées (Figure 14).

[‡] sccm : cm³/min dans les conditions standard de température et de pression.

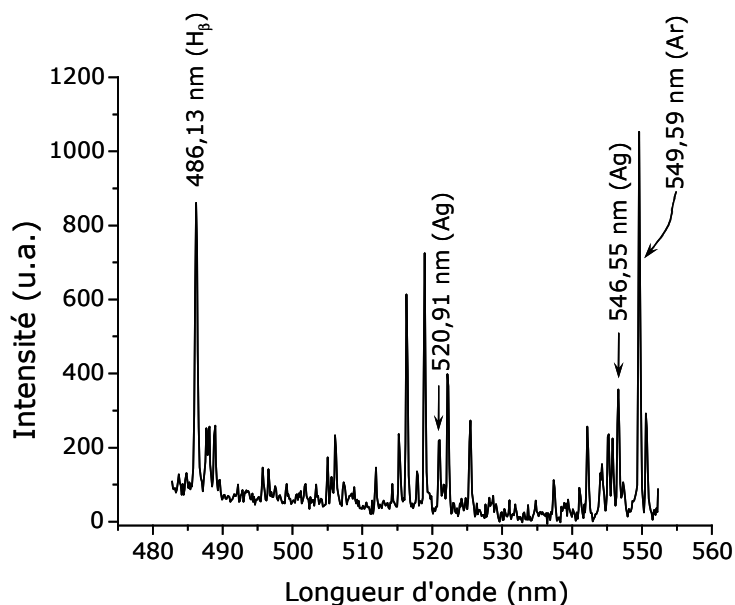


Figure 14. Exemple de spectre d'émission optique de la phase plasma lors du procédé de synthèse du dépôt nanocomposite.

L'argon étant le gaz de référence (débit constant), il est alors possible de déterminer les rapports d'intensité des raies d'émission, Ag/Ar et H_β/Ar, afin de contrôler la composition du milieu plasma au cours des étapes successives du procédé. Ainsi, le ratio Ag/Ar reflète la quantité d'argent dans le plasma, alors que le ratio H_β/Ar indique le degré de dissociation du précurseur.

C – Description du protocole de dépôt et des conditions opératoires

1 – Dépôts nanocomposites

Le protocole opératoire utilisé pour synthétiser les dépôts nanocomposites est schématisé sur la Figure 15 et les paramètres expérimentaux sont résumés dans le Tableau 7. Neuf coupons d'acier inoxydable de dimensions 25,2 mm x 6,3 mm x 0,9 mm et un coupon d'acier de dimensions 10 mm x 10 mm x 0,9 mm, préalablement nettoyés selon la procédure acétone/éthanol, ainsi que deux coupons de silicium intrinsèque (10 mm x 10 mm x 0,1 mm ; nettoyage par gravure chimique à l'acide fluorhydrique pendant 30 s, puis rinçage sous eau déminéralisée pendant 3 min et séchage sous flux d'azote sec) sont placés sur l'électrode inférieure. Les coupons de silicium intrinsèque vont permettre de mesurer l'épaisseur des dépôts par profilométrie et d'analyser la structure chimique de la matrice les constituant, par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) en mode transmission (cf. paragraphe IV-D-2). Les échantillons sont préalablement protégés par un masque jusqu'à la stabilisation du plasma.

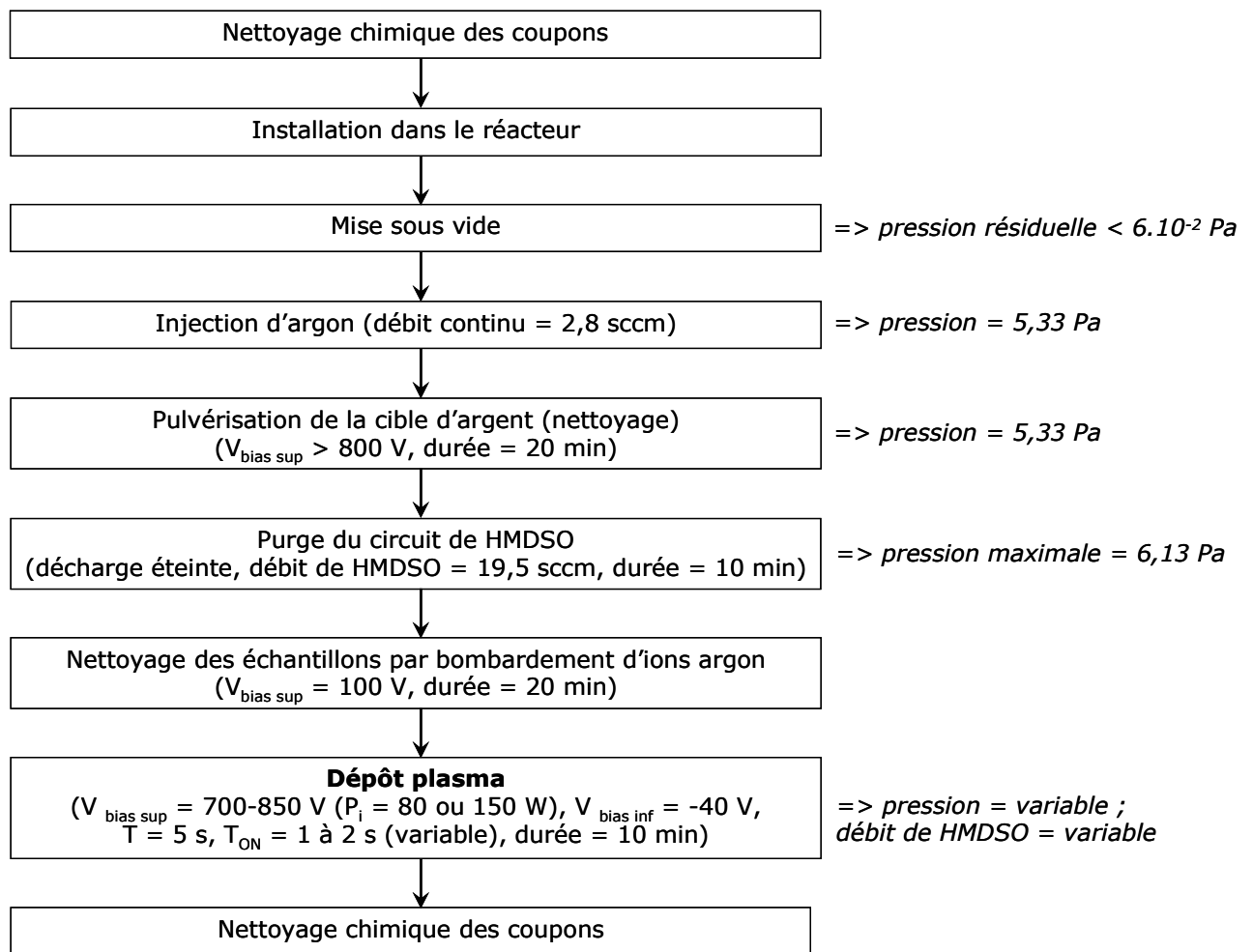


Figure 15. Schéma récapitulatif du protocole de synthèse des dépôts nanocomposites par procédé plasma (consignes et paramètres suivis au cours du procédé).

L'enceinte est placée sous vide primaire, puis sous vide secondaire pendant 16 h (pression résiduelle inférieure à 10^{-4} Pa), afin d'éliminer l'humidité et les contaminants atmosphériques. Le réacteur est ensuite placé sous un vide primaire (pression résiduelle inférieure à 6.10^{-2} Pa), pour réaliser le protocole de dépôt. De l'argon de pureté 99,9995% (Alphagaz™) est injecté de manière continue dans l'enceinte, à un débit de 2,8 sccm. La pression d'argon, mesurée par une jauge Baratron MKS, est maintenue égale à 5,33 Pa tout au long du procédé.

La première étape consiste à nettoyer la cible d'argent des éventuels contaminants organiques et de l'humidité résiduelle, par bombardement d'ions argon pendant 20 min, selon un protocole similaire à celui décrit au paragraphe II-B-2. La puissance incidente de la décharge asymétrique RF est fixée à une valeur comprise entre 80 et 120 W, afin d'atteindre une tension d'auto-polarisation ($V_{\text{bias sup}}$) supérieure à 800 V entre les deux électrodes. Au fur et à mesure du décapage de la cible d'argent, la tension d'auto-polarisation augmente. Le processus est stoppé lorsque $V_{\text{bias sup}}$ est environ égale à 1000 V et que l'intensité de la raie d'argent à 546,55 nm est supérieure à celle de la raie d'argon sur le spectre OES.

Le précurseur HMDSO (pureté > 99,5%, Sigma Aldrich), chauffé à 40°C pour empêcher toute condensation dans les tuyaux, est ensuite injecté dans le réacteur. Le circuit de transport du HMDSO est purgé pendant 10 min, de manière à éviter la présence de bulles d'air dans le réseau. Pour réaliser cette purge, le débit de précurseur est réglé à sa valeur maximale (19,5 sccm) et la décharge électrique éteinte.

Au bout de 10 min, le débit de HMDSO est stoppé et le gaz présent dans l'enceinte éliminé par pompage. La décharge est à nouveau allumée afin de vérifier l'absence de HMDSO résiduel (raie H_{β} confondue avec le « bruit » de la ligne de base). Un bombardement d'ions argon est alors effectué pendant 20 min, afin d'éliminer toute trace de contamination organique et d'activer la surface des échantillons. Pour cela, la puissance incidente est fixée à 15 W ($V_{\text{bias sup}} \sim 100$ V) et le masque retiré. A l'issue de ce nettoyage, il est remis en place pour protéger les échantillons lors de la stabilisation des conditions opératoires pour le dépôt proprement dit.

La tension d'auto-polarisation ($V_{\text{bias sup}}$) est augmentée à une valeur comprise entre 700 et 800 V (correspondant à une puissance incidente de l'électrode RF de 80 W ou 150 W suivant la résistance induite par les contacts électriques au niveau des connexions). Une décharge RF est également appliquée au niveau de l'électrode porte-échantillon ($V_{\text{bias inf}} = -40$ V), afin de favoriser la dissociation du HMDSO et l'ancrage des fragments organosiliciés sur les échantillons. Les pulses de débit du HMDSO sont déclenchés en utilisant un contrôleur de débit OMICRON, équipé d'un générateur d'impulsion AGILENT (période $T = T_{\text{ON}} + T_{\text{OFF}} = 5$ s ; T_{ON} compris entre 1 et 2 s). Le débit maximal de HMDSO, obtenu pour $T = T_{\text{ON}} = 5$ s, est égal à 0,4 sccm. Par conséquent, le débit moyen de HMDSO injecté peut être estimé par la formule : $0,4 \times \frac{T_{\text{ON}}}{T}$. Des spectres OES sont régulièrement enregistrés afin de suivre l'évolution de la composition du plasma, par l'intermédiaire des rapports d'intensité Ag/Ar et H_{β} /Ar. Lorsque les conditions sont stabilisées (*i.e.*, régime permanent atteint), le masque est retiré et la durée du dépôt est alors fixée à 10 min. La

tension d'auto-polarisation au niveau de l'électrode RF ($V_{\text{bias sup}}$), ainsi que l'évolution de la pression au sein du réacteur (permettant de déduire P_{HMDSO}) et des rapports Ag/Ar et H_{β} /Ar sont suivis.

Les dépôts nanocomposites synthétisés selon ce protocole sont les dépôts B à H (Tableau 7). Ce tableau résume les consignes fixées pour la synthèse de chacun des films nanocomposites, ainsi que les paramètres opératoires enregistrés au bout de 9 min de dépôt.

A l'issue de la phase de dépôt, les coupons sont nettoyés selon le protocole acétone/éthanol avant d'être testés. De même, lorsqu'ils sont utilisés plusieurs fois consécutives, ils sont nettoyés entre chaque expérience selon la même procédure.

Tableau 7. Paramètres opératoires (consignes et *paramètres suivis*) utilisés pour la synthèse des dépôts par procédé plasma.

Nom du dépôt	T_{ON} (s) *	Pression HMDSO (Pa)	Puissance RF P_i (W) **	Tension d'auto-polarisation $V_{\text{bias sup}}$ (V)
A	3,00	0,85	150	736
B	1,60	0,43	150	777
C	1,50	0,40	150	757
D	1,85	0,53	80	807
E	1,40	0,35	150	766
F	1,20	0,28	150	761
G	1,10	0,25	150	772
H	1,00	0,21	150	756
I	4,00	Non déterminée ($P_{\text{HMDSO} + \text{oxygène}} = 1,4$ Pa)	150	445

* La valeur de T_{ON} correspond à la durée d'injection du précurseur HMDSO dans le réacteur. Elle permet de contrôler le paramètre « pression de HMDSO » dans l'enceinte.

** La puissance RF correspond à la puissance affichée par le générateur RF. Du fait de la modification aléatoire des contacts électriques d'un essai à l'autre (démontage du réacteur pour nettoyage), la puissance affichée sur le générateur RF (*i.e.*, puissance totale dissipée dans le système décharge + circuit électrique et contacts résistifs aux connexions) ne correspond pas à la puissance réellement injectée dans la décharge. Par conséquent, la puissance RF n'est pas le paramètre permettant le contrôle du procédé de dépôt (il s'agit en réalité de la tension d'auto-polarisation $V_{\text{bias sup}}$). La valeur de la puissance RF est donc réglée de manière à obtenir une tension d'auto-polarisation comprise entre 700 et 800 V.

2 – Dépôts de matrice organosiliciée

Des dépôts constitués uniquement de matrice organosiliciée (dépôt A, Tableau 7) sont également réalisés sur des échantillons d'acier inoxydable et de silicium intrinsèque, afin de dissocier les effets respectifs du « nano-argent » et de la matrice sur l'adhésion et la viabilité des microorganismes. Le protocole est identique à celui mis en œuvre pour réaliser les dépôts nanocomposites. Toutefois, dans ce cas, la quantité de HMDSO injectée est fortement augmentée (*via* la valeur de T_{ON}). Ainsi, la vitesse de dépôt des fragments $SiC_xO_yH_z$ au niveau de l'électrode RF devient supérieure à celle de la pulvérisation avec, de ce fait, une couverture totale de l'électrode d'argent. Cette électrode n'étant plus soumise au bombardement ionique, les atomes d'argent ne sont plus éjectés et les couches déposées sur les échantillons ne contiennent pas de particules d'argent.

Les dépôts de matrice sont réalisés pour une tension d'auto-polarisation de 750 V et une valeur de T_{ON} égale à 3,00 s (soit un débit moyen de HMDSO de 0,24 sccm), sur une durée de 10 min, après stabilisation du plasma (Tableau 7). L'acquisition de spectres OES permet de suivre régulièrement le rapport d'intensité $H\beta/Ar$ et de vérifier que le ratio Ag/Ar est bien égal à 0. Les différents paramètres opératoires ($V_{bias\ sup}$, pression dans le réacteur) sont enregistrés au cours du dépôt.

3 – Dépôts de matrice avec ajout d'oxygène dans le plasma

Dans l'optique de moduler les caractéristiques de la matrice (caractère organique/inorganique), des dépôts complémentaires, dénommés I, sont synthétisés en ajoutant de l'oxygène dans le plasma (Tableau 7). Le protocole est analogue à celui présenté dans le paragraphe III-C-2.

Le mélange de gaz injecté dans le réacteur est constitué d'argon, d'oxygène et de HMDSO. Le débit d'argon pur est maintenu à 2,8 sccm pendant toute la durée du dépôt. L'oxygène (Alphagaz™) est introduit à un débit de 3,28 sccm. Le HMDSO est injecté dans le réacteur à une valeur $T_{ON} = 4,00$ s, correspondant à un débit moyen de 0,32 sccm. Ces valeurs ont été choisies de manière à ce que le rapport des débits de gaz précurseurs HMDSO/O₂ soit égal à 1/10.

La tension d'auto-polarisation de l'électrode porte-échantillon est fixée à -40 V. L'électrode supérieure est soumise à une puissance incidente de 150 W ($V_{bias\ sup} = 450$ V). Les électrons mis en mouvement et accélérés par la décharge RF provoquent la fragmentation du HMDSO et la dissociation des molécules d'oxygène. Des réactions de recombinaison et de dissociation se produisent simultanément entre les fragments organosiliciés et les espèces excitées issues de la décomposition de l'oxygène, notamment les radicaux libres. L'oxygène atomique provoque l'oxydation des fragments polymériques $SiC_xO_yH_z$ (élimination des éléments C et H sous forme de CO₂ et H₂O). Les produits ainsi créés se déposent et polymérisent à la surface des échantillons d'acier inoxydable et de silicium intrinsèque. L'oxygène atomique induit également une oxydation complémentaire au niveau de la couche en cours de croissance. La durée du dépôt est fixée à 20 min.

IV – Caractérisation des films obtenus par procédé plasma

A – Mesure de l'épaisseur des revêtements

1 – Profilométrie

L'épaisseur des dépôts synthétisés par procédé plasma a été mesurée par profilométrie, avec l'appareil KLA Tencor Alphastep IQ, décrit au paragraphe II-C-1. Pour cela, un dépôt réalisé sur un coupon de silicium intrinsèque est rayé grâce à un stylet en acier inoxydable (le silicium intrinsèque ne peut lui être rayé par l'acier inoxydable). La profondeur de la marche ainsi créée est mesurée avec le stylet profilométrique sur une longueur de 400 μm (vitesse du stylet = 20 $\mu\text{m/s}$; fréquence d'échantillonnage = 50 Hz ; « force » appliquée = 14,9 mg). Cette mesure a été réalisée sur trois dépôts représentatifs : A, B et E. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne de trois mesures sur chaque dépôt.

2 – Ellipsométrie

Dans le cas du dépôt I, les échantillons testés n'ont pas pu être rayés. Par conséquent, la mesure de l'épaisseur a dû être effectuée par ellipsométrie spectroscopique (Figure 16), au LAPLACE (appareil : Sopra GES-5). Cette méthode optique de caractérisation de surface repose sur la mesure, par spectrométrie, du changement de l'état de polarisation de la lumière, dû à la réflexion sur une surface plane (dans notre cas, la surface du coupon de silicium intrinsèque). La modification de la polarisation du faisceau incident et du rayon réfléchi est très sensible aux épaisseurs des couches déposées à la surface.

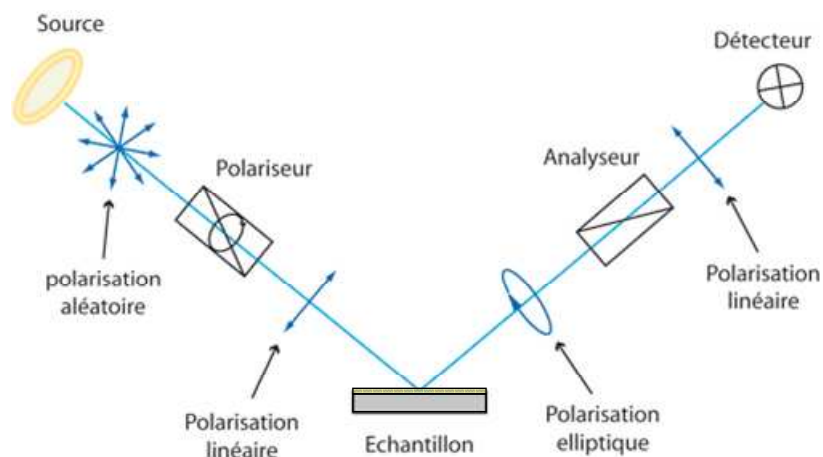


Figure 16. Schéma de principe et états de polarisation de la lumière lors d'une mesure d'épaisseur par ellipsométrie à modulation par polariseur tournant.

B – Détermination de la topographie de surface des dépôts

1 – Observation de la morphologie de surface par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Afin de visualiser l'état de surface des dépôts nanocomposites synthétisés par procédé plasma, des photographies en Microscopie Electronique à Balayage ont également été réalisées sur quatre dépôts représentatifs (dépôts A, B, E et H), au sein du service commun TEMSCAN de l'Université de Toulouse (UPS), sur le microscope SEM-FEG JEOL JSM 6700 F (<http://www.lcc-toulouse.fr/lcc/spip.php?article134>).

2 – Caractérisation de la rugosité de surface par profilométrie

Selon un protocole identique à celui décrit au paragraphe II-C-1 de ce chapitre, la rugosité moyenne arithmétique (R_a) des dépôts A, B, E, H et I a été déduite des mesures réalisées par profilométrie (KLA Tencor Alphastep IQ). Les résultats obtenus correspondent à la moyenne de 5 mesures.

C - Caractérisation de la structure et de la composition interne par Microscopie Electronique en Transmission (MET) couplée à une Analyse Dispersive en Energie (EDS)

1 – Microscopie Electronique en Transmission

Afin de caractériser la structure interne du dépôt nanocomposite D, en évaluant la forme, la taille et la distribution des nanoparticules d'argent, des photographies en Microscopie Electronique en Transmission ont été réalisées au service commun TEMSCAN de l'Université de Toulouse (UPS), sur le microscope TEM-FEG JEOL JEM 2100 F (<http://www.lcc-toulouse.fr/lcc/spip.php?article134>). Le microscope utilisé présente une résolution spatiale de 2-3 Å. Le dépôt D observé par MET a été synthétisé sur un coupon de silicium intrinsèque, de manière à être découpé puis aminci (~ 50 nm) pour permettre l'observation en transmission (Figure 17).

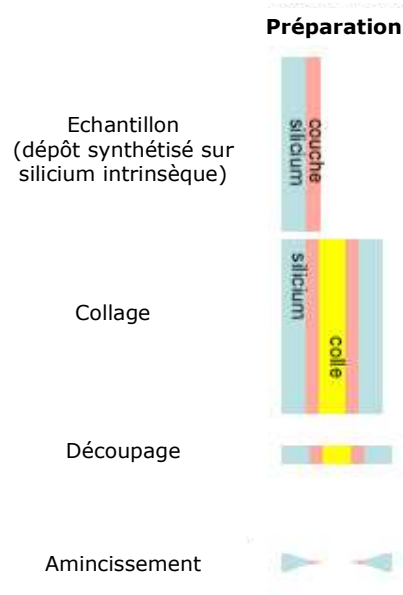


Figure 17. Préparation de l'échantillon pour l'observation par Microscopie Electronique en Transmission.

2 – Analyse par Spectroscopie Dispersive en Energie des rayons X (EDS)

La technique EDS a été mise en œuvre simultanément à l'observation en MET (JEOL JEM 2100 F, spectroscope Brucker avec détecteur SDD 30 mm², résolution = 133 eV). Elle repose sur l'étude des rayonnements X, émis par les atomes de l'échantillon lorsqu'ils retombent dans leur état fondamental, après avoir été excités par le faisceau électronique envoyé sur l'échantillon pour l'observation MET. L'énergie des rayons X étant caractéristique de l'atome émetteur, il est possible d'identifier les éléments présents dans l'échantillon. L'analyse par spectroscopie EDS permet ainsi de décrire qualitativement la composition de l'échantillon observé.

Ce type d'analyse a également été réalisé simultanément à l'observation en MEB de la surface des dépôts B et E, au service commun TEMSCAN (microscope JEOL JSM 6700F, spectroscope Brucker avec détecteur SDD 30 mm², résolution = 135 eV).

D – Détermination de la composition et des caractéristiques physico-chimiques des dépôts

1 – Evaluation de la composition et de la structure chimique de la surface par spectroscopie XPS

La composition chimique de surface des dépôts A à I a été analysée par XPS au LPCS de l'ENSCP, technique dont le principe est exposé au paragraphe II-C-2 et en Annexe 1. Préalablement à l'analyse, la surface est décapée très légèrement par bombardement d'ions argon (érosion faible), afin d'éliminer les contaminants organiques.

Une analyse quantitative est effectuée à partir de la surface des pics sur les spectres de haute résolution normalisés (Ag 3d, C 1s, O 1s et Si 2p). Ceci permet de déterminer la composition atomique de la surface des dépôts (ratios et pourcentages atomiques) et notamment, leur contenu en argent.

Les spectres de haute résolution (Si 2p, C 1s et O 1s) sont analysés afin de déterminer la nature de la matrice constituant les différents dépôts, notamment son caractère organocilié ou silicié (*i.e.*, inorganique), c'est-à-dire son degré d'oxydation. En effet, la position exacte (en énergie de liaison) des pics élémentaires, déterminée par décomposition des spectres de haute résolution (référence : pic C 1s à 284,4 eV), renseigne sur le type de liaison engagée par les atomes émetteurs d'électrons. Les spectres de haute résolution Si 2p, C 1s et O 1s du dépôt A sont comparés à ceux enregistrés pour les dépôts B à H, de manière à évaluer l'influence de la présence d'argent sur la structure chimique de la matrice.

Le spectre de haute résolution de l'argent (Ag 3d) est également décomposé en pics élémentaires, afin de déterminer le degré d'oxydation de l'argent (argent métallique Ag(0) et/ou argent oxydé Ag(I)) constituant les nanoparticules incluses dans le dépôt. Pour déterminer avec précision l'état chimique de l'argent, le paramètre Auger modifié de l'argent (α') est calculé, en sommant l'énergie de liaison du pic Ag 3d le plus intense (Ag 3d_{5/2}), déterminée sur le spectre XPS, et l'énergie cinétique de la raie Auger la plus fine, qui correspond au pic Auger M₄N₄₅N₄₅. Cette énergie est déduite de l'énergie $h\nu$ du faisceau de rayons X incidents, à laquelle on soustrait l'énergie de liaison de la raie Auger (lue sur le spectre XPS).

2 – Etude de la structure chimique par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) en transmission et spectroscopie Raman

2.1 – Spectroscopie FTIR

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon analysé. Les longueurs d'onde auxquelles l'échantillon absorbe sont caractéristiques des groupes chimiques présents dans le matériau. Lorsque la fréquence de résonance du faisceau infrarouge (c'est-à-dire sa longueur d'onde) est proche de l'énergie de vibration du groupe chimique, celui-ci absorbe le rayonnement et entre en mouvement. Cette absorption provoque une diminution de l'intensité lumineuse transmise.

Les mouvements des groupes chimiques sont classés en différentes catégories (Figure 18), selon que les atomes vibrent dans l'axe de leur liaison, dans le plan qu'ils forment ou hors de ce plan. La position des bandes d'absorption des fonctions chimiques, comprise entre 4000 et 400 cm⁻¹ (soit λ : 2,5 – 25 μm) dépend entièrement des masses atomiques et des forces de liaison. Elle est donc associée à une liaison particulière. Par conséquent, le spectre IR apparaît comme un moyen d'identification qualitatif de la composition et de la structure chimique du matériau.

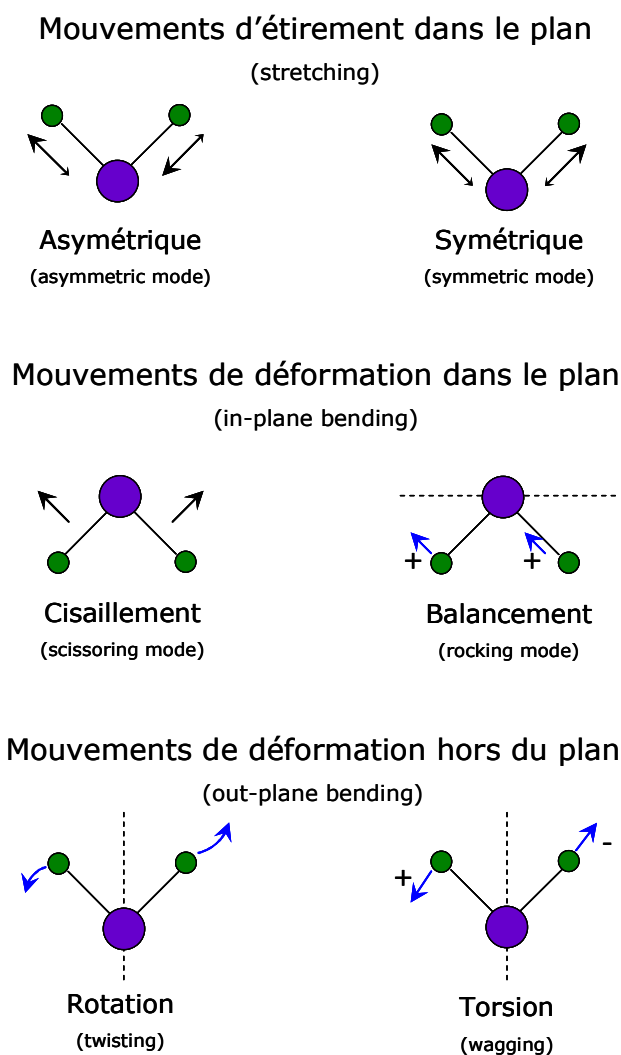


Figure 18. Modes de vibration d'une molécule.

Les dépôts A à I ont été analysés par spectroscopie FTIR au LAPLACE. Les spectres IR permettent d'évaluer si la matrice du dépôt analysé a conservé une structure proche de celle du précurseur HMDSO (notamment présence de liaisons Si-CH₃ et Si-(CH₃)₃). Cette technique présente l'avantage d'être non destructive, simple et rapide à mettre en œuvre. Des analyses comparatives ont été réalisées entre les dépôts de matrice A et I, afin de déterminer l'influence de l'ajout d'oxygène sur le caractère organique/inorganique du dépôt. De même, une comparaison a été réalisée entre le dépôt A et les dépôts nanocomposites présentant des contenus en argent croissants (dépôts B à H), pour évaluer l'impact de la présence d'argent dans le film sur la structure chimique de la matrice.

L'appareil utilisé est un spectromètre à transformée de Fourier (Bio-Rad, Digilab Division, FTS-60A). Il envoie le rayonnement infrarouge sur l'échantillon à travers un interféromètre de Michelson, qui permet de collecter simultanément l'information à toutes les longueurs d'onde, à

l'aide d'un détecteur pyroélectrique DTGS. L'interférogramme obtenu est ensuite converti en un spectre infrarouge à l'aide de la « transformée de Fourier ». Les spectres IR sont réalisés en mode transmission, sur des coupons de silicium intrinsèque (10 mm x 10 mm x 0,1 mm) recouverts par les dépôts. L'enceinte de mesure, dans laquelle est placé le coupon, est purgée en permanence par un flux d'azote sec, pour éliminer l'eau et le dioxyde de carbone présents dans l'atmosphère ambiante. Chaque spectre est obtenu à une résolution de 4 cm^{-1} , en moyennant le signal de 64 scans (logiciel Bio-Rad Win-IR Pro) et en déduisant le spectre correspondant au substrat de silicium intrinsèque vierge.

2.2 – Spectroscopie Raman

L'effet Raman consiste en la diffusion inélastique, par le matériau, d'un photon émis par une source monochromatique (un laser dans la plupart des cas). L'échange d'énergie entre les photons incidents et l'échantillon provoque la vibration des liaisons entre les atomes de cet échantillon (transitions vibrationnelles, Figure 19). Par conséquent, la lumière diffusée n'a pas la même longueur d'onde que la lumière incidente, ce qui correspond à un décalage en fréquence, caractéristique du matériau. L'étude de la lumière diffusée permet donc une analyse qualitative de la composition et la structure chimique de l'échantillon.

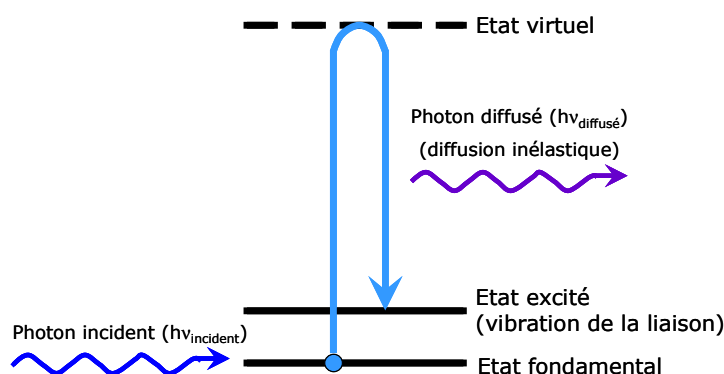


Figure 19. Principe de la spectroscopie Raman.

Cette technique non destructive est complémentaire de la spectroscopie infrarouge, car elle cible plutôt les vibrations des structures homonucléaires ($-\text{C}-\text{C}-$, $-\text{C}=\text{C}-$, etc.), qui sont, elles, peu visibles en spectroscopie IR.

Les dépôts A, B et D ont été analysés par spectroscopie Raman, afin d'évaluer la structure chimique de la matrice les constituant. Une comparaison a été effectuée entre le spectre du dépôt A et les spectres des dépôts nanocomposites B et D, pour déterminer l'influence de l'argent sur la structure chimique de la matrice. Les analyses ont été réalisées au Service Commun de Spectroscopies Infrarouge et Raman de l'Université Paul Sabatier (UPS) de Toulouse, sur des dépôts synthétisés sur des coupons d'acier inoxydable (ce matériau n'ayant pas de spectre visible en Raman, contrairement au silicium intrinsèque).

3 – Détermination du profil de composition élémentaire par spectroscopie de masse d'ions secondaires (SIMS), couplée à une analyse par temps de vol (ToF)

La technique ToF-SIMS (« Time of Flight – Secondary Ion Mass Spectrometry ») permet de déterminer le profil en épaisseur de la composition des dépôts. Elle consiste à bombarder la surface de l'échantillon avec un faisceau d'ions primaires, afin de pulvériser et d'ioniser la matière. Les ions secondaires émis sont alors accélérés à travers l'analyseur à temps de vol, jusqu'au spectromètre de masse. Celui-ci les détecte puis les identifie par la mesure du rapport m/z , qui est déduit du temps de vol (voir Annexe 2). Le spectre obtenu représente l'intensité du signal (nombre d'ions détectés) en fonction du rapport m/z et permet de déterminer la composition élémentaire de l'échantillon. Cette technique est résolutive et très sensible (limites de détection de l'ordre de 10^{12} à 10^{16} atomes/cm³).

En alternant des phases d'abrasion de l'échantillon par pulvérisation ionique et des phases d'analyse (technique destructive), il est possible de suivre l'évolution de la composition en fonction de l'épaisseur du substrat (Figure 20). Ainsi, pour chaque espèce détectée, le profil en épaisseur correspond à la variation de l'intensité du signal en fonction du temps de décapage (résolution en profondeur de l'ordre du nanomètre). Il est important de noter que l'évolution de l'intensité des signaux dépend de la nature de la matrice d'où les ions secondaires ont été émis.

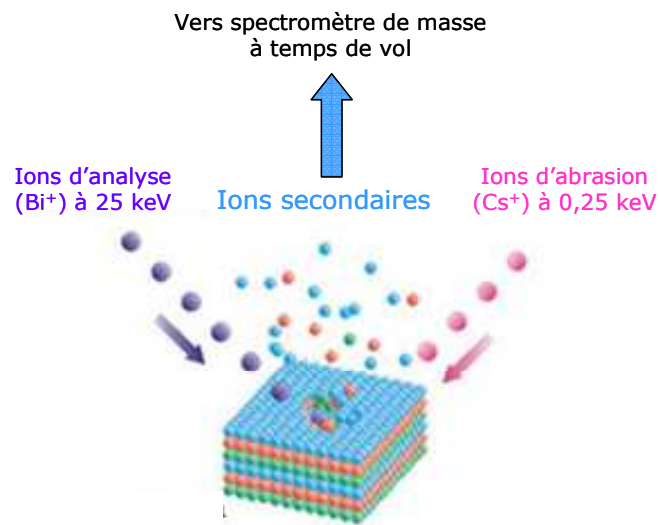


Figure 20. Principe de l'analyse ToF-SIMS.

L'analyse a été effectuée au LPCS de l'ENSCP, sur les dépôts nanocomposites B et G, avec un spectromètre de masse Ion TOF. Elle est réalisée sous un vide poussé (pression résiduelle : 10^{-7} Pa), grâce à une source pulsée d'ions primaires Bi^+ (énergie : 25 keV) délivrant un courant de 1,1 pA sur une surface de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ (soit 11 nA/cm^2). L'abrasion de l'échantillon est opérée sous un faisceau d'ions Cs^+ (énergie : 0,25 keV), générant un courant de 25 nA sur une surface de $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$ (soit $28 \mu\text{A/cm}^2$). Afin d'obtenir une sensibilité plus importante pour

les fragments provenant des espèces oxydées, notre intérêt s'est uniquement porté sur la collecte des ions négatifs. Ainsi, la distribution des ions Ag^- , Si^- , O^- , SiO^- , C^- , FeO^- et CrO^- est tracée en fonction de la durée de pulvérisation du dépôt par les ions Cs^+ et correspond aux profils en épaisseur des ions négatifs choisis. L'acquisition et le traitement des données sont exécutés sur le logiciel « Ion-Spec ».

4 – Evaluation du caractère hydrophile/hydrophobe de la surface des dépôts

Après synthèse des dépôts sur les coupons d'acier inoxydable, les éventuelles modifications du caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces ont été déterminées par la méthode de la goutte posée. Des mesures ont été effectuées sur les dépôts A à I. Le protocole mis en œuvre est identique à celui décrit au paragraphe II-C-3. Les résultats indiqués correspondent à la moyenne d'au moins 5 mesures d'angles de contact avec l'eau, à différents endroits de l'échantillon.

L'angle de contact statique mesuré par cette méthode n'a de validité que pour des surfaces non réactives, non rugueuses, homogènes et qui n'absorbent pas le liquide. Il correspond à l'angle d'avancée et peut être influencé par des hétérogénéités physiques (rugosité de surface) et chimiques (composition de l'extrême surface, contaminations organiques) de l'échantillon. Pour pallier à ce problème, des mesures d'angle de contact dynamique permettent de déterminer la valeur de l'angle de retrait et l'hystérésis entre l'angle d'avancée et l'angle de retrait. La valeur de l'hystérésis renseigne sur l'hétérogénéité physique et chimique de la surface et permet d'obtenir des informations plus précises sur les propriétés physico-chimiques des dépôts, comme exposé par Drelich *et al.* (1996) et Müller *et al.* (2001). Ces mesures dynamiques ont été réalisées sur le film A et correspondent au dépôt d'une goutte d'eau sur la surface, puis à l'augmentation et à la diminution de son volume par injection/aspiration d'eau supplémentaire, permettant de déterminer l'évolution de l'angle de contact en fonction de la largeur de la goutte sur la surface.

E – Evaluation de la cinétique de relargage d'argent par immersion des dépôts nanocomposites en milieu aqueux

Une analyse chimique multi-élémentaire par ICP-MS (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif) a été réalisée, afin de déterminer la cinétique de relargage des ions et/ou atomes d'argent dans de l'eau osmosée ($t = 0, 1, 7, 14$ et 28 jours). Pour cela, un coupon d'acier inoxydable ($10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 0,9 \text{ mm}$) recouvert du dépôt nanocomposite C a été immergé dans 50 mL d'eau osmosée. L'expérience a été réalisée en triplica. Les analyses par ICP-MS ont ensuite été effectuées au Laboratoire des Mécanismes et Transfert en Géologie (LMTG) de Toulouse sur un ICP-MS quadripolaire 7500ce (Agilent Technologies). Lors de cette analyse, l'échantillon liquide est nébulisé puis injecté dans un plasma d'argon à couplage inductif (source d'ionisation). Les ions Ar^+ du plasma provoquent l'ionisation de l'ensemble des éléments présents dans l'échantillon, qui sont

ensuite détectés et identifiés par spectrométrie de masse quadripolaire, en fonction de leur rapport m/z. Les limites de détection des éléments traces sont de l'ordre du ppb ou de la dizaine de ppb, selon l'élément. L'utilisation d'un étalon interne (addition d'un élément non interférent avec les éléments à mesurer) a permis d'augmenter la précision et la justesse des résultats.

V – Détermination par méthode hydrodynamique des propriétés anti-adhésives des films nanocomposites vis-à-vis de *S. cerevisiae*

L'adhésion et le détachement des levures aux différents coupons d'acier inoxydable, nettoyés par voie chimique ou modifiés par plasma, ont été étudiés *in vitro* par méthode hydrodynamique, grâce à une chambre à écoulement cisailé. Celle-ci permet d'observer *in situ* le détachement des microorganismes, préalablement adhérents à la surface testée, dans des conditions hydrodynamiques et physico-chimiques contrôlées. Dans ce type de dispositif, les cellules ne sont pas soumises à une interface liquide-air et, par conséquent, à des forces de capillarité dont l'effet sur l'adhésion pourrait s'avérer préjudiciable. La géométrie de la chambre à écoulement utilisée dans notre étude est telle que l'écoulement est longitudinal. Par conséquent, les forces hydrodynamiques exercées sur les levures sont des forces de cisaillement (Guillemot *et al.*, 2006). Le principe de cette méthode consiste à appliquer, dans des conditions environnementales données (*i.e.*, solution saline NaCl 0,15 M, température ambiante) et en régime laminaire, des paliers successifs de débit d'une durée fixée à 3 min, afin de détacher les levures préalablement adhérentes au support solide (Guillemot *et al.*, 2006). Le contrôle strict des conditions hydrodynamiques à l'intérieur de la chambre permet d'obtenir un écoulement uniforme et de déterminer la contrainte de cisaillement pariétale. Le traitement ultérieur des images (*i.e.*, photographies de la zone observée, réalisées à l'issue de chaque palier) permet d'établir le profil de détachement de *S. cerevisiae* sur le coupon testé.

A – Description du dispositif expérimental

La chambre à écoulement cisailé est composée de plusieurs éléments superposés (Figure 21 a) :

- une plaque inférieure en acier, qui constitue le support du dispositif et qui est fixée à la platine du microscope ;
- une plaque en acier inoxydable, dans laquelle sont percés les orifices et canaux horizontaux d'entrée et de sortie du fluide (NaCl 0,15 M). Cette plaque constitue le canal d'écoulement et un logement dédié permet d'insérer le coupon d'acier inoxydable vierge ou modifié (dimensions du réceptacle = 25,2 mm x 6,3 mm x 0,9 mm).

Le canal d'écoulement a une largeur de 12 mm et une hauteur de 200 μm . La partie parallélépipédique du canal est précédée d'un divergent afin d'assurer l'uniformité du profil de vitesse en entrée de cette zone. Elle est suivie d'un convergent permettant d'éviter la formation de tourbillons en sortie ;

- une lame de verre (60 mm x 24 mm x 1 mm) permettant l'observation par microscopie optique ;
- un joint en silicone cellulaire (épaisseur = 2 mm) et deux joints supplémentaires placés sur le pourtour du canal d'écoulement (joint en silicone de 0,5 mm d'épaisseur et joint en EPDM[§] cellulaire 75-2, d'épaisseur 2 mm) assurant l'étanchéité de la chambre ;
- une plaque supérieure en acier inoxydable.

Ces différents éléments sont percés de 10 pas de vis, répartis en périphérie, permettant le serrage et le maintien de l'ensemble du dispositif (Figure 21 a). L'ensemble du dispositif peut être stérilisé par autoclavage.

La chambre à écoulement a été caractérisée d'un point de vue hydrodynamique grâce au logiciel Comsol Multiphysics[®] (données non présentées). Cette étude a montré que l'écoulement est établi à partir d'une distance de 5 mm par rapport au début du coupon. Pour l'ensemble des expérimentations réalisées, la zone d'observation a donc été choisie à une distance de 20 mm par rapport au début du coupon, pour s'assurer une marge de sécurité (Figure 21 b).

La contrainte de cisaillement pariétale est uniforme dans la zone d'observation et calculée par la relation suivante (Guillemot *et al.*, 2006) :

Équation 2
$$\tau_p = \frac{3 \mu Q}{4 h^2 l}$$

- où
- τ_p : contrainte de cisaillement pariétale (Pa),
 - Q : débit du fluide (m^3/s),
 - μ : viscosité dynamique du fluide (Pa.s),
 - h : demi-hauteur du canal (m),
 - l : demi-largeur du canal (m).

Le nombre de Reynolds (Re) est déterminé selon l'Équation 3 :

Équation 3
$$\text{Re} = \frac{Q}{2lv},$$
 où v est la viscosité cinématique du fluide (m^2/s).

Les viscosités dynamique et cinématique du fluide utilisé (solution saline : NaCl 0,15 M) sont estimées égales à celle de l'eau, à savoir $\mu = 10^{-3}$ Pa.s et $\nu = 10^{-6}$ m^2/s (à 20°C). Les expérimentations ont été réalisées à température ambiante (soit environ 20°C). Pour la chambre utilisée dans nos expériences, h = 100 μm soit 10^{-4} m et l = 6 mm soit $6 \cdot 10^{-3}$ m.

[§] EPDM : "ethylene-propylene-diene-monomer".

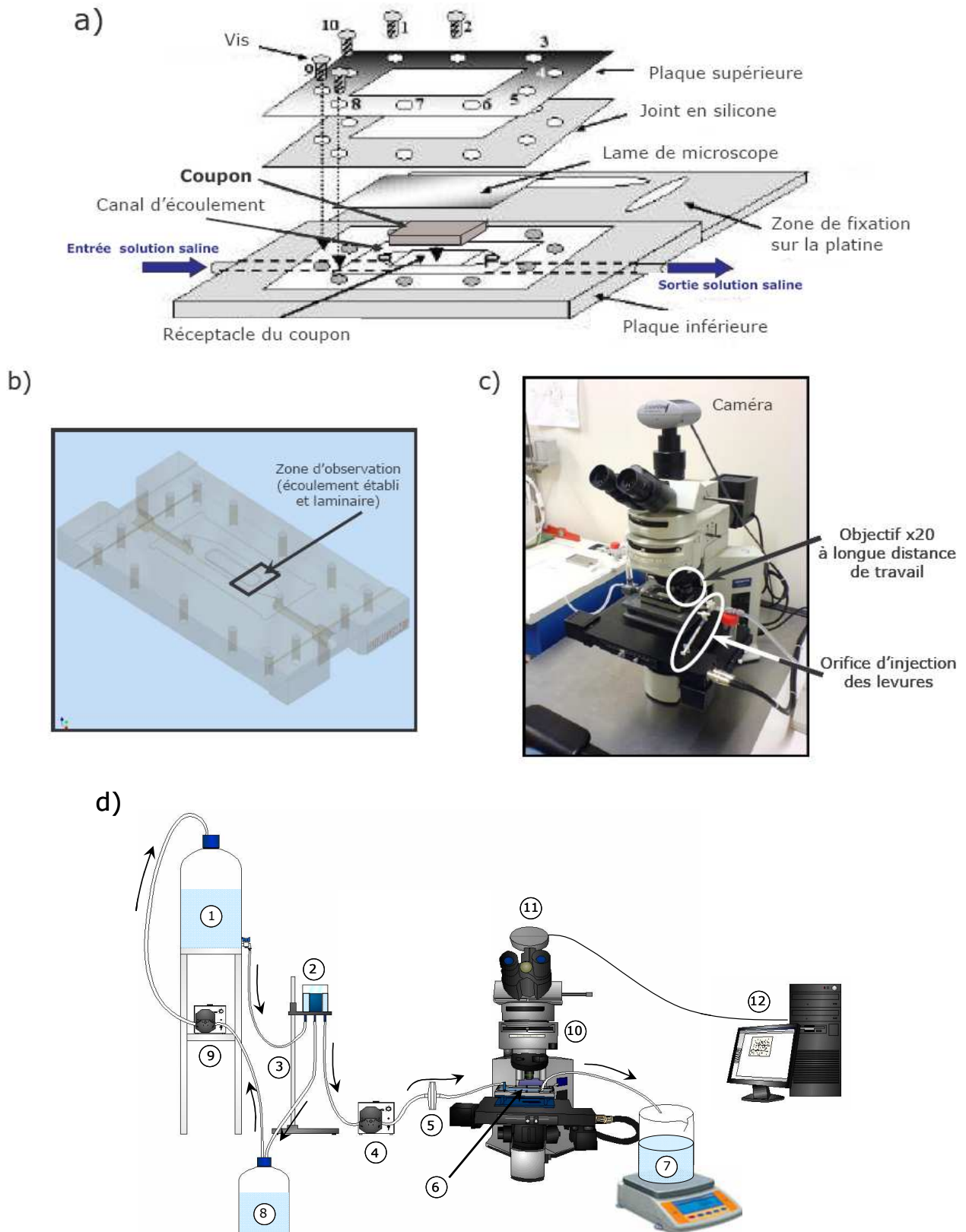


Figure 21. Schéma représentant a) une vue éclatée de la chambre à écoulement cisailé, b) le canal d'écoulement, c) photographie de la chambre fixée sur la platine du microscope et de l'orifice d'injection des microorganismes et d) l'ensemble du dispositif permettant de réaliser les expériences de détachement.

B – Déroulement d'une expérience de détachement

Les expériences sont réalisées à température ambiante grâce au dispositif présenté sur les Figures 21 c et d. La chambre à écoulement est tout d'abord assemblée, reliée aux tuyaux d'entrée et de sortie du fluide, puis fixée sur la platine du microscope optique (Olympus BX51, Olympus France S.A.S) (Figure 21 c). Le réservoir (1) est rempli de solution saline (NaCl 0,15 M). La vanne du réservoir est alors ouverte de manière à permettre la circulation du fluide jusqu'à un vase à niveau constant (2) placé sur une crémaillère (3). Un filtre (5) permet d'éliminer les éventuelles particules contaminant le fluide. L'ensemble des tuyaux ainsi que la chambre à écoulement (6) sont remplis par le fluide, en prenant garde d'évacuer toutes les bulles d'air présentes dans le système.

0,5 mL d'une suspension de levures, récupérées en phase stationnaire de croissance, lavées et resuspendues dans la solution saline ($DO_{620\text{ nm}} \sim 4$) selon le protocole décrit au paragraphe I-A de ce chapitre, sont lentement injectées dans la chambre, par l'intermédiaire de l'orifice d'injection (Figure 21 c). On laisse s'écouler, en condition statique, c'est-à-dire sans écoulement de fluide, une période de 20 min, nécessaire à la sédimentation des levures sous l'effet de la gravité, suivie d'un temps de contact d'1 h.

Les levures adhérees à la surface de l'échantillon sont observées en mode « réflexion », grâce au microscope optique (10) équipé d'un objectif x20 à longue distance de travail. A l'issue du temps de contact, une photographie est réalisée grâce à une caméra 3,3 MPixels CCD (11) (Color View I, Olympus Soft Imaging System GmbH), afin de déterminer le nombre initial N_0 de levures adhérees dans la zone d'observation. Le dénombrement est effectué selon les critères développés par Guillemot *et al.* (2006) : la cellule était présente dès le début de l'expérience, elle est isolée (*i.e.*, elle ne fait pas partie d'un agrégat) et non bourgeonnante, et la distance qui la sépare de sa plus proche voisine est supérieure à 3 rayons (de « paroi à paroi »).

La procédure incrémentale d'augmentation du débit est ensuite amorcée : le débit Q (donc la contrainte τ_p) est augmenté par paliers d'une durée de 3 minutes (Figure 22 a). En effet, il a été démontré par Guillemot *et al.* (2006) qu'au delà de 3 min, le nombre de levures adhérees reste constant. Les faibles débits (entre 0 et 14,5 mL/min) sont obtenus par gravité et augmentés en faisant monter le vase à niveau constant grâce à la crémaillère. Les débits supérieurs sont générés par une pompe à engrenages (4) (Ismatec, IDEX Corporation). La mesure du débit Q s'effectue par pesée, en recueillant le fluide en sortie de circuit (7). Un second réservoir (8) et une pompe péristaltique (9) (Masterflex, Bioblock Scientific) permettent la récupération du fluide issu du débordement dans le vase à niveau constant. A la fin de chaque palier, une photographie est réalisée afin de dénombrer les levures restant adhérees à la surface (N) (Figure 22 b). Le dernier palier atteint correspond à un débit égal à 6,7 mL/s (400 mL/min), soit une contrainte de

cisaillement pariétale de 80 Pa. Dans ces conditions, $Re = 560$, ce qui démontre que l'écoulement reste laminaire tout au long de l'expérience.

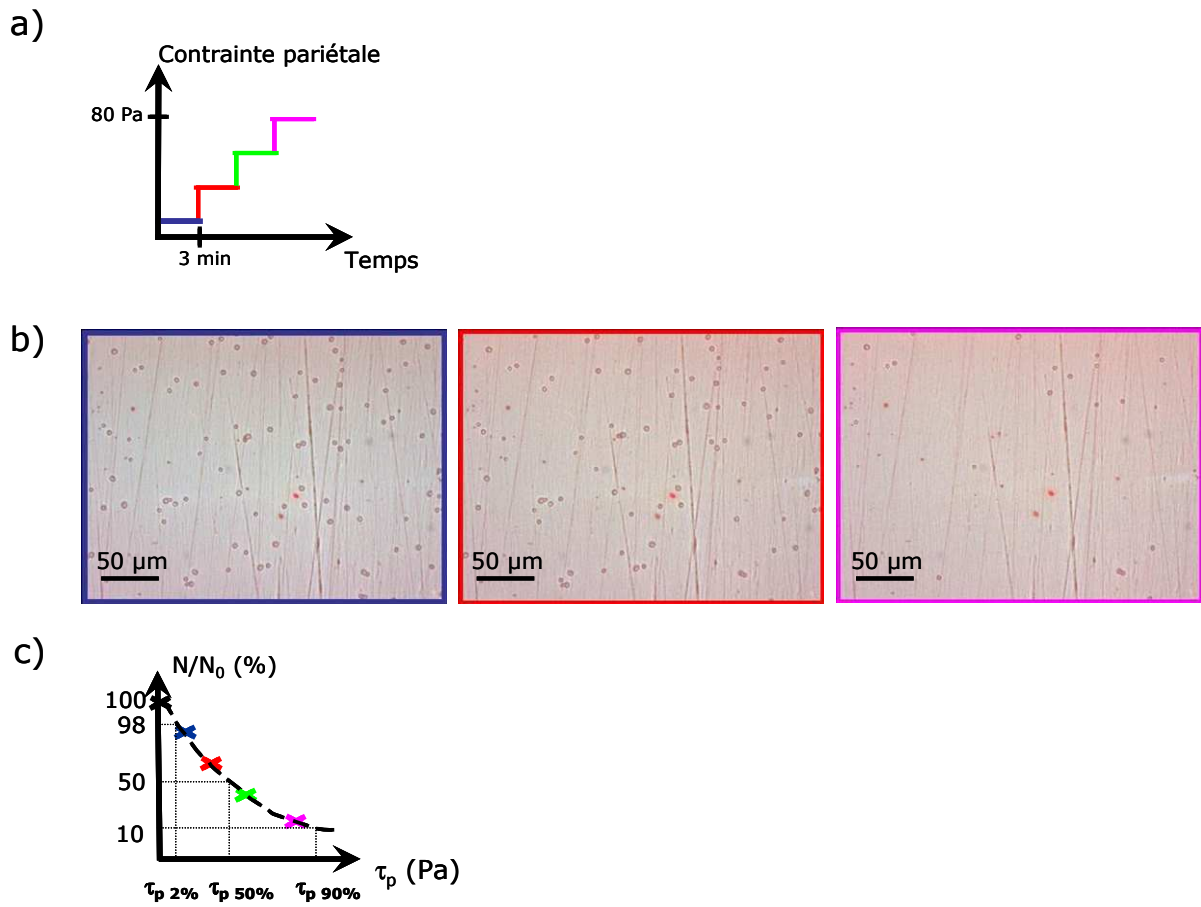


Figure 22. Schéma de présentation d'une expérience de détachement de *S. cerevisiae* : a) durée des paliers appliqués, b) exemple de photographies à l'issue de trois paliers pour lesquels un détachement significatif des levures a été observé sur le dépôt D, c) profil de détachement et mode de détermination des valeurs de $\tau_{p\ 2\%}$, $\tau_{p\ 50\%}$ et $\tau_{p\ 90\%}$.

Le traitement des images est exécuté à l'issue de l'expérience, grâce au logiciel AnalySIS[®] AUTO (12) (Olympus Soft Imaging System GmbH). Le comptage des cellules selon les critères énoncés ci-dessus permet de tracer le profil de détachement, représentant le nombre de levures restant adhérentes à la surface à la fin de chaque palier (N), normalisé par le nombre de cellules initialement adhérentes dans la zone d'observation (N_0), en fonction de la contrainte de cisaillement τ_p appliquée à la paroi (Figure 22 c). Il est alors possible de déterminer les contraintes de cisaillement nécessaires pour détacher 2%, 50% et 90% des levures initialement adhérentes, notées respectivement $\tau_{p\ 2\%}$, $\tau_{p\ 50\%}$ et $\tau_{p\ 90\%}$ (Figure 22 c).

Les échantillons testés sont :

- les surfaces d'acier inoxydable vierge, traitées par les différents protocoles (acétone/éthanol, H₂O₂/H₂SO₄, bombardement par plasma d'ions argon) ;
- les surfaces d'acier inoxydable recouvertes du dépôt de matrice organosiliciée (dépôt A ; cf. Tableau 7) ;
- les surfaces d'acier recouvertes des dépôts nanocomposites, présentant différents contenus en argent (dépôt B à H ; cf. Tableau 7) ;
- les surfaces d'acier recouvertes du dépôt de matrice synthétisée avec ajout d'oxygène dans le plasma (dépôt I ; cf. Tableau 7).

Les expérimentations sont généralement réalisées en triplica (sauf mention particulière), sur des suspensions cellulaires issues de culture indépendantes.

VI – Détermination des propriétés antimicrobiennes des films nanocomposites sur les microorganismes d'étude

A – Evaluation des propriétés biocides des dépôts sur *S. cerevisiae*

1 – Tests en conditions statiques

L'objectif de ce test est de déterminer les propriétés biocides des dépôts nanocomposites sur les levures, comparativement aux surfaces témoins (acier inoxydable et matrice organosiliciée).

L'expérience (Figure 23) débute par une pré-culture et une culture, comme exposé au paragraphe I-A. Les levures sont prélevées en phase stationnaire de croissance et 50 mL de suspension sont centrifugés (3 min, 10000 rpm, 10°C, centrifugeuse Eppendorf 5804 R). Les culots sont ensuite lavés deux fois dans une solution saline stérile (NaCl 0,15 M) par centrifugations et re-suspensions successives. A l'issue des lavages, la suspension microbienne est diluée pour obtenir $DO_{620\text{ nm}} = 4$ (soit environ $2,5 \cdot 10^7$ UFC/mL).

Plusieurs coupons (dimensions 25,2 mm x 6,3 mm x 0,9 mm) sont testés :

- 3 coupons d'acier inoxydable vierge ;
- 3 coupons recouverts du dépôt de matrice organosiliciée (dépôt A ; cf. Tableau 7) ;
- 5 coupons recouverts du dépôt nanocomposite (tests avec dépôts B ou D ; cf. Tableau 7).

Les différents échantillons, préalablement nettoyés selon le protocole acétone/éthanol, sont placés dans des pots stériles entourés d'aluminium pour garantir l'obscurité. Puis, 15 mL de suspension cellulaire diluée dans la solution saline (NaCl 0,15 M) sont ajoutés dans chaque pot. Deux échantillons « contrôles », contenant uniquement la suspension cellulaire, sont également réalisés.

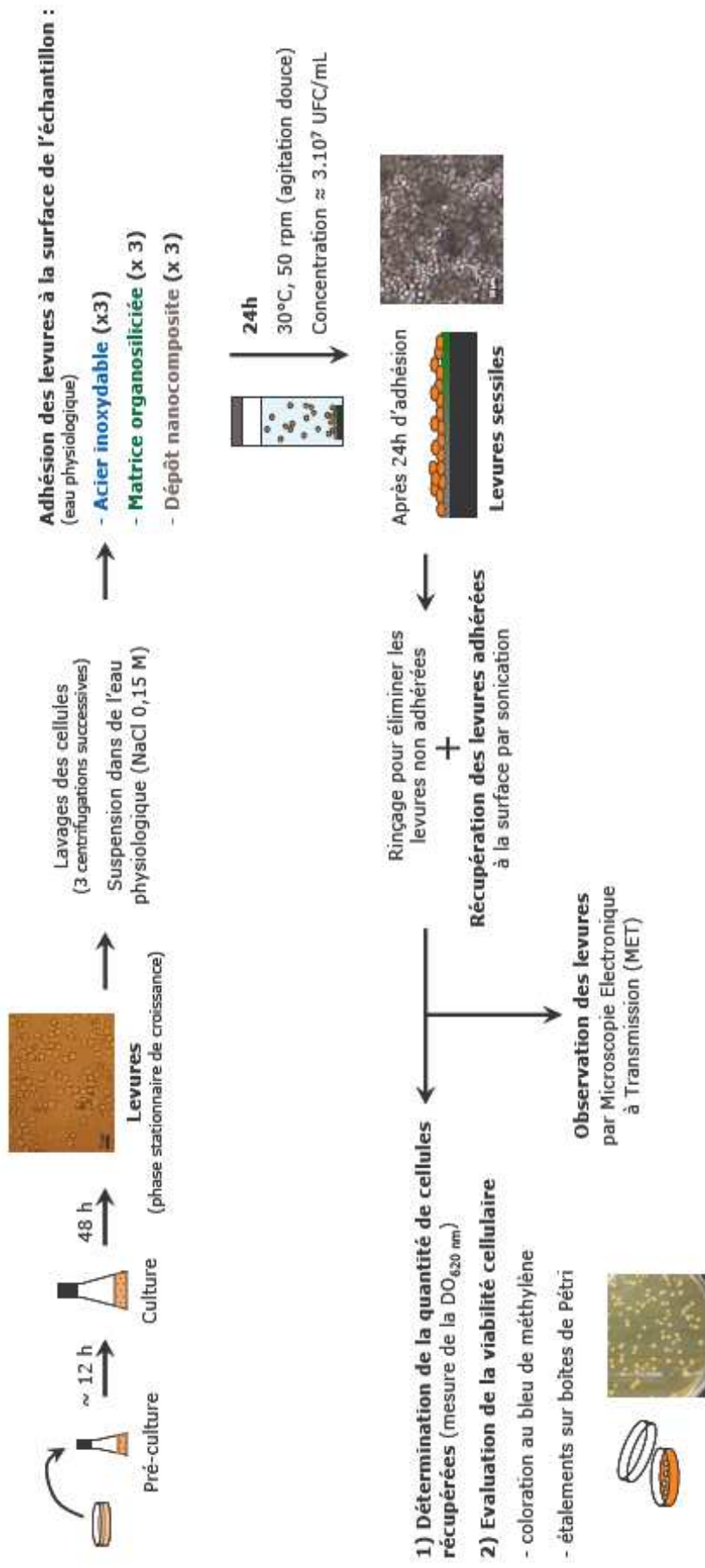


Figure 23. Protocole du test d'évaluation des propriétés biocides des dépôts nanocomposites sur *S. cerevisiae*.

Les conditions de contact des levures sur les différentes surfaces solides sont les suivantes :

- durée : 24 h (des expériences préliminaires ont montré que la viabilité des levures n'était pas affectée par leur conservation pendant 24 h dans le milieu salin) ;
- température : 30°C ;
- agitation : 50 rpm.

Après 24 h, les coupons sont récupérés, rincés dans 5 bains successifs de solution saline (cycles d'aspirations et d'ajouts de 10 mL de NaCl 0,15 M) pour éliminer les levures non adhérentes, puis placés dans des tubes à hémolyse stériles contenant 2,5 mL de solution saline.

Les levures en contact avec les différentes surfaces sont alors décrochées par sonication (bain de sonication Bioblock Scientific 91631), pendant 3 min (35 kHz, 35% de 50 W). Des tests préliminaires sur levures planctoniques, à des concentrations équivalentes à celles récupérées sur les coupons, ont démontré que les conditions expérimentales utilisées pour la sonication n'induisaient pas de perte de viabilité cellulaire.

Afin de déterminer la quantité de microorganismes récupérés, la densité optique à 620 nm est mesurée pour chaque suspension. Une corrélation entre la densité optique ($DO_{620\text{ nm}}$) et le dénombrement sur lame de Thoma (cellule à numération Preciss), permet d'exprimer cette quantité récupérée en nombre de levures/mL :

$$\text{Nombre de levures / mL} = 9,31 \cdot 10^6 \times DO_{620\text{ nm}} \quad (R^2 = 0,982)$$

La viabilité des levures est ensuite déterminée par plusieurs méthodes :

- Coloration au bleu de méthylène** ;
- Etalements sur milieu gélosé :
 - o Dilutions successives au dixième (10^{-1} à 10^{-5}) dans de la solution saline : deux séries de dilutions indépendantes sont réalisées pour chaque suspension, afin de vérifier la reproductibilité de la méthode ;
 - o Etalements de 50 μL des dilutions 10^{-3} à 10^{-5} sur milieu gélosé (YPD + 1,5% m/v d'agar), en boîtes de Pétri ;
 - o Incubation à 30°C, pendant 48 h ;
 - o Dénombrement des UFC puis calcul de la concentration cellulaire (en UFC/mL).

Les résultats de viabilité sont exprimés en nombre d'UFC/nombre de levures récupérées en surface des coupons. Pour chaque condition, les données présentées correspondent à la moyenne \pm écart-type des duplicas de trois (ou cinq) expériences indépendantes. On peut ainsi calculer la valeur de

** La coloration au bleu de méthylène est en réalité un indicateur de l'activité enzymatique de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (réduction du colorant par l'enzyme), qui est considéré comme représentatif de la viabilité cellulaire.

l'abattement, par rapport aux coupons témoins (acier inoxydable et dépôt A de matrice), avec n le nombre d'UFC/nombre de levures :

$$\text{Abattement} = \log \frac{n_{\text{témoins (acier ou matrice)}}}{n_{\text{dépôts nanocomposites}}}$$

L'influence des dépôts nanocomposites sur la viabilité des levures peut également être exprimée en pourcentage d'inhibition :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{(n_{\text{témoins}} - n_{\text{dépôts nanocomposites}})}{n_{\text{témoins}}} \times 100.$$

Une partie de la suspension cellulaire de chaque échantillon (issue de la sonication) est conservée pour réaliser différentes analyses *a posteriori* (congélation à -80°C pour analyses FTIR par rayonnement Synchrotron, stockage à 4°C pour observation de l'ultra-structure des levures par MET-EDS).

2 – Analyse des levures par microspectroscopie infrarouge, sous une source de rayonnement Synchrotron

Afin d'évaluer l'impact de l'argent relargué par les dépôts nanocomposites et ses effets directs sur *S. cerevisiae*, la composition chimique des levures a été caractérisée à l'échelle d'une cellule unique, par microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, avec une source de rayonnement Synchrotron (SOLEIL, Gif-sur-Yvette). La formation du rayonnement Synchrotron dans l'accélérateur SOLEIL est décrite en Annexe 3.

Les levures ont été analysées sur la ligne SMIS (« Spectroscopy and Microscopy in the Infrared region using Synchrotron »), en mode trans-réflexion. Cette ligne de lumière est actuellement le seul équipement fiable permettant de cartographier localement et *in situ* la composition de *S. cerevisiae* à l'échelle d'une levure unique (diamètre moyen d'une cellule ~ 5 µm). En effet, le rayonnement Synchrotron présente une brillance (intensité, focalisation) et une stabilité bien supérieures à celles des sources communément utilisées pour la spectroscopie IR.

Pour éviter la distorsion de la ligne de base des spectres IR due aux effets de bord (effet de Mie ; Szeghalmi *et al.*, 2007 ; Kohler *et al.*, 2008), les analyses ont été effectuées sur des levures au sein d'agrégats de 5 à 10 cellules, avec une haute résolution spatiale.

Le principe de la spectroscopie FTIR a été exposé au paragraphe IV-D-2. Cette analyse est applicable aux échantillons biologiques et le spectre IR permet de caractériser les groupements chimiques constituant les microorganismes (protéines, sucres, acides nucléiques, etc.). En comparant les spectres obtenus sur les levures après mise en contact pendant 24 h avec les

dépôts nanocomposites D et ceux correspondant aux levures témoins, il est possible de mettre en évidence les déplacements chimiques des pics IR, donc de déterminer de manière fine la nature des effets exercés par l'argent issu des dépôts nanocomposites sur *S. cerevisiae* (cibles préférentielles, mécanismes d'action).

Les échantillons suivants ont été analysés :

- (i) échantillon « contrôle » (levures viables) : levures après 24 h en suspension dans la solution saline (NaCl 0,15 M).
Les échantillons ayant été stockés et acheminés à -80°C , l'influence de la congélation sur la composition chimique des levures a été prise en compte, en analysant des cellules « fraîches » (*i.e.*, cultivées en milieu YPD gélosé puis resuspendues dans de l'eau osmosée) avant et après congélation ;
- (ii) échantillon « contrôle » (levures mortes) : levures après une exposition de 2 h à une concentration létale de nitrate d'argent (AgNO_3 2 mM, préparé dans de l'eau osmosée ; Guillemot *et al.*, 2008), afin d'observer les modifications des spectres IR imputables aux ions Ag^+ ;
- (iii) levures récupérées (par sonication) après 24 h de contact avec les dépôts nanocomposites D, dans la solution saline (NaCl 0,15 M), selon le protocole décrit au paragraphe VI-A-1. Des échantillons « témoins », correspondant aux levures après un contact de 24 h avec des dépôts A de matrice organosiliciée, ont également été analysés.

Pour réaliser les analyses (Figure 24), les différents échantillons stockés à -80°C sont décongelés à température ambiante. Une goutte (20 μL) de suspension cellulaire est déposée sur la face réfléchissante d'une lame de microscope (Tienta Sciences) permettant la trans-réflexion du faisceau infrarouge, puis séchée pendant 30 min à température ambiante. L'échantillon est monté sous lamelle et placé sous le microscope (Continuum XL, Thermo Fischer Scientific) fonctionnant en mode confocal et couplé à un spectromètre FTIR (Nicolet 5700, Thermo Fischer Scientific). Le rayonnement est focalisé sur une levure au sein d'un agrégat, absorbé par les différents constituants cellulaires, puis réfléchi sur la face de la lame de microscope (trans-réflexion) et enfin détecté (détecteur MCT-A refroidi par azote liquide). Pour chaque échantillon, 10 levures différentes sont analysées.

Chaque spectre IR (moyen IR : 4000 à 800 cm^{-1}), correspondant à la moyenne de 128 scans, est enregistré sous un format log (1/R) (où R représente le rapport entre la lumière réfléchie par l'échantillon et la lumière réfléchie par la lame de microscope), à une résolution spectrale de 4 cm^{-1} . La dérivée seconde de chaque spectre est ensuite calculée, normalisée puis tracée. Une analyse statistique (analyse par composante principale – ACP) est réalisée sur ces dérivées secondes à l'aide du logiciel Matlab (10 spectres par condition).

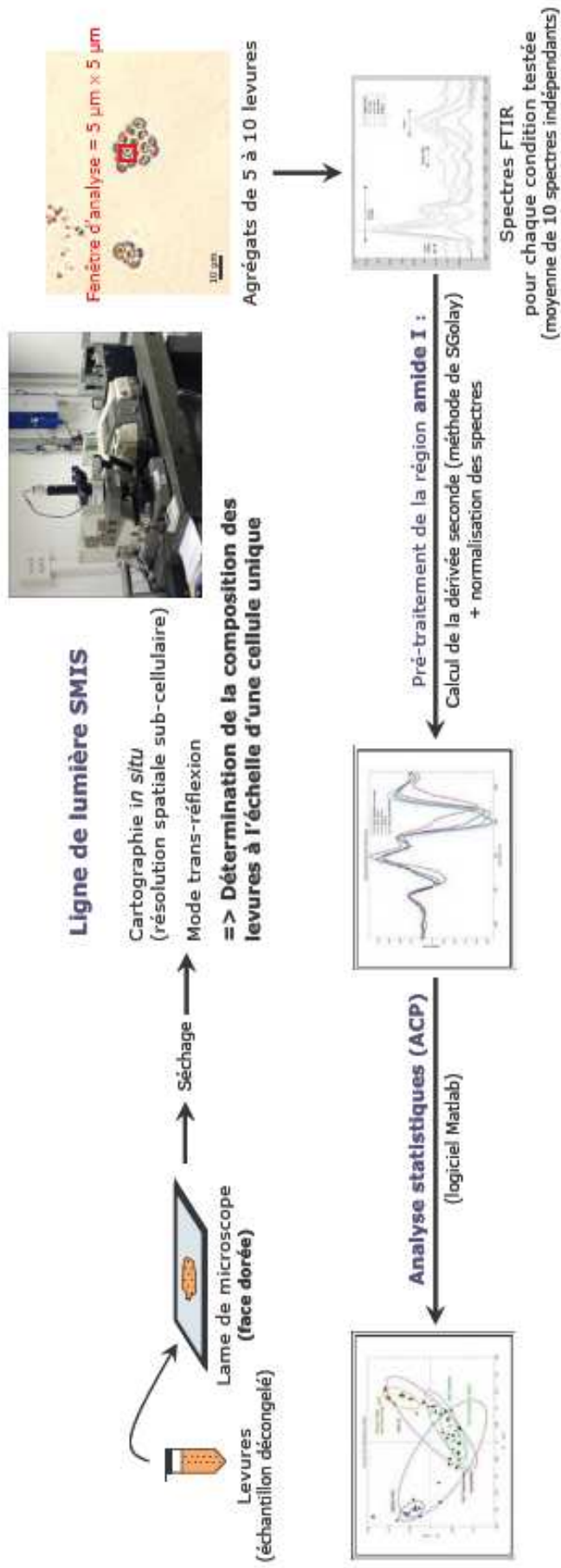


Figure 24. Protocole d'analyse de *S. cerevisiae* en microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, sur la ligne SMIS du Synchrotron SOLEIL.

3 – Observation de l’ultra-structure des levures par Microscopie Electronique en Transmission et analyse élémentaire par Spectroscopie Dispersive en Energie

3.1 – Microscopie Electronique en Transmission

Les levures ont été observées par Microscopie Electronique en Transmission (MET) au Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB) de Toulouse. Cette technique expérimentale a été choisie afin de repérer les modifications structurales (paroi, membrane, organites intracellulaires : mitochondries, vacuoles, noyau) induites par l’exposition à l’argent relargué par les dépôts nanocomposites, ainsi que la localisation éventuelle d’argent métallique dans les cellules. Par conséquent, couplée à l’investigation par microspectroscopie FTIR, elle permet une compréhension fine de l’activité biocide des dépôts nanocomposites.

L’objectif est de visualiser les levures suite au contact avec les dépôts nanocomposites D et de comparer les photographies obtenues avec celles des différents échantillons « témoins » :

- Levures après 24 h en suspension dans la solution saline (NaCl 0,15 M) à 30°C ;
- Levures après 2 h d’exposition à une concentration létale d’AgNO₃ (2 mM dans de l’eau osmosée) ;
- Levures après 24 h de contact avec des coupons d’acier inoxydable vierge ;
- Levures après 24 h de contact avec les dépôts A de matrice organosiliciée.

D’autres échantillons cellulaires ont été observés (levures de la suspension cellulaire initiale, levures planctoniques après 24 h à 30°C avant/après sonication), afin de s’assurer que les différentes étapes de notre protocole opératoire n’induisaient pas de modifications de l’ultra-structure des levures.

Dans chaque cas, 1 mL de suspension cellulaire, obtenu selon le protocole décrit au paragraphe VI-A-1, est centrifugé dans un eppendorf (3 min, 10000 rpm, 10°C). La solution saline est alors éliminée et remplacée par 200 µL de solution de fixateur (glutaraldéhyde 2% dans du tampon Sørensen^{††} 0,1 M, pH = 7,4). Les eppendorfs sont conservés à 4°C (maximum 4 h), puis traités selon le protocole suivant (fournisseur des produits : EMS-CHEMIE, France) :

- Centrifugation (3 min, 5000 rpm, 4°C) puis deux lavages dans du tampon Sørensen (0,2 M) et stockage pendant 12 h à 4°C ;
- Post-fixation : dans une solution de glucose (0,25 M), tampon Sørensen (0,05 M) et tétroxyde d’osmium (1% v/v), pendant 1 h à température ambiante ;

^{††} Composition du tampon Sørensen : solution A = Na₂HPO₄ (0,95% m/v dans de l’eau distillée) ; solution B = KH₂PO₄ (0,90% m/v dans de l’eau distillée) ; tampon = 4 vol. solution A / 1 vol. solution B.

- Déshydratation : 5 bains successifs (10 min chacun) dans des solutions d'éthanol de concentration croissante (éthanol 30°, 50°, 70°, 95°) puis 3 bains successifs (15 min) dans de l'éthanol à 100°. Après chaque bain, une centrifugation (3 min, 1000 rpm, 4°C) permet de récupérer le culot cellulaire, qui est remis en suspension dans la solution suivante ;
- Substitution et imprégnation : suspension du culot cellulaire dans une solution de résine LR White de concentration croissante :
 - o 5 h à 4°C dans 1 vol. LR W /2 vol. éthanol 100°, puis centrifugation (3 min, 2000 rpm, 4°C) et remise en suspension ;
 - o 12 h à 4°C dans 2 vol. LR W /1 vol. éthanol 100°, puis centrifugation et remise en suspension ;
 - o 40 h à 4°C dans LR W pur (3 bains).
- Inclusion des levures : polymérisation complète de la résine pendant 48 h à -20°C, sous une lampe ultra-violette ;
- Coupes : réalisation de coupes de 90 nm d'épaisseur sur ultra-microtome (Ultracut Reichert) et dépôt sur grilles de cuivre (« 150 mesh » collodionnées) ;
- Contraste par trempage des coupes dans une solution d'acétate d'uranyle (2% v/v dans de l'eau osmosée) pendant 2 min, puis dans une solution de citrate de plomb pendant 10 min ;
- Observation par MET : appareil Hitachi HU12A (tension d'accélération = 75 kV).

3.2 – Microscopie Electronique en Transmission (MET) couplée à une analyse par Spectroscopie Dispersive en Energie (EDS)

Afin d'identifier les éléments présents au sein des levures (et notamment l'argent) après 24 h de contact avec les dépôts nanocomposites D, une micro-analyse en EDS a été réalisée simultanément à l'observation par MET. La technique MET-EDS a été exposée au paragraphe IV-C. Des échantillons témoins (levures après 24 h en suspension dans la solution saline et levures après 2 h d'exposition à 2 mM d'AgNO₃) ont également été analysés. Les coupes réalisées au CMEAB ont été observées au service commun TEMSCAN de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, sur un Microscope JEOL JEM 2100 F couplé à un spectroscope Brucker (détecteur SDD 30 mm², résolution = 133 eV). Parmi les éléments détectés, une attention particulière a été portée aux éléments C, O, N, S, P, caractéristiques des microorganismes, ainsi qu'à l'argent, afin d'évaluer sa présence dans les levures.

B – Evaluation de l'activité antibactérienne des dépôts nanocomposites sur *S. aureus* et *E. coli*

Le protocole mis au point sur *S. cerevisiae* (partie VI-A-1) a été adapté aux bactéries choisies pour l'étude. Les revêtements nanocomposites testés sont les dépôts D. Les surfaces « témoins » sont les coupons d'acier inoxydable vierge. Seules les modifications apportées par rapport au protocole défini pour les levures sont exposées ci-dessous.

S. aureus et *E. coli* sont cultivées en milieu TSB et LB, selon les protocoles définis aux paragraphes I-B et I-C, respectivement. Elles sont ensuite prélevées en phase stationnaire de croissance, lavées deux fois dans la solution saline stérile (NaCl 0,15 M), puis diluées à une $DO_{580\text{ nm}}$ égale à 2. Les suspensions microbiennes sont alors réparties dans différents pots stériles (15 mL/pot) entourés d'aluminium, contenant chacun le coupon à tester, préalablement nettoyé par acétone/éthanol (3 coupons d'acier inoxydable vierge et 5 coupons recouverts du dépôt nanocomposite D). Deux échantillons « contrôles », correspondant à la suspension bactérienne uniquement, sont également réalisés.

Pour les bactéries, le temps de contact avec les surfaces solides a été réduit à 4 h (37°C, agitation douce à 50 rpm). En effet, des expériences préliminaires ont démontré que cette durée permet de récupérer une quantité suffisante de bactéries, sans affecter leur viabilité dans la solution saline (NaCl 0,15 M). Après 4 h, chaque coupon est récupéré et rincé selon le protocole défini pour les levures, puis placé dans un tube à hémolyse contenant 2,5 mL de solution saline (NaCl 0,15 M). Les bactéries au contact des différentes surfaces sont décrochées :

- par sonication (bain Elma[®]sonic One) pour *S. aureus* (3 min, 35 kHz, 35% de 50 W) ;
- par simple « vortexage » pendant 1 min pour *E. coli*.

Le nombre total de bactéries récupérées est déterminée par dénombrement sur lame de Thoma (cellule à numération Preciss). La viabilité cellulaire est obtenue par étalements de dilutions successives sur milieu gélosé. Pour les deux souches bactériennes, les étalements sont réalisés par « micro-méthode », qui permet d'obtenir quatre répétitions pour chaque condition de dilution des différents échantillons (gain de temps, reproductibilité des résultats). Cette dernière consiste à utiliser une plaque de 96 puits pour réaliser les dilutions et une plaque de 24 puits pour effectuer les étalements (milieu TSA pour *S. aureus* et LBA pour *E. coli*). Quatre séries de dilutions successives au dixième (de 10^{-1} à 10^{-6}) sont réalisées dans du milieu liquide « Tryptone Soya » (TS). 50 μ L de chaque dilution sont ensuite étalés en inclusion, puis incubés à 37°C pendant 24 h. Enfin, les UFC sont dénombrées et la concentration cellulaire (en UFC/mL) est calculée.

Comme pour les levures, le calcul du nombre d'UFC/nombre de bactéries permet d'évaluer la viabilité cellulaire après mise en contact avec les différentes surfaces. Les résultats obtenus pour

les bactéries après contact avec les dépôts nanocomposites D sont comparés à ceux déterminés pour les surfaces d'acier inoxydable (témoins).

VII – Evolution des propriétés anti-adhésives et biocides des films nanocomposites suite à une procédure de vieillissement : corrélation avec leurs caractéristiques physico-chimiques

Afin d'évaluer l'influence d'une utilisation répétée des dépôts nanocomposites D sur le maintien de leur efficacité anti-adhésive vis-à-vis de *S. cerevisiae*, trois dépôts issus de la même campagne expérimentale ont subi successivement deux expériences de détachement, selon la procédure décrite au paragraphe V-B. A la fin de chaque expérience, un train de bulles d'air est envoyé dans la chambre à écoulement, de manière à éliminer les levures restant adhérees. Puis, les coupons sont nettoyés selon le protocole acétone/éthanol (voir paragraphe II-B-1), avant d'être réutilisés une seconde fois.

En parallèle, pour déterminer l'impact d'une utilisation répétée sur les propriétés antimicrobiennes, cinq coupons recouverts du dépôt nanocomposite D ont été testés deux fois successivement, selon le protocole décrit au paragraphe VI-A-1. Entre les deux utilisations, les dépôts sont soigneusement nettoyés par acétone/éthanol (cf. paragraphe II-B-1).

Pour relier l'évolution de l'efficacité anti-adhésive des dépôts nanocomposites D et leur propriétés (composition, structure chimique), une caractérisation de la surface d'un des trois dépôts a été réalisée après la première utilisation par observation en MEB-EDS, analyse par spectroscopie XPS (niveaux de cœur Ag 3d, Si 2p, C 1s, O 1s, N 1s, S 2p, Cl 2p et paramètre Auger modifié α') et par mesures de l'angle de contact avec l'eau (cf. protocoles de ces techniques dans la partie IV de ce chapitre). A titre de comparaison, des analyses par spectroscopie XPS ont également été effectuées sur un dépôt A de matrice organosiliciée après son unique utilisation en chambre à écoulement cisailé. De manière identique, l'évolution des propriétés antimicrobiennes des dépôts nanocomposites D a été interprétée grâce à l'analyse par spectroscopie XPS de la surface d'un des cinq coupons testés, à l'issue de sa première utilisation.

Des tests complémentaires ont également été réalisés sur les dépôts B et D, avec une procédure de vieillissement différente, basée sur un stockage de durée variable (selon l'effet à mettre en évidence et les mesures effectuées pour obtenir l'information souhaitée) en solution saline (NaCl 0,15 M). Tout d'abord, le dépôt nanocomposite D a été immergé pendant 6 h en milieu salin (20°C, 50 rpm) et sa surface régulièrement analysée par spectroscopie XPS et détermination du paramètre Auger modifié, pour évaluer la quantité d'argent présente en surface et son degré d'oxydation. Deux autres dépôts nanocomposites D (l'un synthétisé sur un coupon de silicium

intrinsèque et l'autre sur un coupon d'acier inoxydable) ont été stockés pendant 15 jours dans la solution saline (20°C, 50 rpm). La morphologie interne du dépôt, synthétisé sur silicium, a ensuite été observée par MET et analysée par EDS. Le dépôt synthétisé sur acier inoxydable a, quant à lui, été étudié par spectroscopie Raman, afin de déterminer l'influence du stockage en milieu salin sur la structure chimique de la matrice. Enfin, un coupon recouvert du dépôt nanocomposite B a été conservé pendant 60 jours dans la solution saline (20°C, 50 rpm), puis analysé par ToF-SIMS (cf. protocole au paragraphe IV-D-3 de ce chapitre), afin de déterminer l'évolution du profil en épaisseur de l'argent et des différents éléments constituant la matrice, et de les comparer à ceux de la surface native.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I – CARACTERISATION DE L'ADHESION DES LEVURES SUR L'ACIER INOXYDABLE MODIFIE : COMPARAISON DES DIFFERENTS TRAITEMENTS DE SURFACE**

Une adhésion forte et spécifique de *S. cerevisiae* aux surfaces d'acier inoxydable 316L, nettoyées par acétone/éthanol, a été mise en évidence lors de travaux antérieurs, menés par Guillemot *et al.* (2006) au LISBP. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de mettre au point une méthode efficace pour prévenir, ou tout du moins limiter, l'adhésion des levures à la surface de l'alliage. Au vu de la littérature (Everaert *et al.*, 1998 ; Chu *et al.*, 2002), l'une des stratégies couramment mise en œuvre consiste à modifier la surface du support et, plus précisément, ses caractéristiques physico-chimiques. Plusieurs travaux (Boulangé-Petermann *et al.*, 1993 ; Compère *et al.*, 2001) ont mis en évidence l'influence du nettoyage de l'acier inoxydable austénitique sur les composantes polaires et apolaires de sa surface. Dans ce cadre, trois traitements de surface ont été évalués sur des coupons d'acier inoxydable austénitique AISI 316L poli « optique » ($R_a = 1,3 \pm 0,1$ nm) et sont résumés dans le Tableau 8 :

- deux procédures de nettoyages chimiques, l'une par trempage dans un mélange acétone/éthanol (50/50, v/v), inspirée du protocole développé par Boulangé-Petermann *et al.* (1993) et qui constitue le traitement de référence, et l'autre par immersion dans un bain de décapage H_2O_2/H_2SO_4 , utilisée dans l'industrie métallurgique pour passiver les surfaces d'acier inoxydable, c'est-à-dire modifier la couche d'oxydes/hydroxydes ;
- un bombardement de la surface par des ions argon issus d'un plasma radiofréquence (RF), mis en œuvre sur des coupons préalablement nettoyés par le mélange acétone/éthanol. Cette technique d'ablation physique a pour but d'éliminer la couche de contamination organique et de moduler la composition chimique de la couche passive, par collisions inélastiques des ions Ar^+ avec les atomes de la surface.

Dans la littérature, de nombreux travaux font référence aux bombardements par plasma avec des gaz inertes (argon, néon) ou réactifs (oxygène, azote) comme des méthodes efficaces pour nettoyer et modifier les surfaces (Chu *et al.*, 2002). Everaert *et al.*, (1998) ont traité des surfaces plastiques par plasma d'argon, ce qui les a rendues hydrophiles et a permis de réduire l'adhésion microbienne. Dans notre étude, nous avons choisi un gaz plasmagène inerte pour éviter les réactions chimiques avec les composés de la surface métallique. De plus, l'argon est peu coûteux et présente un rendement de pulvérisation élevé (Hegemann *et al.*, 2003).

** Les travaux décrits dans ce chapitre font l'objet d'un article, intitulé "Plasma-mediated modification of austenitic stainless steel: application to the prevention of yeast adhesion", accepté pour publication dans le journal "Plasma Processes and Polymers" (2009).

La composition et les caractéristiques physico-chimiques des surfaces d'acier inoxydable ont ensuite été déterminées par différentes méthodes (spectroscopie XPS, angle de contact à l'eau) et comparées. Des expériences de détachement, réalisées en chambre à écoulement cisailé avec *S. cerevisiae*, ont permis d'évaluer l'incidence des modifications de surface générées sur l'adhésion des levures.

Tableau 8. Résumé des traitements réalisés pour modifier les surfaces d'acier inoxydable.

Echantillon	Traitement de surface
Référence	Nettoyage par un mélange acétone/éthanol (5 min, 20°C)
H ₂ O ₂ /H ₂ SO ₄	Nettoyage dans un mélange eau oxygénée/acide sulfurique (2 min, 20°C)
Bombardement par plasma d'argon (condition I)	Nettoyage par un mélange acétone/éthanol, suivi d'un bombardement par plasma d'argon (20 min, 5 W, V _{bias sup} = -210 V)
Bombardement par plasma d'argon (condition II)	Nettoyage par un mélange acétone/éthanol, suivi d'un bombardement par plasma d'argon (20 min, 10 W, V _{bias sup} = -320 V)

I – Caractérisation des surfaces d'acier inoxydable après traitement

A – Influence des traitements de surface sur la couche de contamination et le film passif

1 – Couche de contamination

L'influence des traitements de surface (nettoyages chimiques / bombardement physique) sur la composition et l'épaisseur de la couche de contamination a été évaluée par spectroscopie XPS. Le spectre général correspondant à la surface de référence est présenté à titre d'exemple sur la Figure 25. Il révèle les différents éléments présents sur la surface : Fe, Cr, Ni, Mo, Mn, Si, C et O, ce qui est cohérent avec la composition chimique de l'acier inoxydable AISI 316L, présentée dans le Tableau 2 du Chapitre II de la partie bibliographique. La présence de silicium et de carbone peut également être due aux résidus de papiers abrasifs SiC et à la pâte diamant, utilisés pour réaliser le polissage mécanique. La quantité importante de carbone et d'oxygène est attribuée aux contaminations organiques provenant de l'atmosphère ambiante (Compère *et al.*, 2001 ; Landoulsi *et al.*, 2008). Cette couche de contamination recouvre la surface d'acier inoxydable, expliquant la faible intensité des pics correspondant aux constituants de l'alliage (Fe, Cr, Ni, Mo, Mn).

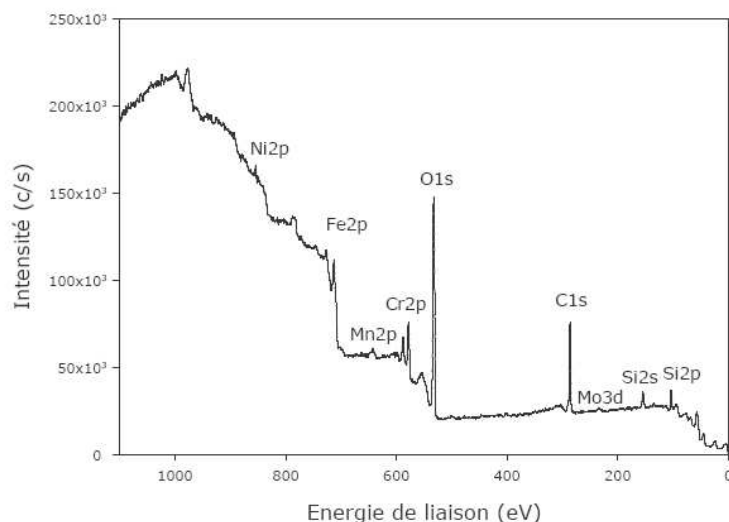


Figure 25. Spectre XPS général de la surface d'acier inoxydable de référence (nettoyage acétone/éthanol).

Pour chaque échantillon, le spectre de haute résolution du niveau de cœur C 1s peut être décomposé en trois pics élémentaires (à titre d'exemple, cf. Figure 26 pour la surface de référence) :

- le pic le plus intense situé à 285,6 eV est attribué au carbone des liaisons C–H et C–C ;
- l'épaule observé à 287,2 eV correspond au carbone des liaisons C–O et/ou C–N ;
- le pic de faible intensité à 289,6 eV correspond au carbone des liaisons C=O, O–C–O et/ou O–C=O.

Ces trois pics sont observés quel que soit le traitement de surface opéré, avec des intensités plus ou moins élevées (spectres non présentés). Ceci confirme la présence d'une contamination organique de surface pour tous les échantillons, en quantité variable.

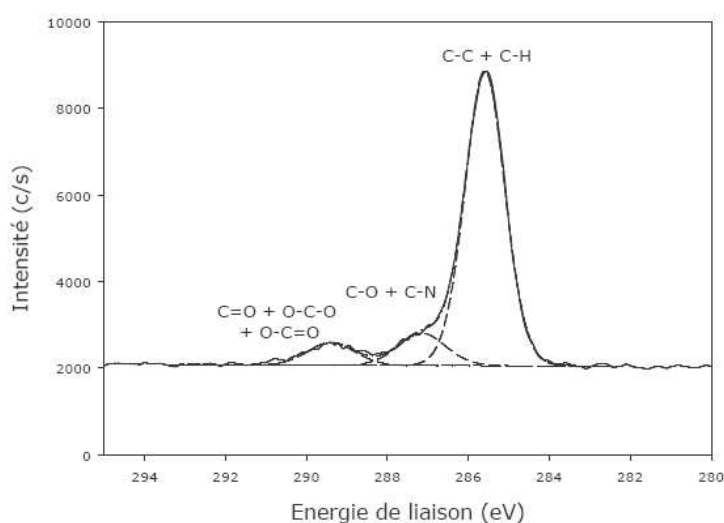


Figure 26. Spectre de haute résolution du niveau de cœur C 1s, obtenu par analyse XPS de la surface d'acier inoxydable de référence (nettoyage acétone/éthanol).

En se basant sur les spectres C 1s obtenus pour chaque échantillon, la couche de contamination est caractérisée très précisément, en termes de composition (Tableau 9) et d'épaisseur (Figure 27).

Tableau 9. Composition de la couche de contamination présente en surface des échantillons d'acier inoxydable après les différents traitements.

	Composition (% at.)		
	C-H et/ou C-C (285,6 eV)	C-O et/ou C-N (287,2 eV)	C=O, O-C-O et/ou O-C=O (289,6 eV)
Référence	84,8	9,0	6,1
H₂O₂/H₂SO₄	71,4	21,7	6,9
Bombardement (condition I)	77,1	12,0	10,9
Bombardement (condition II)	71,2	11,6	17,2

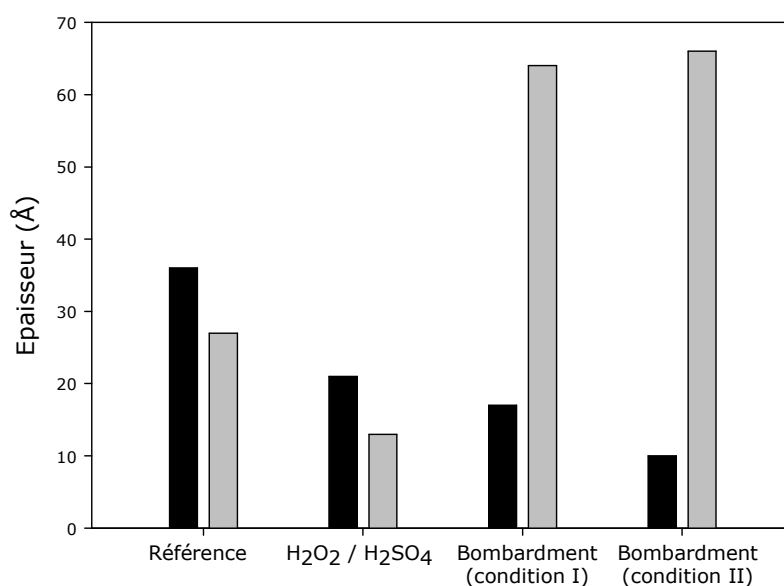


Figure 27. Epaisseurs des couches de contamination (■) et couches passives (■) des différents échantillons d'acier inoxydable.

Dans le cas de l'acier inoxydable de référence, la couche de contamination a une épaisseur de 36 Å (Figure 27) et elle est principalement composée d'espèces hydrocarbonées (84,8% at.), comme observé par Landoulsi *et al.* (2008). En nettoyant des plaques d'acier inoxydable 316L selon le même protocole, puis en analysant les surfaces par XPS et ToF-SIMS, Compère *et al.* (2001) ont démontré que la présence d'une couche de contamination en surface de l'alliage est inévitable. De même, Callewaert *et al.* (2005) ont étudié différents métaux et oxydes métalliques et les analyses XPS effectuées révèlent la présence systématique de carbone en surface. Cette contamination

carbonée est due à des composés organiques, qui s'adsorbent en quelques minutes sur la surface, après contact avec l'atmosphère ambiante (entre l'étape de nettoyage et l'étape d'analyse) ou avec la phase gazeuse du spectromètre XPS, et conduisent à une diminution de l'énergie de surface du matériau, c'est-à-dire à un état plus stable thermodynamiquement (Landoulsi *et al.*, 2008).

Après décapage par le mélange $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$, l'épaisseur de la couche de contamination est plus faible (21 Å) que celle de l'échantillon de référence (Figure 27). Ce résultat démontre l'efficacité du traitement. On peut toutefois se demander si la persistance d'une couche de contamination est due à un effet incomplet ou à une re-contamination post-traitement. En effet, même si la procédure de nettoyage est parfaitement efficace, la surface d'acier inoxydable est immédiatement contaminée lors de sa remise à l'air, par les composants organiques présents dans l'atmosphère (Rouxhet et Mozes, 1990). Il est intéressant de noter que la quantité de groupements C–O et C–N est deux fois plus élevée qu'après le traitement de référence (Tableau 9). Ceci peut être dû au procédé de décapage qui s'accompagne de réactions d'oxydation. Il contribue à l'élimination des espèces hydrocarbonées, mais laisse en surface une contamination résiduelle partiellement oxydée. La présence de sulfate, également détectée en surface (données non présentées), est attribuée à l'acide sulfurique utilisé pour ce décapage.

Après bombardement des échantillons par plasma d'argon, l'épaisseur de la couche de contamination est encore plus faible : elle est égale à 17 Å et 10 Å dans les conditions I et II, respectivement (Figure 27). Ces valeurs sont proches de celle déterminée par Houmard et ses collaborateurs (2007) : après un rinçage dans une solution d'alcool et d'acétone, suivi d'un traitement de 10 min par plasma d'argon (50 W), l'épaisseur de la couche de contamination carbonée est égale à 8 Å. Comme attendu au vu des résultats de la littérature (Santos *et al.*, 2004 ; Legeay *et al.*, 2006), le bombardement par plasma d'argon a provoqué l'ablation physique des contaminants adsorbés sur la surface, par l'intermédiaire de collisions inélastiques des ions Ar^+ sur les atomes de surface de l'échantillon, qui surpassent les forces de physisorption de ces contaminants (Catherine, 1988 ; Taga, 1993). Cependant, des espèces hydrocarbonées sont détectées sur les surfaces traitées (Tableau 9), certainement dû à une re-contamination instantanée des échantillons à l'ouverture du réacteur plasma. On peut noter que la contribution des espèces oxydées (*i.e.*, C=O/O–C–O/O–C=O) dans le pic C 1s augmente sensiblement en comparaison de celle de l'acier inoxydable de référence. En effet, le traitement par plasma d'argon provoque une activation de la surface en créant des liaisons radicalaires pendantes (Denes *et al.*, 2001 ; Legeay *et al.*, 2006). La plupart de ces radicaux sont oxydés lorsque les échantillons sont remis à l'air, générant alors des fonctions chimiques oxygénées, comme C–OH, –C=O, –COOH, etc.

2 – Couche passive

En parallèle, la composition et l'épaisseur de la couche passive des échantillons d'acier inoxydable ont été déterminées par spectroscopie XPS après chaque traitement de surface.

La couche passive de l'acier inoxydable de référence présente une épaisseur égale à 27 Å (Figure 27). Ce résultat est cohérent avec celui présenté dans les travaux de Houmard *et al.* (2007) : ces auteurs rapportent une épaisseur de 33 Å après nettoyage de l'acier inoxydable selon la même procédure expérimentale. Comme indiqué dans le Tableau 10, la couche passive est principalement constituée d'oxydes et d'hydroxydes de fer et de chrome. Le rapport $(\text{Fe/Cr})_{\text{ox}}$ est égal à 0,95, ce qui indique que ces deux composants sont présents en quantité quasiment équivalente. Comme observé dans de nombreuses études (Maurice *et al.*, 1996 ; Compère *et al.*, 2001), la couche passive est enrichie en chrome par rapport au cœur du matériau, où le rapport (Fe/Cr) est environ égal à 4. En effet, le chrome est l'élément le plus oxydable de l'alliage (Landolt, 1990) et les oxydes de chrome sont plus stables que les oxydes de fer (McDonald *et al.*, 1992). Une faible quantité d'oxydes de molybdène est détectée dans la couche passive (Tableau 10), alors qu'aucune trace de nickel n'est décelée, comme démontré notamment par Clayton et Olejford (1995) et Landoulsi *et al.* (2008).

Tableau 10. Composition de la couche passive des échantillons d'acier inoxydable après les différents traitements.

	Composition (% at.)			$(\text{Fe/Cr})_{\text{ox}}$
	$\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$	Cr^{3+}	Mo^{6+}	
Référence	47,6	50,0	2,4	0,95
H₂O₂/H₂SO₄	16,8	79,0	4,2	0,21
Bombardement (condition I)	78,1	21,1	0,8	3,7
Bombardement (condition II)	67,6	31,8	0,7	2,1

En utilisant le nettoyage chimique H₂O₂/H₂SO₄, notre objectif était de modifier la couche d'oxydes/hydroxydes. Conformément à nos attentes, l'analyse par spectroscopie XPS montre une variation significative de la composition de la couche passive (Tableau 10), causée par une dissolution préférentielle des oxydes et hydroxydes de fer (McDonald *et al.*, 1992 ; Dabosi, 1994). Dans le bain de décapage H₂O₂/H₂SO₄, l'acide sulfurique maintient le pH aux environs de 1, entraînant la solubilisation des oxydes et hydroxydes de fer présents dans la couche passive ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \rightarrow 2 \text{Fe}^{3+} + 3 \text{O}^{2-}$, $\text{Fe}(\text{OH})_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2 \text{OH}^-$ et peut-être $\text{FeO} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}^{2-}$). Les ions ferriques Fe^{3+} participent également au procédé de décapage de l'acier inoxydable ($\text{Fe} + 2 \text{Fe}^{3+} \rightarrow 3 \text{Fe}^{2+}$, qui combine la demi-réaction d'oxydation du fer métallique (1) $\text{Fe} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2 \text{e}^-$ et la demi-réaction de réduction des ions ferriques (2) $\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). Ces réactions sont réversibles mais favorisées dans les sens indiqués par les conditions de pH faibles. Simultanément, l'oxydation des ions ferreux Fe^{2+} , issus de la dissolution des oxydes de fer et de la réduction des ions Fe^{3+} , se produit grâce au

peroxyde d'hydrogène et permet l'entretien de la quantité d'ions Fe^{3+} . Du fait de cette dissolution préférentielle du fer, un fort enrichissement en oxydes et hydroxydes de chrome est observé ($(\text{Fe}/\text{Cr})_{\text{ox}} = 0,21$; Tableau 10). Ces résultats sont en accord avec de précédentes études de la littérature (Keddam, 1995). Ainsi, Maurice *et al.* (1996) ont observé que, lorsqu'un acier inoxydable est conservé en milieu acide, la couche la plus externe du film passif est principalement constituée d'oxydes Cr_2O_3 et d'hydroxydes de chrome $\text{Cr}(\text{OH})_3$. De même, Haupt et Strehblow (1995) expliquent que la vitesse de dissolution des oxydes/hydroxydes de fer est plus importante pour des pH faibles qu'à pH neutre. A noter par ailleurs que l'épaisseur de la couche passive après décapage par $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ est deux fois plus faible (13 Å) que celle du film passif de l'acier inoxydable de référence (27 Å ; Figure 27).

Les traitements de surface effectués par plasma d'argon provoquent une augmentation importante de l'épaisseur de la couche d'oxydes/hydroxydes (64 Å et 66 Å, pour les conditions de bombardement I et II, respectivement), soit plus du double de celle de la couche passive de l'acier inoxydable de référence (Figure 27). En effet, les ions argons de la décharge plasma se caractérisent par une énergie cinétique suffisamment élevée (qui dépend néanmoins de la puissance incidente injectée) pour pénétrer dans le matériau et provoquer des modifications structurales sur quelques nanomètres d'épaisseur, comme décrit notamment par Blaise (1988).

Concernant la composition de la couche passive après bombardement ionique, on constate que la quantité d'oxydes MoO_3 est plus faible qu'après nettoyage par acétone/éthanol (Tableau 10). Il est également intéressant de remarquer que la composition chimique de la couche passive (*i.e.*, rapports $(\text{Fe}/\text{Cr})_{\text{ox}}$ égaux à 3,7 et 2,1 pour les conditions de bombardement I et II, respectivement) est très similaire à celle du cœur de l'acier inoxydable 316L, présentée dans le Tableau 2 du Chapitre II de la bibliographie (*i.e.*, Fe/Cr compris entre 3,5 et 4,5). Ces modifications de composition s'expliquent par la combinaison de différents effets. Tout d'abord, les processus collisionnels qui se produisent jusqu'à une profondeur de quelques nanomètres, entre les ions Ar^+ et les atomes de surface de l'acier inoxydable, peuvent provoquer l'éjection de ceux localisés dans les premières couches atomiques (pulvérisation par bombardement ionique). En particulier, les atomes constituant le film passif natif sont éjectés de la surface et la couche est partiellement ou totalement éliminée. En outre, si les ions Ar^+ incidents ont une énergie cinétique suffisante, ils peuvent provoquer, au sein du matériau, le déplacement d'un atome de son site. Ceci induit une désorganisation de la structure au niveau atomique et la création de défauts, comme décrit par Lang (1988). La combinaison de la pulvérisation des atomes de surface et des perturbations de la structure atomique du cœur du matériau, appelées dégâts d'irradiation, entraîne un appauvrissement préférentiel en atomes légers, comme par exemple l'oxygène (Lang, 1988). A l'ouverture du réacteur, les échantillons traités par plasma se retrouvent dans l'atmosphère ambiante. L'oxygène réintègre le matériau et la couche d'oxydes/hydroxydes se reforme, avec une épaisseur pouvant être différente de celle de la couche initialement présente.

B – Influence des traitements de surface sur l'hydrophilie/hydrophobie

Pour évaluer l'impact des traitements chimiques ou bombardements ioniques sur les propriétés physico-chimiques de l'acier inoxydable, le caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces a été déterminé pour chaque condition, par la méthode de la goutte posée. Les angles de contact obtenus avec l'eau déionisée sont présentés sur la Figure 28. L'acier inoxydable de référence est qualifié d'hydrophobe, car l'angle de contact avec l'eau θ_{eau} est égal à $92,6 \pm 3,9^\circ$, résultat en accord avec nos travaux précédents (Guillemot *et al.*, 2006). Selon Boulangé-Petermann et ses collaborateurs (1993), le nettoyage de l'acier inoxydable en présence d'un solvant organique conduit à une surface hydrophobe. L'hydrophobie de la surface d'acier inoxydable de référence est corrélée à la persistance d'une couche de contamination organique, comme démontré par spectroscopie XPS (Tableau 9, Figure 27).

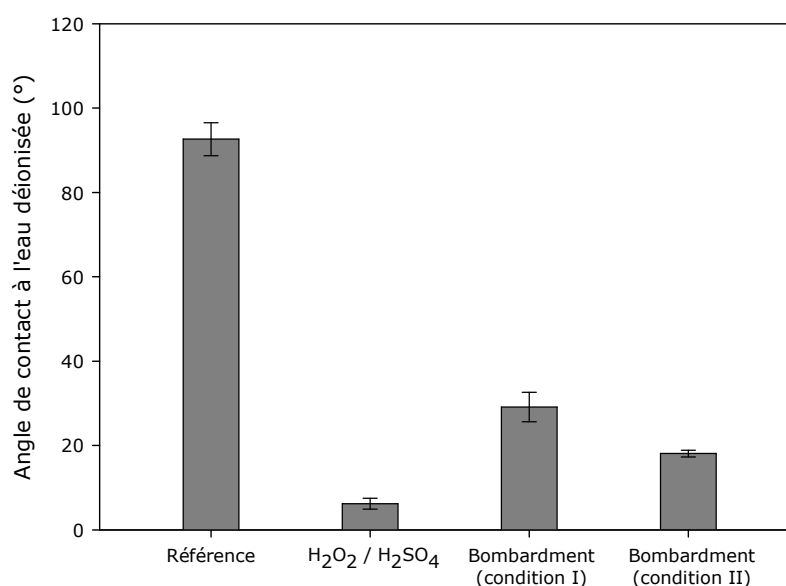


Figure 28. Angles de contact avec l'eau mesurés sur les surfaces d'acier inoxydable après les différents traitements.

Après traitement par H₂O₂/H₂SO₄, la surface d'acier inoxydable présente un angle de contact avec l'eau très faible ($\theta_{\text{eau}} = 6,2 \pm 1,3^\circ$) et se caractérise donc par une hydrophilie importante. Ce résultat est dû en partie à la formation de groupements chimiques polaires (C–O, C–N, C=O, O–C–O) dans la couche de contamination, qui représentent 28,6% at. de la composition de la couche, alors qu'ils ne constituent que 15,1% at. après le nettoyage de référence (Tableau 9). Toujours selon Boulangé-Petermann *et al.* (1993), un lavage avec une solution acide (ex. : acide nitrique 4 M) conduit à une surface hydrophile. La présence de sulfates en surface, détectée par XPS, constitue une cause supplémentaire pour expliquer le résultat obtenu.

La surface d'acier inoxydable traitée par bombardement ionique présente une mouillabilité intermédiaire, avec un angle de contact θ_{eau} égal à $29,1 \pm 3,5^\circ$ et $18,1 \pm 0,8^\circ$ pour les conditions I et II, respectivement (Figure 28). Cette augmentation de l'hydrophilie s'explique par la présence d'une quantité importante d'espèces oxydées et polaires dans la couche de contamination (*i.e.*, les groupements C–O, C–N, C=O, O–C–O représentent 22,9% at. et 28,8% at. de la composition de la couche, après les bombardements dans les conditions I et II, respectivement), en comparaison avec l'acier inoxydable de référence (*i.e.*, 15,1% at.) (Tableau 9). De manière similaire, une augmentation de l'hydrophilie de surface a été rapportée pour des polymères initialement hydrophobes, traités par plasma d'argon RF ou micro-onde (Chu *et al.*, 2002 ; Legeay *et al.*, 2006). Ainsi, Everaert *et al.* (1998) ont traité une surface polymérique hydrophobe (*i.e.*, prothèses médicales en silicone, $\theta_{\text{eau initial}} = 115^\circ$) par plusieurs plasmas d'argon successifs (6 plasmas à 24 h d'intervalle, traitement à 5 W pendant 5 min), afin d'obtenir un matériau hydrophile ($\theta_{\text{eau final}} = 15^\circ$), sans préciser les mécanismes expliquant cette augmentation significative de la polarité.

La valeur de θ_{eau} est inversement proportionnelle à la quantité de groupements chimiques oxydés présents dans la couche de contamination (Tableau 9). On peut également noter qu'elle est inversement proportionnelle à la puissance incidente injectée dans la décharge radiofréquence. En effet, lorsque la puissance RF augmente, les ions argon acquièrent une vitesse et donc une énergie cinétique plus importantes. Par conséquent, les perturbations induites par ces ions Ar^+ en surface de l'échantillon sont plus marquées (Catherine, 1988) et le nombre de liaisons radicalaires pendantes, générées lors du traitement, augmente également (Lang, 1988). Lors de la remise à l'air des échantillons, le phénomène d'oxydation en surface est donc plus prononcé, avec une conséquence directe sur le caractère polaire.

Selon les conditions expérimentales mises en œuvre et la nature du matériau traité, le bombardement ionique peut modifier la rugosité de surface (Blaise, 1988). Or, la rugosité a une influence sur la valeur de l'angle de contact θ_{eau} (Müller *et al.*, 2001). Pour prendre en compte ces effets, la rugosité arithmétique R_a a été déterminée à partir des mesures réalisées par profilométrie optique sur les coupons d'acier inoxydable traités avec le bombardement ionique le plus intense (condition II). La valeur obtenue, égale à $2,0 \pm 0,1$ nm, est proche de celle de la surface native ($1,3 \pm 0,1$ nm), ce qui démontre que l'ablation de matière provoquée par le bombardement n'a pas induit de variation significative de la topographie des surfaces dans les conditions opératoires testées. Par conséquent, l'augmentation de l'hydrophilie observée est due essentiellement aux modifications de la composition chimique des surfaces, évaluées par spectroscopie XPS.

II – Evaluation de l’adhésion des levures sur les différentes surfaces traitées

L’adhésion de *S. cerevisiae* BY4741 sur les surfaces d’acier inoxydable modifiées chimiquement par traitement dans le mélange H_2O_2/H_2SO_4 ou physiquement par bombardement ionique (condition I) a été évaluée en réalisant des expériences de détachement en chambre à écoulement cisailé, dans un milieu salin à forte force ionique (NaCl 0,15 M). Ces conditions expérimentales ont été établies par Guillemot *et al.* (2006). La géométrie de la chambre utilisée est telle que l’écoulement est laminaire quelle que soit la contrainte de cisaillement pariétale appliquée (pour une contrainte maximale de 80 Pa, le nombre de Reynolds est égal à 560). Les levures à analyser sont prélevées en phase stationnaire de croissance, de manière à satisfaire aux critères de dénombrement définis par Guillemot *et al.* (2006). Les profils de détachement obtenus à l’issue de chaque expérimentation, correspondant à l’évolution du pourcentage de cellules restant adhérentes à la surface en fonction de la contrainte de cisaillement τ_p appliquée (0-80 Pa), sont présentés sur la Figure 29. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus avec l’acier inoxydable de référence (*i.e.*, nettoyé par acétone/éthanol), déterminés dans les mêmes conditions expérimentales.

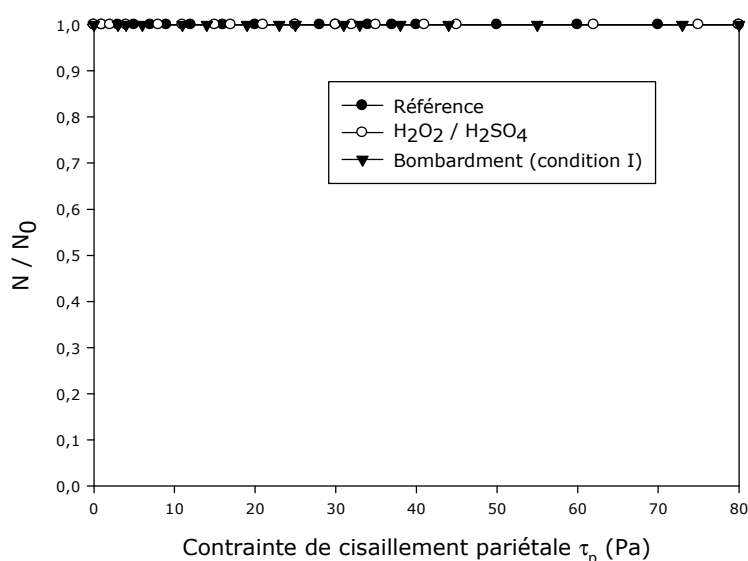


Figure 29. Profils de détachement obtenus pour les levures *S. cerevisiae* BY4741 préalablement adhérentes aux surfaces d’acier inoxydable traitées (NaCl 0,15 M).

Quel que soit le traitement opéré sur les échantillons d’acier inoxydable, les levures adhèrent très fortement aux surfaces : dans les conditions expérimentales testées, aucun détachement des cellules n’est observé, même pour une contrainte de cisaillement maximale appliquée de 80 Pa (Figure 29). Pour l’acier inoxydable de référence, nos résultats confirment ceux obtenus précédemment par Guillemot *et al.* (2006), qui ont mis en évidence une adhésion forte et

spécifique de *S. cerevisiae*, par rapport à d'autres supports non métalliques (verre, polypropylène, polystyrène). Pour les aciers inoxydables modifiés par décapage chimique ou par bombardement d'ions argon, malgré des modifications significatives de la composition et de la structure de leur surface (Figure 27, Tableaux 9 et 10), accompagnées d'une augmentation du caractère hydrophile (Figure 28), aucune réduction de l'adhésion des levures n'est observée.

De manière analogue, Dong *et al.* (2005) ont montré que *L. monocytogenes* adhère de manière identique à des surfaces d'acier inoxydable non modifiées ou traitées par plasma d'oxygène, alors que ces dernières présentent une couche de contamination plus oxydée et un angle de contact avec l'eau plus faible, par rapport aux surfaces contrôles. Ainsi, comme l'ont déjà démontré Boulangé-Petermann et ses collaborateurs (1993) sur les bactéries *S. thermophilus* adhérentes à l'acier inoxydable 304, l'adhésion de *S. cerevisiae* à l'acier 316L ne s'explique pas, à la lueur de nos résultats, par des propriétés macroscopiques comme la polarité du matériau solide, même si certains auteurs affirment le contraire (Flint *et al.*, 2000 ; Brugnoni *et al.*, 2007).

Nos résultats confirment la spécificité de l'acier inoxydable par rapport à d'autres surfaces inertes, comme le verre ou les plastiques, pour lesquelles le caractère polaire/apolaire exerce un rôle déterminant dans l'adhésion des microorganismes au support (Guillemot *et al.*, 2006).

Différentes hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'impact de la couche de contamination, présente en surface des coupons d'acier inoxydable, sur l'adhésion des levures. En effet, si ces contaminations organiques sont déposées en « îlots » isolés sur la surface du coupon (Houmard *et al.*, 2007), l'attachement des levures peut avoir lieu dans les parties non contaminées ou peu contaminées, selon différents mécanismes d'interaction entre la surface microbienne et les éléments de la couche passive (voir ci-après et Figure 30), et ce, quelles que soient les caractéristiques de cette couche de contamination à l'issue des différents traitements chimiques ou bombardements physiques de la surface. D'autre part, notons que les propriétés macroscopiques de surface de l'acier inoxydable ont été évaluées « *ex situ* », c'est-à-dire dans l'atmosphère ambiante. Mais on peut s'interroger sur le devenir de la couche de contamination, quelle que soit son étendue (*i.e.*, îlots ou couche continue), une fois l'acier inoxydable immergé en milieu liquide. Une dissolution partielle ou totale de la couche, lors de l'exposition à la solution saline, peut être envisagée (Figure 30). Dans ce cas, l'acier inoxydable recouvrerait ses caractéristiques natives (*i.e.*, celles d'un matériau de haute énergie). Du fait de l'absence de moyens d'investigation à l'échelle locale adaptés, ces hypothèses n'ont pas pu être validées ou infirmées dans le cadre de notre étude.

En se basant sur ces suppositions (*i.e.*, îlots de contamination ou dissolution de la couche), l'adhésion forte de *S. cerevisiae* à l'acier inoxydable peut être expliquée par l'établissement d'interactions directes entre les levures et la couche passive de l'alliage (Figure 30).

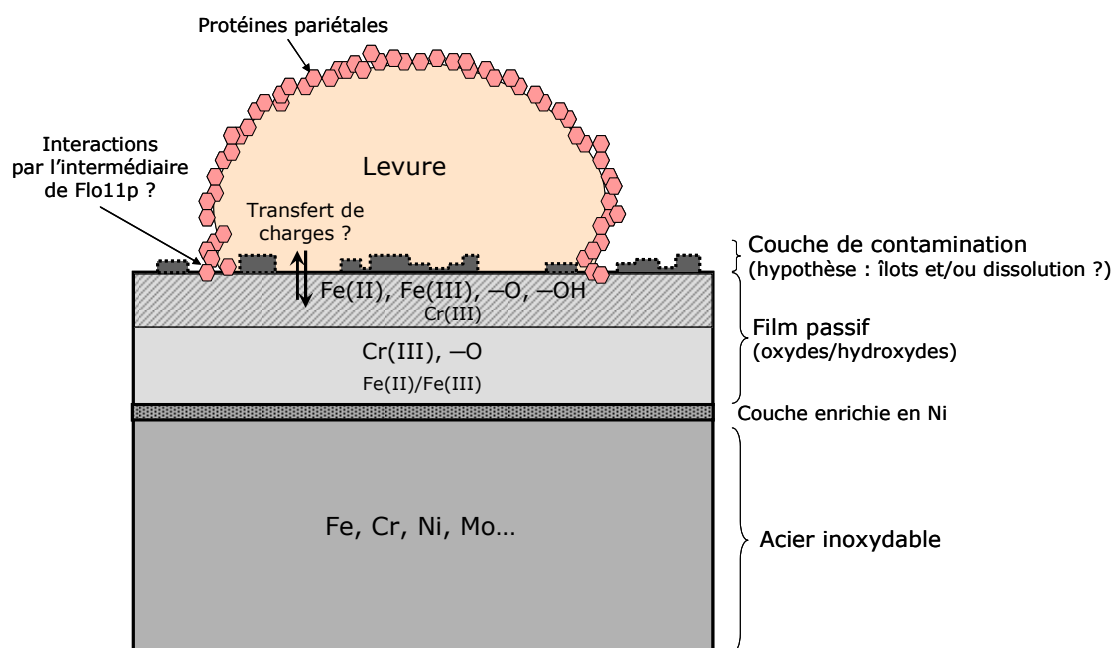


Figure 30. Représentation schématique des mécanismes d'interaction possibles entre *S. cerevisiae* et la surface d'acier inoxydable 316L, dans la solution saline (NaCl 0,15 M) (le dessin présenté n'est pas à l'échelle : taille des levures / épaisseur des îlots de contamination et des différentes couches constituant l'acier inoxydable).

Flint *et al.* (2000) ont étudié d'un point de vue macroscopique l'influence du film passif sur l'adhésion de streptocoques. Ils ont observé une réduction de l'adhésion bactérienne sur des échantillons d'acier 304L, immédiatement après traitement du support par de l'acide sulfurique à 5%, destiné à éliminer la couche d'oxydes/hydroxydes. Cependant, après une exposition de 20 min à l'air, le film passif s'était reformé et les auteurs ont montré que l'adhésion des bactéries à la surface était restaurée. Ils ont également mis en évidence une adhésion plus importante des bactéries à l'acier inoxydable 316L par rapport au 304L. Cette différence a été attribuée à la présence de molybdène dans l'acier 316L et donc, à la composition du film passif. Dans notre cas, l'augmentation ou la diminution de l'épaisseur de la couche passive (Figure 27), ainsi que les modifications de sa composition élémentaire (Tableau 10), n'ont pas affecté l'aptitude au détachement des levures de l'acier inoxydable, dans notre configuration expérimentale (NaCl 0,15 M et contrainte de cisaillement maximale de 80 Pa, appliquée en chambre à écoulement cisailé). Ce résultat peut s'expliquer par la présence systématique d'éléments métalliques propres à établir des interactions avec les levures, et notamment avec leurs protéines pariétales. En effet, Zanna *et al.* (2005) ont démontré l'existence d'interactions directes et spécifiques entre les ions Mo^{6+} présents dans la couche passive de l'acier 316L et une protéine modèle (albumine de sérum bovin – BSA). De plus, Ercal et ses collaborateurs (2001) ont démontré que les métaux comme le fer et le chrome partageaient leurs électrons, permettant la formation de liaisons covalentes avec les groupements thiols de protéines modèles.

Le rôle des protéines de surface dans l'adhésion cellulaire à un support solide a été étudié et clairement mis en évidence dans le cas des bactéries (Cucarella *et al.*, 2001 ; Parkar *et al.*, 2001 ; Pradier *et al.*, 2005). Ainsi, Flint *et al.* (1997) ont démontré qu'un traitement de *S. thermophilus* par du métapériodate de sodium, du lysozyme ou de l'acide trichloracétique, destiné à éliminer les polysaccharides de surface, n'avait aucune conséquence sur l'adhésion bactérienne à l'acier inoxydable. Au contraire, l'élimination des protéines de surface, par action de la trypsine ou du sodium dodécyl sulfate (SDS), réduisait d'un facteur 100 le nombre de bactéries adhérentes.

Chez *S. cerevisiae*, la protéine Flo11p a été particulièrement étudiée. C'est une glycoprotéine pariétale de la famille des « adhésines », dont le rôle dans l'adhésion à différents plastiques, comme le polystyrène ou le polypropylène, a été démontré (Reynolds et Fink, 2001 ; Li et Palecek, 2003). Par conséquent, on peut supposer que l'adhésion forte de *S. cerevisiae* BY4741 aux différentes surfaces d'acier inoxydable 316L, traitées par voie chimique ou physique, est en partie liée à la présence de ces protéines pariétales et à leur affinité vis-à-vis de différents composants de la couche passive (Ercal *et al.*, 2001) (Figure 30). Toutefois, cette question reste pour le moment ouverte.

En se basant sur la littérature concernant l'adhésion des bactéries aux surfaces conductrices (Poortinga *et al.*, 1999), on peut également supposer que l'adhésion forte de *S. cerevisiae* BY4741 aux surfaces d'acier inoxydable implique un mécanisme de transfert de charges entre le matériau conducteur et les cellules, *via* la présence d'éléments métalliques et d'électrons dans le film passif. De plus, en utilisant la technique de microscopie à force atomique, Mei *et al.* (2009) ont mis en évidence l'établissement de forces d'attractions non spécifiques entre des bactéries (deux souches de streptocoques) et l'acier inoxydable 316L, pour de courtes distances (*i.e.*, 20-40 nm), comme illustré sur la Figure 31 A. Selon les auteurs, ces forces non spécifiques sont dues à des interactions électrostatiques attractives entre les bactéries, chargées négativement, et leurs images de charges positives. Celles-ci se forment au sein du matériau conducteur, par réarrangement des charges à l'approche de la cellule (Figure 31 B). Lors du contact (Figure 31 C), l'attraction entre le microorganisme et son image positive au sein du support est maximale et un mécanisme additionnel de transfert de charges est possible (Mei *et al.*, 2009).

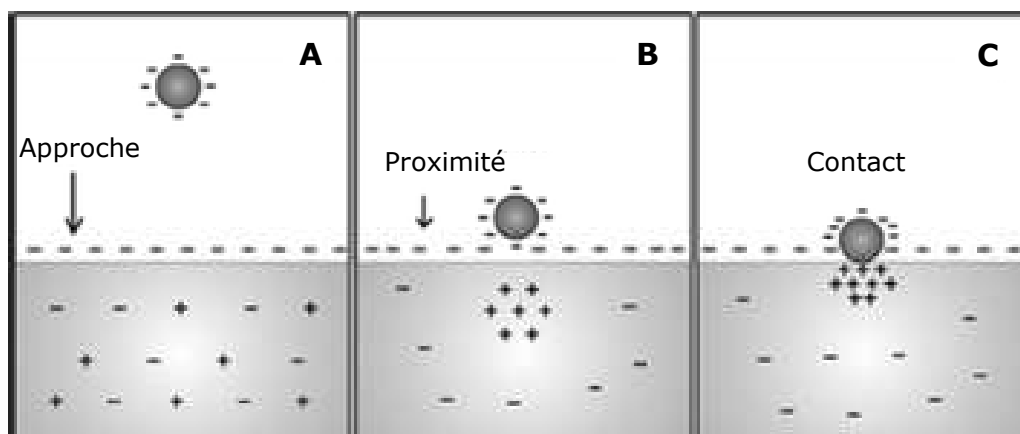


Figure 31. Mécanisme d'interaction entre une cellule et l'acier inoxydable 316L (selon Mei *et al.*, 2009).

Notons que les surfaces du microorganisme et du support sont chargées négativement dans le tampon utilisé dans ces travaux (phosphate de potassium 2 mM, chlorure de potassium 50 mM, chlorure de calcium 1 mM, pH = 6,8), comme c'est le cas dans notre étude pour *S. cerevisiae* et l'acier inoxydable immergés dans la solution saline (NaCl 0,15 M ; Guillemot *et al.*, 2007).

Dans notre étude, la présence systématique d'éléments métalliques et d'électrons libres dans le film passif des différentes surfaces d'acier inoxydable 316L traitées (Tableau 10) pourrait expliquer l'adhésion forte et invariable des levures à ce support (Figure 30). A notre connaissance, cette hypothèse n'a pas encore été démontrée pour les levures.

Conclusion

Afin de prévenir l'adhésion de *S. cerevisiae* sur l'acier inoxydable austénitique 316L, nous avons modifié sa chimie de surface (composition, propriétés physico-chimiques). Pour cela, différents traitements chimique (bain de décapage H_2O_2/H_2SO_4) ou physique (bombardement d'ions argon) ont été opérés et comparés à un nettoyage non agressif, réalisé dans un mélange acétone/éthanol. Les analyses effectuées par spectroscopie XPS ont démontré des modifications importantes de la composition, de l'épaisseur et de l'état d'oxydation de la couche de contamination organique et du film passif. Ceci s'est traduit par une augmentation significative de l'hydrophilie des surfaces métalliques traitées, déterminée par mesure des angles de contact avec l'eau. Cependant, ces modifications de surface n'ont eu aucune incidence sur le détachement des levures adhérentes à l'acier inoxydable, évalué par méthode hydrodynamique en chambre à écoulement cisailé. En effet, quel que soit le traitement opéré, les levures restent adhérentes aux surfaces, dans notre configuration expérimentale (NaCl 0,15 M, temps de contact en conditions statiques égal à 80 min, augmentation de la contrainte par palier d'une durée de 3 min, contrainte de cisaillement

maximale de 80 Pa). Contrairement aux surfaces plastiques, pour lesquelles une augmentation de l'hydrophilie de surface entraîne une réduction de la colonisation bactérienne et fongique (Everaert *et al.*, 1998), l'adhésion de *S. cerevisiae* à l'acier inoxydable 316L ne s'explique pas par les propriétés physico-chimiques macroscopiques du support, telles que l'hydrophilie. Ce matériau présente des spécificités en raison de sa nature métallique et, notamment, de la composition de son film passif (présence de fer, de chrome et de molybdène). Bien que le mécanisme d'adhésion des levures à l'acier austénitique ne soit pas à l'heure actuelle clairement élucidé, on peut supposer qu'il est principalement gouverné par des interactions locales, impliquant certains composés-clés de la surface microbienne (*i.e.*, mannoprotéines). L'hypothèse d'un mécanisme de transfert de charges avec les éléments métalliques de l'acier peut également être évoquée. En conclusion, cette première stratégie destinée à prévenir l'adhésion de *S. cerevisiae* à l'acier inoxydable ne s'est pas avérée concluante et une autre approche doit être adoptée pour atteindre l'objectif visé.

Dans cette optique, nous avons choisi de recouvrir l'acier inoxydable d'un film « barrière », permettant de limiter les effets de transfert de charge par l'établissement d'une couche non conductrice (Poortinga *et al.*, 1999 ; Mei *et al.*, 2009). En jouant également sur le caractère polaire de la surface inerte ainsi mise au point, nous avons pu exploiter au mieux ses effets potentiellement anti-adhésifs. Cette stratégie a été obtenue en réalisant la polymérisation d'hexaméthylsiloxane par PE-CVD dans une décharge radiofréquence, afin de recouvrir l'acier austénitique d'un dépôt organosilicié de faible épaisseur (*i.e.*, de l'ordre de la centaine de nanomètres). De manière à combiner une activité antimicrobienne à l'effet anti-adhésif, la polymérisation par PE-CVD a été couplée à la pulvérisation d'une cible en argent, permettant de synthétiser différents revêtements composites, constitués de nanoparticules d'argent incluses dans la matrice organosiliciée. Les caractéristiques et les potentialités de ces films minces nanocomposites sont décrites dans le Chapitre II.

CHAPITRE II – CARACTERISATION DES DEPOTS NANOCOMPOSITES

Ce chapitre est consacré à la caractérisation complète des dépôts nanocomposites, synthétisés par PE-CVD d'hexaméthylsiloxane, couplée à la pulvérisation d'une cathode en argent par bombardement d'ions argon, dans une décharge asymétrique RF (13,56 MHz). Ce procédé de dépôt a été mis en œuvre au LAPLACE. L'évaluation des caractéristiques morphologiques, de la composition et de la structure chimique, ainsi que des propriétés physico-chimiques des différents dépôts a été réalisée grâce à un large spectre de techniques d'analyse, mises en œuvre conjointement au LAPLACE et au LPCS. Les résultats de la présente étude permettront, par la suite, de comprendre les effets anti-adhésifs et biocides de ces films nanocomposites sur les trois microorganismes d'étude.

Au vu des résultats présentés dans le Chapitre I, nous avons retenu le nettoyage chimique des surfaces par acétone/éthanol. De plus, un bombardement par plasma d'argon a été opéré sur les coupons d'acier inoxydable préalablement au procédé de dépôt plasma, afin d'éliminer les contaminations organiques et de favoriser l'adhérence du revêtement. Toutefois, pour éviter l'apparition de défauts structuraux lors de la croissance du dépôt (liaisons pendantes, hétérogénéités de surface, etc.), le bombardement ionique a été atténué par rapport aux conditions testées précédemment (*i.e.*, tension d'auto-polarisation égale à 100 V, au lieu de 200-300 V en valeur absolue) et la configuration ajustée pour obtenir des conditions de bombardement adéquates, permettant la croissance du dépôt (*i.e.*, coupons d'acier inoxydable placés sur l'électrode inférieure et non pas sur l'électrode RF).

I – Influence de la pression de HMDSO sur la composition du dépôt nanocomposite

A – Relation entre la valeur de T_{ON} et la pression de HMDSO dans le réacteur

Une première série de 7 dépôts présentant différents contenus en argent a été réalisée (Figure 32). En se basant sur des travaux antérieurs menés au LAPLACE (Despax et Raynaud, 2007), les dépôts A, B, C, E, F, G et H, contenant des quantités de métal croissantes, ont été synthétisés en faisant varier uniquement la pression de HMDSO dans l'enceinte (*i.e.*, quantité de précurseur injectée dans le réacteur), par l'intermédiaire de la valeur de T_{ON} (Tableau 11). D'après ces travaux, une valeur de T_{ON} égale à 3,00 s correspond à un dépôt de matrice organosiliciée ne contenant pas de nanoparticules d'argent. Le dépôt A constituera donc notre référence pour la suite des analyses. Pour l'ensemble des procédures de dépôt, la tension d'auto-polarisation dans la

décharge a été maintenue à une valeur constante et proche de 750 V, en fixant la puissance de l'électrode RF « cible » à 150 W (Tableau 11). L'électrode porte-échantillon est également polarisée à -40 V grâce à l'application d'une seconde décharge RF.

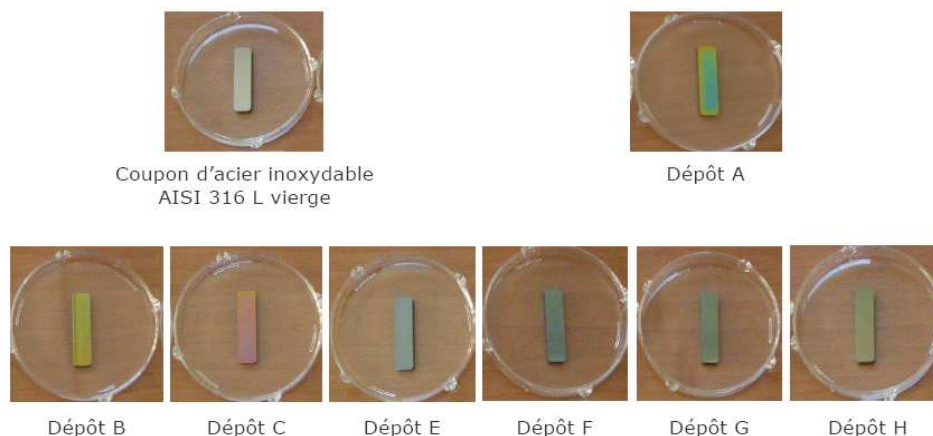


Figure 32. Coupons d'acier inoxydable AISI 316L vierge et recouverts des différents dépôts nanocomposites.

Tableau 11. Paramètres opératoires (consignes et *paramètres suivis*) choisis pour l'étude de l'influence de la pression de HMDSO dans le réacteur sur la composition des dépôts nanocomposites.

Nom du dépôt	T_{ON} (s) *	Pression HMDSO (Pa)	Puissance RF P_i (W) **	Tension d'auto-polarisation $V_{bias\ sup}$ (V)
A	3,00	0,85	150	736
B	1,60	0,43	150	777
C	1,50	0,40	150	757
E	1,40	0,35	150	766
F	1,20	0,28	150	761
G	1,10	0,25	150	772
H	1,00	0,21	150	756

* La valeur de T_{ON} correspond à la durée d'injection du précurseur HMDSO dans le réacteur. Elle permet de contrôler le paramètre opératoire « pression de HMDSO » dans l'enceinte.

** La puissance RF correspond à la puissance affichée par le générateur RF. Elle permet de faire varier le paramètre opératoire « tension d'auto-polarisation » ($V_{bias\ sup}$).

Comme attendu, la pression de HMDSO mesurée au cours du dépôt est bien proportionnelle à la durée d'injection du précurseur (T_{ON}) (Figure 33). L'utilisation de cycles de pulsations, ajustés grâce au paramètre T_{ON} , permet donc d'introduire une quantité contrôlée et précise de HMDSO dans la décharge.

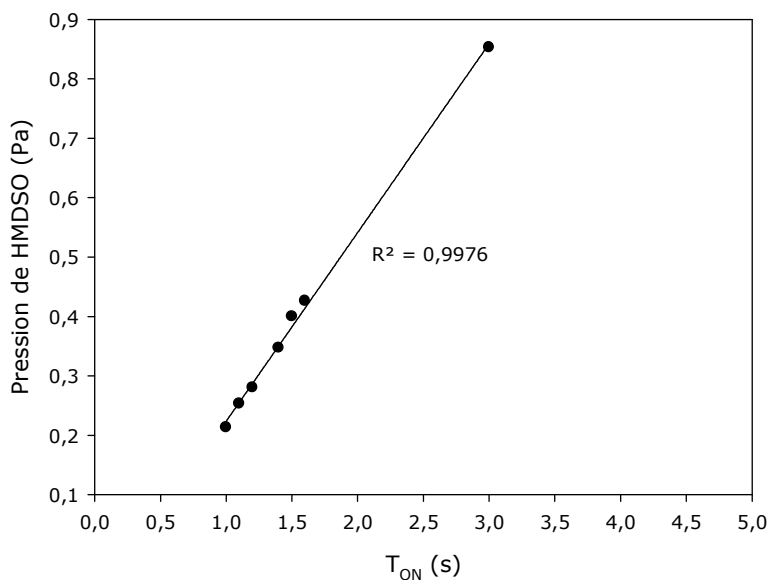


Figure 33. Evolution de la pression de HMDSO dans le réacteur en fonction de la valeur de T_{ON} (durée d'injection du précurseur).

B – Contrôle en ligne du procédé de dépôt par Spectroscopie d'Emission Optique

L'émission optique des espèces excitées présentes dans le plasma est mesurée au cours de la synthèse des différents dépôts nanocomposites, à travers une fenêtre de verre et une fibre optique placée en face de la décharge. L'étude des spectres OES obtenus, pour une gamme de longueurs d'ondes comprise entre 480 et 550 nm, permet de visualiser le processus de pulvérisation de l'argent par rapport à la fragmentation/polymérisation du précurseur organosilicié (Despax et Raynaud, 2007). En effet, sur la plage choisie, les raies d'argent (546,55 et 520,91 nm), la transition de H_{β} (486,13 nm) et la raie d'argon (549,59 nm) sont facilement détectées et identifiées (Figure 14). Les raies d'argent et la transition de H_{β} sont respectivement corrélées à la présence d'argent et de fragments issus de la dissociation du HMDSO dans le plasma (Despax et Raynaud, 2007). Les résultats présentés ici correspondent à des données enregistrées après stabilisation des conditions du plasma (régime permanent).

La Figure 34 présente les intensités des raies d'argon, d'argent (546,55 nm) et d'hydrogène H_{β} en fonction de la pression de HMDSO dans le réacteur (P_{HMDSO}), dans une gamme comprise entre 0,21 et 0,85 Pa (Tableau 11). L'intensité de la raie d'émission H_{β} reste stable entre 0,21 et 0,43 Pa, puis a tendance à sensiblement croître pour une pression de 0,85 Pa. Ceci s'explique par l'augmentation de la quantité de précurseur injecté dans l'enceinte, donc du nombre de fragments issus de sa

décomposition. La diminution de la raie d'émission d'argon aux fortes pressions de HMDSO est principalement liée à l'accroissement de la quantité de HMDSO, qui modifie les interactions électrons/gaz. La raie d'émission de l'argent montre une baisse significative d'intensité lorsque la pression du HMDSO augmente dans le réacteur. En effet, la couverture partielle de l'électrode RF « cible » par les fragments $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ augmente avec la pression de HMDSO, ce qui induit une modification du plasma d'argon. La conjonction de ces deux phénomènes provoque alors une diminution de la quantité d'atomes d'argent pulvérisés sous l'impact des ions argon. Pour une tension d'auto-polarisation d'environ 750 V et une pression d'environ 0,6 Pa, la raie d'émission de l'argent disparaît totalement car l'électrode RF est totalement recouverte par les fragments $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ (Figure 34). La gamme de pression entre 0,21 et 0,60 Pa correspond à une région de transition entre un plasma constitué d'une quantité importante de métal et un plasma riche en fragments organosiliciés. Elle est assimilée à une zone critique où l'équilibre entre la pulvérisation d'argent et la couverture partielle de l'électrode RF nécessite un temps de stabilisation plus long (30 à 60 min).

Nos résultats confirment ceux obtenus précédemment par Despax et Raynaud (2007), qui ont observé, pour une puissance RF de 100 W, le début de la couverture de l'électrode RF pour une pression de HMDSO de 0,21 Pa et une disparition de la raie d'argent à partir de 0,66 Pa.

D'autre part, le dépôt A, synthétisé à une pression de HMDSO égale à 0,85 Pa, ne semble pas contenir d'argent (Figure 34). Ce résultat devra être confirmé par la détermination précise de la composition de ce dépôt, par spectroscopie XPS (cf. paragraphe III-A-1).

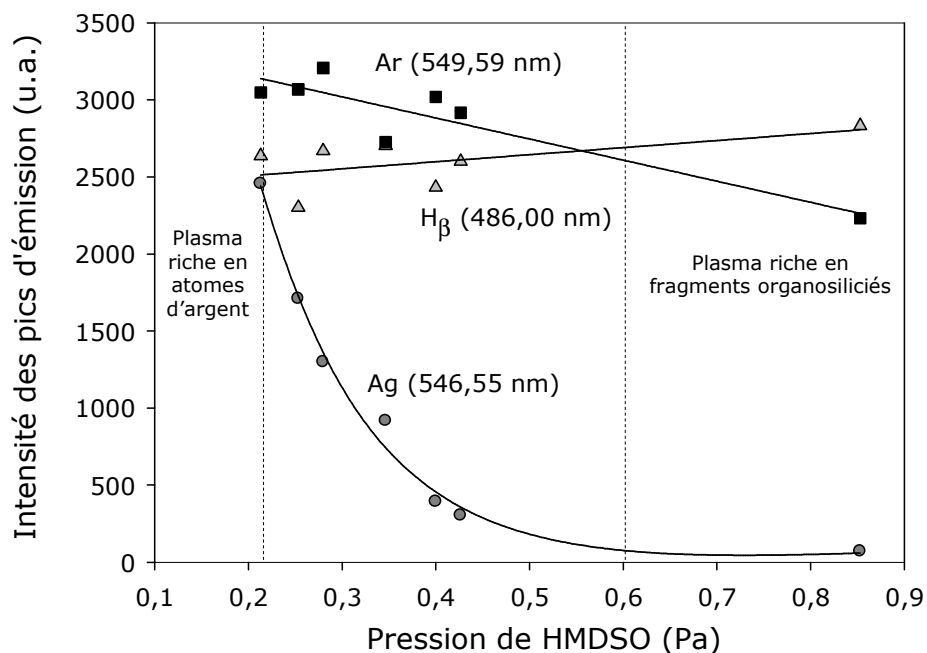


Figure 34. Evolution de l'intensité des raies d'émission optique Ar, H β et Ag en fonction de la pression de HMDSO dans le réacteur.

Dans notre procédé, l'argon est le gaz de référence et son débit reste constant tout au long de l'expérience et pour l'ensemble des dépôts réalisés (2,8 sccm, soit une pression de 5,33 Pa). Le calcul du rapport entre l'intensité de la raie d'émission H_{β} (486,13 nm) ou Ag (546,55 nm) et l'intensité de la raie d'argon (549,59 nm) (*i.e.*, H_{β}/Ar et Ag/Ar) permet de contrôler la composition du plasma lors des différentes étapes du procédé. Le rapport H_{β}/Ar indique le degré de dissociation du précurseur et le ratio Ag/Ar donne une image de la quantité d'argent dans le plasma. Le dépôt du film sur acier inoxydable est réalisé lorsque les rapports H_{β}/Ar et Ag/Ar sont stabilisés (données non présentées).

En conclusion, la mesure de l'intensité des raies d'émission de l'argon, de H_{β} et de l'argent par Spectroscopie d'Emission Optique (OES) permet de contrôler en ligne le procédé de dépôt, et plus particulièrement l'équilibre entre la fragmentation du HMDSO et la pulvérisation de la cible d'argent. En effet, la gamme de longueurs d'ondes choisie pour l'étude (480-550 nm) permet de visualiser avec précision les raies des espèces excitées d'intérêt, comme conseillé par Granier *et al.* (2003).

Cette technique d'évaluation *in situ* du procédé de dépôt, non intrusive et semi-quantitative, est couramment utilisée pour étudier les plasmas de HMDSO dans des décharges RF, comme par Mota *et al.* (1995) ou plus récemment par Granier *et al.* (2003). Toutefois, ces travaux ne portent pas sur la synthèse de dépôts composites contenant de l'argent et par conséquent, ne décrivent pas l'émission optique des espèces métalliques excitées. En revanche, Favia et ses collaborateurs (2000) ont employé l'OES lors de la synthèse de revêtements « Ag/PEO-like », utilisant l'oxyde de polyéthylène comme précurseur gazeux. Ces auteurs mentionnent le fait que les rapports d'intensités sont proportionnels à la densité des espèces émettrices présentes dans le plasma. Ainsi, dans le cas de nos expériences, les rapports H_{β}/Ar et Ag/Ar constituent une représentation fidèle de la composition du milieu plasma. Le calcul de ces ratios à chaque étape du procédé permet d'ajuster les conditions de la décharge pour obtenir la composition souhaitée dans le plasma, grâce à un réglage approprié des paramètres opératoires externes (V_{bias} , P_{HMDSO}).

Au vu des résultats présentés dans cette partie, le choix de la pression de HMDSO (P_{HMDSO}) comme paramètre opératoire discriminant pour modifier la composition de la phase plasma s'avère concluant. La variation de P_{HMDSO} permet de balayer une gamme de composition, allant du plasma riche en éléments métalliques au plasma constitué majoritairement de fragments organosiliciés.

En se basant sur les résultats obtenus avec les dépôts A, B, C, E, F, G et H, une campagne expérimentale complémentaire a été menée, pour synthétiser des revêtements « D », contenant une quantité d'argent intermédiaire entre celles des dépôts C et E. Pour cela, les paramètres opératoires (V_{bias} et P_{HMDSO}) ont été fixés et réglés afin d'obtenir un rapport Ag/Ar égal à 0,2 ($Ag/Ar = 0,13$ et $0,34$ pour les dépôts C et E, respectivement). Les paramètres opératoires du procédé sont les suivants : $P_{HMDSO} = 0,53$ Pa ($T_{ON} = 1,85$ s) et $V_{bias\ sup} = 807$ V ($P_i = 80$ W) (Tableau 7).

En outre, un dépôt nommé « I » a été synthétisé en ajoutant de l'oxygène au mélange argon/HMDSO, afin de moduler les propriétés physico-chimiques de la matrice (organique/inorganique). Dans ce cas, les conditions opératoires sont : $T_{ON} = 4,00$ s et $V_{bias\ sup} = 445$ V ($P_i = 150$ W) (Tableau 7). La pression de HMDSO n'a pas pu être évaluée, car le mélange injecté contient également de l'oxygène (pression du mélange "HMDSO + O₂" égale à 1,4 Pa).

II - Caractérisation morphologique des dépôts

L'épaisseur, la topographie de surface et les caractéristiques structurales des dépôts, synthétisés par procédé plasma sur des échantillons d'acier inoxydable polis mécaniquement, sont déterminées par le couplage de différentes techniques : profilométrie, Microscopie à Force Atomique (AFM), Microscopies Electroniques à Balayage (MEB) et en Transmission (MET).

A – Epaisseur des dépôts

L'épaisseur de trois dépôts contenant différentes quantités d'argent (dépôts A, B et E), c'est-à-dire synthétisés sous différentes pressions de HMDSO (0,85, 0,43 et 0,35 Pa), a été évaluée par profilométrie optique au LAPLACE. Les films ont été déposés sur des coupons de silicium intrinsèque. La mesure consiste à déterminer la profondeur de la marche formée en rayant le dépôt avec un stylet d'acier inoxydable. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 12. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne de trois mesures sur chaque dépôt.

Tableau 12. Epaisseur de quatre dépôts synthétisés par procédé plasma.

Dépôt	Epaisseur (nm)
A	175,0 ± 0,8
B	174,8 ± 1,2
E	175,0 ± 2,0
I	382 ± 4 (<i>ellipsométrie spectroscopique</i>)

On constate que l'épaisseur des revêtements A, B et E est similaire pour des pressions de HMDSO dans le réacteur comprises entre 0,35 et 0,85 Pa. Pour l'ensemble des dépôts, la durée du procédé a été fixée à 10 min. Par conséquent, la vitesse de dépôt est de l'ordre de 17-18 nm/min, dans les conditions opératoires mises en œuvre (décharge RF, $V_{bias\ sup} = 750$ V, $V_{bias\ inf} = -40$ V). Ce résultat est cohérent avec celui obtenu précédemment par Despax et Raynaud (2007), qui ont déterminé une vitesse de dépôt comprise entre 12 et 15 nm/min, pour des pressions de HMDSO de 1,06 à 0,27 Pa respectivement, sous une puissance RF égale à 100 W (pas de précision concernant $V_{bias\ sup}$). Ceci s'explique par les conditions expérimentales mises en œuvre, et plus particulièrement

la tension d'auto-polarisation élevée, qui provoque une dissociation importante du HMDSO. Une quantité importante de carbone et d'hydrogène, voire de silicium, est donc éliminée sous forme de produits volatils (CH_4 , C_2H_2 , C_2H_4 , $\text{HSi}(\text{CH}_3)$, H_2 , etc.), comme décrit par Despax et Raynaud (2007). Ce phénomène se produit pour l'ensemble des dépôts, expliquant la valeur identique de l'épaisseur pour les différentes couches minces déposées. De plus, Rau et Kulish (1994) indiquent que la cinétique de croissance des dépôts $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ dépend principalement de la puissance injectée dans le plasma et de la température d'évaporation du précurseur, paramètres gardés constants pour l'ensemble des procédures de dépôts.

L'épaisseur du dépôt I a été déterminée par ellipsométrie spectroscopique au LAPLACE (Figure 16). En effet, ces couches minces n'ont pas pu être rayées par le stylet d'acier inoxydable, ce qui a empêché la réalisation de la mesure par profilométrie optique. Pour déterminer l'épaisseur du dépôt à partir du changement de polarisation de la lumière réfléchi par rapport au faisceau incident, il est nécessaire de connaître l'indice de réfraction du matériau analysé. Dans notre cas, nous avons utilisé l'indice de réfraction de la silice SiO_2 (1,45-1,47), puis nous avons validé cette hypothèse en analysant les dépôts par spectroscopie FTIR (cf. partie III-B-2 de ce chapitre). L'épaisseur du dépôt I, correspondant à la moyenne des valeurs déterminées sur trois dépôts issus de la même campagne expérimentale (3 mesures/dépôt), est égale à 382 ± 4 nm. La durée du procédé ayant été fixée à 20 min, la vitesse de dépôt est d'environ 19 nm/min. On remarque que cette valeur est sensiblement identique à celle obtenue dans le cas des dépôts A, B et E, réalisés sans ajout d'oxygène.

La littérature indiquant une diminution de la vitesse de dépôt avec l'augmentation du pourcentage d'oxygène dans le mélange, en raison de l'oxydation du HMDSO en produits volatils (CO_2 et H_2O), nous avons choisi d'augmenter la durée du dépôt à 20 min et la valeur de T_{ON} à 4,00 s. Or, nos propres résultats n'ont pas confirmé cette diminution en présence d'oxygène. Ceci peut éventuellement s'expliquer par le fait que, dans la littérature, les dépôts sont synthétisés pour des puissances faibles, n'induisant pas une fragmentation poussée du précurseur. Par conséquent, les dépôts organosiliciés obtenus contiennent une forte proportion de carbone et d'hydrogène et présentent donc une épaisseur plus importante que celle des dépôts synthétisés en présence d'oxygène (pour lesquels la totalité du C et du H est éliminée), ce qui correspond à une vitesse de dépôt supérieure. Dans le cas de nos films organosiliciés (A, B et E), la puissance (c'est-à-dire la tension d'auto-polarisation) est élevée et provoque le départ d'une quantité importante de carbone et d'hydrogène, comme exposé ci-dessus. Ceci pourrait expliquer pourquoi la vitesse de dépôt des films A, B et E est relativement proche de celle des revêtements I, synthétisés en présence d'oxygène (pour lesquels la totalité du C et du H a été éliminée, du moins en théorie).

B – Topographie et morphologie de surface des dépôts

Les surfaces de quatre dépôts (A, B, E et H), synthétisés par procédé plasma sur des coupons d'acier inoxydable polis mécaniquement, ont été observées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB). Les photographies obtenues sont présentées sur la Figure 35.

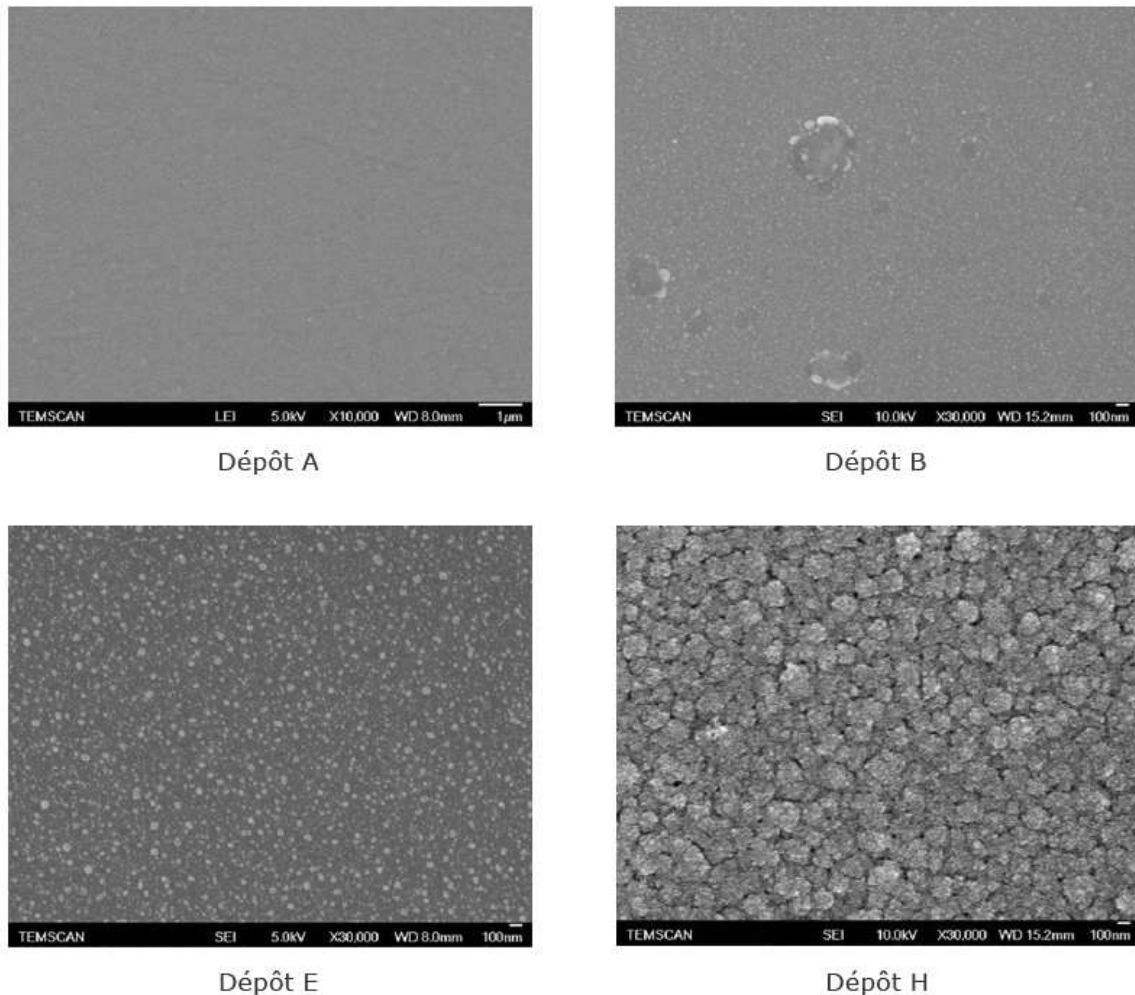


Figure 35. Photographies en Microscopie Electronique à Balayage de la surface des dépôts A, B, E et H.

Sur la photographie du dépôt A, on distingue des rayures correspondant à la surface de l'acier inoxydable poli mécaniquement. Contrairement à ce dépôt, la surface des films nanocomposites B, E et H est granulaire. Les nanoparticules d'argent présentes en surface (points gris clair) se distinguent nettement de la matrice organosiliciée (gris plus foncé). Comme attendu au vu des travaux antérieurs (Despax et Raynaud, 2007), la taille des agrégats augmente lorsque la quantité de HMDSO injecté dans le réacteur diminue (Figure 35 et Tableau 11). Dans le cas du dépôt B, on observe un très grand nombre de particules sphériques de très petite taille, ainsi que des agrégats de taille importante, disposés de manière circulaire. Cette localisation préférentielle pourrait être

liée à la présence de trous, de micro-rugosités ou de résidus de polissage en surface du substrat d'acier inoxydable, induisant des hétérogénéités lors de la croissance du dépôt. Au contraire, la surface du dépôt E présente une répartition homogène des nanoparticules d'argent, qui sont englobées dans la matrice, affleurent ou sont dispersées sur la surface. Leur forme est sphérique avec un diamètre compris entre 5 et 25 nm (diamètre moyen égal à 10 nm). Quelques agrégats ont une taille plus importante (diamètre de l'ordre de 50 nm). Le dépôt H est, quant à lui, constitué de nombreux amas non sphériques, formés de nanoparticules d'argent agrégées. Ces amas de taille submicronique (0,1-0,2 μm) sont superposés les uns aux autres et séparés par de minces filaments de matrice polymérique.

Nos résultats sont en accord avec ceux reportés par Despax et Raynaud (2007), qui ont observé des particules métalliques de diamètre compris entre 2 et 10 nm, pour une fraction volumique d'argent environ égale à 0,25 ($P_{\text{HMDSO}} = 0,37 \text{ Pa}$), et des amas de taille plus importante (30-100 nm), pour une fraction volumique de l'ordre de 0,6 ($P_{\text{HMDSO}} = 0,26 \text{ Pa}$). De même, dans leurs travaux concernant l'élaboration par décharge RF de dépôts nanocomposites « Ag/PEO-like », Sardella *et al.* (2006) ont également observé que la dimension des « clusters » métalliques est dépendante des paramètres opératoires qui contrôlent la fragmentation du précurseur organique et le bombardement de la cible d'argent (débit d'argon et puissance RF dans leur cas).

Les analyses réalisées par Spectroscopie Dispersive en Energie (EDS) sur les dépôts B et E, simultanément aux observations MEB, montrent la présence de carbone, d'oxygène, de silicium et d'argent (données non présentées). En comparant l'intensité des pics du silicium et de l'argent, on constate que la quantité d'argent est plus importante dans le dépôt E que dans le dépôt B. La spectroscopie EDS étant une analyse qualitative, des informations plus précises, permettant de quantifier la composition des dépôts au niveau de l'extrême surface, vont être déterminées par spectroscopie XPS (cf. partie III-A de ce chapitre).

Pour déterminer plus précisément la topographie de surface de ces différents dépôts (A, B, E et H), ainsi que celle du dépôt I, la rugosité arithmétique (R_a) a été évaluée à partir de mesures réalisées par profilométrie optique. Les résultats obtenus, présentés dans le Tableau 13, correspondent à la moyenne de 5 mesures par échantillon.

Dans un premier temps, rappelons que ces dépôts ont été synthétisés sur des coupons d'acier inoxydable polis mécaniquement, dont la rugosité arithmétique R_a est égale à $1,3 \pm 0,1 \text{ nm}$. On constate donc que les dépôts A et I (matrice seule) présentent une rugosité de surface similaire à celle du substrat vierge.

Tableau 13. Rugosité arithmétique de la surface des cinq dépôts A, B, E, H et I, déterminée par profilométrie optique.

Dépôt	Rugosité arithmétique R_a (nm)
A	$1,8 \pm 0,3$
B	$7,3 \pm 1,5$
E	$4,7 \pm 1,6$
H	$1,5 \pm 0,3$
I	$1,6 \pm 0,1$

L'incorporation de nanoparticules d'argent dans le dépôt entraîne une augmentation de la valeur de R_a . Ainsi, les dépôts B et E présentent une rugosité R_a de $7,3 \pm 1,5$ nm et $4,7 \pm 1,6$ nm, respectivement (Tableau 13). L'augmentation significative de la rugosité dans le cas du dépôt B peut s'expliquer par la présence d'agrégats de taille importante sur la surface, comme expliqué précédemment. La rugosité du dépôt H est plus faible que celle des dépôts A, B et E. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce résultat : tout d'abord, le fait que les nanoparticules métalliques soient agrégées les unes aux autres peut empêcher une mesure correcte de la rugosité. De plus, la pointe du profilomètre peut décrocher et entraîner des nanoparticules peu cohésives, induisant un artéfact dans la mesure. Enfin, la rugosité a été mesurée sur une longueur de $0,5 \mu\text{m}$, de l'ordre de la taille d'un agrégat de nanoparticules (Figure 35). Par conséquent, la valeur de R_a obtenue correspond peut-être à la rugosité d'un agrégat, mais pas à celle de la surface. Pour le déterminer, des mesures devront être effectuées sur une distance de parcours plus longue.

C – Structure interne des dépôts nanocomposites

La structure interne du dépôt nanocomposite D a été observée par Microscopie Electronique en Transmission, afin d'évaluer la morphologie des nanoparticules, leur répartition spatiale dans la couche et leur distribution en taille. La Figure 36 présente deux images MET obtenues à des échelles différentes. Sur les Figures 36 a et b, on distingue très nettement les particules d'argent de taille nanométrique (en gris), englobées dans la matrice organosiliciée (en gris clair). Certaines particules apparaissent en gris plus foncé ou en noir. Elles correspondent probablement à la superposition de plusieurs entités, visualisées en transmission à travers l'épaisseur de la section amincie (~ 50 nm). Sur cette image, on constate la présence de nanoparticules alignées les unes à côté des autres, au niveau de l'interface avec le substrat de silicium. La présence de cette couche très organisée peut être liée à des mécanismes particuliers d'initiation de la croissance du dépôt. On peut supposer que ces mécanismes sont provoqués par l'existence de liaisons radicalaires pendantes en surface de l'échantillon, due à son bombardement préalable par les ions argon. Dans le reste de l'épaisseur du film, la distribution des particules métalliques est homogène (Figure 36 a), ce qui démontre l'efficacité de l'injection du HMDSO en mode pulsé pour le contrôle du procédé de dépôt, comme établi précédemment par Despax et Raynaud (2007).

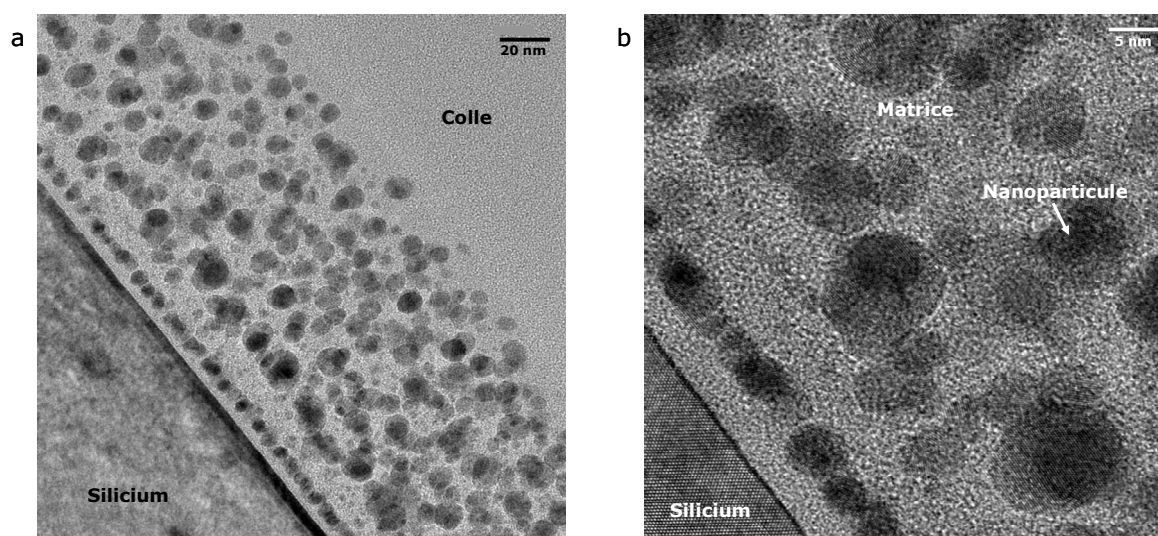


Figure 36. Photographies en Microscopie Electronique en Transmission du dépôt nanocomposite D (a : échelle = 20 nm et b : échelle = 5 nm).

Une analyse qualitative de la composition du dépôt D a été réalisée par Spectroscopie Dispersive en Energie (EDS), simultanément à l'observation MET. Comme indiqué sur la Figure 37, différentes zones ont été analysées (surface d'analyse = $4 \mu\text{m}^2$). On observe dans tous les cas la présence de cuivre, correspondant au substrat de l'échantillon aminci (grilles de cuivre). En effet, la profondeur de pénétration de l'analyse EDS est de l'ordre de $1 \mu\text{m}$, alors que l'épaisseur des dépôts amincis est d'environ 50 nm . La zone correspondant à la matrice est composée d'une quantité importante de carbone, de silicium et d'oxygène (Figure 37), du fait de la nature du précurseur HMDSO. Au niveau de la zone observée sur la nanoparticule, on confirme la présence d'une quantité importante d'argent. La détection concomitante des éléments C, Si et O est due au fait que le faisceau d'électrons traverse une section mince de dépôt, donc une faible épaisseur de matrice, située au-dessus et en-dessous de la nanoparticule observée.

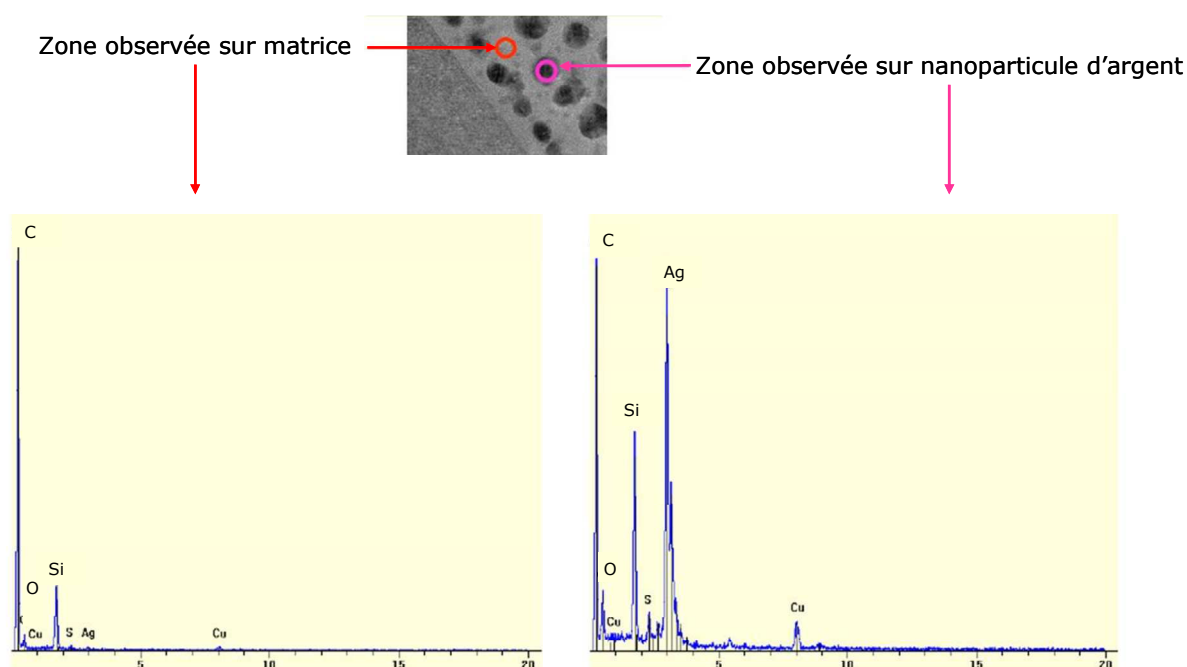


Figure 37. Analyse par Spectroscopie Dispersive en Energie (EDS) de la section amincie du dépôt nanocomposite D, réalisée simultanément à l'observation en MET.

Un traitement d'image a été réalisé avec le logiciel AnalySIS[®] AUTO (Olympus Soft Imaging System GmbH), afin de déterminer la distribution en taille des nanoparticules dans le dépôt nanocomposite D (Figure 38), à partir de l'image MET (Figure 36 a). Cette analyse ne constitue néanmoins qu'une estimation, en raison de la superposition possible des nanoparticules, qui peut fausser la détermination de leur diamètre réel. Le graphique présenté sur la Figure 38 montre une répartition gaussienne. Le diamètre moyen des nanoparticules d'argent est égal à $8,3 \pm 2,1$ nm (diamètre compris entre 3 et 15 nm pour l'ensemble des nanoparticules visualisées sur l'image). Plus de 80% des nanoparticules ont un diamètre compris entre 5 et 10 nm et 37% des agrégats présentent un diamètre de 7-8 nm (Figure 38). Ce résultat est cohérent avec celui exposé par Despax et Raynaud (2007), qui ont observé par MET des nanoparticules d'argent de diamètre compris entre 2 et 10 nm, dans un dépôt synthétisé avec une puissance RF de 100 W et une pression de HMDSO de 0,37 Pa.

Les particules nanométriques se caractérisent par un rapport surface/volume plus élevé que les particules de taille plus importante, ce qui augmente leur réactivité vis-à-vis des microorganismes. Les interactions des dépôts nanocomposites avec les microorganismes, et notamment leur impact sur la viabilité cellulaire, seront exposées dans le Chapitre III.

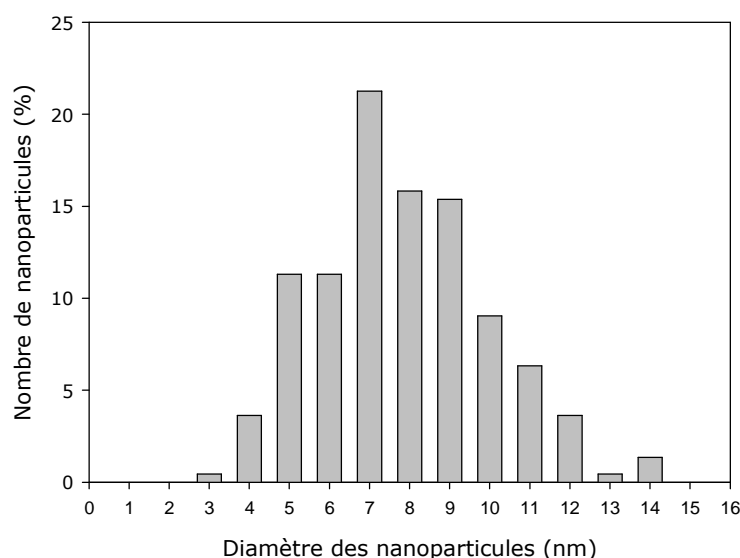


Figure 38. Répartition en taille des nanoparticules d'argent, après traitement de l'image du dépôt nanocomposite D obtenue en MET (logiciel AnalySIS[®] AUTO).

Les particules constituant le dépôt D présentent une forme sphérique facettée (Figure 36 b et Figure 39). Chacune d'elle est constituée d'atomes d'argent agrégés les uns aux autres, qui forment des plans cristallins, comme observé sur la Figure 39 correspondant à un agrandissement de la Figure 36 b. Au contraire, la matrice organosiliciée qui entoure les nanoparticules présente une structure atomique amorphe. Ceci démontre un arrangement spécifique des atomes d'argent lors de la croissance du dépôt, déjà observé par d'autres auteurs (Favia *et al.*, 2000 ; Hanus *et al.*, 2009). Morones *et al.* (2005) et, plus récemment, Pal *et al.* (2007) mentionnent le fait que la forme et la structure cristalline des nanoparticules d'argent leur confèrent une activité catalytique et une réactivité élevées en milieu biologique, par l'intermédiaire d'effets électroniques locaux à la surface des particules. En réalisant des observations par MET à haute résolution (HRTEM), Morones *et al.* (2005) ont démontré que les nanoparticules constituées de plans cristallins de type $\{111\}$ sont les plus réactives, car ces plans se caractérisent par une densité atomique élevée. Bien que nous n'ayons pas déterminé finement la structure cristalline des nanoparticules composant le dépôt D, la comparaison de la Figure 39 avec les photographies présentées par ces auteurs laisse supposer, en première approximation, que nos nanoparticules ont une forme décahédrique uniquement constituée de faces cristallines $\{111\}$ (symbolisées sur la Figure 39), avec de ce fait, une réactivité élevée vis-à-vis des microorganismes (Morones *et al.*, 2005).

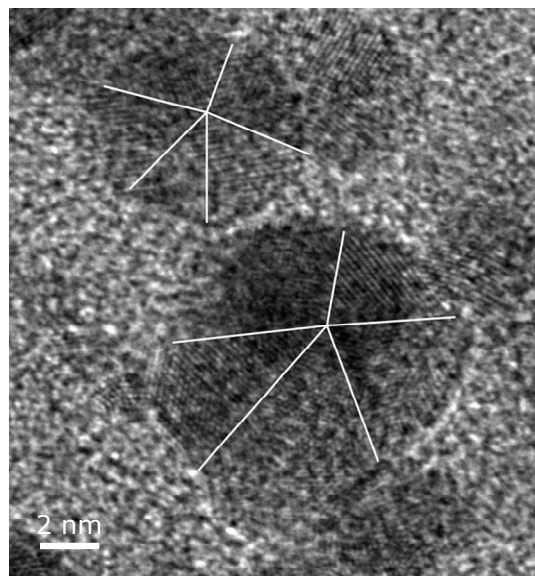


Figure 39. Agrandissement de l'image en MET du dépôt D (Figure 36 b), permettant de visualiser l'arrangement des atomes d'argent en plans cristallins. Les traits blancs symbolisent les limites des facettes.

III - Caractérisation de la composition, de la structure et des propriétés physico-chimiques des dépôts nanocomposites

A – Analyses de la composition et de la structure physico-chimique de surface des dépôts par spectroscopie XPS

La composition chimique de la surface des dépôts nanocomposites a été déterminée par spectroscopie de photoélectrons émis par rayons X (XPS) au LPCS de l'ENSCP. L'objectif est d'évaluer de manière quantitative la composition du dépôt et, en particulier, le contenu en argent. De plus, l'XPS apporte une information qualitative sur l'environnement chimique des éléments (liaisons engagées, environnement chimique des espèces C, O, Si, état d'oxydation de l'argent).

Les analyses XPS ont été réalisées sur les dépôts A à I (Tableau 7). Les spectres généraux des dépôts A, I et D sont présentés à titre d'exemple sur les Figures 40, 42 et 43, respectivement. Pour chaque dépôt, les spectres de haute résolution des niveaux de cœur Ag 3d, Si 2p, C 1s et O 1s permettent d'accéder à sa composition chimique, qui est déduite de l'aire des pics et exprimée en pourcentages atomiques. La décomposition des spectres de haute résolution en pics élémentaires permet également de définir la nature chimique de manière précise (liaisons chimiques engagées entre les différents atomes constituant le dépôt, nature organique/inorganique de la matrice, degré d'oxydation de l'argent). A titre d'exemple, les spectres de haute résolution des niveaux de cœur Si 2p, C 1s et O 1s du dépôt A et ceux correspondant au dépôt D (avec le spectre Ag 3d en plus) sont présentés sur les Figures 41 et 44, respectivement. Les concentrations en pourcentages atomiques des éléments Ag, Si, C et O permettent ensuite de calculer les rapports atomiques (*i.e.*, Ag/Si, C/Si et O/Si). Le Tableau 14 résume les paramètres opératoires mis en œuvre (P_{HMDSO} et V_{bias}), les ratios Ag/Ar déterminés par OES au cours du procédé, ainsi que les concentrations atomiques et les rapports atomiques pour l'ensemble des dépôts réalisés (A à I).

Tableau 14. Composition des dépôts nanocomposites (concentrations atomiques en Ag, Si, C et O et rapports atomiques Ag/Si, C/Si et O/Si) déterminée par spectroscopie XPS.

Nom du dépôt	P _{HMDSO} (Pa)	V _{bias sup} (V)	Ag/Ar	Concentrations atomiques (% at.)							Rapports atomiques			
				Ag (mét + ox)	Si	C	O	Ag _{métal} /Si	C/Si	O/Si	Ag _{oxydé} /Ag _{métal}			
A	0,85	736	0	0	23,2	61,2	15,6	0	0	2,6	0,7	-		
B	0,43	777	0,10	11,7	17,5	45,4	20,2	0,7	0,7	2,6	1,1	0,07		
C	0,40	757	0,13	9,5	18,0	50,9	16,3	0,5	0,5	2,8	0,9	0,08		
D	0,53	807	0,20	20,5	15,1	43,5	18,6	1,3	1,3	2,6	1,2	0,08		
E	0,35	766	0,34	23,6	12,5	38,5	15,1	1,9	1,9	3,1	1,2	0,11		
F	0,28	761	0,40	24,3	13,8	35,1	16,0	1,7	1,7	2,5	1,2	0,07		
G	0,25	772	0,56	32,5	12,8	29,6	12,6	2,5	2,5	2,3	1,0	0,07		
H	0,21	756	0,81	28,6	13,0	40,3	12,8	2,2	2,2	3,1	1,0	0,04		
I	ND (P _{HMDSO+oxygène} = 1,4 Pa)	445	0	0	33,3	3,4	63,3	0	0	0,1	1,9	-		

ND : non déterminé. NC : non communiqué.

1 – Etude du dépôt A

D'après le spectre général de la Figure 40, le dépôt A ne contient pas d'argent, conformément à nos attentes. Il est uniquement constitué de Si, C et O. Le niveau de cœur C 1s (Figure 41) présente une seule composante symétrique à 284,4 eV, associée au carbone dans un environnement Si-CH_x (x = 1, 2, 3) (Alexander *et al.*, 1999). Le pic O 1s présente également une seule composante à 532,1 eV, correspondant à l'oxygène dans un environnement CH_x-Si-O (Figure 41).

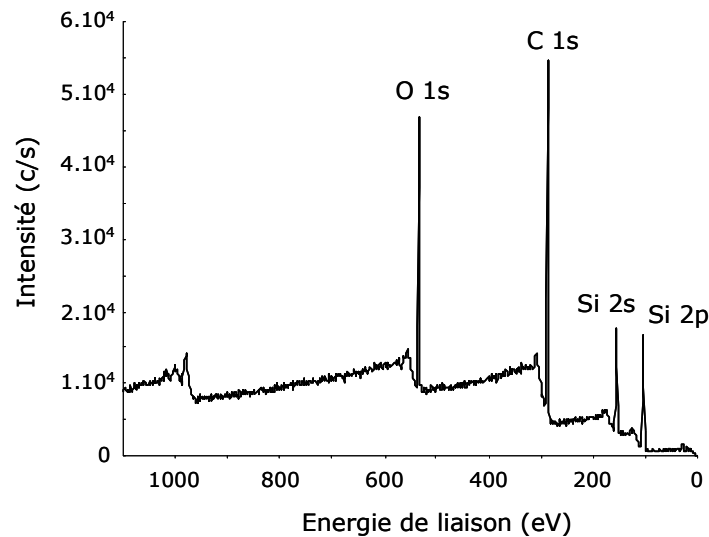


Figure 40. Spectre XPS général du dépôt A.

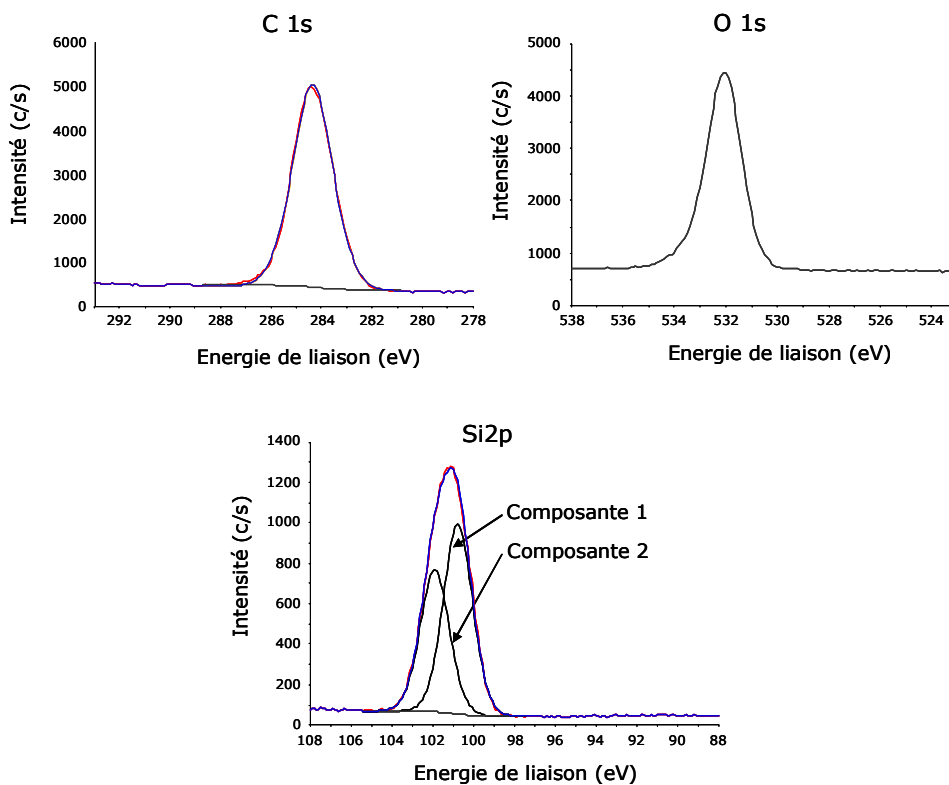


Figure 41. Spectres de haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p obtenus par analyse XPS du dépôt A.

Pour étudier le niveau de cœur Si 2p et évaluer la nature organique (type « SiC_xO_yH_z ») et/ou inorganique (type « SiO₂ ») de la matrice, nous nous sommes basés sur les travaux d'Alexander *et al.* (1999), qui ont estimé la position en énergie du pic Si 2p dans différents composés de type R_xSiO_y (R : composés hydrocarbonés), en prenant comme référence le C 1s à 284,4 eV. Les écarts en énergie de liaison Δ(C 1s – Si 2p) ont ainsi pu être calculés pour chaque composé :

Structure	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{R}-\text{Si}-\text{O} \\ \\ \text{R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{R}-\text{Si}-\text{O} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{Si}-\text{O} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{O}-\text{Si}-\text{O} \\ \\ \text{O} \end{array}$
Abréviation (R : composés hydrocarbonés)	R ₃ SiO	R ₂ SiO ₂	RSiO ₃	SiO ₄
Energie de liaison (eV) (d'après Alexander <i>et al.</i> , 1999)	101,5 (estimé)	102,1 (PDMS *)	102,8 (estimé)	103,4 (SiO ₂)
Δ(C 1s – Si 2p) (calculé)	182,9	182,3	181,6	181,0

* PDMS : Poly(diméthylsiloxane).

Dans notre cas, en prenant comme référence le pic C 1s à 284,4 eV et en se basant sur l'hypothèse de composantes présentant la même largeur à mi-hauteur, le niveau de cœur Si 2p a pu être décomposé en deux pics élémentaires (100,8 eV et 101,9 eV). Différents types de composés, issus de la décomposition du HMDSO, sont donc présents dans le dépôt. Les écarts en énergie de liaison Δ(C 1s – Si 2p) ont ensuite été déterminés pour chacune des composantes (référence : C 1s à 284,4 eV) :

	Δ(C 1s – Si 2p)
Composante 1 (100,8 eV)	183,6 eV
Composante 2 (101,9 eV)	182,5 eV

Ainsi, la composante 1, située à 100,8 eV, peut être associée à un composé de type R₃SiO et la composante 2, qui présente une énergie de liaison supérieure (101,9 eV) et un écart C 1s – Si 2p de 182,5 eV, peut être attribuée à un composé de type R₂SiO₂.

Les rapports atomiques calculés dans le cas du dépôt A sont : C/Si = 2,6 et O/Si = 0,7 (Tableau 14). L'ensemble de ces résultats confirme que ce dépôt correspond à de la matrice organosiliciée seule.

La formule chimique du précurseur HMDSO est C₆H₁₈OSi₂, soit SiC₃O_{0,5}H₉. Dans le cas du dépôt A, si l'on suppose que la composition de surface est représentative de celle du cœur du dépôt, alors la formule chimique théorique de la matrice organosiliciée synthétisée par PE-CVD devrait être SiC_{2,6}O_{0,7}:H. Ceci démontre une modification sensible de la structure chimique du dépôt par rapport à celle du précurseur, notamment au niveau du rapport entre C et O (*i.e.*, C/O est égal à 6 dans le

cas du HMDSO et à 3,7 pour le dépôt A). Cette variation s'explique par les réactions de dissociation et polymérisation (création de nouvelles liaisons), qui se sont déroulées au cours du procédé, ainsi que par l'élimination de CO₂ et d'H₂O (Despax et Raynaud, 2007). Ce résultat est similaire à celui obtenu par Benitez *et al.* (2000), qui ont déterminé une composition théorique SiC_{1,5}O_{0,66}:H pour un dépôt organosilicié synthétisé avec un débit continu de HMDSO.

En comparant le spectre général du dépôt A (Figure 40) au spectre général obtenu sur le coupon d'acier inoxydable vierge (Figure 25, cf. Chapitre I de la partie Résultats et Discussions), il est intéressant de remarquer que les différents éléments caractéristiques de l'acier inoxydable (fer, chrome, molybdène, manganèse) ne sont pas détectés lorsque le coupon est recouvert avec la matrice. Ce résultat est cohérent au vu de l'épaisseur mesurée pour ce dépôt (175,0 ± 0,8 nm) et de la profondeur de pénétration pour l'analyse XPS (~ 5-10 nm). Le dépôt de matrice organosiliciée constitue donc un film « barrière » sur le substrat d'acier inoxydable, qui pourrait limiter, voire totalement inhiber, les mécanismes de transfert de charges entre la couche passive de l'acier inoxydable et les microorganismes. Les potentialités anti-adhésive des dépôts A seront évaluées dans le Chapitre III.

2 – Etude du dépôt I

Afin de moduler la composition chimique des dépôts plasma et de modifier leurs caractéristiques physico-chimiques de surface, des couches minces, nommées I, ont été synthétisées en ajoutant de l'oxygène au précurseur HMDSO. Le rapport entre le débit de HMDSO et le débit d'oxygène est fixé à 1/10, de manière à fortement oxyder les fragments organosiliciés au cours de la croissance du dépôt. Comme dans le cas du dépôt A (partie III-A-1), l'analyse XPS du revêtement obtenu va permettre d'évaluer sa nature organique/inorganique.

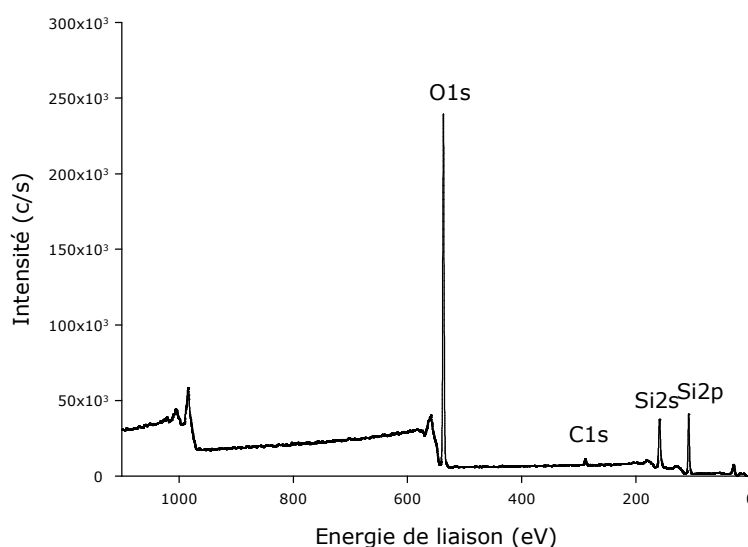


Figure 42. Spectre XPS général du dépôt I de matrice synthétisé avec ajout d'oxygène dans le plasma (HMDSO/O₂ : 1/10).

Le spectre général du dépôt I, présenté Figure 42, démontre que les seuls éléments présents en surface sont Si, C et O. Le niveau de cœur Si 2p (spectre non exposé) comporte une seule composante symétrique à 103,8 eV, correspondant à un atome de silicium lié à quatre atomes d'oxygène, c'est-à-dire à une structure de type SiO₂ (Moulder *et al.*, 1992 ; Alexander *et al.*, 1999). De plus, les écarts en énergie de liaison C 1s (284,4 eV) – Si 2p et O 1s – Si 2p sont respectivement de 181,3 eV et 429,4 eV, valeurs similaires à celles obtenues lors de l'analyse préliminaire d'un cristal de quartz (181,0 eV et 429,5 eV respectivement). Ces résultats sont confirmés par le rapport atomique O/Si, égal à 1,9, proche de la stœchiométrie du SiO₂. Le spectre du niveau de cœur O 1s présente une seule composante symétrique à 532,5 eV, attribué à l'oxygène dans un matériau silicié inorganique (Moulder *et al.*, 1992). En conclusion, ces résultats révèlent que le dépôt synthétisé à partir du mélange HMDSO/O₂ (1/10) est un matériau silicié, oxydé et inorganique, de type SiO_x (x ~ 2).

Il présente par ailleurs une faible contamination carbonée en surface (C/Si = 0,1). Le spectre de haute résolution du niveau de cœur C 1s comporte une seule composante centrée sur 285,6 eV (spectre non exposé), associée à des liaisons de type C–C et C–H. L'épaisseur équivalente de cette couche de contamination est estimée à 2 Å.

Comme dans le cas du dépôt A, on peut remarquer que les différents pics XPS, associés aux éléments métalliques constituant l'acier inoxydable (Fe, Cr, Ni, Mo, Mn), ne sont pas détectés par l'analyse XPS (Figure 42), du fait de l'épaisseur estimée à 382 ± 4 nm. Le dépôt de matrice « SiO_x » forme donc une couche « barrière » vis-à-vis de l'environnement extérieur. Son efficacité anti-adhésive sera déterminée dans le Chapitre III.

3 – Etude des dépôts nanocomposites B à H : influence de la présence d'argent

Des analyses XPS ont été réalisées sur les dépôts nanocomposites B à H (Tableau 14), le dépôt A (*i.e.*, matrice organosiliciée sans nanoparticules d'argent) servant de référence. Les Figures 43 et 44 présentent respectivement le spectre général et les spectres de haute résolution (Ag 3d, Si 2p, C 1s, O 1s et pic Auger de l'argent) du dépôt D, à titre d'exemple. Comme dans le cas du dépôt A ne contenant pas d'argent, aucun élément métallique constitutif de l'acier inoxydable n'est détecté sur les spectres généraux des différents dépôts nanocomposites (cf. Figure 43 à titre d'exemple). Ceci démontre que les dépôts nanocomposites forment également une couche « barrière », limitant les mécanismes de transfert de charges potentiels avec les microorganismes.

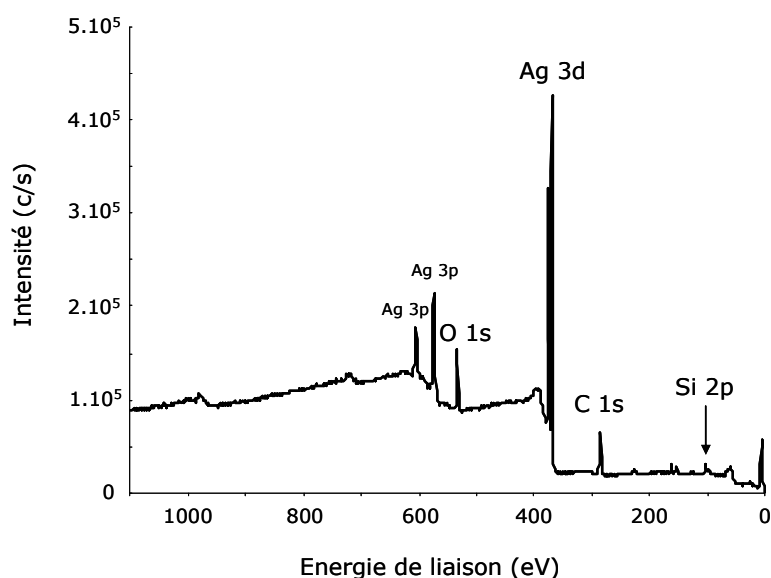


Figure 43. Spectre XPS général du dépôt nanocomposite D.

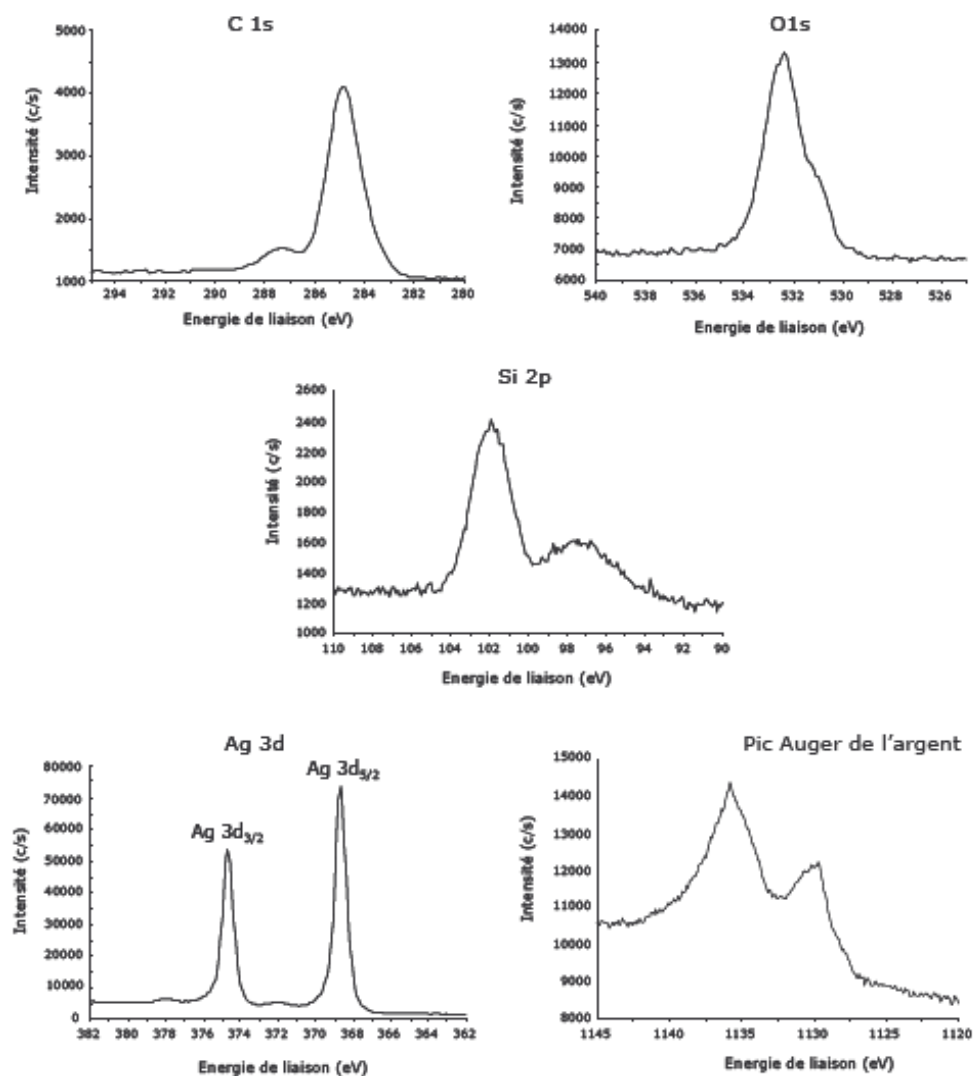


Figure 44. Spectres de haute résolution des niveaux de cœur Ag 3d, Si 2p, C 1s et O 1s et du pic Auger obtenus par analyse XPS du dépôt nanocomposite D.

3.1 – Relation entre la quantité d'argent présente dans la phase plasma et le contenu en argent des dépôts

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser à l'évaluation de la composition de surface des 7 dépôts nanocomposites (A, B, C, E, F, G et H) synthétisés avec une pression de HMDSO décroissante (tension d'auto-polarisation constante), dans le but de varier le contenu en argent. On considère l'évolution de la concentration atomique en argent ($\text{Ag}/\text{Ag}+\text{Si}+\text{C}+\text{O}$) de ces dépôts en fonction de la pression du précurseur HMDSO dans le réacteur au cours du procédé. La concentration atomique en élément métallique varie entre 0 et 30% (Tableau 14). Comme attendu, la quantité d'argent dans le dépôt augmente lorsque la pression de HMDSO diminue. Ce résultat s'explique par une réduction de la couverture de l'électrode RF d'argent par les fragments $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ et une modification du plasma d'argon (cf. partie I de ce chapitre), lorsque la quantité de HMDSO injectée dans le réacteur diminue. Par conséquent, le nombre d'atomes d'argent pulvérisés hors de l'électrode cible augmente, provoquant un accroissement de la quantité d'argent incluse dans le dépôt. Comme observé précédemment en Spectroscopie d'Emission Optique (OES), la gamme de pressions de HMDSO utilisée correspond à une zone de transition entre un dépôt ne contenant pas d'argent (dépôt A) et un dépôt riche en élément métallique (dépôts G et H). Ceci confirme les résultats présentés par Despax et Raynaud (2007).

Le rapport d'intensité Ag (546,55 nm) / Ar (549,59 nm) des pics d'émission optique (OES) constitue une représentation fiable de la quantité d'argent présente dans le plasma. De ce fait, le rapport Ag/Ar peut être corrélé à la composition atomique en argent du dépôt nanocomposite, déterminée par XPS. La Figure 45 représente l'évolution de la concentration atomique en argent en fonction du rapport d'intensité Ag/Ar. On observe une relation linéaire entre ces deux grandeurs, pour des valeurs du rapport Ag/Ar comprises entre 0,10 et 0,56. Plus la quantité d'atomes d'argent présents dans la phase plasma augmente, plus le dépôt résultant est riche en argent. Dans le cas du ratio Ag/Ar le plus élevé ($\text{Ag}/\text{Ar} = 0,81$), la mesure XPS est faussée par la présence d'une quantité très importante de carbone et d'oxygène, certainement liée à des contaminants organiques de surface. Par extrapolation (Figure 45), pour des ratios Ag/Ar très faibles (entre 0 et 0,1), la composition en argent chute de manière drastique, ce qui s'explique par la transition brutale entre une couverture partielle de l'électrode cible d'argent pour $P_{\text{HMDSO}} = 0,43$ Pa et une couverture totale pour une pression deux fois plus importante ($P_{\text{HMDSO}} = 0,85$ Pa). Nos résultats confirment les données exposées par Despax et Raynaud (2007).

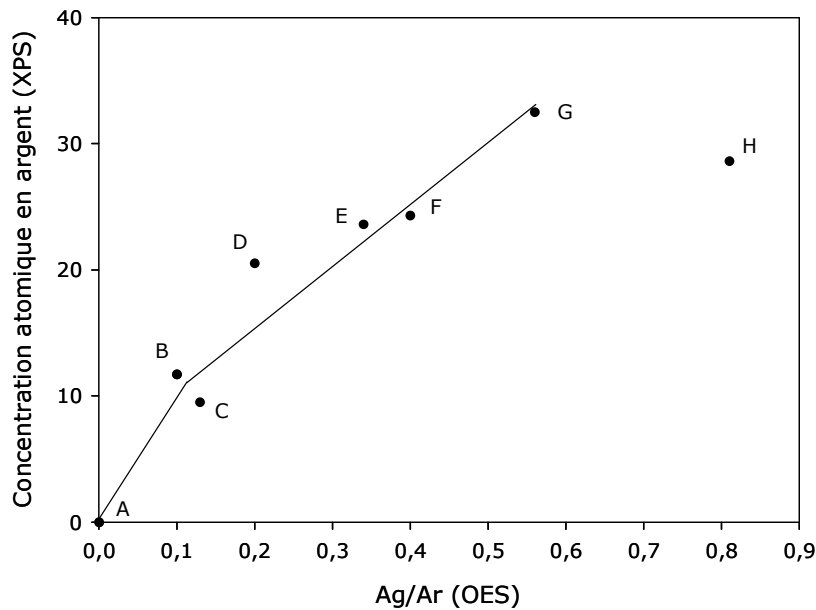


Figure 45. Evolution de la concentration atomique en argent des dépôts nanocomposites A à H, déterminée par spectroscopie XPS, en fonction du rapport d'intensité des pics d'émission de l'argent (546,55 nm) et de l'argon (549,59 nm).

Le diagramme présenté sur la Figure 45 constitue un abaque très utile pour évaluer *a priori* la composition atomique du dépôt nanocomposite en se basant sur le rapport Ag/Ar calculé en temps réel pendant le procédé de dépôt. La Spectroscopie d'Emission Optique constitue donc une méthode fiable pour contrôler *in situ* et en ligne la composition de la phase plasma et, de manière indirecte, le contenu en argent du dépôt nanocomposite. Grâce à l'abaque de la Figure 45 et au Tableau 14, les paramètres opératoires (P_{HMDSO} et $V_{\text{bias sup}}$) sont ajustés pour obtenir la composition en argent souhaitée dans le dépôt nanocomposite. Nous nous sommes basés sur cette méthodologie pour synthétiser le dépôt D (Tableau 14), l'objectif étant de réaliser des couches minces contenant une concentration d'argent intermédiaire entre celles des dépôts C et E. Pour cela, les paramètres opératoires P_{HMDSO} et $V_{\text{bias sup}}$ ont été réglés de manière à obtenir un rapport Ag/Ar proche de 0,2. Ce rapport correspond à une concentration atomique en argent égale à 20,5% (Figure 45 et Tableau 14).

Une corrélation similaire à celle déterminée dans notre étude a été obtenue par Favia *et al.* (2000) lors de la synthèse de dépôts « Ag/PEO-like », pour différentes conditions expérimentales. Les auteurs confirment l'intérêt de l'OES comme technique non intrusive de diagnostic, permettant d'évaluer et de contrôler la quantité d'argent incluse dans le dépôt.

En outre, cette méthode de suivi permet d'assurer la reproductibilité des expérimentations. Comme souligné par Favia et ses collaborateurs (2001), il existe de nombreuses relations multi-variables entre les paramètres « externes » (pression, puissance réellement injectée) ajustés par l'opérateur et les caractéristiques « internes » de la décharge (répartition des espèces au sein du plasma, réactions chimiques, etc.). De plus, la configuration du réacteur n'est pas rigoureusement

identique pour chaque campagne expérimentale (micro-fuites, fonctionnement de la pompe, raccords électriques, etc.). Par conséquent, la mise en œuvre de paramètres opératoires identiques d'une expérience à l'autre ne suffit pas à garantir des caractéristiques de dépôt similaires. Seul le contrôle d'une variable interne, comme l'intensité des pics d'émission de la phase plasma, par l'ajustement des paramètres opératoires externes, permet de reproduire les conditions souhaitées avec précision.

Malgré les précautions prises à ce niveau, une variabilité de la composition des dépôts a néanmoins été observée, notamment dans le cas des dépôts D, issus de différentes campagnes expérimentales. En effet, la couverture progressive de l'électrode cible d'argent au cours du procédé provoque une variation temporelle de la composition du plasma (« régime transitoire »). Il est donc difficile de débiter la phase de dépôt pour une valeur du rapport Ag/Ar rigoureusement identique d'une expérience à l'autre. En outre, on observe une variabilité au sein d'une même campagne expérimentale, qui peut être liée à la position de l'échantillon sur l'électrode porte-substrat (répartition spatiale inhomogène des espèces activées du plasma).

3.2 – Caractérisation de l'argent dans les dépôts nanocomposites

Pour l'ensemble des dépôts analysés, le spectre de haute résolution du pic Ag 3d correspond à deux pics : le pic Ag 3d_{3/2} et le pic Ag 3d_{5/2} (Figure 44 : spectre du dépôt D, à titre d'exemple). La raie Ag 3d_{5/2} est constituée d'une composante principale à 368,2 eV, attribuée à de l'argent sous forme métallique, et d'un épaulement à une énergie de liaison plus élevée (369,6 eV), associé à de l'oxyde d'argent (Schön, 1973) (décomposition non présentée). La position à plus haute énergie de liaison du pic correspondant à l'oxyde d'argent est due au fait que l'argent est présent sous forme de nanoparticules et non pas sous forme massive (Luo *et al.* 2000 ; Lopez-Salido *et al.*, 2005 ; Bera *et al.*, 2006). En déterminant l'aire des deux pics élémentaires, il est possible de déterminer la concentration atomique en argent métallique ou oxydé. Ainsi, le dépôt D est constitué de 19,0% at. d'argent métallique Ag(0) et de 1,5% at. d'argent sous forme oxydée Ag(I). Le rapport $Ag_{oxydé}/Ag_{métal}$ a été calculé pour chaque dépôt analysé (Tableau 14) et on constate, dans tous les cas, la présence d'une faible proportion d'argent sous forme Ag(I). La spectroscopie XPS est une technique d'analyse chimique de l'extrême surface (profondeur d'analyse ~ 5-10 nm). Par conséquent, ce résultat démontre que les nanoparticules présentes en surface des dépôts, et plus particulièrement leurs couches externes, s'oxydent faiblement au contact de l'oxygène et de l'humidité de l'atmosphère ambiante.

Les positions en énergie de liaison de l'argent métallique et de l'argent oxydé diffèrent seulement de quelques dixièmes d'eV, comme mentionné par Favia *et al.* (2000). Or, la position en énergie de liaison de la raie Ag 3d_{5/2} peut être influencée par la taille et la géométrie des particules (Luo *et al.* 2000 ; Lopez-Salido *et al.*, 2005), ainsi que par des effets de charge (Bera *et al.*, 2006). Par conséquent, la détermination de l'état d'oxydation de l'argent (*i.e.*, Ag(0) ou Ag(I)), basée sur la

seule position des composantes du pic Ag 3d_{5/2}, n'est pas une méthode totalement fiable (Bera *et al.*, 2006). En revanche, le déplacement de la transition Auger M₄N₄₅N₄₅ en fonction de l'état chimique de l'argent est plus important que celui du pic Ag 3d_{5/2}. De ce fait, la caractérisation de l'état chimique de l'argent constituant les dépôts nanocomposites a été réalisée en calculant le paramètre Auger modifié (α'). Il correspond à la somme de l'énergie de liaison du pic Ag 3d le plus intense (Ag 3d_{5/2}) et de l'énergie cinétique du pic Auger M₄N₄₅N₄₅ (*i.e.*, énergie $h\nu$ du faisceau de rayons X incidents à laquelle on soustrait l'énergie de liaison de la raie Auger, déterminée sur le spectre XPS) et n'est pas influencé par des effets de charge (Briggs et Seah, 1996 ; Bera *et al.*, 2006). D'après Schön (1973) et Bera *et al.* (2006), l'argent métallique se caractérise par un paramètre Auger modifié égal à 726,2 eV et α' est égal à 724,1 eV et 724,8 eV pour Ag₂O et AgO, respectivement. A titre d'exemple, la raie Auger de l'argent, obtenue par analyse du dépôt nanocomposite D, est présentée sur la Figure 44. Pour l'ensemble des dépôts, le paramètre Auger modifié α' est compris entre 726,2 eV et 725,9 eV, confirmant le fait que l'argent est principalement sous forme métallique. Ces résultats sont similaires à ceux reportés par Favia *et al.* (2000) pour des nanoparticules d'argent englobées dans une matrice de type PEO.

En conclusion, les nanoparticules d'argent présentes en surface (Figure 35) sont principalement composées d'argent métallique. Une faible proportion d'oxyde d'argent est également détectée par spectroscopie XPS. On peut donc supposer que la surface de ces nanoparticules s'oxyde faiblement au contact de l'air ambiant et de l'humidité, malgré les précautions de stockage, prises entre l'ouverture du réacteur plasma et l'analyse XPS. Ce phénomène d'oxydation est renforcé par la réactivité élevée de l'argent sous forme nanoparticulaire.

3.3 – Etude de la matrice des dépôts nanocomposites B à H : influence de la présence d'argent

Les dépôts nanocomposites B à H sont principalement constitués de C, O et Si (la concentration atomique en argent maximale est égale à 30% pour les dépôts G et H). La composition des différents dépôts (concentrations et rapports atomiques) est exposée dans le Tableau 14.

Le spectre du niveau de cœur Si 2p est décomposé en trois pics élémentaires. La composante à basse énergie de liaison (97,8 eV) correspond au niveau de cœur Ag 4s. En se basant sur l'analyse réalisée pour le dépôt A (cf. partie III-A-1 de ce chapitre : référence = C 1s à 284,4 eV, décomposition en pics élémentaires de même largeur à mi-hauteur, positions en énergie de liaison identique à celles utilisées pour le dépôt A), le niveau de cœur Si 2p peut être décomposé, pour l'ensemble des dépôts B à H, en deux pics : l'un associé aux composés de type R_3SiO (100,8 eV) et l'autre à des espèces de type R_2SiO_2 (101,9 eV).

La Figure 46 correspond aux spectres des niveaux de cœur Si 2p, enregistrés pour les dépôts A et B. Les pics ont été normalisés par rapport à la raie Si 2p du dépôt A. Logiquement, le pic situé à 97,8 eV (*i.e.*, niveau de cœur Ag 4s) apparaît dans le cas du dépôt B (Figure 46 b). Par ailleurs, en comparant l'intensité des pics élémentaires correspondant aux espèces R_3SiO et R_2SiO_2 , pour les dépôts A et B, on constate que la contribution du pic associé à la composante la plus oxydée (R_2SiO_2) augmente lorsque le dépôt contient de l'argent (Figure 46). Ceci indique une oxydation sensiblement plus importante de la matrice organosiliciée, et plus précisément du silicium, en présence de métal.

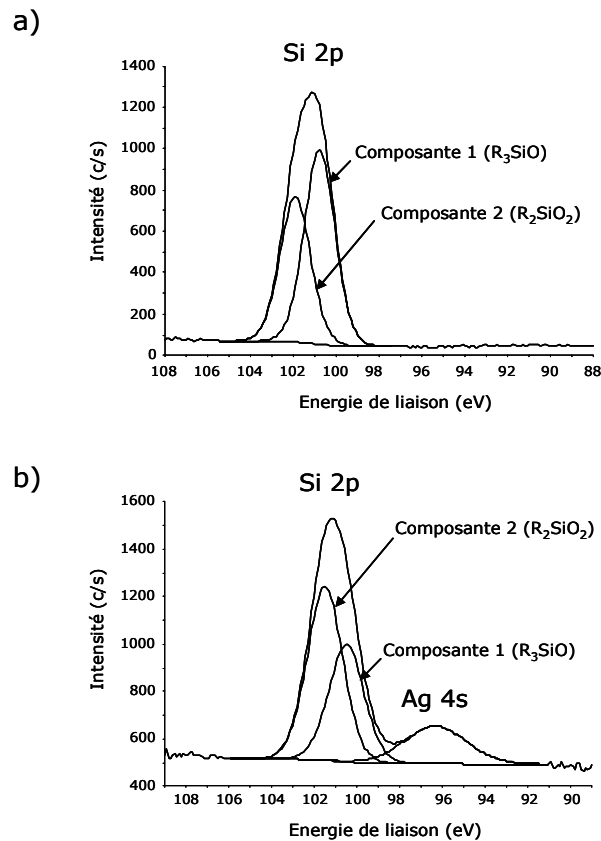


Figure 46. Spectres du niveau de cœur Si 2p des dépôts A (a) et B (b).

Ce phénomène d'oxydation en présence d'argent sous forme nanoparticulaire a été décrit par Hanus *et al.* (2009). Selon ces auteurs, les espèces Ag(0) et Ag(I) exercent une activité catalytique et provoquent l'oxydation des espèces hydrocarbonées qui sont à leur contact. Dans notre cas, l'argent métallique s'oxyde dès le contact du dépôt avec l'atmosphère ambiante, comme l'avons décrit au paragraphe III-A-3.2. On peut supposer que des réactions d'oxydation, similaires à celles reportées par Hlidek *et al.* (2008) et Hanus *et al.* (2009), se produisent sur les composants organosiliés de la matrice, qui englobent les nanoparticules affleurant en surface ou localisées dans les couches superficielles du dépôt.

Contrairement au dépôt A, pour lequel le pic C 1s est symétrique (Figure 41), le niveau de cœur C 1s des dépôts nanocomposites peut être décomposé en plusieurs pics élémentaires. La Figure 47 correspond à la superposition des niveaux de cœur C 1s, enregistrés pour les dépôts A à H. La composante principale des spectres, observée à 284,4 eV, est attribuée au carbone lié au silicium (Si-CH_x avec x = 1, 2, 3 ; Moulder, 1992). Sa largeur à mi-hauteur est similaire pour tous les dépôts contenant de l'argent. Elle est plus importante pour le dépôt de matrice A (Figure 47). Cette composante correspond aux espèces silico-carbonées, issues de la fragmentation/polymérisation du précurseur HMDSO lors du procédé PE-CVD.

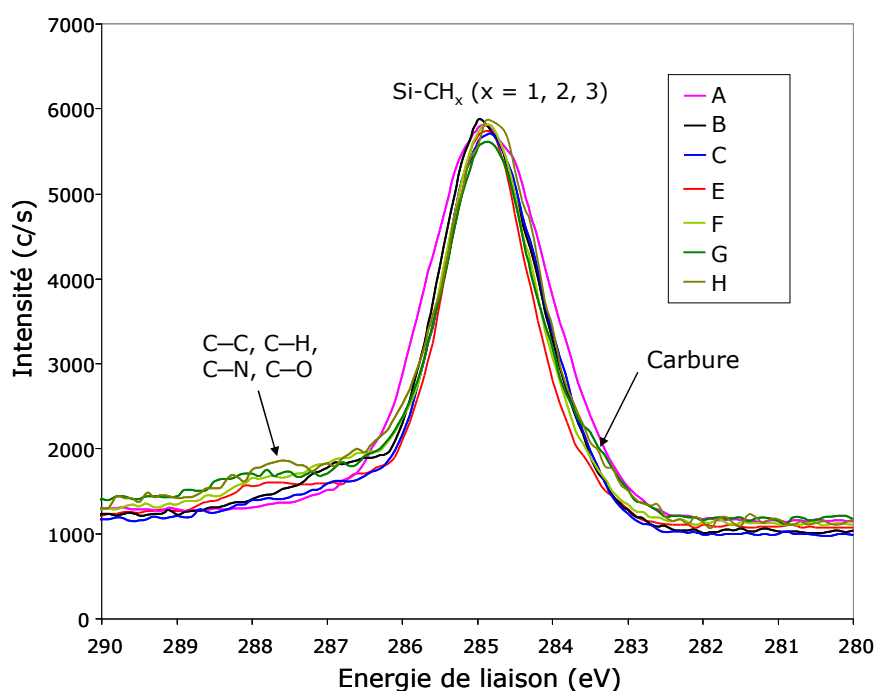


Figure 47. Superposition des spectres du niveau de cœur C 1s, enregistrés pour les dépôts A, B, C, E, F, G et H.

On remarque également un épaulement à 286,5 eV, correspondant au carbone des liaisons C–C et/ou C–H et aux liaisons C–O et/ou C–N. Cet épaulement est donc probablement associé au carbone constituant le dépôt, mais également à des composés organiques de contamination. Sur la Figure 47, on peut remarquer que ce pic est décelé principalement pour les dépôts contenant une quantité élevée d'argent (dépôts E, F, G et H). La présence d'argent dans les films nanocomposites semble donc favoriser l'adsorption de contaminants sur la surface. Ceci s'explique par le fait que ce métal présente une affinité importante pour les composés organiques (cf. Chapitres IV et V de la partie bibliographique).

Enfin, dans le cas des dépôts G et H, on observe une composante à basse énergie de liaison (283,7 eV), associée à des carbures (e.g., Si–C) et/ou des liaisons C=C. Des observations similaires ont été réalisées par Despax et Raynaud (2007). La présence d'une quantité importante d'argent dans les dépôts composites induit donc des modifications chimiques sensibles de la matrice organosiliciée. Ces transformations peuvent s'expliquer par l'activité catalytique de l'argent, sous forme Ag(0) et Ag(I), qui provoque notamment des réactions de déshydrogénation des espèces hydrocarbonées, conduisant à la formation de liaisons C=C (Hlidek *et al.*, 2008), et potentiellement à la formation de carbures, dans le cas de nos dépôts.

Le spectre du niveau de cœur O 1s présente une composante principale à 532,1 eV (Figure 44), associée majoritairement à l'oxygène des composés organosiliciés O–Si–CH_{x = 1, 2, 3} constituant la matrice (Moulder, 1992 ; Alexander *et al.*, 1999). Les espèces organiques du dépôt ainsi que les contaminants présents en surface peuvent également contribuer à cette composante. Un épaulement, attribué à l'oxygène de l'oxyde d'argent, est observé à une énergie de liaison égale à 530,2 eV. Rappelons que cette contribution de l'argent oxydé est également observée sur le pic Ag 3d_{5/2} pour une énergie de liaison de 369,6 eV (cf. partie III–A–3.2 de ce chapitre).

L'évolution de la composition de la matrice (rapports atomiques C/Si et O/Si) a été étudiée en fonction du contenu en argent des dépôts, représenté par le rapport atomique Ag/Si (Figure 48). Si l'on compare le dépôt de matrice A (Ag/Si = 0) avec les dépôts contenant de l'argent (Ag/Si = 0,5 à 2,5), on remarque que la présence de métal a tendance à augmenter les rapports C/Si (de 2,5 à plus de 3) et O/Si (de 0,7 à plus de 1). Dans ce cas, la formule chimique théorique des dépôts peut être notée SiC_{~3}O_{~1}:H (pour rappel, la formule de la matrice organosiliciée est SiC_{2,6}O_{0,7}:H ; cf. partie III-A-1 de ce chapitre).

En outre, dans le cas des dépôts contenant de l'argent (Ag/Si > 0,5 ; Figure 48), l'augmentation du rapport C/Si est lié à l'accroissement du ratio C(286,5 eV)/Si (le rapport C(284,4 eV)/Si reste sensiblement constant quel que soit le contenu en argent du dépôt). Comme évoqué précédemment, l'épaulement pic situé à 286,5 eV correspond au carbone des liaisons C–C, C–H,

C–O et/ou C–N. On peut donc en déduire que l'augmentation des rapports C/Si et O/Si, observée lorsque les dépôts contiennent de l'argent ($Ag/Si > 0,5$), est principalement causée par la présence de contaminants organiques en surface.

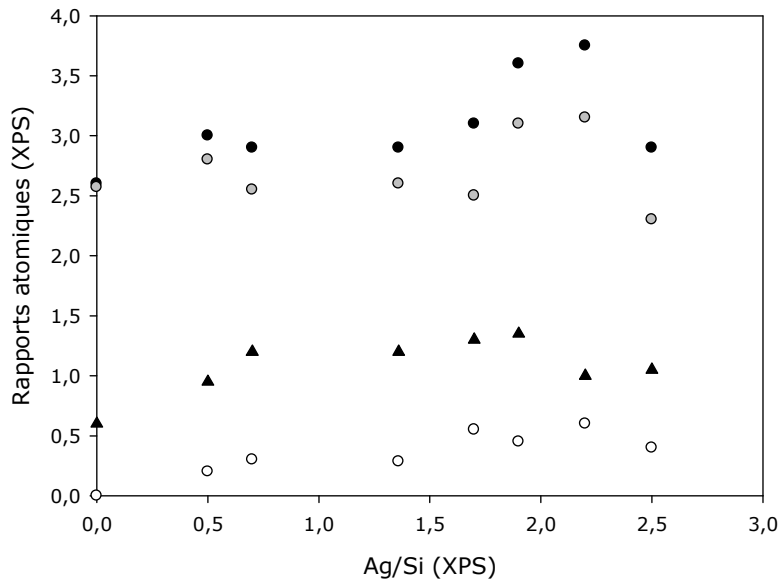


Figure 48. Evolution des rapports atomiques C/Si (●), C(284,4 eV)/Si (○), C(286,5 eV)/Si (○) et O/Si (▲).

B – Analyses de la composition des dépôts nanocomposites par spectroscopies FTIR et Raman

Suite à l'étude de l'extrême surface des dépôts nanocomposites par spectroscopie XPS (profondeur investiguée $\sim 5-10$ nm), nous nous sommes intéressés à l'analyse de leur structure chimique. La spectroscopie FTIR en transmission et la spectroscopie Raman permettent de décrire avec précision la nature des liaisons covalentes entre les différents atomes constituant les dépôts, car leur profondeur d'analyse (jusqu'à 5 μm) est largement supérieure à l'épaisseur du dépôt (*i.e.*, de l'ordre de quelques centaines de nm). Les analyses par spectroscopie FTIR ont été réalisées au LAPLACE et l'étude des différents dépôts par spectroscopie Raman a été mise en œuvre au Service Commun de Spectroscopies Infrarouge et Raman de l'Université Paul Sabatier (UPS) de Toulouse. Dans cette partie, nous allons tout d'abord décrire la structure chimique des dépôts de matrice A et I, synthétisés respectivement en absence ou en présence d'oxygène dans le plasma. Puis, nous évaluerons l'influence de la présence des nanoparticules d'argent sur les liaisons chimiques de la matrice, en comparant les résultats obtenus pour le dépôt A avec ceux déterminés pour les dépôts nanocomposites B à H.

1 – Composition et structure chimique du dépôt A

1.1 – Etude par spectroscopie FTIR

Le spectre infrarouge en transmission du dépôt A, synthétisé sur un coupon de silicium intrinsèque, est présenté sur la Figure 49. La principale caractéristique de ce spectre est la présence de deux larges massifs, centrés autour de $1015-990\text{ cm}^{-1}$ et $830-800\text{ cm}^{-1}$. La position et la largeur de ces bandes IR ne rendent pas aisée l'attribution des pics. La largeur des pics traduit le fait que la structure chimique du dépôt est amorphe.

La présence d'un pont Si–O–Si dans la formule théorique du précurseur HMDSO du dépôt, et la difficulté de fragmentation d'une telle liaison, permettent de suggérer l'attribution de la bande de haute intensité, située autour de 1000 cm^{-1} , à un pont Si–O–Si dans un environnement très déficitaire en oxygène. Cette hypothèse peut être étayée par les résultats de Fogarassy *et al.* (1994), qui ont étudié le spectre infrarouge du monoxyde de silicium. Ces auteurs ont démontré que l'oxydation progressive de ce composé conduit à un décalage du pic infrarouge principal, situé normalement à 980 cm^{-1} , vers 1070 cm^{-1} pour la silice en film mince (SiO_2). Par conséquent, le massif situé entre 990 et 1015 cm^{-1} est attribué en partie au mode d'étirement (« stretching ») asymétrique des liaisons Si–O–Si (Fogarassy *et al.*, 1994 ; Grill *et al.*, 2003).

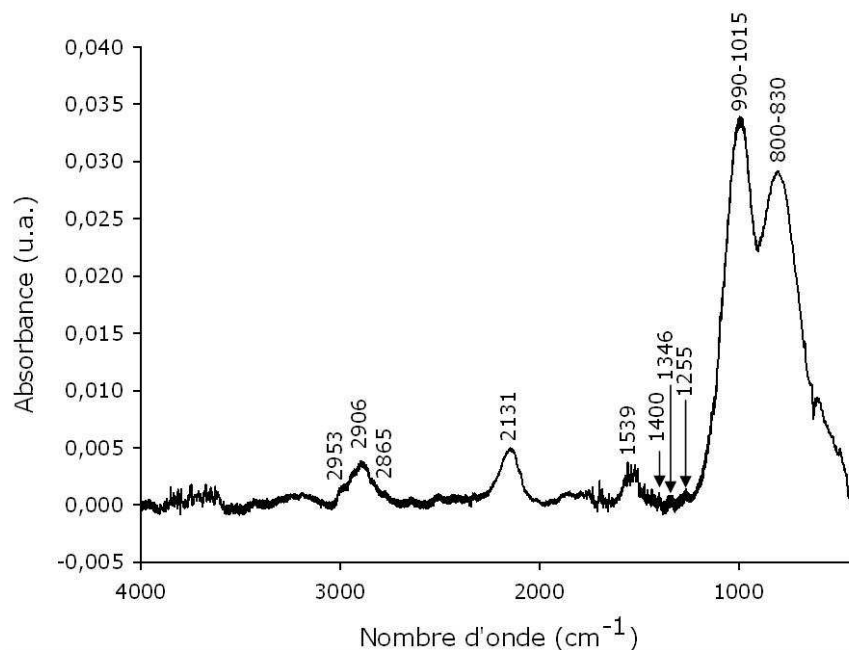


Figure 49. Spectre FTIR en transmission du dépôt A, synthétisé sur un coupon de silicium intrinsèque.

Une contribution des ponts Si-CH₂-Si ($\sim 1020 \text{ cm}^{-1}$) à ce massif est probable. En effet, d'après Matsutani *et al.* (2003) et Xu *et al.* (2000), la décomposition par plasma de molécules comme le HMDSO conduit à la formation d'un produit, doté de liaisons Si-(CH₂)_{n<2}-Si (pic IR à $1000\text{-}1020 \text{ cm}^{-1}$), accompagnées de liaisons Si-C (pic IR à 800 cm^{-1} environ). Dans le cas du dépôt A, la présence des liaisons Si-CH₂-Si est confirmée par le pic de faible intensité à 1346 cm^{-1} , caractéristique de la déformation (« scissoring ») des liaisons C-H des groupements méthylènes (C-H₂) dans un environnement Si-CH₂-Si (Xu *et al.*, 2000 ; Matsutani *et al.*, 2003), ainsi que par l'épaulement à 830 cm^{-1} , attribué aux liaisons Si-C. La présence de ces liaisons peut être expliquée par des réactions de recombinaison (polymérisation) ayant eu lieu lors du procédé de dépôt, suite à la décomposition des molécules de HMDSO par les électrons du plasma (Benitez *et al.*, 2000). Enfin, la présence de liaisons Si-O-C est possible. Néanmoins, les spectres IR des produits contenant ce type de groupement se caractérisent par deux bandes, localisés à $1200\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$ et $970\text{-}945 \text{ cm}^{-1}$. Dans le cas du spectre présenté Figure 49, seule la seconde bande apparaît.

Le second massif large, situé à 800 cm^{-1} , correspond aux vibrations d'étirement des liaisons Si-C et/ou à la déformation (« bending ») des liaisons Si-O (Benitez *et al.*, 2000 ; Grill *et al.*, 2003 ; Matsutani *et al.*, 2003), donc à un environnement de type O-Si-C, ce qui est en accord avec la structure chimique du précurseur HMDSO. La déformation (« rocking ») des liaisons C-H dans Si-(CH₃)₂ contribue également à ce massif (Benitez *et al.*, 2000 ; Vautrin-UI *et al.*, 2000).

Au niveau du pic à 800 cm^{-1} , on observe également un épaulement à 830 cm^{-1} , qui peut être attribué aux liaisons Si–C (« stretching ») et/ou C–H (« rocking ») des groupements $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ (Rau et Kulish, 1994 ; Grill *et al.*, 2003) et à corrélérer à la présence des pics de faible intensité, situés à 1255 cm^{-1} et 1400 cm^{-1} . Ces pics sont en effet associés à la déformation (symétrique et asymétrique) des liaisons C–H des groupements CH_3 dans un environnement $\text{Si}-(\text{CH}_3)_x$ (Rau et Kulish, 1994 ; Vautrin-UI *et al.*, 2000 ; Grill *et al.*, 2003). Ces résultats sont confirmés par le pic à 2906 cm^{-1} , attribué à l'étirement symétrique des liaisons C–H des groupements méthyles et entouré de deux épaulements à 2865 cm^{-1} et 2953 cm^{-1} , qui représentent les vibrations d'étirement symétrique des groupes C–H₂ et les vibrations d'étirement asymétrique des groupes C–H₃, respectivement (Rau et Kulish, 1994 ; Grill *et al.*, 2003).

L'ensemble des pics décrits ci-dessus sont également observés sur le spectre IR du précurseur HMDSO (Schwarz *et al.*, 1998), ce qui démontre que la décomposition du précurseur n'est pas totale lors de la croissance du dépôt A.

Il est possible d'attribuer le pic situé à 1539 cm^{-1} à des groupements C=C aromatiques, liés à H ou Si. Le pic observé à 2131 cm^{-1} peut correspondre au mode d'étirement des liaisons Si–H (Benitez *et al.*, 2000) ou à des groupements terminaux de type $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ (Despax et Raynaud, 2007). Ces pics ne sont pas observés dans les spectres IR du monomère HMDSO (Benitez *et al.*, 2000 ; Vautrin-UI *et al.*, 2000), tout comme la raie à 1346 cm^{-1} (*i.e.*, vibrations de déformation des liaisons C–H dans un environnement $\text{Si}-\text{CH}_2-\text{Si}$). Ils traduisent les mécanismes de polymérisation des fragments issus de la décomposition du HMDSO, au cours du processus de dépôt.

1.2 – Analyse par spectroscopie Raman

La spectroscopie d'absorption infrarouge permet la détection des liaisons hétéropolaires (*i.e.*, Si–O, Si–C, Si–H, C–H), mais fournit peu d'indications concernant les liaisons entre atomes de même nature (liaisons homopolaires), impliquées dans un environnement symétrique. Dans le but d'observer la présence de telles liaisons dans le dépôt A de matrice organosiliciée, des analyses complémentaires ont été réalisées par spectroscopie Raman. En effet, ce mode d'excitation favorise l'apparition de certaines transitions non observables en infrarouge, comme par exemple les liaisons carbone-carbone lorsque leur environnement est symétrique.

La Figure 50 présente le spectre Raman du dépôt A, synthétisé sur un coupon d'acier inoxydable. En effet, ce matériau n'a pas de spectre Raman. Cela permet d'identifier les liaisons homopolaires sans avoir d'effets parasites dus à des interférences avec le substrat, comme dans le cas du silicium intrinsèque, où le spectre des liaisons Si–Si (très actives en Raman) rendrait très difficile l'analyse du film mince lui-même.

La bande à 1477 cm^{-1} , observée Figure 50, indique un arrangement carboné de type « carbone amorphe », correspondant à un mélange de liaisons C=C, C–C et C–H. Ce type de spectre est généralement obtenu lors de l'analyse de dépôts synthétisés dans un plasma de précurseur hydrocarboné. Il correspond à un produit organique présentant une structure de polymère plus ou moins réticulé (Veres *et al.*, 2006). En raison de l'intensité élevée de la bande à 1477 cm^{-1} , le spectre de la Figure 50 démontre clairement la présence de « petits » domaines carbonés dans la matrice organosiliciée, avec une quantité significative de liaisons C=C.

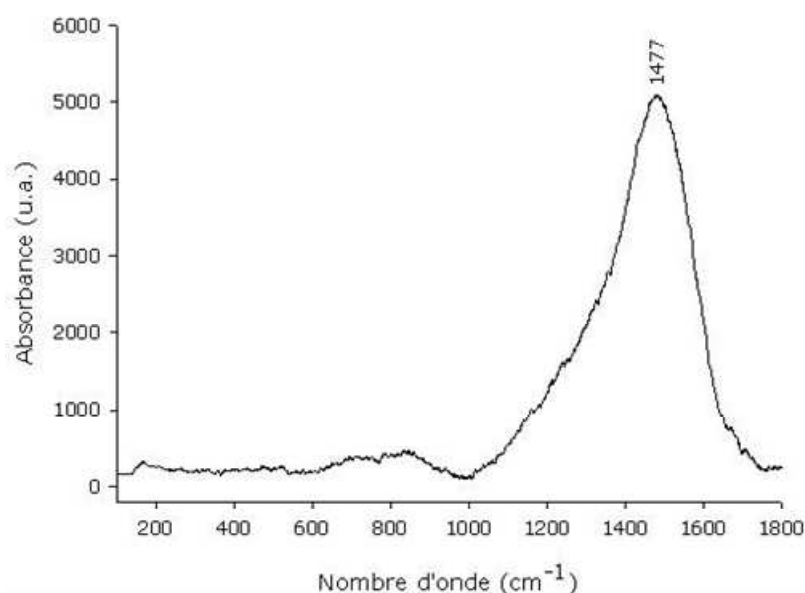


Figure 50. Spectre Raman du dépôt A, synthétisé sur un coupon d'acier inoxydable.

En conclusion, les analyses réalisées conjointement par spectroscopies infrarouge et Raman confirment les données obtenues en XPS pour l'extrême surface (cf. partie III-A-1 de ce chapitre), à savoir que la structure chimique du dépôt A est celle d'un matériau organosilicié de type $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ (liaisons Si–O–Si et O–Si–C, liaisons Si–C, Si–O et Si–H, groupes CH_3 , CH_2 , Si– CH_x et Si– $(\text{CH}_3)_x$). Prasad et ses collaborateurs (2005) ont réalisé des observations similaires en analysant par FTIR des dépôts $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ synthétisés par PE-CVD de HMDSO à 13,56 MHz (décharge RF). On observe également la présence de liaisons Si– CH_2 –Si, C=C et Si–H ou $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$, traduisant des réactions de dissociation du précurseur HMDSO, suivies par des réarrangements et la formation de nouvelles liaisons chimiques lors de la croissance du film mince. Une conclusion identique a été proposée par Benitez *et al.* (2000).

2 – Composition et structure chimique du dépôt I

2.1 – Etude par spectroscopie FTIR

La structure chimique du dépôt I, synthétisé en ajoutant de l'oxygène au précurseur organosilicié (HMDSO/O₂ : 1/10), est également analysée par spectroscopie FTIR en transmission. Cette technique va permettre de confirmer le caractère inorganique (SiO_x) de la couche mince, précédemment déterminé en extrême surface par spectroscopie XPS, par l'analyse des liaisons chimiques entre les différents éléments présents. Le spectre FTIR du dépôt synthétisé sur un coupon de silicium intrinsèque est présenté sur la Figure 51.

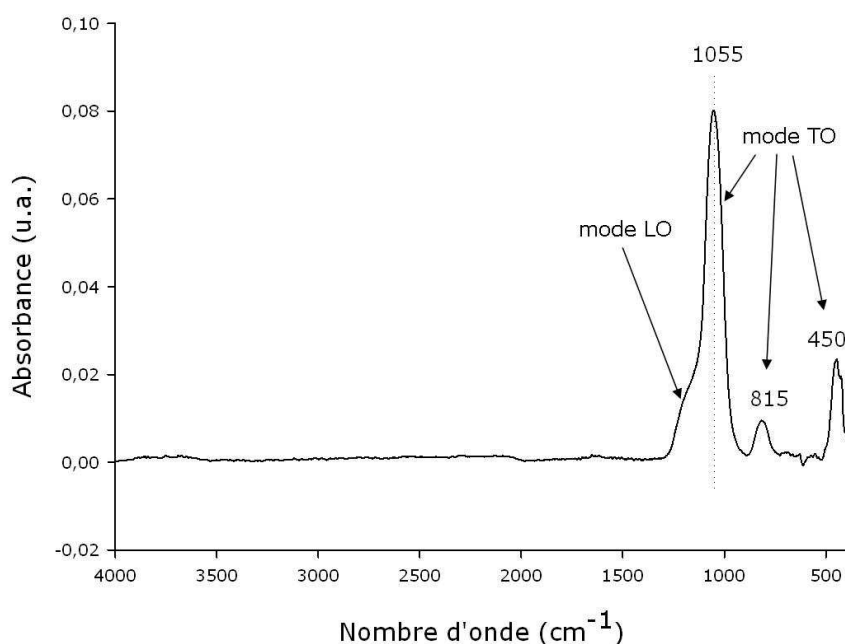


Figure 51. Spectre FTIR en transmission du dépôt I, synthétisé sur un coupon de silicium intrinsèque, en ajoutant de l'oxygène au précurseur organosilicié (HMDSO/O₂ : 1/10).

On observe trois bandes d'absorption principales, centrées à 450, 815 et 1055 cm⁻¹, ainsi qu'un épaulement à une fréquence supérieure à celle du pic le plus intense, soit 1170-1200 cm⁻¹. En se basant sur les données de la littérature (Kirk, 1988 ; Prasad *et al.*, 2005 ; Chayani *et al.*, 2005), les trois pics principaux sont attribués aux modes transverses optiques (TO)^{§§} du mouvement de balancement (« rocking ») des liaisons Si–O–Si, du mode d'étirement (« stretching ») symétrique des liaisons O–Si–O et du mode d'étirement asymétrique des liaisons Si–O, respectivement. L'épaulement à 1170-1200 cm⁻¹ est associé au mode longitudinal optique (LO) de la vibration d'étirement asymétrique des liaisons Si–O (Kirk, 1988 ; Chayani *et al.*, 2005). Ces résultats indiquent que le dépôt I se compose d'oxyde de silicium.

^{§§} La spectroscopie FTIR en transmission permet d'exciter les modes longitudinaux et transverses optiques d'une même liaison chimique, car l'angle d'incidence du faisceau est nul par rapport à la normale à l'échantillon (Bertrand *et al.*, 1997).

En outre, d'après Sawada *et al.* (1995), lorsque le pic d'adsorption à 1055 cm^{-1} est caractérisé par une faible largeur à mi-hauteur, comme c'est le cas pour notre dépôt (Figure 51), cela prouve que la structure du matériau analysé est proche de la stœchiométrie du SiO_2 . Ce résultat est confirmé par le rapport atomique O/Si égal à 1,9, déterminé par spectroscopie XPS (cf. partie III-A-2).

De plus, aucune bande d'adsorption correspondant aux liaisons CH_x ($x = 1, 2, 3$), Si-CH_x , $\text{Si-(CH}_3)_x$ ou Si-C n'est observée, confirmant l'absence d'espèces hydrocarbonées dans le dépôt I.

Ceci s'explique par le fait que l'oxygène injecté dans le plasma fournit des espèces très actives (oxygène atomique, radicaux), qui améliorent la dissociation du monomère organosilicié et favorisent l'oxydation des groupements méthyles (CH_3) en espèces volatiles (*i.e.*, H_2O et CO_2), qui sont ensuite pompées hors du réacteur (Vautrin-UI *et al.*, 2000 ; Prasad *et al.*, 2005). Le dépôt I est donc constitué exclusivement d'un réseau dense et inorganique, de type oxyde de silicium (Si-O-Si) amorphe, conformément aux résultats obtenus par spectroscopie XPS. Ce film mince correspond par conséquent à un dépôt de matrice « SiO_x ».

Des résultats similaires ont été obtenus par Prasad et ses collaborateurs (2005) avec le même rapport des débits de HMDSO et d'oxygène, ainsi que par Vautrin-UI *et al.* (2000) et Benitez *et al.* (2000), pour des contenus en oxygène plus faibles dans la phase plasma (*i.e.*, HMDSO/O_2 : 1/4 et 2/3, respectivement).

En comparant le spectre FTIR du dépôt I (Figure 51) avec celui de la matrice A (Figure 49, partie III-B-1), on constate que l'ajout d'oxygène au précurseur HMDSO, dans des proportions adéquates, a permis de moduler totalement les caractéristiques chimiques des revêtements, allant d'un caractère organique pur pour le dépôt A, à une composition exclusivement inorganique dans le cas du dépôt I. On remarque également un déplacement du pic correspondant au mode transverse optique (TO) des vibrations d'étirement des liaisons Si-O, qui passe de $1015\text{-}990\text{ cm}^{-1}$ dans le cas du dépôt A à 1055 cm^{-1} pour le dépôt I. Ceci s'explique par la présence d'un environnement plus oxydé dans le cas du dépôt SiO_x , comparativement au dépôt de matrice $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ (Fogarassy *et al.*, 1994 ; Vautrin-UI *et al.*, 2000 ; Chayani *et al.*, 2005) et confirme le fait que le dépôt I présente une structure chimique proche de celle de l'oxyde de silicium SiO_2 .

3 – Influence de la présence d’argent sur la structure chimique des dépôts nanocomposites

3.1 – Etude par spectroscopie FTIR

Les spectres infrarouge en transmission des dépôts nanocomposites A à H, synthétisés sur des substrats de silicium intrinsèque, sont représentés sur la Figure 52 (chaque spectre a été normalisé par rapport à l’épaisseur du dépôt). Un agrandissement de la zone, pour les nombres d’onde compris entre 400 et 2000 cm^{-1} , est présenté sur la Figure 53.

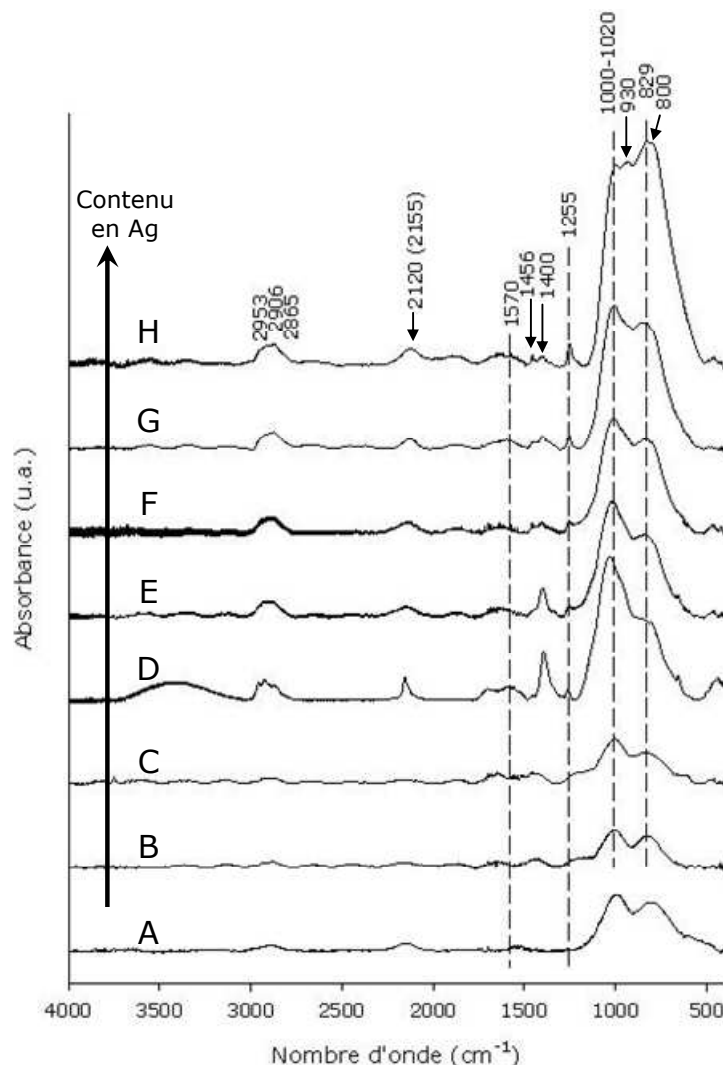


Figure 52. Spectres FTIR en transmission des dépôts nanocomposites A à H (quantité d’argent croissante), synthétisés sur des coupons de silicium intrinsèque.

La comparaison des spectres des dépôts B à H, contenant une quantité d’argent croissante (Tableau 14), au spectre IR de la matrice organosiliciée A nous permet d’étudier l’influence de la présence d’argent sur l’évolution de leur structure chimique. D’un point de vue qualitatif, les dépôts nanocomposites se caractérisent par un spectre IR très similaire à celui de la matrice organosiliciée seule.

Cependant, une distinction majeure correspond à l'augmentation de l'intensité du pic situé à 1255 cm^{-1} (*i.e.*, liaisons C–H dans un environnement $\text{Si}-(\text{CH}_3)_x$) pour des contenus en argent croissants. En comparaison, ce pic est à peine détectable dans le dépôt A de matrice organosiliciée (Figure 53). Il est également intéressant de remarquer l'augmentation de l'intensité du massif à $800\text{-}830\text{ cm}^{-1}$ par rapport à celle du massif à $1020\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, de manière corrélée au pourcentage d'argent dans les dépôts. Rappelons que le pic à 800 cm^{-1} correspond aux vibrations d'étirement des liaisons Si–C et probablement à la déformation des liaisons C–H dans $\text{Si}-(\text{CH}_3)_2$ (cf. partie III-B-1). De plus, l'épaule observée à 830 cm^{-1} dans le cas du dépôt A (*i.e.*, liaisons Si–C et/ou C–H des groupements $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) devient un pic discernable à 829 cm^{-1} dans le cas des dépôts D, E, F, G et H. Ces résultats sont corrélés à l'accroissement très net de l'intensité des pics à 2865 , 2906 et 2953 cm^{-1} (« stretching » symétrique des groupements hydrocarbonés CH_3 et CH_2) dans les dépôts D à H. On observe également une augmentation de l'intensité du pic à 1400 cm^{-1} (*i.e.*, « stretching » asymétrique des liaisons C–H dans un environnement $\text{Si}-(\text{CH}_3)_x$), notamment dans le cas des dépôts D et E. L'ensemble de ces observations converge vers le lien probable entre la présence d'argent et l'incorporation accrue de groupements méthyles dans les couches minces.

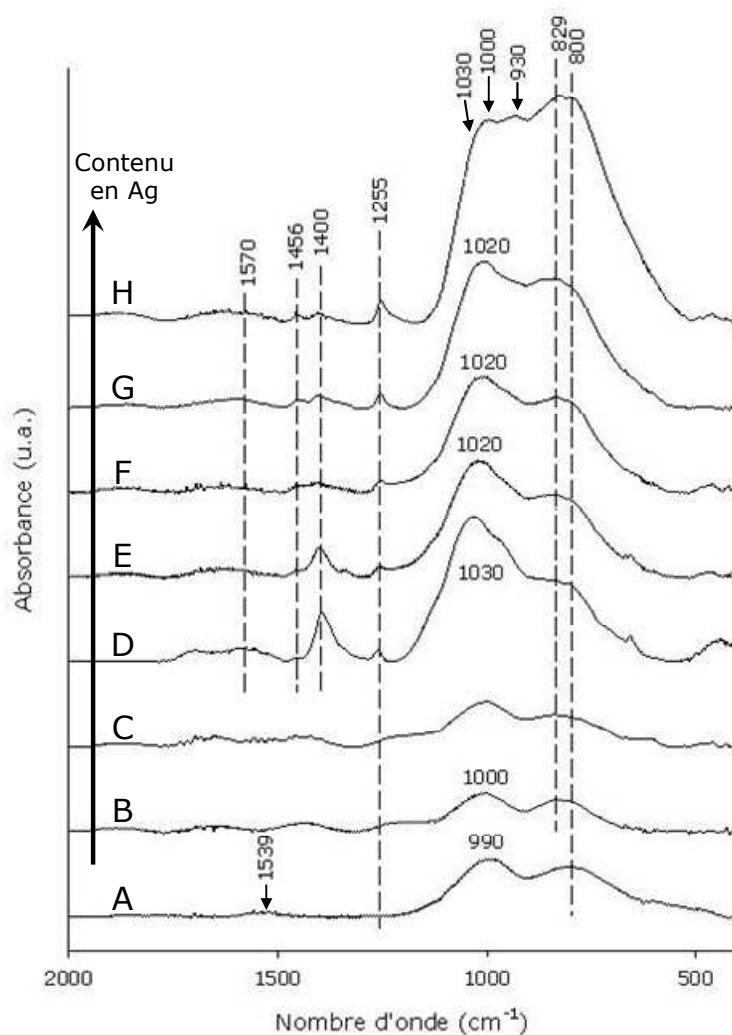


Figure 53. Agrandissement de la zone comprise entre 400 et 2000 cm^{-1} des spectres FTIR en transmission des dépôts nanocomposites A à H.

Le massif correspondant aux vibrations d'étirement des liaisons Si—O—Si est légèrement déplacé vers les plus hautes énergies dans le cas des dépôts D à H ($\sim 1020\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ et même 1030 cm^{-1} pour le dépôt D, au lieu de $1015\text{-}990\text{ cm}^{-1}$ dans le cas de la matrice sans argent). Ceci traduit une plus forte oxydation de l'environnement chimique du silicium, en présence d'une quantité d'argent élevée. De plus, un pic à 930 cm^{-1} , correspondant à des liaisons Si—O—C et/ou Si—OH, est détecté dans le cas du dépôt H (épaulement dans le cas des dépôts D à G), confirmant l'oxydation du silicium pour des contenus en argent importants. Ainsi, la présence de métal provoque l'incorporation d'oxygène dans les dépôts. Selon nos résultats, cet accroissement de la quantité d'oxygène, lié à la présence d'argent, se traduit par une oxydation de la matrice, et plus précisément du silicium (cf. paragraphe III-A-3.3).

Un pic à 1456 cm^{-1} est observé, sans que l'attribution des liaisons chimiques correspondantes puisse être établie.

La raie à 2120 cm^{-1} (liaisons Si—H et/ou $\text{—C}\equiv\text{C—H}$), peu visible dans le cas des dépôts A, B et C (Figure 52), est détectée pour les dépôts contenant une concentration en argent intermédiaire (dépôts D et E) et élevée (dépôts F à H). En outre, ce pic est déplacé vers les hautes énergies ($\sim 2155\text{ cm}^{-1}$) pour des pourcentages importants d'argent (Figure 52).

Enfin, les spectres des dépôts contenant des quantités d'argent intermédiaires et élevées (dépôts D à H) montrent une augmentation de l'intensité du pic situé à 1570 cm^{-1} , correspondant aux liaisons aromatiques C=C. Celles-ci proviennent peut-être de fragments carbonés pulvérisés, provenant de l'électrode cible, comme indiqué par Despax et Raynaud (2007).

3.2 – Etude par spectroscopie Raman

Pour compléter l'étude réalisée par FTIR et identifier les liaisons homopolaires impliquées dans un environnement symétrique, les dépôts nanocomposites B et D ont été analysés par spectroscopie Raman. Les spectres obtenus ont ensuite été normalisés par rapport à l'épaisseur des dépôts et comparés au spectre Raman du dépôt de matrice A (Figure 54).

En présence d'argent, on observe de manière générale une augmentation de l'amplitude des spectres, qui peut être attribué à l'effet SERS (« Surface Enhanced Raman Spectroscopy ») dû à la présence de particules métalliques.

Dans le cas du dépôt B, on constate que l'introduction d'une faible quantité d'argent ($\text{Ag/Si} = 0,7$, déterminé par XPS) dans la matrice induit une modification des arrangements carbonés. En effet, en plus de l'épaulement situé vers 1450 cm^{-1} , encore assimilable à du carbone amorphe, deux bandes supplémentaires sont observées à 1357 cm^{-1} et 1562 cm^{-1} . Selon les données de la littérature, les bandes situées entre 1550 et 1590 cm^{-1} (« G band ») sont attribuées à des domaines graphitiques purs et organisés (carbones sp^2), alors que la bande localisée autour de 1350 cm^{-1} (« D band ») correspond au graphite désordonné et peut également être liée à la

déformation des liaisons C–H des groupements CH₃ (Veres *et al.*, 2006). Ce dernier mode est généralement de très faible intensité en spectroscopie Raman, sauf dans le cas où les carbones sp³ des groupements CH₃ sont attachés à des atomes de carbone engagés dans des doubles ou des triples liaisons (Veres *et al.*, 2006).

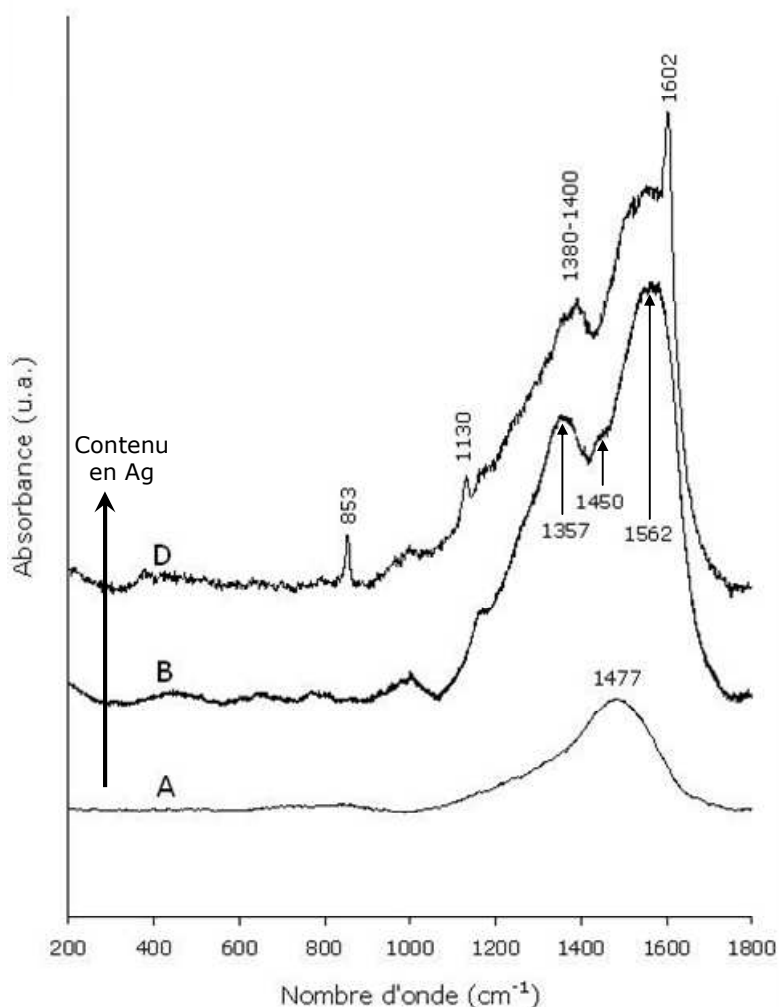


Figure 54. Spectre Raman des dépôts nanocomposites A, B et D, synthétisés sur des coupons d'acier inoxydable.

Dans le cas du dépôt D, l'épaulement situé vers 1450 cm⁻¹ est moins intense, comparativement aux dépôts A et B, ce qui démontre une diminution de la proportion de carbone amorphe au profit du carbone graphitique. De plus, la présence d'une quantité importante d'argent dans le film mince (Ag/Si = 1,3, déterminé par XPS) induit des modifications au niveau du spectre Raman, sans remettre en cause la présence de graphite (« G band »). Ainsi, on remarque un déplacement du pic de la « bande D », de 1357 cm⁻¹ vers la zone 1380-1400 cm⁻¹. Ceci pourrait indiquer de manière plus évidente la présence de groupements méthyles (carbones sp³), liés à des doubles ou des triples liaisons, comme exposé ci-dessus. En outre, trois pics étroits apparaissent sur le spectre du dépôt D (1602 cm⁻¹, 1130 cm⁻¹ et 853 cm⁻¹). La raie à 1602 cm⁻¹ pourrait être attribuée à une organisation du graphite correspondant à un empilement de cycles benzéniques (Veres *et al.*,

2006). Le pic à 1130 cm^{-1} est caractéristique de la vibration des liaisons sp^2 de chaînes hydrocarbonées, lorsque l'épaisseur du dépôt est inférieure à 300 nm (Veres *et al.*, 2006) ou pourrait correspondre à des défauts polyacétyléniques-trans entre les joints de grains du carbone « diamant » (Pfeiffer *et al.*, 2003). Le pic à 853 cm^{-1} , rarement observé, pourrait correspondre au mode transverse optique des liaisons C=C, observé vers 867 cm^{-1} dans le graphite ou les nanotubes de carbone (Dresselhaus *et al.*, 2002).

La spectroscopie Raman démontre qu'en présence d'argent (dépôts B et D), une partie des domaines carbonés présente une structure graphitique, alors qu'ils sont majoritairement sous forme amorphe dans le dépôt A de matrice seule. Toutefois, il faut souligner que l'effet SERS, induit par les nanoparticules d'argent, peut provoquer des artéfacts et augmenter artificiellement la proportion du graphite par rapport au carbone amorphe. La présence de liaisons C=C (chaînes hydrocarbonées) est également possible, notamment dans le cas du dépôt D, ce qui confirmerait les données obtenues en FTIR. Simultanément à la mise en évidence des liaisons C=C, on observe également la présence de carbones sp^3 (groupements méthyles) dans les dépôts contenant des proportions importantes d'argent, corroborant les résultats de spectroscopie FTIR.

3.3 – Conclusion sur l'influence de la présence d'argent sur la structure chimique de la matrice

Les techniques de spectroscopies FTIR et Raman démontrent que la présence d'argent dans les dépôts provoque des modifications chimiques de la matrice organosiliciée les constituant. Ainsi, on observe une augmentation de la quantité de groupements CH_3 et de liaisons hydrogénées (Si–H, C–H). Ces résultats confirment les données obtenues précédemment par Despax et Raynaud (2007) et semble indiquer que l'argent favorise la formation de produits hydrogénés, lors de la croissance du dépôt. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'argent sous forme métallique induit des réactions de réduction, donc d'hydrogénation, comme exposé par Hlidek *et al.* (2008). Dans notre cas, ce type de réactions peut se produire lors de l'interaction des nanoparticules d'argent avec la matrice du dépôt en cours de formation.

On constate également que la présence d'argent s'accompagne d'une augmentation de la quantité de liaisons C=C (carbone graphitique, cycles benzéniques, chaînes hydrocarbonées) et de liaisons $-C\equiv C-$ dans les dépôts D à H, par rapport au dépôt A de matrice seule. Comme évoqué précédemment, l'argent (métallique et oxydé), placé au contact d'espèces hydrocarbonées, provoque des réactions de déshydrogénation (Hlidek *et al.*, 2008). Ainsi, on peut supposer qu'une activité catalytique de ce type a lieu lors de la croissance des dépôts nanocomposites.

Enfin, la présence d'argent dans les dépôts nanocomposites provoque une incorporation d'oxygène et une oxydation de la matrice, plus précisément du silicium composant cette matrice (*i.e.*, environnement des liaisons Si–O–Si, apparition de liaisons Si–O–C et/ou Si–OH). Ce résultat peut être corrélé aux observations réalisées par spectroscopie XPS, qui ont révélé une oxydation du

silicium constituant les couches superficielles de la matrice, en présence d'argent (cf. paragraphe III-A-3.3). En complément de son rôle sur les liaisons hydrocarbonées, l'argent semble donc induire des réactions d'oxydation lors de la croissance et du stockage des dépôts. Cette observation confirme les résultats exposés par Despax et Raynaud (2007). Comme décrit dans le paragraphe III-A-3.3, Hanus *et al.* (2009) ont remarqué que des nanoparticules d'argent, englobées dans une matrice hydrocarbonée, catalysent des réactions d'oxydation. De plus, selon Hlidek *et al.* (2008), l'argent induit l'adsorption d'espèces oxygénées et de groupements radicalaires (liaisons insaturées) sur la surface des nanoparticules métalliques en cours de formation. Dans notre cas, ce phénomène peut se produire non seulement au cours de la croissance du dépôt, car la dissociation du précurseur HMDSO fournit des fragments contenant de l'oxygène et de nombreuses espèces radicalaires, mais aussi à l'ouverture du réacteur plasma. L'argent (métallique et oxydé), ainsi que les espèces oxygénées et les radicaux adsorbés sur les nanoparticules, provoquent l'oxydation de la matrice, observée par spectroscopie FTIR.

En conclusion, les nanoparticules d'argent, constituées de métal et d'oxyde métallique, combinent diverses activités catalytiques. L'ensemble de ces réactions a lieu à l'interface entre les nanoparticules et la matrice polymérique (Hlidek *et al.*, 2008) et induit différentes transformations et réarrangements chimiques du matériau, dans notre cas l'augmentation de la quantité de groupements méthyles et de liaisons hydrogénées, ainsi que l'oxydation des groupements organosiliciés constituant la matrice et la formation de liaisons C=C ou C≡C.

C – Analyses du profil de composition élémentaire des dépôts nanocomposites par spectroscopie ToF-SIMS

Afin de compléter la caractérisation des dépôts nanocomposites, des profils de composition en épaisseur ont été réalisés, par spectrométrie ToF-SIMS au LPCS de l'ENSCP, sur les dépôts B (Ag/Si = 0,7, déterminé par XPS) et G (Ag/Si = 2,5). Les ions négatifs ont été collectés, afin d'obtenir une meilleure détection des fragments provenant des espèces oxydées. La Figure 55 présente l'évolution des signaux correspondant aux ions négatifs Ag^- , Si^- , SiO^- , O^- , C^- , FeO^- et CrO^- , mesurés simultanément par le spectromètre à temps de vol, en fonction du temps de décapage du dépôt. Elle reflète la variation de la concentration de chaque composé en fonction de l'épaisseur du dépôt. Les conditions d'analyse (ions Bi^+) et de décapage (ions Cs^+) sont identiques pour les deux dépôts. Soulignons que l'axe des ordonnées correspond à une échelle logarithmique. Ce mode de représentation présente l'inconvénient de minimiser les fortes variations observées, mais permet de mieux visualiser les signaux de faible intensité.

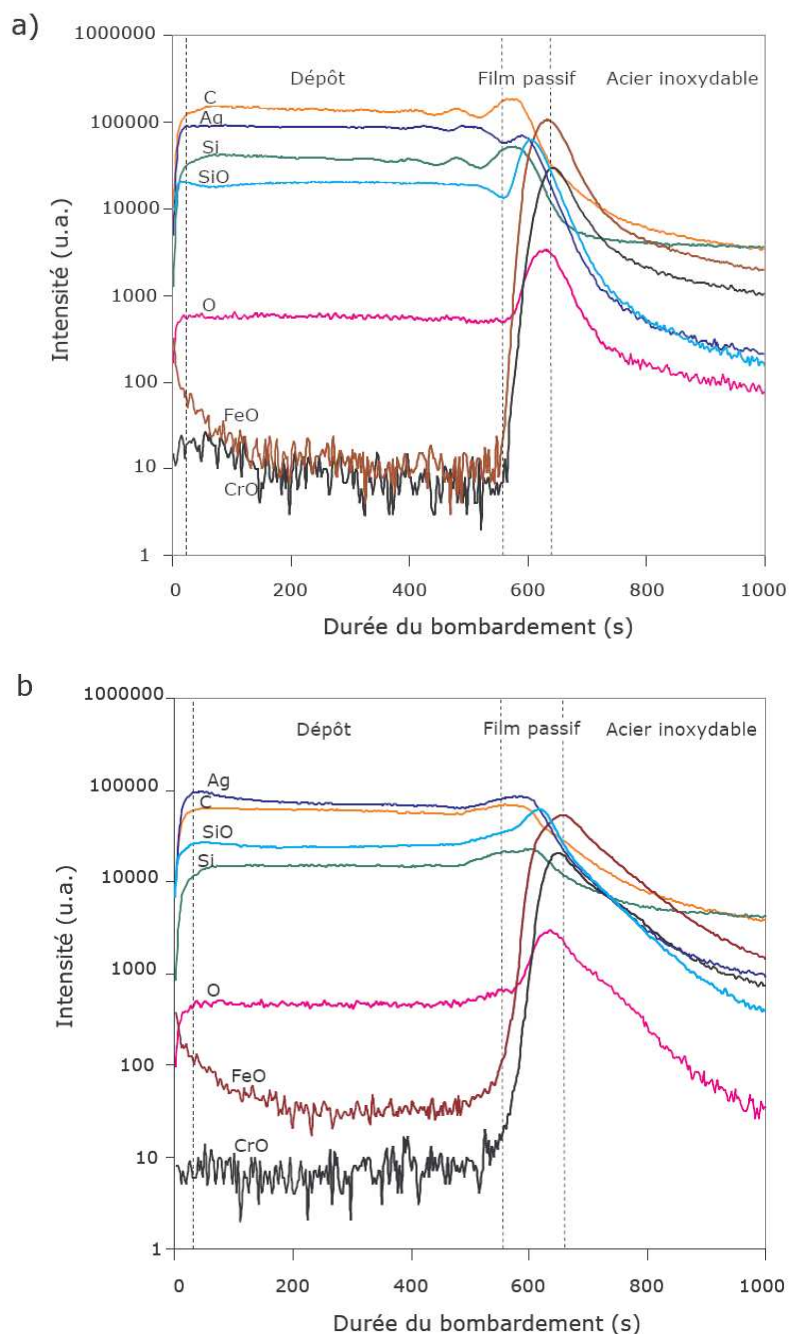


Figure 55. Profils en épaisseur des ions négatifs Ag^- , Si^- , SiO^- , O^- , C^- , FeO^- et CrO^- , obtenus par analyse ToF-SIMS avec des ions Bi^+ (découpage avec des ions Cs^+), pour les dépôts B (a) et G (b).

Pour les deux dépôts analysés, quatre régions ont été identifiées (Figures 55 a et b). La première partie des courbes, correspondant à une durée de découpage comprise entre 0 et 30 s, se caractérise par une augmentation graduelle des signaux dont l'intensité est élevée (Ag^- , Si^- , O^- , SiO^- , C^-). Elle correspond à la durée requise pour atteindre les conditions de stabilité de l'analyse et peut également s'expliquer par la présence d'une couche de contamination organique en surface. Pour les deux dépôts, on observe la présence d'une faible quantité d'oxyde de fer en extrême surface, qui peut provenir d'une contamination due à la manipulation des échantillons, malgré les précautions employées (*i.e.*, port de gants).

Dans la deuxième phase (jusqu'à 550 s de décapage ionique environ), l'intensité des signaux correspondant aux éléments Ag, Si, O, SiO et C atteint un plateau. Cette partie est donc associée au film mince nanocomposite. La composition des dépôts est homogène sur l'épaisseur. Comme attendu, une proportion d'argent plus importante (par rapport au signal du silicium) est observée dans le cas du dépôt G, comparativement au dépôt B (Figures 55 a et b). Pour le dépôt B (Figure 55 a), on constate que la proportion de silicium oxydé (signal SiO), par rapport au signal du silicium, est plus élevée en extrême surface que dans le cœur du dépôt. Ce résultat confirme les données obtenues en spectroscopie XPS, qui ont démontré une oxydation du silicium de l'extrême surface, en présence d'argent (cf. paragraphe III-A-3.3). Dans le cas du dépôt G (Figure 55 b), le rapport d'intensités SiO/Si est supérieur à celui du dépôt B, ce qui confirme une oxydation plus prononcée du silicium en présence d'une quantité importante d'argent ($Ag/Si = 0,7$ et $2,5$, pour les dépôts B et G, respectivement).

A partir de 550 s de décapage, on observe une modification de l'intensité relative des signaux, qui traduit l'apparition du film passif de l'acier inoxydable (Figures 55 a et b). Dans le cas du dépôt B (Figure 55 a), on constate tout d'abord une augmentation de l'intensité des éléments Si et C alors que celle du signal de l'argent diminue. Concernant le dépôt G (Figure 55 b), l'intensité des signaux d'Ag et de Si augmente plus que celle du signal correspondant au C. En outre, on observe une augmentation de la concentration de silicium oxydé pour le dépôt G, alors qu'elle diminue dans le cas du dépôt B. Ce résultat démontre que le silicium constituant la matrice du revêtement G est oxydé au niveau de l'interface dépôt/film passif. Ce phénomène peut être attribué à la présence d'une quantité importante d'argent au niveau de cette interface, qui provoque une oxydation des fragments organosiliciés lors de la croissance du film mince, comme discuté dans le paragraphe III-B-3.3.

On observe ensuite que l'intensité des signaux des éléments caractéristiques des dépôts nanocomposites (Ag, Si et C) diminue, à l'exception du signal de l'oxygène qui augmente. Ceci s'accompagne d'un accroissement très significatif de l'intensité des signaux FeO^- et CrO^- , qui correspondent aux oxydes/hydroxydes présents dans le film passif de l'acier inoxydable (cf. Chapitre I de la partie Résultats et Discussion). On remarque également que la diminution du signal SiO est plus tardive que celle des éléments Ag, Si et C. Ceci peut s'expliquer par le fait que le film passif, riches en oxydes et hydroxydes et soumis au bombardement ionique lors des premiers instants du dépôt des fragments organosiliciés, est une source d'oxygène actif pour la couche en croissance, qui induit probablement l'oxydation du silicium constituant les couches initiales de la matrice.

A partir d'un temps de décapage de 630 s (dépôt B) et 650 s (dépôt G), l'intensité des trois signaux O^- , FeO^- et CrO^- décroît, ce qui correspond à la transition vers le cœur de l'acier inoxydable 316L. Ensuite, le substrat d'acier est décapé (temps > 800 s).

L'analyse par spectroscopie ToF-SIMS confirme que les dépôts nanocomposites se fixent sur le film passif présent en surface de l'acier inoxydable AISI 316L. Le bombardement d'ions argon, réalisé pendant 20 min préalablement à l'élaboration des couches minces, a permis d'éliminer la majeure partie de la contamination organique de surface (cf. Chapitre I de la partie Résultats et Discussion), favorisant leur adhérence ultérieure au substrat. En outre, les résultats obtenus démontrent que les deux dépôts ont une épaisseur similaire, confirmant les mesures effectuées par profilométrie optique (cf. partie II-A de ce chapitre). La composition des dépôts analysés est homogène en épaisseur, jusqu'au niveau de l'interface dépôt/film passif. Le dépôt G est plus riche en argent sur toute son épaisseur, comme attendu au vu des résultats obtenus par spectroscopie XPS (Tableau 14) sur l'extrême surface.

Il est intéressant de remarquer que la composition de l'interface dépôt/film passif est différente : dans le cas du dépôt contenant une faible concentration d'argent (dépôt B), elle est enrichie en C et Si et appauvrie en Ag et en SiO par rapport à la composition du cœur du dépôt, alors qu'elle est plus riche en Ag, Si et SiO dans le cas du dépôt contenant une forte proportion d'argent (dépôt G). Pour expliquer l'enrichissement en Si, on peut citer les travaux de Wapner et Grundmeier (2005), qui ont observé par ToF-SIMS la formation de liaisons covalentes Si—O—Fe, au niveau de l'interface entre un dépôt synthétisé par plasma de HMDSO et une surface d'oxyde de fer, utilisée comme substrat. Par ailleurs, comme exposé précédemment, la présence d'une quantité importante d'argent au niveau de l'interface, dans le cas du dépôt G, a pu provoquer l'oxydation du silicium, expliquant l'accroissement du signal SiO observé dans ce cas. Enfin, l'enrichissement en carbone à l'interface dans le cas du dépôt B, et en argent pour le dépôt G, peut s'expliquer par les valeurs de T_{ON} mises en œuvre pour leur synthèse. Rappelons que la grandeur T_{ON} reflète la quantité de HMDSO injectée dans le réacteur (cf. partie I-A de ce chapitre). Ainsi, la probabilité qu'un fragment organosilicié se dépose sur la surface du film passif est plus grande lorsque la valeur de T_{ON} est plus élevée (*i.e.*, $T_{ON} = 1,60$ s pour le dépôt B ; Tableau 11). Au contraire, le dépôt d'atomes d'argent est statistiquement plus probable lorsque la valeur de T_{ON} est plus faible (*i.e.*, $T_{ON} = 1,10$ s pour le dépôt G). Il est possible que ces différences au niveau de l'interface avec le film passif influencent ensuite la tenue et la cohésion des dépôts nanocomposites.

D – Evaluation du caractère hydrophile/hydrophobe de la surface des dépôts

Pour compléter la caractérisation des dépôts A à I, la polarité de leur surface a été déterminée par mesure de l'angle de contact avec l'eau déionisée, selon la méthode de la goutte posée. Les valeurs indiquées dans le Tableau 15 correspondent à la moyenne de cinq mesures, réalisées sur trois échantillons issus de la même campagne expérimentale (dépôts sur acier inoxydable). Les résultats obtenus pour chaque dépôt (A, I et B à H) vont être interprétés sur la base de leur composition et de leur structure chimique, évaluées dans les paragraphes précédents.

Tableau 15. Angle de contact avec l'eau déionisée, déterminée par la méthode de la goutte posée sur les dépôts A à I.

Dépôt	$\theta_{\text{eau}} (^{\circ})$
A	$83,8 \pm 2,4$
B	$65,4 \pm 0,4$
C	$66,1 \pm 0,4$
D	$101,6 \pm 2,1$
E	$67,2 \pm 3,3$
F	$70,2 \pm 1,0$
G	$64,8 \pm 1,7$
H	$61,4 \pm 0,5$
I	$21,2 \pm 7,4$

ND : non déterminé.

1 – Caractérisation de la mouillabilité de surface dépôt A

Le dépôt A se caractérise par une valeur de θ_{eau} égale à $83,8 \pm 2,4^{\circ}$ (Tableau 15). Il est par conséquent qualifié d'hydrophobe, ce qui est cohérent avec la présence et de groupements hydrocarbonés (*i.e.*, CH_2 et CH_3) et de composés organosiliciés (*i.e.*, Si-C , Si-H , Si-CH_x , $\text{Si-(CH}_3)_x$, etc.) au sein du dépôt.

Ce résultat est dans la gamme répertoriée dans la littérature, bien que la plupart des auteurs mentionnent un angle de contact avec l'eau de l'ordre de 100° (Benitez *et al.*, 2000 ; Hegemann *et al.*, 2003 ; Prasad *et al.*, 2005). Par exemple, Janocha et ses collaborateurs (2001) ont synthétisé des couches minces organosiliciées de nature hydrophobe ($\theta_{\text{eau}} = 104,7 \pm 2,6^{\circ}$) par décharge RF dans un plasma de HMDSO. Cette différence peut s'expliquer par une dissociation plus poussée du précurseur HMDSO dans notre étude, due à la mise en œuvre d'une tension d'auto-polarisation plus élevée (750-800 V), à un débit d'argon plus important ou à un débit de HMDSO plus faible que ceux employés dans les travaux cités ci-dessus. Raynaud *et al.* (2005) ont ainsi démontré que l'augmentation de la puissance injectée dans une décharge micro-onde de HMDSO provoquait une dissociation plus poussée du précurseur, se traduisant par une diminution de la quantité de groupements CH_3 dans le dépôt synthétisé. L'hypothèse émise est cohérente car les ratios entre

l'intensité des pics IR situés à 1253 cm^{-1} , 2906 cm^{-1} et 2953 cm^{-1} (*i.e.*, vibrations des groupements CH_3) et l'intensité de la bande à $990\text{--}1015\text{ cm}^{-1}$ (attribuée en partie à Si--O--Si) (Figure 49), sont plus faibles que ceux observés sur les spectres de Benitez *et al.* (2000) et Prasad *et al.* (2005), indiquant une dissociation plus importante du HMDSO dans notre cas. La quantité de groupements CH_3 hydrophobes (en regard des liaisons Si--O--Si) étant plus faible dans notre étude que dans les travaux de la littérature, il est logique que le caractère hydrophobe de notre dépôt A soit moins prononcé.

L'angle de contact mesuré ci-dessus correspond à l'angle d'avancée et peut être influencé par des hétérogénéités physiques (rugosité de surface) et chimiques (composition de l'extrême surface, contamination organique). Par conséquent, des mesures d'angle de contact en mode dynamique ont également été effectuées sur le dépôt A, comme préconisé par Drelich *et al.* (1996) et Müller *et al.* (2001). L'angle de retrait obtenu est égal à $52,5 \pm 7,2^\circ$. L'hystérésis entre l'angle d'avancée et l'angle de retrait est donc égal à $31,3 \pm 9,6^\circ$. Une valeur d'hystérésis de $32,5^\circ$ a été obtenue par Grimoldi *et al.* (2009) pour des revêtements synthétisés par PE-CVD ($13,56\text{ MHz}$) de HMDSO sur des substrats de polyéthylène. Comme rappelé par ces auteurs, il est connu dans la littérature que pour une surface idéale, parfaitement lisse, homogène et non réactive chimiquement, l'hystérésis est égale à 0. Dans le cas de dépôts organosiliciés synthétisés par procédé PE-CVD, la surface n'est pas homogène d'un point de vue chimique : à une échelle microscopique, elle est composée d'une combinaison de zones de différentes mouillabilités (Grimoldi *et al.*, 2009). De plus, des contaminants organiques peuvent être adsorbés sur la surface du dépôt. L'hystérésis de l'angle de contact, observée sur le dépôt A, s'explique en partie par cette hétérogénéité chimique. En outre, la topographie de la surface augmente la valeur de l'hystérésis (Gao et McCarthy, 2006). Bien que la rugosité du dépôt A soit très faible ($R_a < 2\text{ nm}$), elle peut également expliquer le résultat obtenu. En effet, les crevasses présentes en surface du dépôt exercent une force de rétention sur l'eau adsorbée.

Bien que le dépôt A de matrice organosiliciée constitue une couche « barrière », limitant les interactions entre le film passif de l'acier inoxydable et les microorganismes, son caractère hydrophobe peut *a priori* nuire à son efficacité anti-adhésive.

2 – Evaluation de la nature hydrophile/hydrophobe du dépôt I

En se basant sur sa structure chimique, le dépôt de matrice I doit théoriquement présenter des propriétés de surface similaires à celles de la silice ou du verre. Pour s'en assurer, son caractère polaire/apolaire a été évalué par mesure de l'angle de contact avec l'eau déionisée. La valeur moyenne de l'angle d'avancée, déterminée sur trois dépôts issus de la même campagne expérimentale, est égale à $21,2 \pm 7,4^\circ$ (Tableau 15). Le dépôt I peut donc être qualifié d'hydrophile. En effet, le réseau Si--O--Si le constituant favorise l'établissement de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau. Le résultat obtenu est similaire à ceux reportés dans la littérature pour des films de type SiO_x (Benitez *et al.*, 2000 ; Santos *et al.*, 2004). L'angle de retrait

n'a pas pu être déterminé dans le cas du revêtement I, car la goutte d'eau déposée sur l'échantillon s'étalait systématiquement, en raison de l'hydrophilie de surface.

Contrairement au dépôt A organosilicié, la matrice I de type SiO_x présente des propriétés de surface hydrophiles, qui pourraient défavoriser plus fortement l'adhésion microbienne, par établissement d'une couche répulsive de molécules d'eau en surface du dépôt. L'effet « barrière », couplé à la caractéristique hydrophile, constitue un atout majeur dans la mise au point d'un traitement de surface visant à prévenir l'attachement des cellules à l'acier inoxydable.

3 – Détermination de la polarité de surface des dépôts nanocomposites B à H

La caractéristique hydrophile/hydrophobe de la surface des dépôts nanocomposites B à H a été évaluée par méthode de la goutte posée (Tableau 15). Seule la détermination de l'angle d'avancée a été réalisée.

Les dépôts B et C, contenant une faible proportion d'argent (Tableau 14), se caractérisent par des angles de contact avec l'eau proches de 65° . Cette valeur est inférieure à celle déterminée dans le cas de la matrice organosiliciée sans argent (dépôt A : $\theta_{\text{eau}} = 83,8 \pm 2,4^\circ$), ce qui peut s'expliquer par la présence d'une faible quantité d'argent et d'oxyde d'argent en surface des dépôts (Tableau 14), ainsi que par l'oxydation de la matrice (et plus précisément du silicium), observées par spectroscopie XPS.

Le dépôt D ($\text{Ag}/\text{Si} = 1,3$, déterminé par XPS) présente une surface hydrophobe ($\theta_{\text{eau}} = 101,6 \pm 2,1^\circ$). Cette caractéristique peut être attribuée à l'augmentation de la quantité de carbone en surface (*i.e.*, accroissement du rapport C/Si observé en XPS ; Figure 48) et dans le dépôt (liaisons $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{C}$), et plus particulièrement à l'enrichissement en groupements méthyles (par rapport aux liaisons $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$), observé sur le spectre FTIR du dépôt D (Figure 52).

Enfin, les angles de contact avec l'eau déterminés pour les dépôts E à H sont compris entre 60 et 70° , correspondant à des surfaces moyennement hydrophobes. Cette augmentation de la polarité, par rapport au dépôt D, peut s'expliquer par la présence d'une quantité plus importante d'argent dans les dépôts E à H (Tableau 14). Elle peut être corrélée à l'incorporation d'oxygène en surface (*i.e.*, augmentation du rapport atomique O/Si observée en XPS ; Figure 48). L'oxydation de la matrice (et plus précisément du silicium) et des nanoparticules d'argent présentes en surface (cf. paragraphes III-A-3.2 et 3.3), peut également être à l'origine d'une diminution de l'angle de contact avec l'eau. En conclusion, aucune corrélation n'a pu être établie entre la teneur en argent des dépôts et leur mouillabilité de surface.

Comme dans le cas du dépôt A, l'hydrophobie de surface des films minces B à H pourrait s'avérer préjudiciable à leur efficacité anti-adhésive.

Conclusion

Dans le but de modifier les surfaces d'acier inoxydable 316L, des films minces (~ 175 nm), constitués de nanoparticules d'argent englobées dans une matrice polymérique, ont été déposés par PE-CVD radiofréquence (13,56 MHz) dans un plasma de HMDSO, couplé au bombardement d'une cible en argent.

Le réglage des paramètres opératoires (V_{bias} , P_{HMDSO}) et le contrôle de la composition du plasma *in situ* et en ligne par spectroscopie d'émission optique (OES) ont permis d'ajuster le processus de pulvérisation de l'argent par rapport à la fragmentation/polymérisation du précurseur organosilicié. La composition des dépôts nanocomposites étant liée à celle de la phase plasma au cours du procédé de dépôt, un panel de 8 films minces, présentant différents contenus en argent (Ag/Si de 0 à 2,5), a été synthétisé.

La topographie du dépôt A de matrice organosiliciée ne contenant pas d'argent coïncide avec celle du substrat d'acier inoxydable natif. Au contraire, la surface des dépôts nanocomposites est granulaire et constellée de nanoparticules d'argent distribuées uniformément. D'après les analyses effectuées par spectroscopie XPS, les nanoparticules présentes en surface sont composées d'argent métallique et d'une faible proportion d'argent oxydé en périphérie, due à leur contact avec l'atmosphère ambiante. Les observations en MET, ainsi que les analyses par EDS et ToF-SIMS, réalisées sur les dépôts D, B et G, mais qui peuvent être extrapolées aux autres films nanocomposites, ont confirmé la présence de nanoparticules d'argent, sur la totalité de l'épaisseur. Ces particules métalliques sont réparties de manière homogène, ce qui démontre l'efficacité de l'injection du HMDSO en mode pulsé pour le contrôle fin du procédé.

Dans le cas des dépôts contenant une quantité faible ou intermédiaire d'argent (dépôts B à E), les nanoparticules ont une forme sphérique et leur répartition en taille est homogène (diamètre compris entre 3 et 15 nm dans le cas du dépôt D). Ceci constitue un résultat intéressant dans le cadre de la mise au point de surfaces biocides, car plusieurs études démontrent que les nanoparticules d'argent dont le diamètre est compris entre 5 et 10 nm sont les plus réactives vis-à-vis des microorganismes. Les observations par MET ont également démontré que les nanoparticules sont facettées (dépôt D), ce qui peut accroître leur réactivité en milieu biologique. Les images MEB montrent que les dimensions des nanoparticules métalliques augmentent avec le contenu en argent et que leur distribution en taille est plus étalée dans le cas des dépôts riches en argent (pour le dépôt H, taille de certains agrégats de l'ordre de 100 à 200 nm).

La composition et la structure chimique des dépôts de matrice organosiliciée contenant ou non de l'argent ont été étudiées par XPS et par spectroscopies FTIR et Raman, puis comparées. La matrice constituant les dépôts (sans ou avec argent) est un matériau organosilicié de type $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$, qui a conservé en partie la structure chimique du précurseur HMDSO, mais se différencie par la présence de liaisons chimiques spécifiques, conséquence directe des réactions de polymérisation au cours du procédé de dépôt. Cette matrice, contenant ou non des nanoparticules métalliques, forme un film

« barrière » recouvrant complètement le substrat d'acier inoxydable. On peut donc supposer que ces revêtements vont limiter l'adhésion des microorganismes à l'acier inoxydable 316L (cf. Chapitre I de la partie Résultats et Discussion), même si leur caractère plutôt hydrophobe (θ_{eau} compris entre 60° et 100°) peut être un élément préjudiciable.

La présence d'argent dans les dépôts induit des modifications de la structure chimique du matériau organosilicié, plus précisément, l'incorporation de groupements méthyles et de liaisons hydrogénées (Si-H, C-H), la formation de liaisons C=C (carbone graphitique) et $\text{—C}\equiv\text{C—}$, ou encore, une faible oxydation de la matrice au niveau du silicium (liaisons Si-O-Si, Si-O-C et/ou Si-OH). On peut ainsi supposer que l'argent (métallique et oxydé) exerce une activité catalytique sur les composés organosiliciés lors de la croissance des dépôts nanocomposites. Malgré ces différences concernant la structure chimique à l'échelle moléculaire, la composition des films minces est homogène en épaisseur, comme démontré par spectroscopie ToF-SIMS, avec toutefois des variations au niveau de l'interface dépôt/film passif, en fonction du contenu en argent.

Afin de moduler les caractéristiques physico-chimiques de la matrice (organique/inorganique), de l'oxygène a été ajouté au précurseur HMDSO, dans des proportions adéquates (HMDSO/O₂ : 1/10), permettant d'obtenir des revêtements siliciés de type SiO_x (x~2). Contrairement au dépôt A de matrice organosiliciée, qui présente une surface moyennement hydrophobe, ce dépôt inorganique se caractérise par une surface hydrophile, *a priori* plus propice à des effets anti-adhésifs *via* l'établissement d'une couche de molécules d'eau en surface du dépôt.

L'utilisation combinée de méthodes d'analyse complémentaires, opérées à différentes échelles (macro- et microscopique, moléculaire, atomique), a permis de caractériser de manière quasi-exhaustive les propriétés morphologiques, chimiques et physico-chimiques des dépôts nanocomposites synthétisés par procédé plasma. L'étude réalisée va ainsi permettre une meilleure compréhension des effets provoqués par ces films minces sur les trois microorganismes d'étude. L'évaluation de l'activité anti-adhésive et biocide des revêtements nanocomposites fait l'objet du prochain chapitre.

CHAPITRE III – CARACTERISATION DES PROPRIETES ANTI-ADHESIVES ET ANTIMICROBIENNES DES DEPOTS NANOCOMPOSITES***

Au cours de cette étude, nous avons observé que la modification de la composition et l'augmentation du caractère hydrophile des surfaces d'acier inoxydable 316L, selon un traitement chimique (bain de décapage H_2O_2/H_2SO_4) ou physique (bombardement d'ions argon), n'a eu aucune incidence sur l'adhésion de *S. cerevisiae*, évaluée en chambre à écoulement cisailé, comparativement à un nettoyage de référence. Par conséquent, la stratégie adoptée pour limiter la colonisation microbienne des surfaces a consisté à recouvrir l'acier inoxydable d'un revêtement composite, synthétisé par procédé plasma et composé de nanoparticules d'argent métallique englobées dans une matrice organosiliciée. L'objectif est d'obtenir une surface combinant des propriétés anti-adhésives et une activité biocide vis-à-vis des microorganismes réussissant à interagir avec la surface. Une caractérisation complète des dépôts ainsi constitués a été réalisée par le couplage de différentes techniques d'analyse multi-échelles, permettant de mieux appréhender leur réactivité une fois en contact avec les microorganismes (planctoniques vs. sessiles). La suite du travail a donc été consacrée à l'évaluation de l'effet anti-adhésif par méthode hydrodynamique (chambre à écoulement cisailé) et à la détermination de l'activité biocide de ces revêtements sur *S. cerevisiae*, avec une analyse fine des mécanismes d'action du nano-argent. Une comparaison de l'efficacité antimicrobienne a ensuite été effectuée sur les bactéries modèles sélectionnées (*S. aureus* et *E. coli*), en relation avec leurs propriétés de surface (composition et structure de la paroi cellulaire, hydrophilie/hydrophobie).

I - Evaluation de l'efficacité anti-adhésive et biocide des dépôts nanocomposites sur *S. cerevisiae*

A – Caractérisation de l'adhésion des levures sur les différents dépôts par méthode hydrodynamique

1 – Propriétés anti-adhésives de la matrice organosiliciée ($SiC_xO_yH_z$) et du dépôt silicié inorganique (SiO_x)

L'adhésion de *S. cerevisiae* BY4741 sur la surface des dépôts de matrice de types $SiC_xO_yH_z$ (dépôt A) et SiO_x (dépôt I) a été quantifiée *in situ* par méthode hydrodynamique, en utilisant une chambre à écoulement cisailé. Rappelons que cette technique consiste à appliquer, dans des

*** Une partie des travaux décrits dans ce chapitre a fait l'objet de deux articles, intitulés "Plasma-engineered polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of microbial adhesion" et "Plasma deposition of organosilicon polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of microbial adhesion", publiés respectivement dans les journaux "Solid State Phenomena" et "Applied Surface Science" (2009).

conditions physico-chimiques données, des paliers successifs de débits d'une durée fixée à 3 min, pour détacher des cellules préalablement adhérees à la surface de l'échantillon testé. Dans notre étude, réalisée à pH $\sim 6,5$ et température ambiante, le fluide circulant est une solution de NaCl, de force ionique égale à 0,15 M. Les profils de détachement obtenus sur matrice $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ et SiO_x , préalablement nettoyés par acétone/éthanol, ont été comparés à celui déterminé pour l'acier inoxydable 316L nettoyé selon le même protocole, qui constitue la référence (Figure 56). A noter que, pour une meilleure visualisation, un agrandissement de la zone entre 0 et 30 Pa a été effectué. Le Tableau 16 présente le nombre de levures initialement adhérees (*i.e.*, après 1 h de temps de contact en conditions statiques) dans la zone d'observation du coupon (surface = 0,096 mm²). Sur la base de travaux précédents (Mercier-Bonin *et al.*, 2004 ; Guillemot *et al.*, 2006), les contraintes de cisaillement pariétales nécessaires au détachement de 2% (τ_p 2%), 50% (τ_p 50%) et 90% (τ_p 90%) des cellules initialement adhérees ont été choisies comme paramètres représentatifs (Tableau 16).

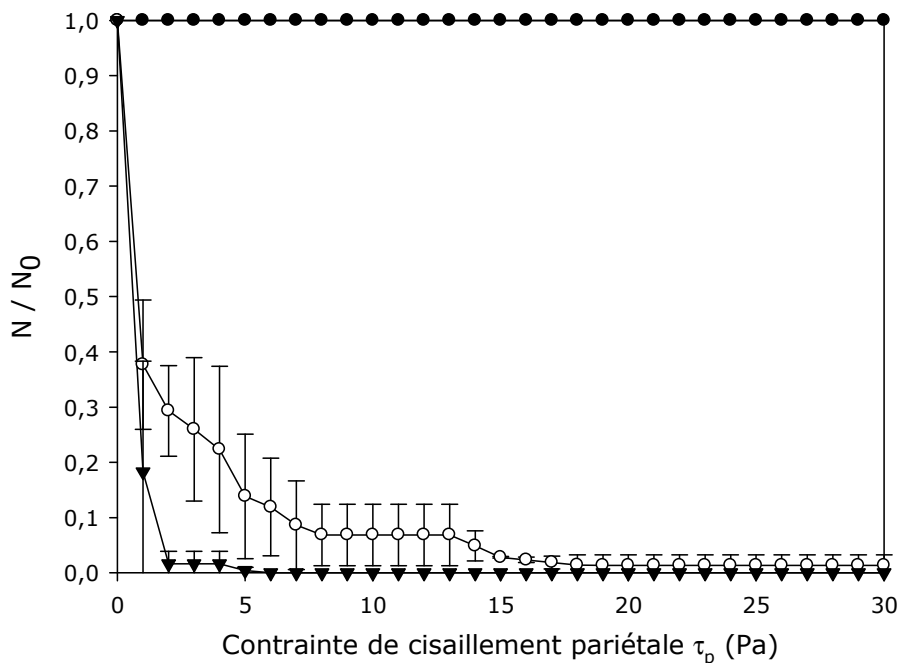


Figure 56. Profils de détachement obtenus pour les levures *S. cerevisiae* BY4741 préalablement adhérees à la surface d'un coupon d'acier inoxydable vierge nettoyé par acétone/éthanol (●), à la surface d'un coupon recouvert du dépôt A de matrice $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ (○) et à la surface d'un coupon recouvert du dépôt I de matrice SiO_x (▼) (NaCl 0,15 M).

Tableau 16. Nombre de levures initialement adhérees (N_0) sur les différentes surfaces et contraintes de cisaillement nécessaires au détachement de 2% (τ_p 2%), 50% (τ_p 50%) et 90% (τ_p 90%) des cellules initialement adhérees.

Dépôt	N_0 (nombre de levures/cm ²)	τ_p 2% (Pa)	τ_p 50% (Pa)	τ_p 90% (Pa)
Acier inoxydable (référence)	$8,2 \cdot 10^4 \pm 1,9 \cdot 10^4$	NA	NA	NA
Dépôt A (matrice SiC _x O _y H _z)	$3,8 \cdot 10^4 \pm 0,2 \cdot 10^4$	$0,02 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,35$	$8,77 \pm 6,51$
Dépôt I (matrice SiO _x)	$4,2 \cdot 10^4 \pm 1,4 \cdot 10^4$	$0,11 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,21$	$1,18 \pm 0,63$

NA : non atteint

Pour les dépôts A et I, on remarque que le nombre de levures initialement adhérees (N_0) est plus de deux fois plus faible que celui déterminé dans le cas de l'acier inoxydable (Tableau 16), car une proportion importante (\sim 50-70 %) des levures injectées dans la chambre à écoulement a été éliminée dès la mise en circulation du fluide. Ceci peut être dû à une variabilité au sein de la population de levures, conduisant à des propriétés de surface différentes, ainsi qu'à des hétérogénéités au niveau de la surface des dépôts, à l'échelle locale. Cette observation constitue une première indication de l'efficacité anti-adhésive des dépôts de matrice A et I.

En comparant les profils de détachement déterminés pour les matrices organosiliciée et siliciée (dépôts A et I) avec celui obtenu sur l'acier inoxydable de référence (Figure 56), on observe des différences très significatives dans l'aptitude au détachement des levures. Contrairement à la surface d'acier inoxydable pour laquelle aucun détachement n'est observé, même pour une contrainte de cisaillement maximale de 80 Pa (cf. Chapitre I de la partie Résultats), le pourcentage de levures restant adhérees aux surfaces des dépôts A et I diminue avec l'augmentation de la contrainte appliquée. Plus de 90% des levures initialement adhérees aux dépôts A et I sont détachées pour une contrainte τ_p proche de 8,8 Pa et de 1,2 Pa, respectivement (Tableau 16). Le détachement est total pour une contrainte de cisaillement pariétale de 15 Pa et de 5 Pa, respectivement. A noter que les valeurs de τ_p 2% et τ_p 50% sont proches (Tableau 16). L'absence de seuil confirme les propriétés anti-adhésives de ces dépôts de matrice, toutefois plus marquées pour I comparativement à A.

La rugosité de surface des dépôts A et I ($1,8 \pm 0,3$ nm et $1,6 \pm 0,1$ nm, respectivement ; Tableau 13 du Chapitre II) étant similaire à celle du substrat d'acier inoxydable ($1,3 \pm 0,1$ nm), les différences observées ne peuvent pas être attribuées à cette caractéristique.

En comparant la valeur de l'angle de contact à l'eau déterminée pour le dépôt A de matrice organosiliciée ($\theta_{\text{eau}} = 83,8 \pm 2,4^\circ$) à celle mesurée sur l'acier inoxydable 316L nettoyé par acétone/éthanol ($\theta_{\text{eau}} = 92,6 \pm 3,9^\circ$), on constate que les deux matériaux présentent un caractère hydrophobe. De même, l'angle de contact avec l'eau déterminé pour le dépôt I de matrice siliciée ($\theta_{\text{eau}} = 21,2 \pm 7,4^\circ$) est relativement proche de celui mesuré sur les surfaces d'acier inoxydable décapées par H₂O₂/H₂SO₄ ($\theta_{\text{eau}} = 6,2 \pm 1,3^\circ$) et bombardées par plasma d'argon ($\theta_{\text{eau}} = 29,1 \pm$

3,5°). Pourtant, un comportement bio-adhésif totalement différent a été observé pour ces différentes surfaces (Figure 56). Ceci confirme l'hypothèse énoncée au Chapitre I, à savoir que l'adhésion de *S. cerevisiae* à l'acier inoxydable ne s'explique pas par des propriétés physico-chimiques macroscopiques, telle que la polarité.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons conclure à une efficacité anti-adhésive des dépôts de matrice organosiliciée $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ et de matrice siliciée SiO_x . Cette propriété est illustrée par les photographies présentées sur la Figure 57, où l'on observe un nombre de cellules adhérees beaucoup plus faible sur la surface de ces dépôts par rapport à la surface d'acier inoxydable, après application d'une contrainte de cisaillement identique de 1 Pa. La stratégie employée s'avère donc concluante, contrairement aux modifications chimiques et physiques des surfaces d'acier, exposées dans le Chapitre I. Les contraintes de cisaillement nécessaires pour détacher la totalité des levures (*i.e.*, 15 Pa et 5 Pa pour les dépôts $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ et SiO_x , respectivement) sont de l'ordre de grandeur de celles mises en œuvre dans les procédures de nettoyage en place (NEP) des industries agro-alimentaires (Brugnoni *et al.*, 2007).

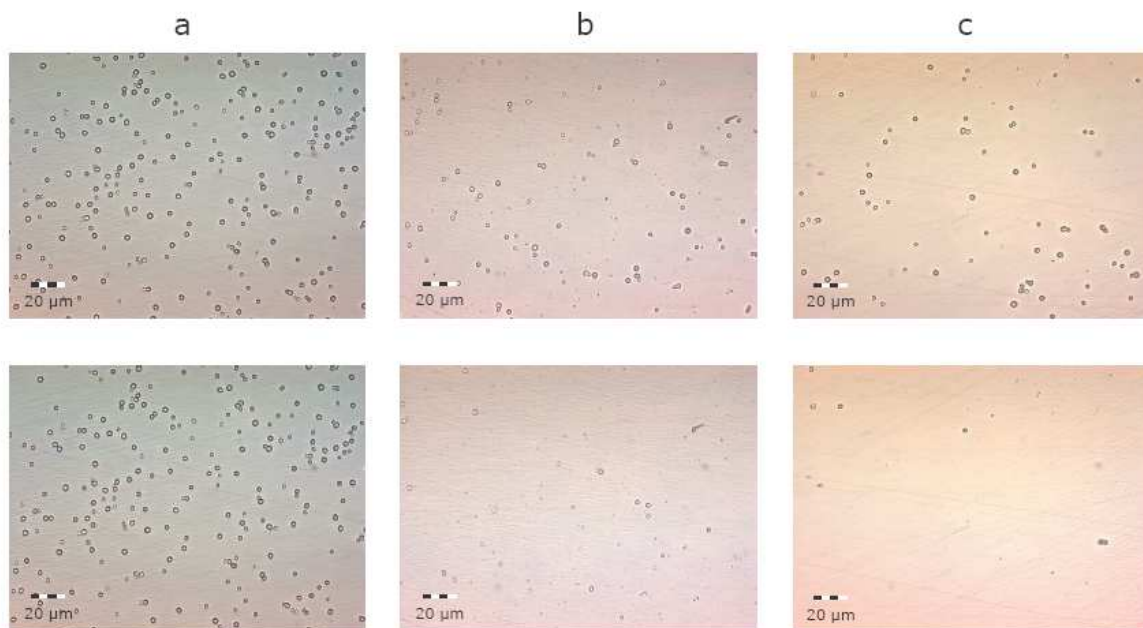


Figure 57. Photographies en microscopie optique des levures *S. cerevisiae* BY4741 initialement adhérees (1^{ère} ligne) et restant adhérees après l'application d'une contrainte de cisaillement de 1 Pa (2^{ème} ligne), sur la surface d'un coupon d'acier inoxydable vierge nettoyé par acétone/éthanol (a), du dépôt A de matrice organosiliciée (b) et du dépôt I de matrice siliciée (c).

Lehocky *et al.* (2006) ont effectué un traitement de surface comparable aux conditions du dépôt A, en déposant des films minces organosiliciés hydrophobes sur des substrats de polycarbonate, grâce à une décharge de HMDSO à pression atmosphérique. Les auteurs ont observé, en conditions statiques, une adhésion faible voire nulle de *S. cerevisiae* aux dépôts ainsi synthétisés, par rapport au substrat non traité. En outre, la structure chimique du dépôt I est proche de celle de l'oxyde de silicium SiO₂ (*i.e.*, liaisons Si–O–Si), donc du verre. Un détachement similaire à celui décrit dans le cas du dépôt I a été observé précédemment par Guillemot *et al.* (2006), avec une souche industrielle de *S. cerevisiae*, après adhésion sur une surface de verre dans les mêmes conditions physico-chimiques (NaCl 0,15 M).

Comme démontré par spectroscopies XPS, FTIR et Raman, les dépôts de matrice organosiliciée sont polymériques et exclusivement constitués de composés siliciés (R₃SiO et R₂SiO₂, avec R = CH_x) et organiques (CH₃, CH₂, C–C, etc.). Leur épaisseur est de l'ordre de 175 nm. De plus, aucun élément métallique, constitutif de l'alliage (Fe²⁺/Fe³⁺, Cr³⁺, Mo⁶⁺), n'a été détecté par spectroscopie XPS à la surface des échantillons recouverts. Par conséquent, le revêtement de matrice organosiliciée forme un film « barrière » non conducteur, masquant la couche d'oxydes/hydroxydes de l'acier inoxydable, ce qui limite toute interaction avec la paroi cellulaire, notamment *via* la suppression des mécanismes de transfert de charge (Poortinga *et al.*, 1999 ; Mei *et al.*, 2009).

Les propriétés de surface des revêtements sont modulables *via* la gestion des paramètres opératoires externes. L'introduction d'oxygène dans le réacteur plasma, simultanément à l'injection du précurseur HMDSO (HMDSO/O₂ : 1/10), permet ainsi d'obtenir un dépôt de matrice SiO_x (x ~ 2) (cf. Chapitre II de la partie Résultats), plus efficace dans la prévention de la colonisation des surfaces, comparativement à la matrice SiC_xO_yH_z. Outre l'effet « barrière » retrouvé ici, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce dernier résultat.

En se référant à la littérature concernant les surfaces de silice SiO₂ immergées dans un milieu aqueux, on constate que ce type de matériau acquiert une charge de surface négative, par l'intermédiaire de la dissociation des groupements silanols (SiOH <=> SiO⁻ + H⁺) (Iler, 1979). En outre, la surface de *S. cerevisiae* est chargée négativement, comme démontré par Mercier-Bonin *et al.* (2004). Ceci pourrait expliquer l'efficacité anti-adhésive du dépôt I, par l'intermédiaire de phénomènes de répulsion électrostatique (Mozes *et al.*, 1987). Cependant, la solution saline employée dans notre étude se caractérise par un pH proche de la neutralité et une force ionique très élevée (NaCl 0,15 M ; pH ~ 6,5). Par conséquent, l'épaisseur de la double couche ionique au niveau de chaque interface est faible, inhibant tout effet de répulsion électrostatique. Des observations similaires ont été reportées par Vernhet et Bellon-Fontaine (2005), pour *S. cerevisiae* adhérente à des surfaces de verre, dans des conditions de force ionique élevée (*i.e.*, KNO₃ 0,06 M).

Comme exposé précédemment, le dépôt I présente une surface hydrophile ($\theta_{\text{eau}} = 21,2 \pm 7,4^\circ$). Cette dernière propriété renforce l'efficacité anti-adhésive, par l'accroissement des interactions de type « répulsion hydrophile » entre la surface solide et les levures. Comme exposé par Legeay *et al.* (2006), l'élaboration d'un film mince hydrophile sur un matériau, notamment par procédés de dépôt plasma, empêche la formation d'une couche stable de cellules par structuration des molécules d'eau à l'interface cellule/substrat. Dans notre cas, des travaux précédents, réalisés sur *S. cerevisiae* BY4741 en phase stationnaire de croissance, ont permis d'estimer le caractère hydrophile/hydrophobe et les propriétés donneur/accepteur d'électrons de la surface microbienne, par la méthode de partition MATS (« Microbial Adhesion To Solvents ») (Guillemot *et al.*, 2007). Les résultats montrent que la surface cellulaire est relativement hydrophile (*i.e.*, affinité des levures pour les solvants apolaires, hexadécane et décane, de l'ordre de 20-40%), avec un caractère donneur d'électrons, expliquant les phénomènes de « répulsion hydrophile » avec la surface du dépôt I.

Les propriétés anti-adhésives plus marquées des dépôts SiO_x par rapport aux dépôts de matrice organosiliciée, du fait de leur polarité plus élevée, sont en accord avec les résultats exposés par Prasad *et al.* (2005), sur des cellulaires musculaires de rat. De même, Janocha et ses collaborateurs (2001) ont comparé différents revêtements synthétisés par plasma dans des décharges RF de HMDSO/ O_2 et présentant une mouillabilité de surface variable. Ils ont observé une adsorption plus faible de la protéine modèle BSA sur les dépôts les plus hydrophiles ($\theta_{\text{eau}} \sim 25^\circ$), synthétisés avec un rapport des débits de gaz de 1/8.

2 – Evaluation de l'effet anti-adhésif des dépôts nanocomposites

Des nanoparticules d'argent ont été englobées dans la matrice organosiliciée, dans le but d'obtenir des revêtements de surface présentant des propriétés biocides combinées à l'efficacité anti-adhésive démontrée précédemment. Il est donc nécessaire d'évaluer l'aptitude au détachement de *S. cerevisiae* BY4741 après adhésion sur les différents dépôts composites, afin de déterminer l'impact de la présence des nanoparticules d'argent sur le maintien ou non des propriétés mises en évidence dans le cas de la matrice seule. Des expériences de détachement ont ainsi été réalisées sur les dépôts nanocomposites B, C et D (quantité d'argent croissante). Les profils de détachement obtenus ont ensuite été comparés à ceux déterminés pour le dépôt A (matrice $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$) et pour l'acier inoxydable 316L vierge (Figure 58). Le Tableau 17 répertorie le nombre de levures initialement adhérees sur chaque type de surface, ainsi que les contraintes de cisaillement pariétales caractéristiques.

Tableau 17. Nombre de levures initialement adhérees (N_0) sur les différentes surfaces et contraintes de cisaillement nécessaires au détachement de 2% (τ_p 2%), 50% (τ_p 50%) et 90% (τ_p 90%) des cellules initialement adhérees.

Dépôt	N_0 (nombre de levures/cm ²)	τ_p 2% (Pa)	τ_p 50% (Pa)	τ_p 90% (Pa)
Acier inoxydable (référence)	$8,2 \cdot 10^4 \pm 1,9 \cdot 10^4$	NA	NA	NA
Dépôt A ($\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$)	$3,8 \cdot 10^4 \pm 0,2 \cdot 10^4$	$0,02 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,35$	$8,77 \pm 6,51$
Dépôt B	$8,9 \cdot 10^4 \pm 2,2 \cdot 10^4$	$0,06 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,30$	$5,71 \pm 1,71$
Dépôt C	$8,8 \cdot 10^4 \pm 2,0 \cdot 10^4$	$0,28 \pm 0,25$	$4,26 \pm 1,15$	NA
Dépôt D	$7,3 \cdot 10^4 \pm 1,3 \cdot 10^4$	$21,04 \pm 4,29$	$36,45 \pm 0,42$	NA

NA : non atteint

Dans le cas des dépôts nanocomposites E, F, G et H contenant une quantité élevée d'argent (Ag/Si > 1,7), un délitement a été observé dès le contact avec la solution saline, se traduisant par un aspect visuel granuleux et non uniforme. Cette mauvaise tenue mécanique s'explique d'une part, par les effets de « percolation » (pénétration de la solution saline dans le dépôt), amplifiés par la teneur en argent, et d'autre part par une adhérence insuffisante des dépôts au substrat. En effet, rappelons que l'analyse réalisée par spectroscopie ToF-SIMS sur le dépôt G avait montré une interface dépôt/couche passive enrichie en Ag et en silicium oxydé, provoquant certainement un effet de cisaillement avec les éléments métalliques de l'acier (cf. paragraphe III-C du Chapitre II).

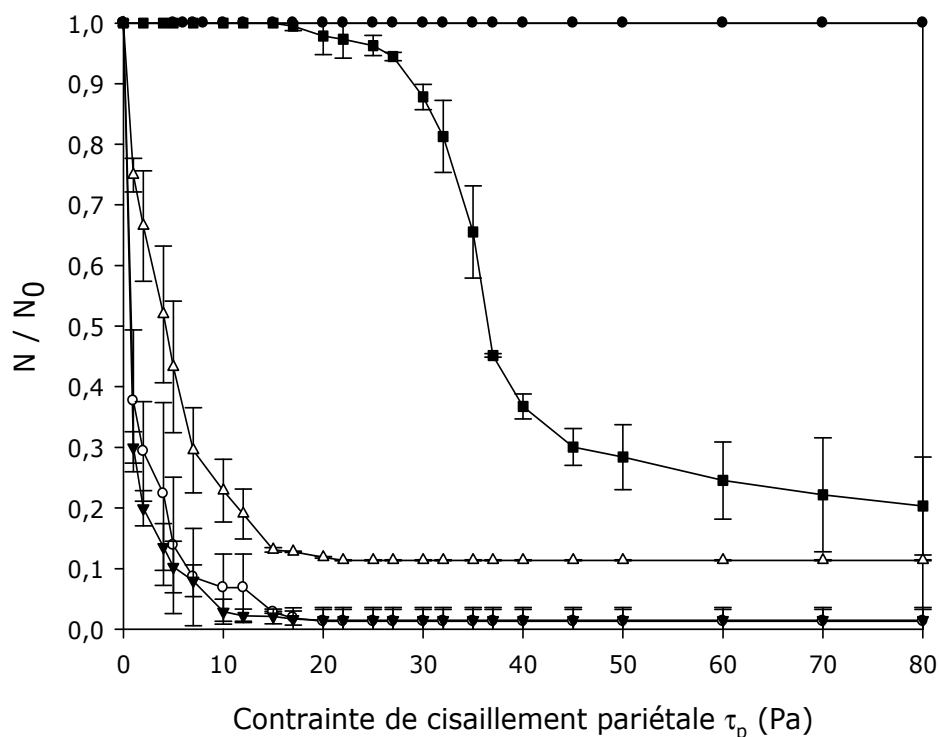


Figure 58. Profils de détachement obtenus pour les levures *S. cerevisiae* BY4741 préalablement adhérentes à la surface d'un coupon d'acier inoxydable vierge nettoyé par acétone/éthanol (●) et à la surface des coupons recouverts des dépôts A (○), B (▼), C (▲) et D (■) (NaCl 0,15 M).

Pour les dépôts nanocomposites B, C et D, le nombre de levures initialement adhérentes à la surface (N_0) est similaire à celui obtenu pour l'acier inoxydable de référence (Tableau 17). De plus, aucun détachement des levures n'est observé lors de la mise en circulation de la solution saline (données non présentées).

En comparant les profils de détachement obtenus pour les dépôts A (matrice organosiliciée), B, C et D, on constate que leur efficacité anti-adhésive est inversement liée au contenu en argent. Dans le cas du dépôt B ($Ag/Si = 0,7$), les contraintes de cisaillement ($\tau_{p\ 2\%}$, $\tau_{p\ 50\%}$ et $\tau_{p\ 90\%}$) nécessaires au détachement des levures sont quasiment identiques à celles déterminées pour le dépôt A (Tableau 17). Concernant le dépôt C ($Ag/Si = 0,5$), on constate que la valeur de $\tau_{p\ 50\%}$ est supérieure à celle déterminée pour les dépôts A et B (Tableau 17) et que la totalité des levures n'est pas détachée pour une contrainte de cisaillement maximale appliquée de 80 Pa ($\tau_{p\ 90\%}$ non atteint ; Tableau 17 et Figure 58). L'aptitude au détachement des levures est fortement réduite dans le cas du dépôt D, correspondant à la quantité d'argent maximale testée ($Ag/Si = 1,3$). En effet, aucun détachement n'est observé pour des contraintes inférieures à 18 Pa et $\tau_{p\ 2\%}$ est égale à $21,0 \pm 4,3$ Pa (Tableau 17). La contrainte de cisaillement nécessaire au détachement de 50% des cellules initialement adhérentes est proche de 35 Pa, valeur 70 fois plus élevée que dans le cas de la matrice seule. Enfin, environ 20% des levures initialement présentes restent adhérentes au dépôt D pour une contrainte de cisaillement de 80 Pa ($\tau_{p\ 90\%}$ non atteint ; Tableau 17 et Figure 58). Néanmoins, malgré la

réduction de l'efficacité anti-adhésive observée, le dépôt D permet d'obtenir un détachement cellulaire, contrairement à l'acier inoxydable traité par voie chimique ou physique (bombardement ionique).

Pour expliquer ces différences de comportement, plusieurs hypothèses peuvent être formulées. La première serait liée à la forte affinité de l'argent (distribué uniformément sur la surface sous la forme de nanoparticules, qui s'oxydent au contact du milieu aqueux), pour les groupements biologiques (thiols, carboxyles, carbonyles, phosphates, hydroxyles, amines) présents sur la paroi cellulaire (cf. Chapitres IV et V de la partie bibliographique). On peut supposer que, dans les conditions choisies (*i.e.*, temps de contact de 1 h), la libération d'ions Ag^+ , issus de l'oxydation des nanoparticules d'argent, dans le milieu environnant est minime. Restant majoritairement confiné au sein de la structure nanocomposite, l'argent présente une capacité élevée de « piégeage » des levures. Une autre hypothèse repose sur l'incorporation de groupements méthyles dans la matrice du dépôt D, observée par spectroscopie FTIR et corrélée à une hydrophobie de la surface plus marquée (cf. Chapitre II de la partie Résultats), apte à promouvoir des interactions hydrophobes avec les cellules. La mise en œuvre de moyens d'investigation à l'échelle locale, adaptés à la quantification directe des interactions microorganismes/surface solide, permettrait de confirmer ces premières hypothèses. Ainsi, la microscopie à force atomique, utilisant une pointe sur laquelle est immobilisée une levure, constitue un outil de caractérisation adapté à ce type d'investigation (Emerson et Camesano, 2004).

3 – Conclusion

La méthode hydrodynamique utilisée dans ce travail a permis d'évaluer les propriétés anti-adhésives des différents revêtements de surface, synthétisés par procédé plasma. Les expériences menées en chambre à écoulement cisailé ont démontré l'efficacité du dépôt de matrice organosiliciée pour prévenir l'adhésion initiale de *S. cerevisiae*, par la formation d'un film « barrière », supprimant les mécanismes de transfert de charge entre les microorganismes et l'alliage conducteur. En outre, la modulation de la polarité de la surface inerte mise au point constitue également un paramètre-clé de contrôle anti-adhésif. Ainsi, l'ajout d'oxygène au sein du réacteur plasma, dans des proportions adaptées (HMDSO/O_2 : 1/10), permet d'ajuster les composantes polaires/apolaires, *via* l'obtention de matrices de type SiO_x . Du fait de leur hydrophilie de surface, conjuguée à l'effet « barrière », ces dépôts s'avèrent encore plus efficaces pour prévenir l'adhésion microbienne, grâce à des phénomènes de « répulsion hydrophile ». La présence de nanoparticules d'argent dans les dépôts de matrice organosiliciée, destinées à conférer des propriétés antimicrobiennes supplémentaires, diminue leur efficacité anti-adhésive (ex. : augmentation de la valeur de $\tau_{p\ 50\%}$ d'un facteur 70, lorsque les concentrations en argent sont importantes ($\text{Ag}/\text{Si} = 1,3$). Ces revêtements restent néanmoins plus performants que dans le cas des traitements réalisés par voie chimique ou physique (bombardement ionique) sur l'acier austénitique vierge.

Dans la suite de l'étude, les propriétés biocides de ces dépôts nanocomposites ont été évaluées, afin de déterminer la configuration « optimale » conjuguant efficacité anti-adhésive et activité antimicrobienne, pour à la fois prévenir l'adhésion microbienne et éliminer les levures réussissant éventuellement à s'implanter.

B – Détermination de l'activité biocide des dépôts nanocomposites sur *S. cerevisiae*

Afin d'appréhender les mécanismes mis en jeu et de proposer un mode d'action des dépôts nanocomposites, des essais comparatifs, entre levures planctoniques et levures sessiles, ont été réalisés. Les propriétés antifongiques des dépôts ont été évaluées *in vitro* par reprise de croissance sur milieu gélosé de levures prélevées en phase stationnaire de croissance. En effet, il a été démontré dans ce cas une plus forte sensibilité microbienne aux métaux, comparativement à des cellules en phase exponentielle de croissance (Teitzel et Parsek, 2003).

Dans un premier temps, des essais ont été réalisés avec *S. cerevisiae* en suspension pendant 24 h à 30°C, dans la solution saline (NaCl 0,15 M) et dans de l'eau osmosée (pour écarter tout effet de « piégeage » de l'argent par les ions Cl⁻), en présence de coupons recouverts des dépôts composites B et D (Ag/Si = 0,7 et 1,3, respectivement). Dans les deux cas et pour les deux milieux testés, aucune diminution de la viabilité des levures planctoniques n'a été observée, par rapport aux cellules planctoniques seules (données non présentées). Ceci démontre que les dépôts nanocomposites n'exercent pas d'activité antimicrobienne sur les cellules planctoniques, conformément aux résultats exposés dans l'étude antérieure de Guillemot *et al.* (2008). On peut alors supposer un mode d'action ciblant spécifiquement les microorganismes s'approchant des surfaces solides ou réussissant à entrer en contact direct. Pour vérifier cette hypothèse, des tests ont ensuite été mis en œuvre avec des levures sessiles.

Comme précédemment, des expériences ont été effectuées dans de l'eau osmosée et dans la solution saline (NaCl 0,15 M). Cependant, les levures n'ayant pas adhéré aux différentes surfaces testées dans l'eau osmosée, du fait de la faible force ionique, seuls les résultats obtenus dans la solution saline vont être présentés.

Les dépôts nanocomposites considérés dans cette étude sont de types B et D. Leur activité biocide sur les levures sessiles a été évaluée *in vitro*, en conditions « batch » (*i.e.*, 24 h dans la solution de NaCl 0,15 M). Des dépôts A de matrice organosiliciée ont été testés simultanément, afin d'attribuer les effets observés sur la viabilité cellulaire à l'argent et/ou aux fragments polymériques SiC_xO_yH_z. Des expérimentations « contrôle » ont été réalisées en parallèle sur des coupons d'acier inoxydable 316L. Ces résultats ont été comparés à la viabilité des levures planctoniques « témoin »,

conservées pendant 24 h à 30°C dans le milieu salin, puis soniquées dans des conditions identiques (*i.e.*, même concentration cellulaire, durée et paramètres de sonication identiques). La viabilité des levures après contact avec les différentes surfaces est exprimée en nombre d'UFC/nombre de levures récupérées par sonication à l'issue du temps de contact (Figure 59). Ce mode de représentation permet de s'affranchir des différences en termes d'adhésion aux surfaces (acier, dépôt de matrice organosiliciée, dépôts nanocomposites).

Avant de comparer les résultats obtenus après mise en contact des cellules avec les différents échantillons, notons que la viabilité des levures en contact avec l'acier inoxydable ($0,82 \pm 0,15$ UFC/nombre de cellules) est inférieure à celle obtenue pour les levures « témoin » (*i.e.*, $1,18 \pm 0,13$ UFC/ nombre de cellules). La différence observée entre les levures planctoniques et sessiles peut être imputée à la phase d'adhésion elle-même, qui peut avoir un impact direct (Terada *et al.*, 2006), limitant la reprise de croissance sur milieu gélosé.

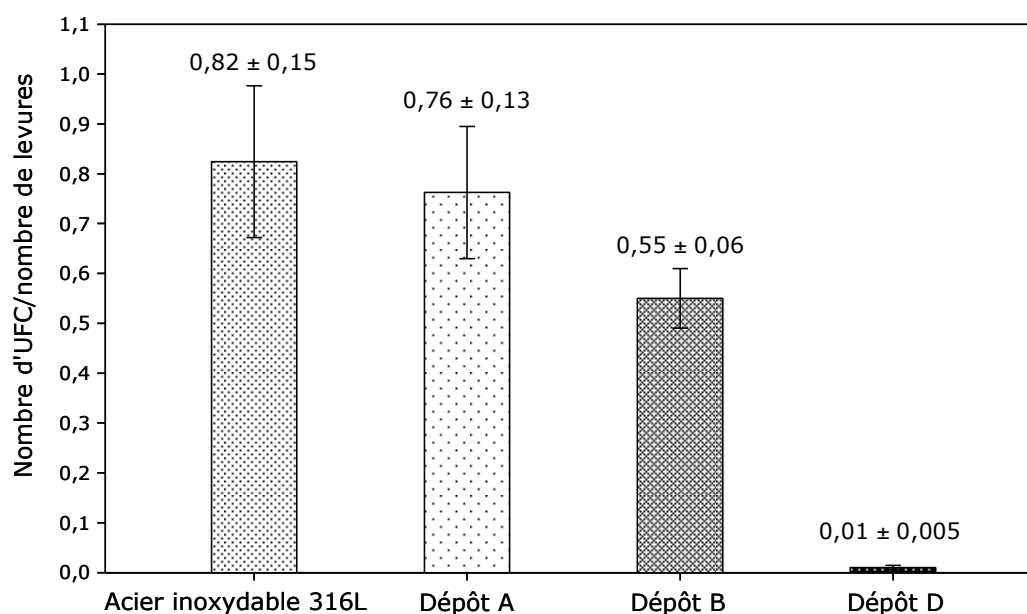


Figure 59. Rapport entre le nombre d'UFC et le nombre de levures récupérées après 24 h de contact avec l'acier inoxydable et les dépôts A, B et D, en solution saline (NaCl 0,15 M).

La comparaison des résultats obtenus pour le dépôt A et l'acier inoxydable démontre que la viabilité des levures est quasi-similaire dans les deux cas (Figure 59), indiquant, comme attendu, que la matrice synthétisée par PE-CVD ne présente aucune activité antimicrobienne sur les levures après 24 h de contact. Prasad *et al.* (2005) ont fait la même observation pour des films minces $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$ déposés sur des coupons d'acier inoxydable 316L et testés sur des cellules de mammifères (cellules musculaires de rat).

Dans le cas du dépôt B, contenant peu d'argent ($Ag/Si = 0,7$; cf. Tableau 14 du Chapitre II), une faible diminution de la viabilité cellulaire a été observée après leur mise en contact avec les dépôts ($0,55 \pm 0,06$ UFC/nombre de levures), par rapport aux cellules adhérentes sur les surfaces d'acier inoxydable ($0,82 \pm 0,15$ UFC/nombre de levures) et de matrice organosiliciée ($0,76 \pm 0,13$ UFC/nombre de levures) (Figure 59). Dans ce cas, l'abattement de la population viable cultivable, par rapport à la matrice organosiliciée A, est égal à $0,2$ log (soit un pourcentage d'inhibition de 33%). Au contraire, une perte significative de la viabilité des levures est observée pour les dépôts nanocomposites de type D ($Ag/Si = 2,2$). Après contact, le rapport entre le nombre d'UFC et le nombre de cellules est en effet égal à $0,01 \pm 0,005$ (Figure 59). Ceci correspond à un abattement de $1,9$ log par rapport au dépôt de matrice A, soit un pourcentage d'inhibition de 98,7%, valeur supérieure à celle reportée pour des dépôts composites contenant des nanoparticules de cuivre (Cioffi *et al.*, 2005). Ces résultats ont été confirmés par les pourcentages de viabilité déterminés par coloration des levures récupérées au bleu de méthylène (viabilité de 4% contre 89% pour le dépôt A). En outre, l'expérience a été renouvelée avec un contenu en argent légèrement plus faible ($Ag/Si = 1,4$). Un abattement de $1,4$ log (soit 96,2% d'inhibition) a alors été obtenu. On constate donc que l'efficacité biocide est directement corrélée à la quantité d'argent présente dans le dépôt. L'ensemble de ces résultats démontrent que les dépôts nanocomposites contenant une proportion d'argent suffisamment élevée ($Ag/Si > 1,4$) présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. cerevisiae*.

Des essais ont également été réalisés après mise en contact des levures avec des coupons d'argent massif et aucune diminution de viabilité n'a été observée, confirmant la forte réactivité de l'argent nanoparticulaire (*i.e.*, oxydation et relargage d'ions Ag^+ plus marqués en raison de l'aire spécifique élevée), largement décrite dans la littérature (Morones *et al.*, 2005 ; Pal *et al.*, 2007 ; Egger *et al.*, 2009).

En se basant sur les résultats de la littérature (Furno *et al.*, 2004 ; Balazs *et al.*, 2005 ; Sardella *et al.*, 2006), l'efficacité antifongique des dépôts nanocomposites peut être attribuée au relargage d'ions Ag^+ , au voisinage immédiat de la surface, suite à l'oxydation des nanoparticules au contact de la solution saline et à la dissolution de l'oxyde d'argent formé. L'absence de technique permettant de mesurer la concentration en argent à proximité directe de la surface solide nous a conduits à quantifier à l'échelle globale la quantité d'argent libéré, par ICP-MS (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif). A titre d'exemple, la cinétique de relargage, réalisée sur 28 jours avec des coupons d'acier inoxydable recouverts du dépôt C ($\text{Ag}/\text{Si} = 0,5$) et immergés dans de l'eau osmosée, est présentée sur la Figure 60.

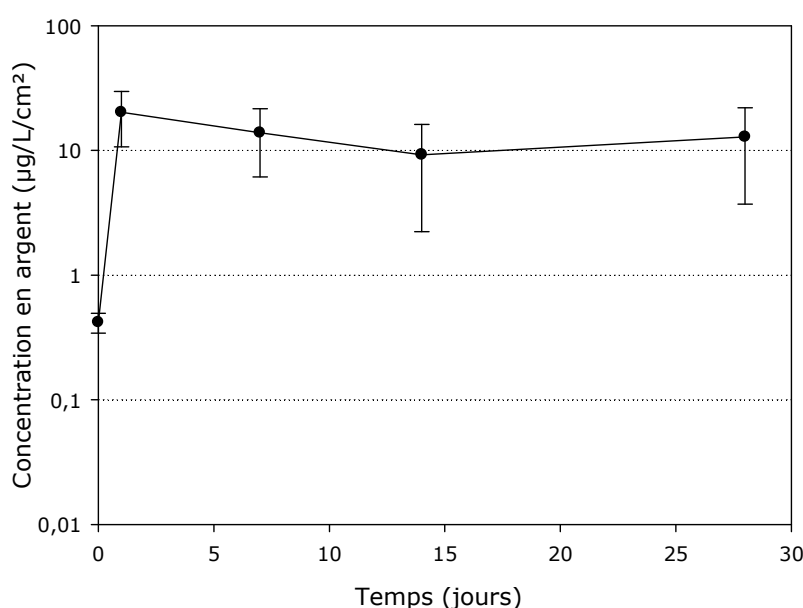


Figure 60. Cinétique de relargage de l'argent par le dépôt nanocomposite C, évaluée par ICP-MS jusqu'à 28 jours d'exposition dans de l'eau osmosée (moyenne sur trois coupons de 1 cm^2).

On constate que la libération d'argent est maximale dès le premier jour, correspondant à une concentration de $20,3 \pm 7,4 \mu\text{g}/\text{L}/\text{cm}^2$ (Figure 60), soit $0,19 \pm 0,07 \mu\text{M}$. Puis un plateau est observé pour des durées d'immersion plus importantes. Cette saturation peut être attribuée au fait que la solution d'immersion n'a pas été renouvelée régulièrement, empêchant le maintien du gradient de concentration pour un transfert total. On peut également supposer que la totalité de l'argent disponible en extrême surface est libérée au bout de 24 h. Il est néanmoins possible que les nanoparticules localisées au cœur du dépôt n'aient pas été dissoutes. Cette hypothèse sera investiguée dans le Chapitre IV. Cette libération d'argent dans le milieu aqueux environnant a pu ensuite être corrélée à la disparition de l'argent en surface des dépôts nanocomposites, quantifiée par XPS. Cette analyse sera également détaillée dans le Chapitre IV.

Les résultats de l'analyse effectuée par ICP-MS démontrent que des ions Ag^+ sont effectivement libérés par les nanoparticules présentes en surface des dépôts nanocomposites. Vu le faible relargage observé en ICP-MS, on peut supposer que des concentrations suffisamment élevées pour induire une perte de viabilité microbienne sont atteintes uniquement dans la couche de diffusion (*i.e.*, couche de Nernst), comme mentionné par Schierholz et Beuth (2001). Sardella *et al.* (2006) sont parvenus à un résultat similaire en étudiant par ICP-MS la cinétique de libération d'ions Ag^+ par des films minces nanocomposites « Ag/PEO-like », dans de l'eau osmosée. Ils ont observé un relargage maximal pendant les six premiers jours d'immersion, considérés comme une période critique pour la survenue d'infections après la pose d'un implant.

Dans notre cas, une contribution directe des nanoparticules à l'activité antifongique ne doit pas être exclue. En effet, il est possible que les nanoparticules situées en surface se détachent au contact des microorganismes et interagissent selon les mécanismes décrits dans le Chapitre V de la partie bibliographique (altération de la paroi, détérioration des organites intracellulaires, dysfonctionnements des enzymes). Par exemple, Egger *et al.* (2009) ont reporté une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 125 mg/L (soit 1,2 mM) pour des nanoparticules d'argent sur *C. albicans*. Les mécanismes d'action de l'argent issu des dépôts nanocomposites seront abordés dans le paragraphe II de ce chapitre.

La concentration d'argent relargué par un coupon, égale à $0,19 \pm 0,07 \mu\text{M}$, est très faible et plus de 15 fois inférieure aux CMI reportées dans la littérature pour *S. cerevisiae*, en mode de croissance planctonique. Par exemple, Yang et Pon (2003) ont déterminé une CMI de 5 μM pour les ions Ag^+ sur *S. cerevisiae*, en milieu de croissance synthétique salin (force ionique non précisée). Ceci explique pour partie les résultats obtenus dans notre cas sur les levures planctoniques. En outre, bien que l'effet biocide sur les levures sessiles soit marqué (*i.e.*, abattement de 1,9 log), il est également possible que des interactions se soient produites avec les ions Cl^- de la solution saline, minimisant l'impact sur la viabilité des levures. De plus, dans le cas où le milieu nutritif contient d'autres composés (ex. : extraits cellulaires), les ions Ag^+ et/ou les nanoparticules d'argent peuvent être piégés au sein de précipités très peu solubles, avec une incidence directe sur l'augmentation de la CMI. Ainsi, Yang et Pon (2003) ont obtenu une CMI de 640 μM en milieu riche YPD.

Des analyses complémentaires en ICP-MS seront nécessaires pour évaluer la quantité d'argent libérée par les dépôts contenant une proportion plus importante de métal (dépôt D).

II – Compréhension du mécanisme d'action de l'argent sur *S. cerevisiae* par contact avec les dépôts nanocomposites^{†††}

Les travaux concernant l'activité biocide des nanomatériaux et/ou des nanoparticules d'argent colloïdales sur les levures sont peu nombreux (Kim *et al.*, 2007 ; Egger *et al.*, 2009) et restent très descriptifs, se limitant à la détermination des CMI. Ces études ne décrivent pas les modes d'action conduisant aux résultats exposés. Dans ce contexte, nous avons cherché à comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans l'activité antifongique des dépôts nanocomposites. Une analyse de la composition cellulaire des levures après 24 h de contact avec ces dépôts a ainsi été réalisée par microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, en rayonnement Synchrotron. Pour compléter cette investigation, l'ultra-structure des levures a été observée par Microscopie Electronique en Transmission (MET), afin d'évaluer l'impact de l'argent sur les cellules (morphologie, organisation cytoplasmique). En parallèle de ces observations par MET, la composition cellulaire a été étudiée de manière qualitative par Spectroscopie Dispersive en Energie (EDS), afin de localiser la présence d'argent et de la corrélérer aux éléments caractéristiques des microorganismes. Suite aux résultats obtenus par mise en contact des levures avec les dépôts nanocomposites B et D, l'ensemble de cette étude a été réalisée avec les dépôts de type D.

A – Evaluation de l'impact de l'argent relargué par les dépôts nanocomposites sur la composition des levures par microspectroscopie FTIR en rayonnement Synchrotron

Afin d'évaluer les modifications de la composition cellulaire de *S. cerevisiae* BY4741 après mise en contact pendant 24 h avec le dépôt nanocomposite D présentant une activité antimicrobienne, une étude par microspectroscopie FTIR en rayonnement Synchrotron a été réalisée sur la ligne SMIS de SOLEIL (Gif-sur-Yvette). La spectroscopie FTIR est une technique d'analyse des biomolécules simple à mettre en œuvre, nécessitant une préparation minimale de l'échantillon. Elle permet la réalisation d'études *in situ* et *in vitro*. Contrairement à d'autres techniques analytiques (chromatographie gazeuse avec détection par spectrométrie de masse, méthodes hystochimiques, marquage fluorescent, etc.), la microspectroscopie FTIR permet d'allier l'étude simultanée de l'ensemble des composants cellulaires (protéines, lipides, acides nucléiques, espèces hydrocarbonées) à une haute résolution spatiale (Kaminskyj *et al.*, 2008). De par sa brillance élevée, le faisceau Synchrotron est la seule source lumineuse permettant l'analyse microspectroscopique de faibles quantités de matériel et de composés de petite taille, comme les

^{†††} Les travaux décrits dans ce chapitre font l'objet d'un article, intitulé "A synchrotron FTIR spectromicroscopy of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to plasma-deposited nanosilver-containing coating", soumis au journal "*Analytical and Bioanalytical Chemistry*" (juillet 2009).

microorganismes (Szeghalmi *et al.*, 2007 ; Jilkine *et al.*, 2008 ; Kaminskyj *et al.*, 2008). L'application de la microspectroscopie FTIR avec rayonnement Synchrotron pour l'exploration de la composition cellulaire a été récemment démontrée par Szeghalmi *et al.* (2007) et Jilkine *et al.* (2008) dans le cas des champignons (*Aspergillus nidulans*, spores de *Neurospora* et *Rhizopus*). Le travail présenté ici constitue, à notre connaissance, la première démonstration des potentialités de la microspectroscopie FTIR en rayonnement Synchrotron pour l'étude des levures, à l'échelle de la cellule unique, et l'investigation de l'effet de l'argent sur les composés de surface et/ou intracellulaires (protéines, acides nucléiques, polysaccharides).

Différents échantillons ont été analysés : (a) échantillon « contrôle » correspondant aux levures après 2 h d'exposition à une concentration létale de nitrate d'argent (AgNO_3 2 mM, dans de l'eau osmosée ; Guillemot *et al.*, 2008) ; (b) échantillon « contrôle » correspondant aux levures « fraîches », cultivées en milieu YPD gélosé puis resuspendues dans de l'eau déionisée ; (c) échantillon « contrôle » correspondant aux levures après 24 h en suspension dans la solution saline (NaCl 0,15 M) ; (d) échantillon « témoin » correspondant aux levures après 24 h de contact avec le dépôt A de matrice organosiliciée en solution saline ; (e) échantillon correspondant aux levures après 24 h de contact avec le dépôt nanocomposite D en solution saline. Mis à part l'échantillon (b), les autres suspensions microbiennes ont été congelées à -80°C avant analyse.

Avant l'acquisition des spectres FTIR, une observation par microscopie optique permet de focaliser la fenêtre d'analyse ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) sur une cellule, au sein d'un agrégat⁺⁺⁺. Pour chaque condition, 10 spectres ont été enregistrés sur des cellules individuelles, localisées dans différents amas. La Figure 61 présente les spectres FTIR bruts obtenus pour les échantillons (a), (b), (c), (d) et (e). Sur chaque spectre, on observe différentes régions spectrales caractéristiques, correspondant à des vibrations de structures chimiques données, et par conséquent, à un constituant particulier de la cellule. Les principales bandes observées sur la Figure 61 sont liées aux protéines (liaison amide I dans la région $1600\text{-}1700\ \text{cm}^{-1}$ et liaison amide II dans la région $1480\text{-}1600\ \text{cm}^{-1}$), aux acides nucléiques PO_2^- ($1180\text{-}1300\ \text{cm}^{-1}$) et aux hydrates de carbone ($900\text{-}1200\ \text{cm}^{-1}$). D'autres pics d'absorption ont été décrits dans la littérature (Toubas *et al.*, 2007) : liaisons N–H des protéines ($3100\text{-}3200\ \text{cm}^{-1}$), liaisons C–H des lipides et des protéines ($2800\text{-}3000\ \text{cm}^{-1}$) et liaisons C=O des esters lipidiques ($1720\text{-}1750\ \text{cm}^{-1}$). Comme exposé par Szeghalmi et ses collaborateurs (2007) dans leur étude microspectroscopique des champignons par rayonnement Synchrotron, il n'est pas possible de distinguer les composants des organites cytoplasmiques (noyau, mitochondries, vacuoles, etc.) de ceux constituant la paroi cellulaire (mannoprotéines, glucanes, chitine, etc.).

⁺⁺⁺ Des spectres IR ont également été réalisés sur des levures individuelles (40 cellules/échantillon). Toutefois, ces données n'ont pas pu être analysées en raison de la distorsion de la ligne de base, provoquée par l'effet de Mie (Szeghalmi *et al.*, 2007 ; Kohler *et al.*, 2008). Ce phénomène est lié au fait que le diamètre des levures est du même ordre de grandeur que la longueur d'onde du faisceau employé.

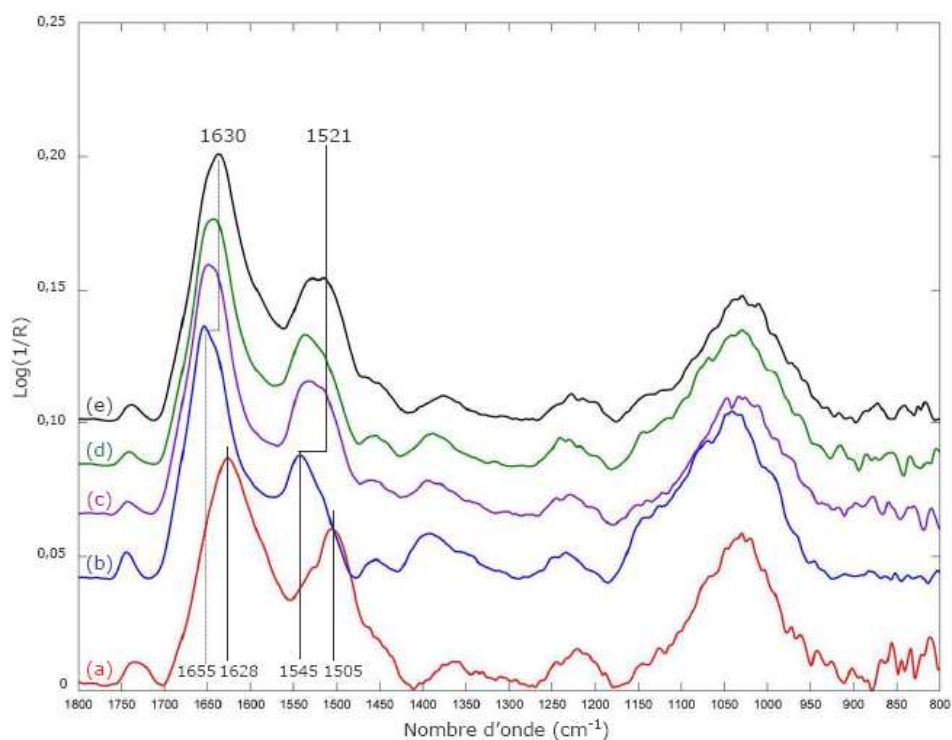


Figure 61. Spectres FTIR bruts des levures *S. cerevisiae*, au niveau de la région 1800 – 800 cm^{-1} , enregistrés sur les échantillons (a), (b), (c), (d) et (e). Les décalages des bandes amide I et amide II dans le cas des levures après contact avec le dépôt nanocomposite (e), par rapport aux levures « contrôle » viables (b) et aux levures « contrôle » mortes (a), sont indiqués sur la figure.

Les travaux précédents menés par spectroscopie FTIR « classique » sur *S. cerevisiae* et *C. albicans* ont observé les principales modifications de la composition cellulaire au niveau de la région des hydrates de carbone (Galichet *et al.*, 2001 ; Sockalingum *et al.*, 2002). Dans le cas de notre étude, les modifications les plus significatives des spectres IR ont été observées dans la région d'absorption des protéines (Figure 61), ce qui constitue une première indication du mode d'action de l'argent. Plus précisément, un décalage significatif des bandes correspondant aux liaisons amide I (1600-1720 cm^{-1}) et amide II (1480-1600 cm^{-1}) a été mis en évidence. Il est important de remarquer qu'aucune différence significative entre les échantillons (b) et (e) n'a été détectée au niveau de la région d'absorption des acides nucléiques (1180-1300 cm^{-1} ; Figure 61).

Les bandes amide I et amide II sont caractéristiques des liaisons peptidiques des protéines cellulaires (Figure 62).

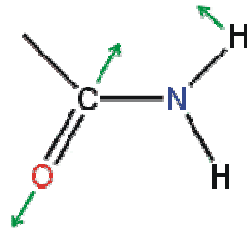


Figure 62. Liaison peptidique indiquant le mouvement d'étirement (« stretching ») de la liaison C=O (bande amide I) et le mouvement de déformation (« bending ») de la liaison N-H (bande amide II).

La bande d'absorption de l'amide II correspond principalement au mouvement d'étirement (« stretching ») de la liaison C–N et, de manière moins marquée, au mouvement de déformation (« bending ») de la liaison N–H (Figure 62).

La bande d'absorption de l'amide I correspond au mouvement d'étirement de la liaison C=O et, dans une moindre mesure, au mouvement d'étirement de la liaison C–N (Figure 62). Les pics de cette région sont assignés aux structures de l'amide I en feuillets- β (1624 cm^{-1} et 1683 cm^{-1}), en hélices- α (1655 cm^{-1}), ainsi qu'aux formes « turn » (1672 cm^{-1}) et « random coil » (1642 cm^{-1}) (Barth et Zscherp, 2002). Dans le cadre de notre étude, nous allons nous focaliser sur l'amide I, qui est mentionnée comme la plus informative pour la détermination de la structure secondaire des protéines (Jackson et Mantsch, 1995).

Les dérivées secondes des spectres dans la région amide I ont ensuite été calculées (méthode de Savitsky-Golay, lissage sur 9 points, polynôme d'ordre 3) puis normalisées, afin d'améliorer la résolution spectrale des bandes d'absorption proches les unes des autres et de visualiser les positions exactes des maxima pour chaque pic (Figure 63).

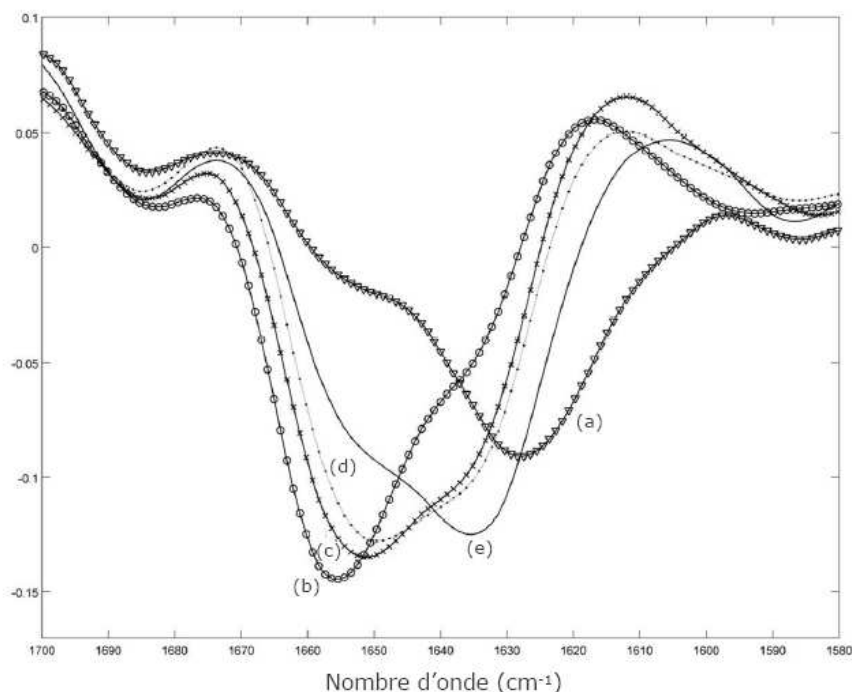


Figure 63. Dérivées secondes des spectres FTIR obtenus sur les échantillons (a), (b), (c), (d) et (e), dans la région de la bande amide I (1700-1580 cm^{-1}).

En comparant les dérivées des spectres obtenus sur les échantillons (a) (*i.e.*, levures exposées à une concentration létale de AgNO_3) et (b) (*i.e.*, levures « fraîches » non congelées), on constate un décalage d'environ 30 cm^{-1} du pic à 1655 cm^{-1} (spectre b), qui passe à 1628 cm^{-1} (spectre a) (Figure 63). L'analyse spectroscopique des levures après 24 h de contact avec le dépôt nanocomposite D (spectre e) révèle un déplacement du même type, quoique sensiblement moins marqué ($\sim 20 \text{ cm}^{-1}$) (Figure 63). La position de la bande amide I est un indicateur de la structure secondaire des protéines. En effet, la fréquence de vibration des groupements C=O dépend des liaisons hydrogènes établies au sein de la protéine et des interactions entre les acides aminés. Lorsque les protéines cellulaires sont affectées par un stress environnemental, leur structure secondaire se modifie avec, à la clé, un déplacement des bandes correspondantes sur le spectre IR. Par conséquent, le déplacement de la position de la bande amide I vers les nombres d'onde plus faibles, observé pour le dépôt D et confirmé avec l'argent ionique en solution, indique une altération de la structure secondaire des protéines, avec notamment, une diminution du nombre de structures en hélices- α au profit des feuillets- β . Elle correspond probablement à la transition d'une conformation active à une conformation inactive, induite par l'argent libéré par le dépôt nanocomposite.

Afin d'évaluer la dispersion des données obtenues pour les cinq conditions expérimentales testées et de discriminer les effets présentés, une analyse par composante principale (ACP) a été réalisée avec le logiciel Matlab, sur les dérivées secondes des spectres FTIR. La Figure 64 représente la dispersion de l'ensemble des points expérimentaux relatifs à la région amide I ($1700-1580\text{ cm}^{-1}$), selon les composantes principales 1 et 2. Chaque point correspond à un spectre en dérivée seconde. Les ellipses représentent les écarts statistiquement équidistants de la moyenne du groupe, avec un intervalle de confiance de 95%. La variance expliquée par les composantes principales CP1 et CP2 est égale à 75% et 15%, respectivement. Ainsi, ces deux premières composantes permettent d'expliquer 90% de la variance totale. Les autres composantes sont attribuées au bruit de fond et ne sont pas prises en compte.

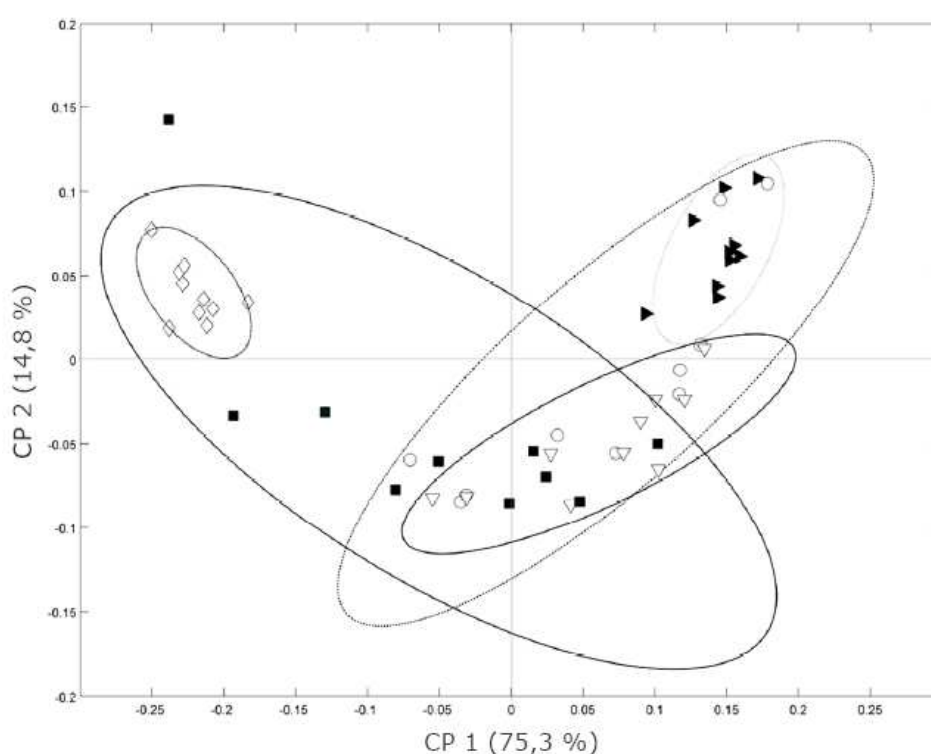


Figure 64. Représentation graphique du résultat de l'ACP présentant la dispersion des spectres en dérivées secondes dans la gamme de nombres d'onde $1700-1580\text{ cm}^{-1}$ (*i.e.*, bande amide I), selon les composantes principales CP1 et CP2. Chaque ellipse correspond à un intervalle de confiance de 95%.

Les points représentés par (◇) correspondent aux spectres des levures exposées au AgNO_3 (échantillon a) ; (▶) levures « fraîches » en suspension dans de l'eau déionisée après culture en milieu YPD gélosé (échantillon b) ; (○) levures après 24 h en suspension dans la solution saline ($\text{NaCl } 0,15\text{ M}$) (échantillon c) ; (▽) levures après 24 h de contact avec le dépôt A de matrice organosiliciée en solution saline (échantillon d) ; (■) levures après 24 h de contact avec le dépôt nanocomposite D en solution saline (échantillon e).

Mis à part pour (b), les échantillons ont été congelés à -80°C avant l'analyse FTIR.

Le graphique de la Figure 64 révèle plusieurs groupes indépendants ou superposés. Ainsi, les groupes correspondant aux spectres des levures « mortes » par exposition au AgNO_3 (échantillon a) et aux spectres des cellules « fraîches » présentant 100% de viabilité (échantillon b) sont discriminés selon la CP1, sur la base de l'activité létale de l'argent. Les points du groupe correspondant aux levures après 24 h en suspension dans la solution saline et congelées à -80°C avant analyse FTIR (échantillon c) sont plus dispersés et positionnés à des valeurs plus faibles de la CP1 (Figure 64). Ceci indique que la congélation à -80°C a probablement provoqué une modification de la structure secondaire des protéines, bien qu'aucune perte de viabilité significative n'ait été observée par étalement sur milieu gélosé. On remarque également que le groupe correspondant aux levures après 24 h de contact avec le dépôt A de matrice organosiliciée (échantillon d) est complètement inclus au groupe précédent. Cela signifie que les structures protéiques n'ont pas été affectées par le contact avec les dépôts polymériques, comme attendu au vu de l'absence d'effet antimicrobien de la matrice (cf. paragraphe I-B). Au contraire, les points correspondant aux spectres des levures après 24 h de contact avec le dépôt nanocomposite D (échantillon e) ont une position intermédiaire entre les groupes (a) et (b) (Figure 64). Trois points sont même localisés au niveau du groupe (a) (levures traitées par AgNO_3). Là-encore, ces résultats sont en accord avec les données obtenues précédemment lors de l'évaluation des propriétés biocides des dépôts nanocomposites, puisqu'une réduction de la viabilité de 1,9 log avait été reportée pour les levures sessiles (cf. paragraphe I-B ; Figure 59). Toutefois, l'efficacité antifongique n'est pas absolue, ce qui peut expliquer le non recouvrement total des groupes (a) et (e) (Figure 64).

En conclusion, l'analyse des spectres FTIR n'a montré aucune incidence significative des traitements appliqués aux levures dans la région spectrale correspondant aux acides nucléiques. Au contraire, des différences notables de la composition cellulaire ont été observées dans la zone d'absorption des protéines, et plus précisément au niveau de la bande amide I. Comme dans le cas des levures exposées au nitrate d'argent, les spectres FTIR des levures placées au contact du dépôt nanocomposite D révèlent un déplacement d'environ 20 cm^{-1} du pic situé à 1655 cm^{-1} , correspondant à une diminution des structures protéiques en hélices- α au profit de structures en feuillets- β ^{§§§}. La fonctionnalité des protéines cellulaires étant liée à leur configuration structurale, ce résultat indique clairement que l'action inhibitrice de l'argent sur *S. cerevisiae* est ciblée sur les protéines cellulaires et s'effectue probablement *via* des interactions avec les groupements thiols des protéines, comme décrit précédemment par Feng *et al.* (2000) dans le cas des bactéries. Les protéines cellulaires correspondent aux protéines pariétales (*i.e.*, mannoprotéines, qui représentent 5-10% des protéines totales), ainsi qu'aux protéines intracellulaires, comme les enzymes.

§§§ Il est important de noter que toutes les protéines cellulaires ne sont pas sous forme d'hélices- α et qu'au sein d'une même protéine, se trouvent à la fois des structures en hélices- α et en feuillets- β .

issu des dépôts nanocomposites D présente donc un mécanisme d'action général, induisant des altérations sur l'ensemble de la cellule. Pour le vérifier, des observations de l'ultra-structure des levures ont été réalisées par MET et couplées à une analyse qualitative de la composition cellulaire par EDS.

B – Evaluation des modifications cellulaires induites par l'argent et localisation de l'argent au sein des levures

1 – Observation de l'ultra-structure des levures par MET

Pour compléter les analyses réalisées par microspectroscopie FTIR et confirmer un effet de l'argent à la fois sur la surface et à l'intérieur des levures, la variation de la morphologie cellulaire après exposition au dépôt nanocomposite D a été suivie grâce à des observations en Microscopie Electronique en Transmission (MET). La Figure 65 présente des photographies réalisées sur les levures (i) après 24 h en solution saline (NaCl 0,15 M ; 30°C), (ii et ii') après traitement par AgNO₃ (2 mM dans de l'eau osmosée), (iii) après un contact de 24 h, en solution saline, avec une surface d'acier inoxydable vierge, (iv) avec le dépôt A de matrice organosiliciée et (v et v') avec le dépôt nanocomposite D. Les résultats présentés dans ce paragraphe seront interprétés par la suite, en les corrélant avec les données obtenues par analyse qualitative de la composition cellulaire, évaluée par Spectroscopie Dispersive en Energie (EDS).

Après 24 h en solution saline à 30°C, les levures présentent une ultra-structure intacte, où l'on peut aisément visualiser la paroi et la membrane cellulaire, le noyau, ainsi que de nombreuses mitochondries et vacuoles (Figure 65 (i)). L'attribution de ces différentes structures cellulaires a été réalisée en se basant sur les descriptions d'Osumi (1998) et de Wright (2000). Ce résultat est cohérent avec le fait qu'aucune diminution de la viabilité n'ait été observée sur ces levures (cf. partie I-B de ce chapitre).

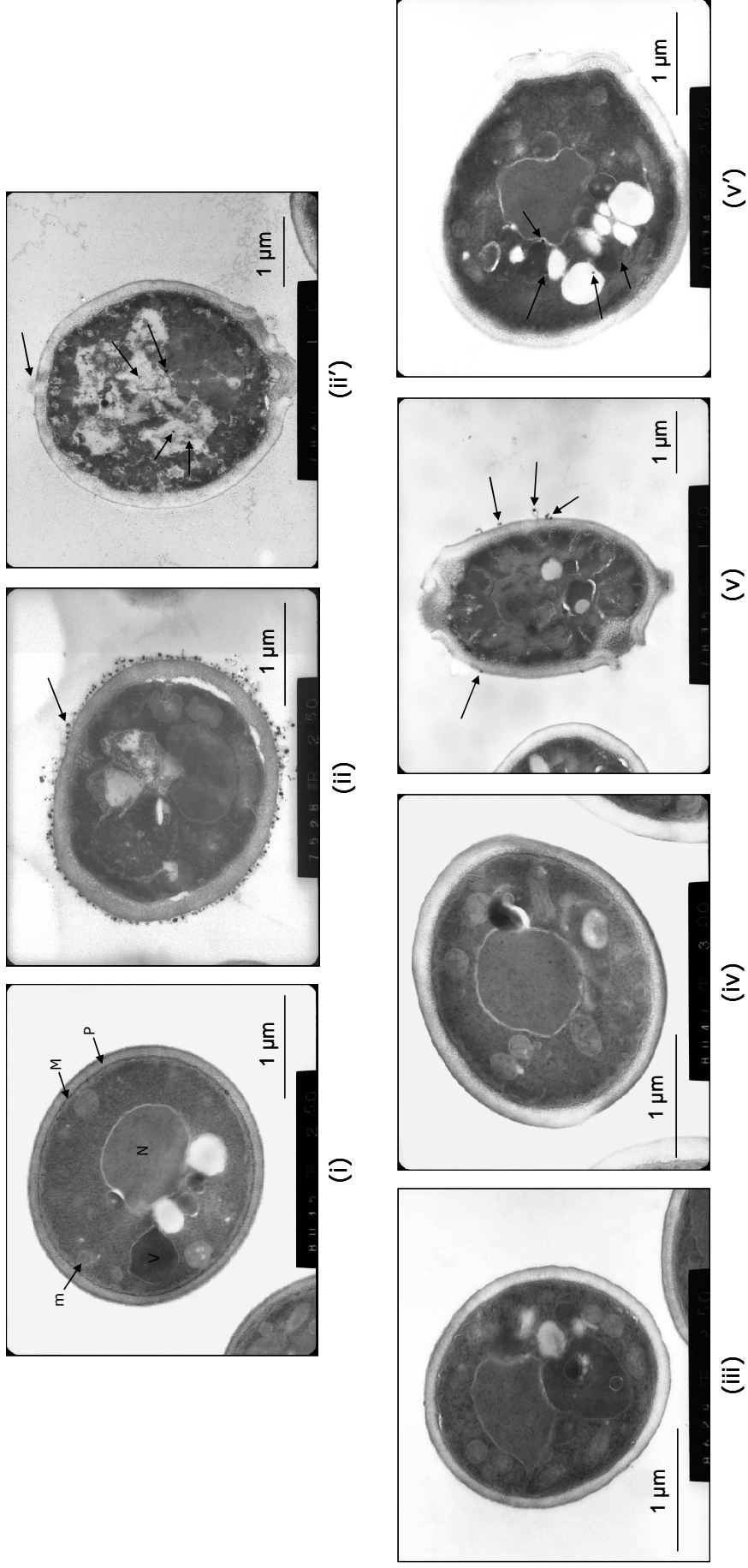


Figure 65. Photographies en MET de coupes ultrafines (~ 90 nm d'épaisseur) de *S. cerevisiae* BY4741 : (i) levures après 24 h en suspension dans la solution saline (NaCl 0,15 M) à 30°C (P = paroi, M = membrane cellulaire ; N = noyau, V = vacuole et m = mitochondries) ; (ii) et (ii') levures après 2 h d'exposition à une concentration létale de AgNO₃ (2 mM, dans de l'eau osmosée). Des agrégats noirs sont distribués uniformément autour de la paroi cellulaire et également présents à l'intérieur des levures (cf. flèches) ; (iii) levures après 24 h de contact avec l'acier inoxydable en solution saline ; (iv) levures après 24 h de contact avec le dépôt A de matrice organosiliciée en solution saline ; (v) et (v') levures après 24 h de contact avec le dépôt nanocomposite D en solution saline. Des agrégats noirs sont présents sur le pourtour et à l'intérieur des cellules (cf. flèches).

Les levures traitées par AgNO_3 présentent au contraire une structure cellulaire complètement altérée, ce qui explique l'absence de survie cellulaire, démontrée par étalement sur milieu gélosé. Des agrégats, retenant les électrons du MET et apparaissant donc en noir, sont localisés sur le pourtour de la cellule (Figure 65 (ii)) ou accrochés à la paroi. D'autres sont également observés à l'intérieur de la levure (Figure 65 (ii')). On constate également que la membrane et la paroi cellulaire sont dégradées (*i.e.*, présence de trous) et décollées l'une de l'autre (Figure 65, photographies (ii) et (ii')). Comme indiqué par Piérard-Franchimont *et al.* (2004), ces dommages structurels augmentent la perméabilité membranaire, ce qui provoque la libération des constituants intracellulaires et facilite la pénétration des ions Ag^+ dans la cellule. Des zones retenant peu les électrons du MET (apparaissant en gris clair) sont observées sur la Figure 65 (ii'), sans que le type de structure impliqué ait pu être déterminé. Enfin, la morphologie des organites intracellulaires (vacuoles, mitochondries) est altérée (Figure 65 (ii')). En comparant les photographies (ii) et (ii'), on constate une hétérogénéité entre les cellules, représentative de l'ensemble des levures observées : certaines sont affectées en surface, d'autres au niveau du cytoplasme. Ces différences, également observées par Kierans *et al.* (1991), peuvent être attribuées à une variabilité au sein de la population microbienne (état physiologique, résistance aux composés biocides).

La comparaison des deux échantillons « témoins » (*i.e.*, levures après 24 h en solution saline et levures traitées par AgNO_3) démontre clairement que les ions Ag^+ provoquent de nombreuses dégradations de l'ultra-structure des levures, tant en surface qu'à l'intérieur de la cellule. Ce résultat est cohérent au vu de l'effet multi-factoriel de l'argent ionique, décrit au Chapitre IV de la partie bibliographique. De plus, des résultats similaires ont été exposés par Feng *et al.* (2000) sur des bactéries *E. coli*, cultivées en milieu liquide et traitées par AgNO_3 , et par Kierans *et al.* (1991) dans le cas des levures *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *Rhodotorula rubra*, *Debaryomyces hansenii*, cultivées sur milieu gélosé contenant du AgNO_3 .

Après 24 h de contact avec l'acier inoxydable et le dépôt A de matrice organosiliciée, l'ultra-structure cellulaire n'est pas modifiée (Figure 65, photographies (iii) et (iv)), par rapport à celle des levures conservées 24 h en solution saline (Figure 65 (i)), démontrant le faible impact de la mise en contact des cellules avec ces surfaces, observé précédemment (cf. partie I-B de ce chapitre). Ce n'est pas le cas des levures placées au contact du dépôt nanocomposite D (Figure 65, photographies (v) et (v')). Des agrégats noirs sont, en effet, observés autour de la cellule (Figure 65 (v)), bien que leur nombre soit moins important que dans le cas des levures traitées par AgNO_3 , probablement en raison d'une concentration locale en ions Ag^+ plus faible (dissolution partielle des nanoparticules). Certains amas ont pénétré la paroi cellulaire en provoquant des perforations, qui peuvent contribuer à la lyse cellulaire, comme mentionné par Sondi et Salopek-Sondi (2004). Comme dans le cas des levures traitées par AgNO_3 , la membrane a tendance à se détacher de la paroi cellulaire (Figure 65 (v')). Dans d'autres cas, les agrégats sont détectés au sein du

cytoplasme cellulaire (Figure 65 (v')) et les organites intracellulaires sont affectés (Figure 65 (v)). On retrouve donc une hétérogénéité dans les effets observés, probablement liée à la variabilité de la population microbienne, comme décrit auparavant dans le cas des levures traitées par AgNO_3 . Ainsi, l'étude réalisée par MET révèle une altération notable de l'ultra-structure cellulaire après mise en contact des levures avec le dépôt nanocomposite D, permettant d'expliquer la réduction de la viabilité observée (cf. partie I-B de ce chapitre). Toutefois, les effets observés sont moins marqués que pour les levures traitées par AgNO_3 , ce qui confirme les résultats précédents obtenus par microspectroscopie FTIR (Figure 64).

2 – Evaluation qualitative de la présence d'argent au sein des levures par EDS

Pour confirmer la nature des agrégats noirs observés dans le cas des levures traitées par AgNO_3 ou mises en contact avec les dépôts nanocomposites D, une cartographie par Spectroscopie Dispersive en Energie (EDS) a été réalisée sur les coupes ultrafines observées par MET. L'EDS permet d'étudier de manière qualitative la composition cellulaire. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux éléments caractéristiques constitutifs de la cellule, tels que le carbone, l'oxygène (données non présentées), l'azote, le soufre et le phosphore, ainsi qu'à l'argent (Figure 66).

Comme attendu, les levures stockées pendant 24 h à 30°C dans la solution saline sont constituées de P, S et N et aucune trace d'argent n'est observée (Figure 66 (i)). Au contraire, dans le cas des levures traitées par AgNO_3 , on confirme la présence d'agrégats noirs, adhérents à la paroi ou intégrés au cytoplasme (Figure 66 (ii), première colonne). Comme attendu, ces agrégats sont effectivement constitués d'argent (Figure 66 (ii), dernière colonne). L'analyse EDS mise en œuvre n'a pas permis de définir la nature métallique et/ou ionique des agrégats et une étude complémentaire par dispersion des rayons X va être réalisée prochainement pour éclaircir ce point. Il est intéressant de remarquer que la présence d'argent est fortement corrélée à la présence de soufre. Ce résultat confirme l'interaction préférentielle, largement décrite dans la littérature, entre l'argent et les composés contenant du soufre, comme les protéines. On remarque également de l'argent disséminé de manière homogène dans la totalité du cytoplasme cellulaire (Figure 66 (ii), dernière colonne).

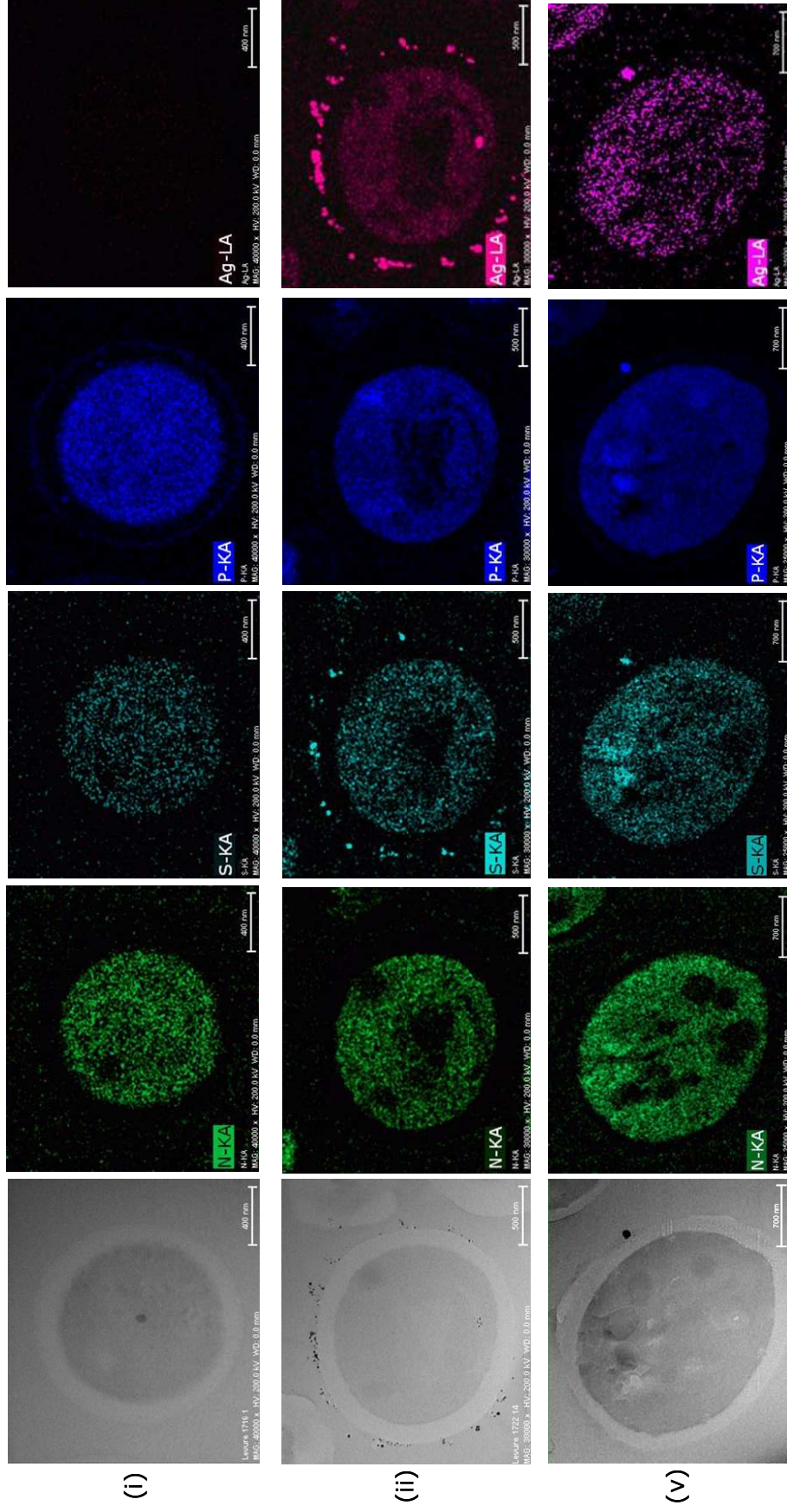


Figure 66. Cartographie de la composition cellulaire de *S. cerevisiae* BY4741 par MET-EDS : (i) levures après 24 h en suspension dans la solution saline (NaCl 0,15 M) ; (ii) levures après 2 h d'exposition à une concentration létale de AgNO_3 (2 mM, dans de l'eau osmosée) ; (v) levures après 24 h de contact avec le dépôt nanocomposite D en solution saline. La colonne de gauche correspond à la photographie des levures en MET. Les colonnes suivantes correspondent à l'analyse par EDS des éléments N, S, P et Ag.

Sur la photographie MET présentant la levure placée au contact du dépôt nanocomposite D, il faut noter la présence d'un seul agrégat noir détecté en périphérie de la paroi (Figure 66 (v), première colonne). Au vu de l'analyse chimique, cet amas est constitué d'argent, de soufre et de phosphore, confirmant la forte réactivité de l'argent, non seulement vis-à-vis des composés soufrés, mais également riches en phosphore (Liau *et al.*, 1997 ; Feng *et al.*, 2000). La détection d'un seul agrégat métallique dans le cas de cet échantillon est certainement liée au fait que la concentration en argent relargué par les dépôts nanocomposites reste faible, comme évoqué précédemment. De manière similaire aux levures traitées par AgNO_3 , de l'argent est détecté dans l'ensemble du cytoplasme (répartition homogène).

En conclusion, les observations, réalisées par MET et couplées aux analyses EDS, confirment le mécanisme d'action multi-paramètres de l'argent (ionique et/ou métallique) libéré par les dépôts nanocomposites D, avec des cibles localisées sur l'ensemble de la cellule (paroi, membrane, organites intracellulaires).

En comparant les photographies des levures après contact avec le dépôt nanocomposite D et après traitement par AgNO_3 , on constate dans les deux cas la présence d'amas d'argent en périphérie de la paroi. Cela indique que l'activité antifongique des dépôts nanocomposites s'exerce, du moins en partie, par l'intermédiaire d'ions Ag^+ relargués par dissolution des nanoparticules. Ces observations concordent avec les analyses réalisées en ICP-MS (cf. paragraphe I-B de ce chapitre) et sont en accord avec les résultats exposés par Feng *et al.* (2000) concernant les ions Ag^+ . De même, Kierans *et al.* (1991) mentionnent la présence de « clusters » en périphérie de différentes souches de levures exposées à du AgNO_3 . L'analyse EDS a démontré que ces agrégats sont également constitués de composés soufrés et phosphorylés. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette composition. Les amas peuvent être constitués d'ions Ag^+ et/ou d'argent métallique, ce dernier étant produit par réduction des ions en présence de composés excrétés naturellement par les cellules ou provenant de la lyse cellulaire (Kierans *et al.*, 1991). Ils peuvent également être les produits d'un mécanisme actif de défense des microorganismes (phénomène de détoxification), correspondant à l'excrétion des ions Ag^+ (Holt et Bard, 2005). En considérant la taille des agglomérats d'argent, on peut aussi supposer que ce sont des nanoparticules détachées de la surface du dépôt nanocomposite, qui ont interagi directement avec la paroi des levures. L'efficacité antifongique des dépôts nanocomposites D est donc vraisemblablement liée à une action combinée des ions Ag^+ et des nanoparticules d'argent, libérés dans le milieu et/ou incorporés par les microorganismes lors de leur contact avec la surface.

Comme observé par MET, certains amas (ou nanoparticules) ont pénétré la paroi cellulaire et sont détectés dans le cytoplasme. Au sein de la paroi, de la membrane, du cytosol et des différents organites intracellulaires, ils peuvent induire des réactions de type radicalaire, provoquant des

dommages structurels et fonctionnels. Cette hypothèse est cohérente au vu des observations rapportées par Sondi et Salopek-Sondi (2004). En étudiant l'activité toxique de nanoparticules d'argent colloïdales sur les bactéries *E. coli*, ces auteurs ont mis en évidence leur accumulation dans l'épaisseur de la membrane cellulaire, ainsi que leur pénétration dans le cytoplasme.

Les dommages au niveau de la paroi et de la membrane cellulaire (trous, détachement) et la pénétration de l'argent à l'intérieur des levures laissent supposer une probable interaction du métal relargué par les dépôts avec les mannoprotéines pariétales, ce qui concorde avec les résultats de l'étude microspectroscopique (cf. paragraphe II-A). De plus, l'altération de la structure des organites intracellulaires et la présence d'argent, disséminé dans la totalité du cytoplasme et co-localisé avec des composés soufrés et phosphorylés, confirment l'établissement d'interactions entre le métal et les protéines intracellulaires, comme déduit par microspectroscopie FTIR. En induisant la transition d'une structure protéique fonctionnelle en une conformation inactive, l'argent libéré par les films nanocomposites a certainement provoqué l'inactivation d'enzymes vitales pour *S. cerevisiae*. Cette hypothèse est en accord avec les études de Wells *et al.* (1995), Yang et Pon (2003) et Jung *et al.* (2008), qui ont démontré une altération de l'activité enzymatique intracellulaire, notamment mitochondriale, induite par les ions Ag^+ .

En se basant sur les travaux de la littérature, on peut également supposer que la structure secondaire des enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant (*i.e.*, catalase, thioredoxine, superoxyde dismutase, thioredoxine peroxydases, responsables de la neutralisation des ROS ; Perrone *et al.*, 2008) a pu être altérée. Cela a pu entraîner une accumulation de ROS et, par suite, des dommages cellulaires, voire l'apoptose du microorganisme. Cette hypothèse est cohérente au vu de différentes études concernant l'impact des ions métalliques sur *S. cerevisiae*. Ainsi, selon Yang et Pon (2003), les ions Ag^+ sont à l'origine de la formation de ROS. Par ailleurs, l'inactivation des mécanismes de défense de *S. cerevisiae* contre le stress oxydant, induite par des ions cuivre, a été mise en évidence par Liang et Zhou (2007). Pour confirmer l'hypothèse émise, une détection de la présence de ROS dans les levures, après contact avec les dépôts nanocomposites, devra être réalisée, par exemple par une technique directe d'imagerie de fluorescence.

III – Evaluation de l’activité antibactérienne des dépôts nanocomposites sur *S. aureus* et *E. coli* : comparaison de l’efficacité biocide entre les trois microorganismes d’étude

A – Caractérisation du caractère hydrophile/hydrophobe des bactéries par méthode MATS

La polarité de surface des bactéries *S. aureus* MW2 et *E. coli* K12, prélevées en phase stationnaire de croissance et suspendues dans la solution saline (NaCl 0,15 M), a été évaluée par la méthode de partition MATS. Les données présentées correspondent à la moyenne de trois tests, réalisés avec des cultures indépendantes.

Les résultats obtenus dans le cas de *S. aureus* (Figure 67 a) démontre que cette bactérie se caractérise par une surface très hydrophobe (affinité pour les solvants apolaires, hexadécane et décane, de l’ordre à 90%).

Au contraire, les bactéries *E. coli* présentent une surface fortement hydrophile (affinité pour les solvants apolaires de l’ordre de 25%), liée à une composante électron-donneur importante (*i.e.*, différence d’affinité entre le chloroforme et l’hexadécane d’environ 80%) (Figure 67 b).

Les deux microorganismes procaryotes sélectionnés pour l’étude présentent donc des caractéristiques de surface très différentes, en termes de polarité.

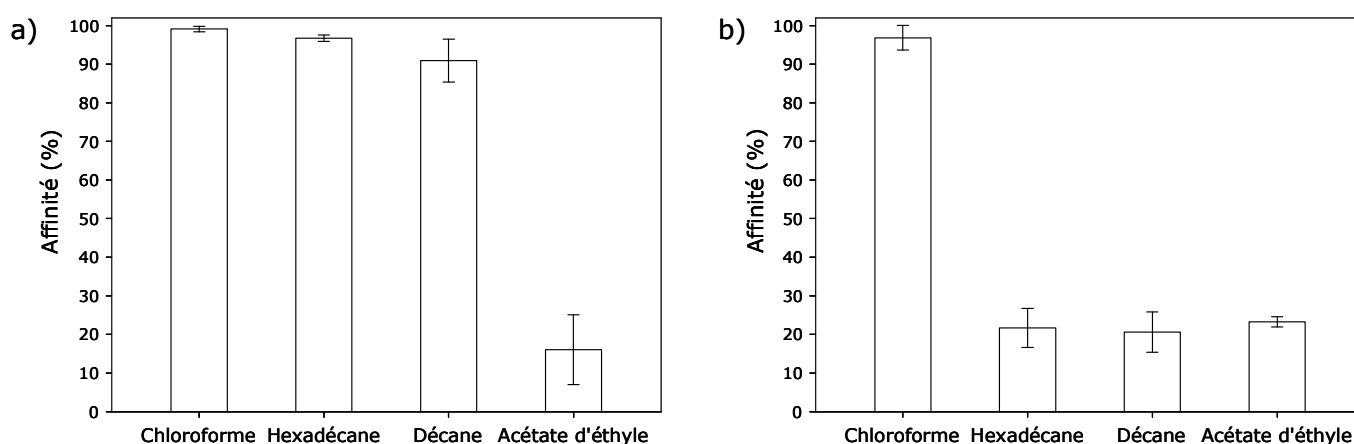


Figure 67. Résultats des tests effectués par méthode MATS sur les bactéries *S. aureus* (a) et *E. coli* (b), prélevées en phase stationnaire de croissance et suspendues dans la solution saline (NaCl 0,15 M).

B – Détermination des propriétés antimicrobiennes des dépôts nanocomposites sur les bactéries modèles

L'activité antimicrobienne des dépôts nanocomposites de type D a ensuite été testée *in vitro* sur les deux modèles bactériens, selon un protocole proche de celui mis en œuvre pour *S. cerevisiae* (durée de la phase d'adhésion réduite ici à 4 h). Les surfaces « témoin » considérées ici sont les coupons d'acier inoxydable vierge, puisqu'il a été démontré l'absence de toxicité de la matrice organosiliciée (dépôt A), du fait de sa composition (surface « inerte », composée uniquement de fragments polymériques) (cf. paragraphe I-B). Les résultats obtenus sur l'ensemble des modèles d'étude permettront ainsi de comparer l'efficacité biocide des revêtements composites sur des microorganismes présentant des caractéristiques différentes (architecture pariétale, réactivité, capacité de résistance, organisation intracellulaire).

1 – Evaluation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus* MW2

La variation du rapport nombre d'UFC/nombre de cellules, choisi comme valeur représentative de la viabilité cellulaire, en fonction du type de surface, est représentée sur la Figure 68. Après contact avec les coupons d'acier inoxydable, ce rapport est égal à $1,65 \pm 0,86$ (valeur comparable à celle obtenue pour les bactéries « contrôle » sans coupon : $1,70 \pm 0,78$), ce qui indique que la viabilité cellulaire n'a pas été affectée par la mise en contact avec ces surfaces. En revanche, ce même rapport, dans le cas des bactéries mises en contact avec le dépôt nanocomposite D (Ag/Si = 1,3), a diminué de manière drastique ($0,007 \pm 0,006$ UFC/bactérie), malgré une forte variabilité (Figure 68). Ce résultat correspond à un abattement moyen de 2,4 log de la population viable cultivable, par rapport à l'acier inoxydable vierge (soit un pourcentage d'inhibition de 99,6%).

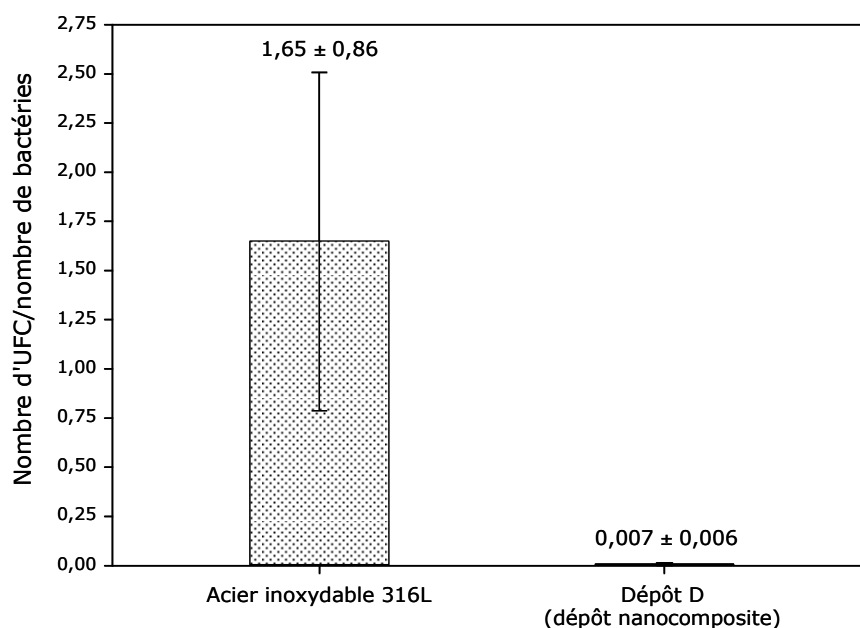


Figure 68. Rapport entre le nombre d'UFC et le nombre de bactéries *S. aureus* MW2 récupérées après 4 h de contact avec l'acier inoxydable et le dépôt nanocomposite D, en solution saline (NaCl 0,15 M).

2 – Caractérisation des propriétés biocides sur *E. coli* K12 MG1655

La variation du rapport nombre d'UFC/nombre de bactéries, en fonction du type de surface testée, est présentée sur la Figure 69. Du fait de la forte hydrophilie de sa surface (cf. paragraphe III-A), *E. coli* a très peu adhéré aux supports testés (*i.e.*, acier inoxydable, dépôt nanocomposite D). Les concentrations bactériennes récupérées pour chaque échantillon à l'issue du temps de contact sont donc très faibles, induisant une imprécision au niveau du dénombrement sur lame de Thoma. Ceci explique l'erreur importante et la valeur faible du rapport nombre d'UFC/nombre de cellules, égal à $0,066 \pm 0,024$ UFC/bactérie après mise en contact avec l'acier inoxydable (Figure 69), relativement proche de celle obtenue pour la suspension « contrôle » ($0,16 \pm 0,09$ UFC/bactérie). Le rapport représentant la viabilité des bactéries après contact avec le dépôt nanocomposite de type D (Ag/Si = 2,1) est égale à $0,002 \pm 0,001$ UFC/bactérie (Figure 69). L'abattement moyen de la population viable cultivable, calculé par rapport au résultat obtenu avec l'acier inoxydable vierge, est égal à 1,5 log (soit 96,6% d'inhibition), permettant d'attribuer une activité biocide des dépôts nanocomposites D sur *E. coli*. Néanmoins, des tests complémentaires, effectués avec des dépôts nanocomposites présentant un contenu inférieur en argent (Ag/Si = 1,3), ont conduit à un abattement moindre de 0,3 log (soit un pourcentage d'inhibition égal à 44,4%), par rapport à la surface témoin. Ceci confirme les conclusions émises pour *S. cerevisiae*, à savoir une efficacité biocide directement corrélée au contenu en argent des dépôts.

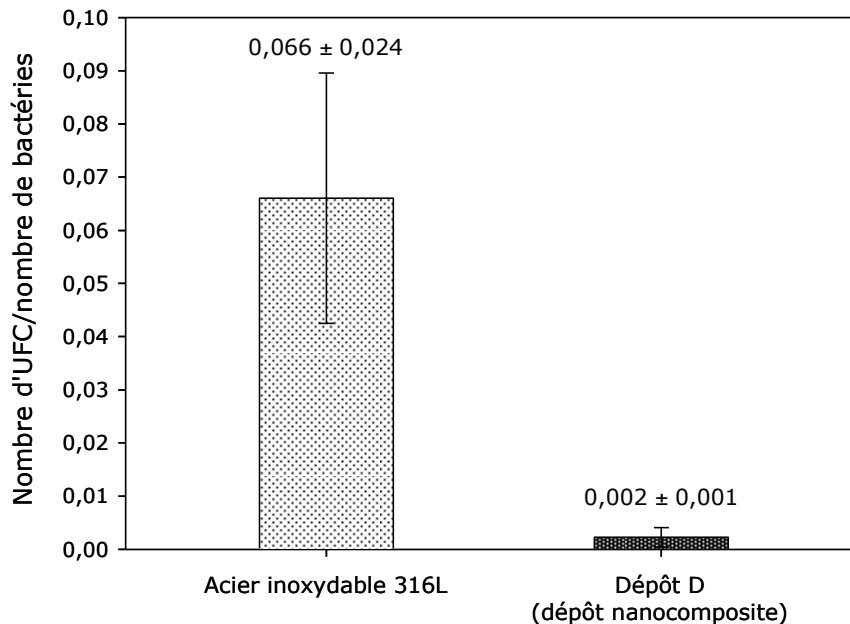


Figure 69. Rapport entre le nombre d'UFC et le nombre de bactéries *E. coli* K12 MG1655 récupérées après 4 h de contact en solution saline (NaCl 0,15 M) avec l'acier inoxydable et le dépôt nanocomposite D.

C – Comparaison de l'efficacité biocide des dépôts nanocomposites sur les trois modèles d'étude

Les dépôts nanocomposites de type D présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis des trois modèles testés, avec un abattement maximal de la population viable cultivable (par rapport à l'acier inoxydable) de 2,4, 1,5 et 1,9 log pour *S. aureus*, *E. coli* et *S. cerevisiae*, respectivement. Néanmoins, en comparant les résultats obtenus sur les deux souches bactériennes, on remarque que, pour une même composition en argent (*i.e.*, Ag/Si = 1,3), l'efficacité biocide des dépôts nanocomposites est plus importante pour *S. aureus* par rapport à *E. coli* (abattement de 2,4 et 0,3 log, respectivement). Pourtant, les travaux de la littérature relatifs aux bactéries soumises à un contact avec de l'argent ionique, introduit sous forme de AgNO₃, s'accordent généralement sur un effet biocide moindre sur les bactéries à Gram positif (Yin *et al.*, 1999 ; Jung *et al.*, 2008). Ainsi, Feng *et al.* (2000) ont démontré que l'argent ionique provoquait des modifications de la structure cellulaire (paroi, membrane, cytoplasme, ADN) plus importantes sur *E. coli* que sur *S. aureus*. De même, les études comparatives entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif, réalisées avec des nanoparticules d'argent en suspension (Shrivastava *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2007) ou englobées dans une matrice (Egger *et al.*, 2009), montrent que la viabilité des bactéries à Gram négatif est plus affectée que celle des bactéries à Gram positif. Ceci s'explique, en partie, par les différences au niveau de la structure pariétale (Shrivastava *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2007).

La paroi des bactéries à Gram négatif (Figure 70) se caractérise par une couche de peptidoglycane de faible épaisseur (6-10 nm), qui ne protège pas la cellule face à l'entrée d'ions et/ou de nanoparticules d'argent. De plus, selon Shrivastava *et al.* (2007), les lipopolysaccharides chargés négativement, présents au niveau de la membrane externe (Figure 70), peuvent interagir avec les ions et les nanoparticules (qui sont chargés positivement) et faciliter leur entrée dans la cellule.

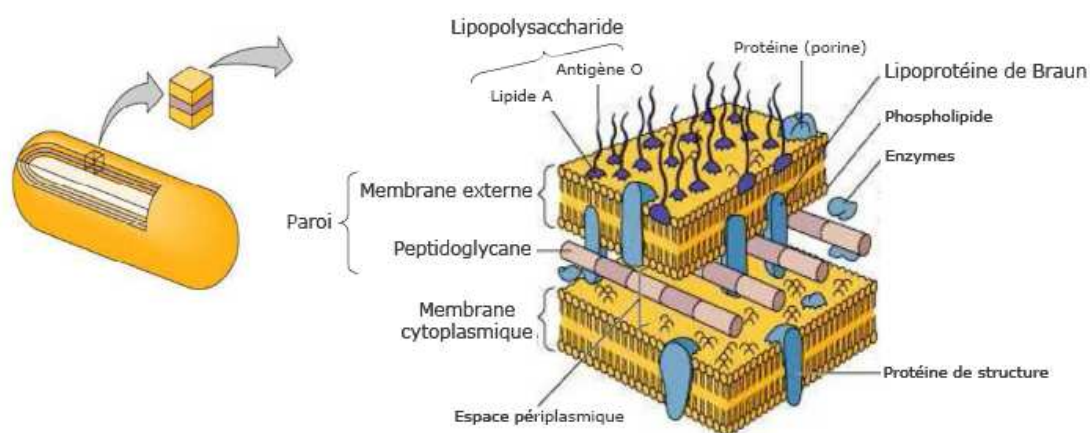


Figure 70. Composition et structure de la paroi des bactéries à Gram négatif (d'après Corvec, 2009).

Au contraire, les bactéries à Gram positif se caractérisent par une paroi constituée de plusieurs couches de peptidoglycane (Figure 71), assemblées en une structure épaisse (15-80 nm) et rigide, qui ralentit la pénétration des ions Ag^+ et/ou des nanoparticules d'argent dans la cellule (Shrivastava *et al.*, 2007 ; Egger *et al.*, 2009). Cette caractéristique confère aux bactéries à Gram positif des mécanismes de défense accrus face à l'argent (Feng *et al.*, 2000), et par suite une sensibilité moindre au niveau cytoplasmique. En outre, selon certains auteurs (Kim *et al.*, 2007 ; Egger *et al.*, 2009), les acides téichoïques et lipotéichoïques constituant la paroi (Figure 71), chargés négativement, provoquent la séquestration des ions Ag^+ et des nanoparticules d'argent par interactions électrostatiques. On constate ici une contradiction avec le rôle attribué dans la littérature au lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif, illustrant la complexité des phénomènes étudiés et démontrant que le mode d'action de l'argent n'est pas encore clairement élucidé à l'heure actuelle.

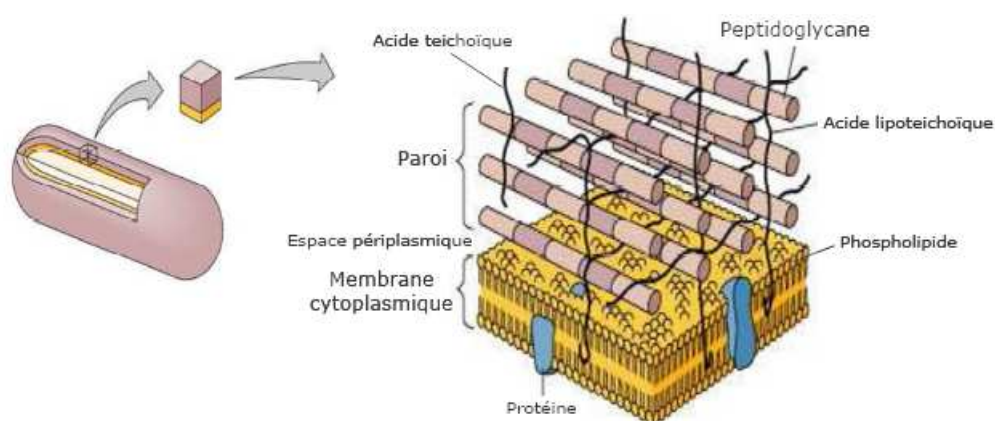


Figure 71. Composition et structure de la paroi des bactéries à Gram positif (d'après Corvec, 2009).

Pour expliquer les résultats obtenus dans notre étude sur *S. aureus* et *E. coli*, nous pouvons supposer que la faible adhésion d'*E. coli* aux surfaces a pu être préjudiciable à l'interaction avec les dépôts nanocomposites et par suite, à l'action des ions Ag^+ relargués (et éventuellement des nanoparticules directement libérées). Au contraire, les bactéries *S. aureus* adhèrent fortement aux différents supports solides, en raison de leur hydrophobicité de surface (cf. paragraphe III-A). Ces résultats indiquent qu'un contact étroit entre bactéries et nanoparticules d'argent présentes en surface des dépôts nanocomposites est certainement indispensable pour garantir une efficacité antibactérienne optimale. Cette hypothèse a par la suite été confirmée, dans le cadre de travaux complémentaires (projet Européen « Napolyde »), en modifiant le mode d'adhésion d'*E. coli* (contact forcé par application d'un film plastique). Dans ce cas, un abattement de 5 log a été atteint, pour des dépôts de teneur en argent similaire à celle de notre étude. Même si les conditions choisies (type de souche, durée de la phase d'adhésion, mode de contact) étaient différentes des nôtres, ce dernier résultat souligne que l'efficacité biocide des films nanocomposites doit toujours être associée au type de protocole mis en œuvre.

Si l'on étend notre comparaison à *S. cerevisiae*, l'activité antimicrobienne est intermédiaire (*i.e.*, abattement de la population viable cultivable de 1,9 log), à mettre en relation d'une part avec ses propriétés de surface moyennement hydrophiles (Guillemot *et al.*, 2007), qui garantissent un contact suffisant avec le dépôt pour obtenir un effet biocide, d'autre part avec la structure pariétale de la levure. En effet, la présence d'une couche interne, constituée de glucanes et de chitine (Figure 72), assure une fonction de protection face aux agressions extérieures.

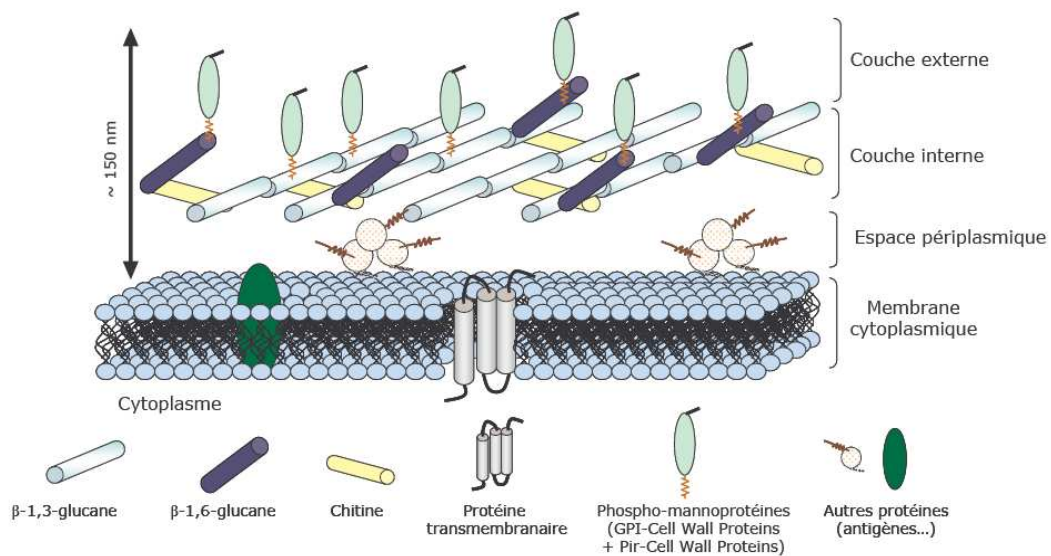


Figure 72. Composition et structure pariétale des levures (d'après Martin-Yken *et al.*, 2002).

Peu de travaux relatifs à l'évaluation des propriétés antimicrobiennes de l'argent, sous forme de nanomatériaux et/ou de nanoparticules colloïdales, effectuent une comparaison bactéries/levures. Seule l'étude reportée récemment par Egger et ses collaborateurs (2009) s'intéresse à un panel étendu de microorganismes, pour étudier les propriétés biocides de nanoparticules, englobées dans des microparticules de silice. Dans le cas de la levure pathogène *C. albicans*, ils ont observé une tolérance intermédiaire entre celle de *S. aureus* et celle d'*E. coli*, sans établir de lien avec les structures pariétales respectives. D'autres travaux (Kim *et al.*, 2007 ; Zeng *et al.*, 2007) décrivent des observations similaires, sans toutefois évoquer les mécanismes mis en jeu au niveau de la paroi. Dans notre étude, la comparaison de l'efficacité antimicrobienne entre les trois microorganismes modèles sélectionnés a été corrélée avec leurs propriétés de surface (composition et structure de la paroi cellulaire, hydrophile/hydrophobie), ce qui constitue une avancée par rapport aux travaux précédemment décrits.

Conclusion

La seconde stratégie mise en œuvre dans notre projet, basée sur le revêtement des surfaces d'acier 316L par des dépôts minces (~ 175 nm), constitués d'une matrice organosiliciée dans laquelle sont incluses des nanoparticules d'argent, s'avère concluante pour prévenir la colonisation du matériau par *S. cerevisiae*. Par rapport aux surfaces d'acier inoxydable, les dépôts nanocomposites présentent une efficacité anti-adhésive vis-à-vis de *S. cerevisiae*, évaluée par méthode hydrodynamique avec une chambre à écoulement cisailé. Comme nous l'avons démontré en étudiant des dépôts avec et sans nanoparticules d'argent, cette propriété est liée à la matrice organosiliciée. Celle-ci forme en effet un film « barrière » non conducteur, empêchant les interactions entre la couche d'oxydes/hydroxydes de l'acier inoxydable et la surface microbienne. De plus, la modulation de la polarité de cette matrice, *via* l'ajout d'oxygène dans le plasma, conduisant à l'obtention d'un dépôt silicié, a permis de renforcer l'efficacité anti-adhésive par l'établissement d'interactions microorganismes/support de type « répulsion hydrophile ». Bien que l'efficacité anti-adhésive des dépôts nanocomposites diminue avec l'augmentation de leur contenu en argent, ils facilitent dans tous les cas le détachement des levures, par rapport à l'acier inoxydable vierge.

L'intérêt de l'inclusion des nanoparticules d'argent dans la matrice organosiliciée réside dans les propriétés biocides qu'elle confère aux dépôts nanocomposites. L'efficacité antimicrobienne *in vitro* de ce type de dépôts a été quantifiée de manière indirecte, en évaluant la reprise de croissance sur milieu gélosé des cellules, après 24 h de contact dans une solution saline (NaCl 0,15 M). Les dépôts nanocomposites présentant une composition en argent de l'ordre de 20-25% at. (Ag/Si compris entre 1,4 et 2,2) sont biocides vis-à-vis de *S. cerevisiae* (*i.e.*, réduction maximale de la population viable cultivable de 1,9 log par rapport à la matrice sans argent). De plus, l'efficacité antifongique a pu être corrélée au contenu en argent des dépôts. L'activité biocide des dépôts nanocomposites est liée à la libération d'ions Ag^+ (évaluée par ICP-MS) au contact du milieu biologique, suite à l'oxydation/dissolution des nanoparticules dotées d'une forte réactivité. Un gradient de concentration en ions Ag^+ est donc créé à proximité de la surface du support. En outre, une contribution directe des nanoparticules relarguées par les dépôts, lors de leur contact avec les microorganismes, n'est pas à exclure.

Dans la continuité de ces expérimentations, nous avons cherché à comprendre chez *S. cerevisiae* le (ou les) mécanisme(s) d'action de l'argent issu des dépôts nanocomposites. Pour cela, une étude par microspectroscopie FTIR a été réalisée, pour la première fois, sur des levures exposées à un stress de type « argent ». Grâce aux propriétés du rayonnement Synchrotron, l'analyse a pu être effectuée *in situ*, à l'échelle de la cellule unique, avec une résolution spatiale sub-cellulaire. Une altération de la structure secondaire des protéines pariétales et intracellulaires a été mise en

évidence, correspondant à la transition d'une conformation active à une structure inactive. Cette étude à l'échelle moléculaire a été corrélée à des observations en MET, couplées à une analyse par EDS. Suite au contact avec les dépôts nanocomposites, la morphologie cellulaire et l'organisation intracellulaire sont endommagées (paroi, membrane, organites). L'argent est présent au niveau de la paroi, sous forme d'agrégats également constitués de soufre et de phosphore. Ces amas correspondent à des ions Ag^+ réduits en présence de composés cellulaires ou excrétés de manière active par la levure, ou encore à des nanoparticules directement détachées de la surface du dépôt. L'argent est également présent dans le cytoplasme, sous forme d'agrégats (observés en MET) et distribué de manière homogène à l'intérieur des cellules (analyse par MET-EDS). Une interaction a été mise en évidence entre le métal et des composés soufrés et phosphorylés, vraisemblablement des protéines, confirmant les résultats de microspectroscopie FTIR.

Un mécanisme d'action de l'argent sur les levures peut ainsi être proposé, en conciliant nos résultats et les données présentées dans la littérature. Les ions Ag^+ chargés positivement (et éventuellement les nanoparticules ou agrégats d'argent) se lient aux composés pariétaux chargés négativement (notamment les phospho-mannoprotéines) et perforent l'enveloppe cellulaire, augmentant sa perméabilité. L'argent sous forme ionique et/ou particulaire pénètre ensuite à l'intérieur de la levure et induit des effets dégénératifs sur les enzymes cytosoliques et sur les organites intracellulaires, notamment les mitochondries. Ces altérations perturbent, voire inhibent, certains processus métaboliques, tels que la respiration mitochondriale ou les mécanismes de défense face au stress oxydant, pour, *in fine*, conduire à l'apoptose cellulaire. Un effet délétère sur l'ADN et l'ARN ne doit pas être écarté, bien qu'il n'ait pas été mis en évidence dans nos travaux, notamment en microspectroscopie FTIR (*i.e.*, pas d'action significative de l'argent relargué par les dépôts nanocomposites sur les acides nucléiques). Les observations en MET n'ont pas révélé de mécanisme de protection par condensation de l'ADN, dans les levures mises en contact avec les dépôts contenant des nanoparticules, comme souligné par Morones *et al.* (2005). Ce résultat peut également s'expliquer par la faible concentration d'argent sous forme nanoparticulaire.

Concernant la détermination de l'espèce impliquée dans l'activité antimicrobienne des films nanocomposites (*i.e.*, ions Ag^+ et/ou nanoparticules), les résultats obtenus semblent indiquer une action combinée des deux entités.

L'évaluation du caractère biocide ayant été réalisée dans un milieu salin (NaCl 0,15 M), il serait intéressant d'évaluer l'impact de la formation de complexes de type AgCl_2^- , AgCl_3^- ou encore AgCl_4^- , solubles dans l'eau, sur cette activité. En effet, selon Gupta *et al.* (1998), la présence d'une concentration importante d'ions chlorure, par rapport à celle des ions Ag^+ , permet la formation de ces complexes. Ces derniers pénètrent plus facilement la membrane des bactéries *E. coli*, augmentant la biodisponibilité de l'argent et par conséquent, sa toxicité (Gupta *et al.*, 1998). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que ces complexes jouent le rôle de « transporteurs » entre la surface des nanoparticules et la surface cellulaire.

Une comparaison de l'activité antimicrobienne des dépôts a ensuite été réalisée sur les deux modèles procaryotes choisis pour l'étude, *S. aureus* et *E. coli*. Une efficacité plus importante a été observée sur *S. aureus* (abattement maximal de 2,4 log), par rapport à *E. coli* (abattement maximal de 1,5 log). Ces résultats devront être confirmés, notamment dans le cas d'*E. coli*, en modifiant le mode de contact, par exemple par application d'un film plastique forçant l'adhésion des bactéries aux surfaces. Les données obtenues sur les trois microorganismes d'étude ont pu être expliquées, en partie, par l'architecture des parois cellulaires, et principalement par les propriétés de surface des microorganismes (*S. aureus* très hydrophobe, *S. cerevisiae* moyennement hydrophile et *E. coli* très hydrophile) influençant le contact avec le support. Comme dans le cas des levures, l'activité antibactérienne a pu être corrélée au contenu en argent des dépôts.

A notre connaissance, la plupart des travaux de la littérature portant sur la détermination des mécanismes d'action de l'argent (ionique et/ou nanoparticulaire), à l'origine de son activité biocide, se focalisent sur un seul modèle microbien (Yang et Pon, 2003 ; Soni et Salopek-Soni, 2004 ; Holt et Bard, 2005). Lorsqu'une investigation est réalisée sur différentes classes de microorganismes (eucaryotes/procaryotes, bactéries à Gram positif/Gram négatif), elle reste très descriptive (Kim *et al.*, 2007 ; Egger *et al.*, 2009). Ainsi, peu d'études conjuguent la compréhension des mécanismes impliqués dans l'activité antimicrobienne du matériau ou du revêtement de surface testé et la comparaison de l'efficacité sur différents microorganismes modèles, comme c'est le cas ici.

Les investigations menées sur les levures sessiles et planctoniques ont montré que l'activité antimicrobienne des dépôts nanocomposites reste localisée à proximité des surfaces. Ce résultat a été confirmé dans le cas des bactéries, pour lesquelles un contact étroit avec la surface des dépôts nanocomposites est requis pour garantir une activité biocide optimale. Ainsi, seuls les microorganismes s'approchant de la surface ou réussissant à entrer en contact direct avec les dépôts nanocomposites (malgré leurs propriétés anti-adhésives) sont tués. L'absence d'effet systémique sur l'ensemble de la population microbienne constitue un atout pour limiter le développement des microorganismes sur les surfaces, tout en n'altérant pas la flore technologique en suspension dans les produits alimentaires, les tissus en cours de régénération après la pose d'un implant ou encore l'environnement aquatique et terrestre.

En conclusion, les dépôts nanocomposites présentent une efficacité anti-adhésive notable par rapport à l'acier inoxydable, combinée à une activité antimicrobienne ciblée sur les microorganismes réussissant à interagir avec la surface. Les résultats obtenus démontrent l'importance de l'optimisation du contenu en argent des dépôts nanocomposites, pour atteindre un

compromis entre les deux propriétés. Cette double fonctionnalité constitue une originalité par rapport aux traitements de surface ne présentant que l'une ou l'autre de ces caractéristiques.

Dans la suite de notre étude, nous nous sommes intéressés au maintien – ou à l'évolution – des propriétés anti-adhésives et antimicrobiennes des dépôts nanocomposites vis-à-vis de *S. cerevisiae*. Afin de reproduire les différentes conditions de « vieillissement », des expériences de détachement et des tests de toxicité ont été répétés plusieurs fois sur les mêmes échantillons, avec des étapes intermédiaires de nettoyage selon le protocole acétone/éthanol. Les techniques d'investigation, mises en œuvre au Chapitre II, ont permis d'évaluer les modifications de la composition élémentaire, de la structure chimique et des caractéristiques physico-chimiques (caractère polaire) des dépôts nanocomposites, pour ensuite corrélérer les variations observées à l'évolution de l'efficacité anti-adhésive et biocide. Cette étude fait l'objet du Chapitre IV.

CHAPITRE IV – INFLUENCE DE L'UTILISATION REPETEE DES DEPOTS NANOCOMPOSITES SUR LEURS PROPRIETES ANTI-ADHESIVES ET ANTIMICROBIENNES

Dans le chapitre précédent, les dépôts nanocomposites D se sont avérés le meilleur compromis pour prévenir l'adhésion de *S. cerevisiae* à l'acier inoxydable 316L, en couplant une efficacité anti-adhésive, liée à la matrice organosiliciée (film « barrière »), et une activité biocide due au relargage d'ions Ag⁺ (et probablement de nanoparticules d'argent), provoquant de nombreuses perturbations structurales et fonctionnelles des levures, notamment au niveau des protéines. L'efficacité antimicrobienne a d'autre part été confirmée sur les procaryotes modèles, *S. aureus* et *E. coli*. Dans la perspective des applications visées (domaine biomédical, secteur agro-alimentaire, etc.), il nous a semblé primordial de s'assurer du maintien ou d'évaluer l'évolution de ces deux propriétés suite à plusieurs utilisations successives, en estimant la stabilité physico-chimique des dépôts dans un milieu aqueux salin (NaCl 0,15 M), « mimant » les environnements rencontrés. Cette étude constitue une analyse originale par rapport à d'autres travaux réalisés dans le domaine du traitement des surfaces à visée « anti-biofilm », souvent restreints à la caractérisation des revêtements natifs. Le microorganisme ciblé est *S. cerevisiae*. Des dépôts nanocomposites D ont ainsi subi deux cycles de nettoyage chimique/utilisation (expérience de détachement en chambre à écoulement cisailé ou test de toxicité par reprise de la croissance cellulaire sur milieu gélosé), selon les protocoles détaillés dans les chapitres précédents. L'évolution de l'efficacité anti-adhésive et antifongique a été interprétée en se basant sur la caractérisation des dépôts après le premier cycle d'utilisation, par observation en MEB couplée à une analyse EDS, spectroscopie XPS et détermination du paramètre Auger modifié et mesures d'angles de contact avec l'eau.

Pour compléter cette étude, des tests complémentaires ont été réalisés par immersion des dépôts nanocomposites dans la solution saline (NaCl 0,15 M), pour des durées variables (6 h, 15 jours et 60 jours). Ainsi, des analyses par spectroscopie XPS ont permis de déterminer l'évolution sur 6 h de la quantité d'argent en surface des dépôts et de son degré d'oxydation. La structure interne de dépôts immergés pendant 15 jours a été analysée par MET-EDS et spectroscopie Raman. Enfin, une analyse par ToF-SIMS a permis d'évaluer le profil de composition en épaisseur suite à un stockage prolongé de 60 jours.

I – Evolution de l’efficacité anti-adhésive des dépôts nanocomposites D

Trois coupons d’acier inoxydable recouverts du dépôt nanocomposite D ont subi chacun deux expériences de détachement successives, afin d’évaluer l’influence d’une utilisation répétée sur leur efficacité anti-adhésive vis-à-vis de *S. cerevisiae*. La Figure 73 présente, à titre d’exemple, les profils de détachement obtenus lors de la première et de la seconde utilisation de l’un de ces trois dépôts. Le Tableau 18 présente le nombre de levures initialement adhérees (N_0) dans la zone d’observation au début des deux expériences réalisées avec ce dépôt, et répertorie les contraintes de cisaillement pariétales caractéristiques.

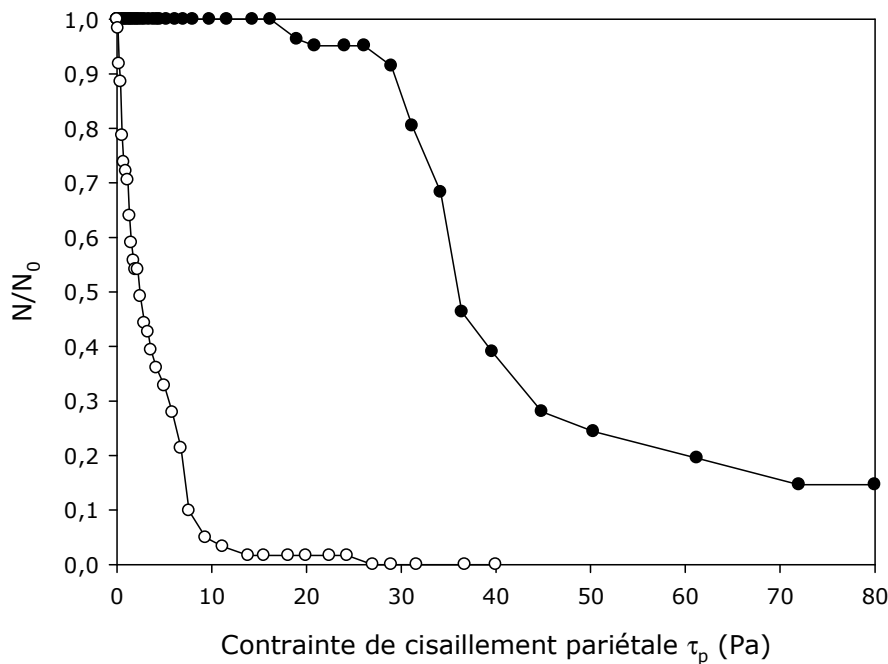


Figure 73. Profils de détachement obtenus pour les levures *S. cerevisiae* BY4741 préalablement adhérees à la surface d’un coupon recouvert du dépôt nanocomposite D : première utilisation (●) et seconde utilisation (○) du dépôt (NaCl 0,15 M).

Tableau 18. Nombre de levures initialement adhérees (N_0) à la surface du dépôt nanocomposite D et contraintes de cisaillement τ_p 2%, τ_p 50% et τ_p 90% pour chaque utilisation.

Dépôt de type D	N_0 (nombre de levures/cm ²)	τ_p 2% (Pa)	τ_p 50% (Pa)	τ_p 90% (Pa)
1 ^{ère} utilisation	$8,5 \cdot 10^4$	17,55	36,00	NA
2 ^{nde} utilisation	$6,4 \cdot 10^4$	0,01	2,36	7,62

NA : non atteint

Lors de la première utilisation du dépôt nanocomposite D, la mise en circulation de la solution saline n'a provoqué aucun détachement des levures présentes dans la zone d'observation ($N_0 = 8,5 \cdot 10^4$ levures/cm²). En revanche, lors de la seconde utilisation de ce même dépôt, environ 20% des levures initialement présentes n'ont pas adhéré. Ainsi, le nombre de cellules initialement adhérentes (N_0) est plus faible (à $6,4 \cdot 10^4$ levures/cm²) (Tableau 18). Ce résultat semble d'ores et déjà indiquer une augmentation des propriétés anti-adhésives du dépôt vis-à-vis de *S. cerevisiae*, suite au premier contact avec le milieu biologique. La comparaison des profils de détachement confirme cette présomption (Figure 73). En effet, pour le dépôt natif, un seuil est observé avant le début du détachement ($\tau_{p\ 2\%} = 17,55$ Pa), ce qui n'est pas le cas pour le dépôt déjà utilisé une fois ($\tau_{p\ 2\%} = 0,01$ Pa) (Tableau 18). La contrainte de cisaillement nécessaire pour détacher 50% des levures initialement adhérentes est divisée d'un facteur 15 entre le dépôt natif et après utilisation. Enfin, 90% des levures sont éliminées pour $\tau_p = 7,62$ Pa, alors que cette valeur n'avait pu être atteinte pour le dépôt natif (Figure 73). Des tendances similaires ont été observées avec les deux autres dépôts nanocomposites de type D (données non présentées).

On observe donc une augmentation très significative du détachement des levures entre les dépôts nanocomposites natifs et après une première utilisation. Il est intéressant de noter que l'efficacité anti-adhésive observée lors de la seconde utilisation est proche de celle obtenue dans le cas de matrice organosiliciée sans nanoparticules d'argent (dépôt A ; cf. Figure 56, partie I-A-1 du Chapitre III). Cette amélioration de l'effet anti-adhésif peut être attribuée à des modifications de composition de surface des dépôts, suite au premier contact avec le milieu biologique.

Nous allons maintenant nous intéresser à l'évolution des propriétés biocides des films nanocomposites D.

II – Evolution de l’activité antifongique des dépôts nanocomposites D

L’efficacité biocide des cinq dépôts nanocomposites de type D, déjà utilisés pour un premier test sur *S. cerevisiae* (cf. paragraphe I-B, Chapitre III de la partie Résultats), a été à nouveau évaluée *in vitro* selon le même protocole, en considérant les dépôts A de matrice organosiliciée comme surface contrôle. La Figure 74 présente le rapport entre le nombre d’UFC et le nombre de levures récupérées après contact avec les dépôts A et les dépôts nanocomposites D, lors de la seconde utilisation. Les résultats obtenus sur les dépôts natifs, déjà présentés au Chapitre III (paragraphe I-B) sont indiqués pour mémoire.

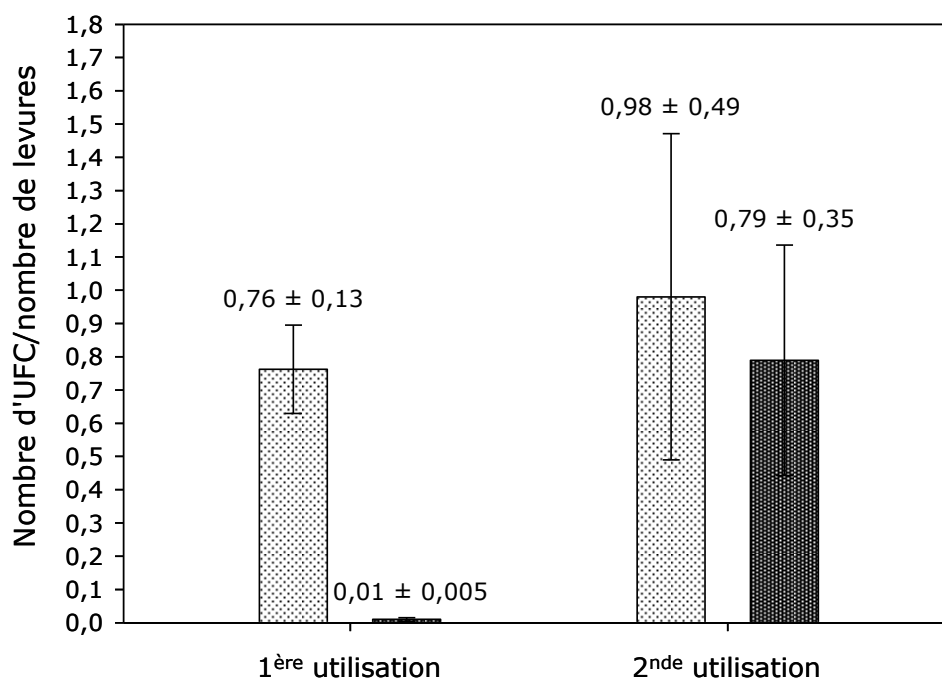


Figure 74. Rapport entre le nombre d’UFC et le nombre de levures *S. cerevisiae* BY4741, récupérées après 24 h de contact avec le dépôt A de matrice organosiliciée (▨) et le dépôt nanocomposite D (▩), lors de chaque utilisation (NaCl 0,15 M).

Contrairement au test réalisé sur les surfaces natives, où une forte diminution de la viabilité avait été mise en évidence (*i.e.*, réduction de la population viable cultivable de 1,9 log par rapport à la matrice, soit une inhibition de 98,7%), aucune perte de viabilité significative n’est observée lors de la seconde utilisation (abattement moyen égal à 0,1 log, soit 19,5% d’inhibition). Ce résultat est confirmé par les pourcentages de viabilité déterminés par coloration au bleu de méthylène (91% de viabilité, contre 4% pour le dépôt natif). De plus, l’ultra-structure des levures (observée en MET), après 24 h de contact avec les dépôts nanocomposites déjà utilisés, n’est pas altérée, que ce soit au niveau de la paroi, de la membrane ou des organites intracellulaires (Figure 75), retrouvant ainsi les caractéristiques décrites pour les surfaces non biocides à l’état natif (acier inoxydable,

matrice) (cf. Figure 65, Chapitre III). Au vu de l'ensemble de ces résultats, les dépôts nanocomposites ne présentent plus d'activité antifongique lors de leur seconde utilisation.

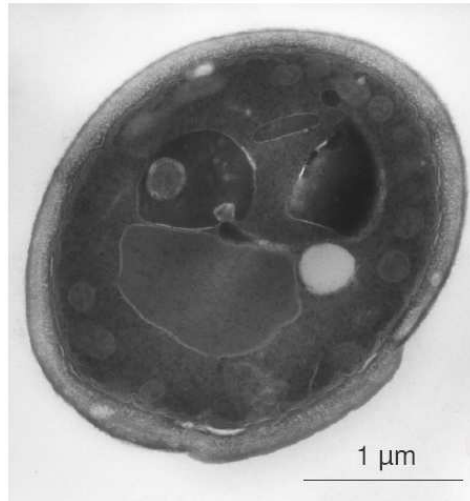


Figure 75. Photographie en MET d'une coupe ultrafine de *S. cerevisiae* BY4741 après 24 h de contact en solution saline avec le dépôt nanocomposite D utilisé pour la seconde fois.

Pour comprendre les évolutions observées en termes d'efficacité anti-adhésive et biocide, des analyses par spectroscopie XPS et des mesures d'angle de contact avec l'eau ont été réalisées sur les dépôts après leur première utilisation et comparées à celles obtenues sur les surfaces natives (cf. Chapitre II de la partie Résultats).

III – Caractéristiques des dépôts nanocomposites D évalués après utilisation : corrélation avec l'évolution des propriétés anti-adhésives et biocides

Lors de la seconde utilisation des dépôts nanocomposites D, une augmentation de l'efficacité anti-adhésive, couplée à une perte de l'activité antifongique, a été observée. Pour interpréter ces modifications, une caractérisation fine a été réalisée sur les dépôts après leur première utilisation.

A – Evolution de la topographie des dépôts

Un dépôt nanocomposite D utilisé en chambre à écoulement et un autre employé pour le premier test de toxicité ont été observés par MEB. En comparant les photographies obtenues à celles du dépôt natif correspondant (Figure 76), on constate une modification de la topographie du dépôt. En effet, le dépôt D natif présente une surface granulaire (Figure 76 a), similaire à celle décrite dans le Chapitre II pour les dépôts B et E (Figure 35). Les nanoparticules d'argent (agrégats gris clairs), de forme sphérique et présentant un diamètre compris entre 5 et 25 nm, sont réparties de manière homogène sur la surface de la matrice organosiliciée dans laquelle elles sont incluses. Au contraire, sur la photographie des dépôts après utilisation (Figures 76 b et c), il est très difficile d'identifier les nanoparticules et des trous de taille différente pour les deux dépôts (zones en gris clair) sont observés.

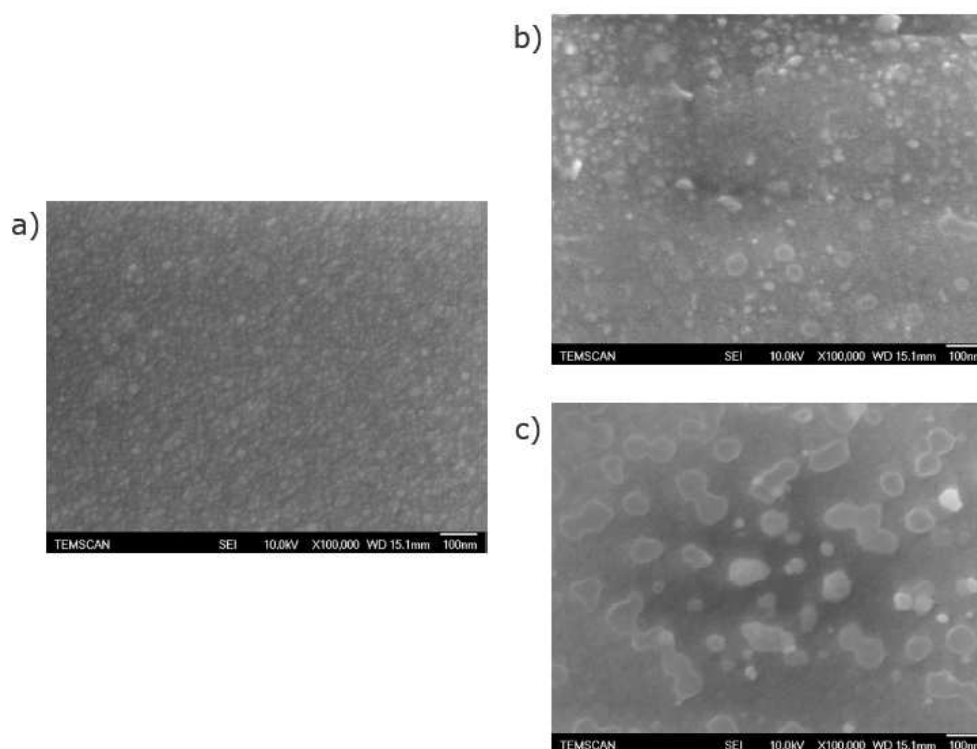


Figure 76. Photographies en MEB du dépôt nanocomposite D natif (a), après une expérience de détachement réalisée en chambre à écoulement cisailé (b) et après un test de toxicité (c).

L'analyse EDS indique que les dépôts D utilisés une première fois, indépendamment du test considéré, sont toujours constitués de Si, C, O et Ag et révèle également la présence d'azote, certainement liée au contact avec les microorganismes (données non présentées). L'analyse EDS a également détecté du chlore, dont la présence est due à l'immersion du dépôt en solution saline (NaCl 0,15 M).

B – Evaluation de la composition et des propriétés physico-chimiques de surface des dépôts nanocomposites après vieillissement

1 – Caractérisation XPS des dépôts après utilisation

Afin de comprendre plus précisément l'évolution des propriétés anti-adhésives et biocides, la composition et la structure chimique de l'extrême surface des dépôts nanocomposites D testés une première fois (chambre à écoulement ou test de toxicité) ont été analysées par spectroscopie XPS. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux déterminés pour le dépôt D natif et l'interprétation a été réalisée en se basant sur l'étude exposée au Chapitre II. A titre de comparaison, des analyses ont également été réalisées sur le dépôt A de matrice organosiliciée, après utilisation en chambre à écoulement cisailé. La Figure 77 présente les spectres de haute résolution (C 1s, O 1s, Si 2p, N 1s, Ag 3d) et le pic Auger de l'argent obtenus par analyse d'un dépôt D ayant subi une expérience de détachement. La Figure 78 présente l'évolution des rapports atomiques C/Si, O/Si, Ag_{métal}/Si et Ag_{oxydé}/Si du dépôt D natif et après sa première utilisation en conditions dynamiques (expérience de détachement) ou en conditions statiques (test de toxicité).

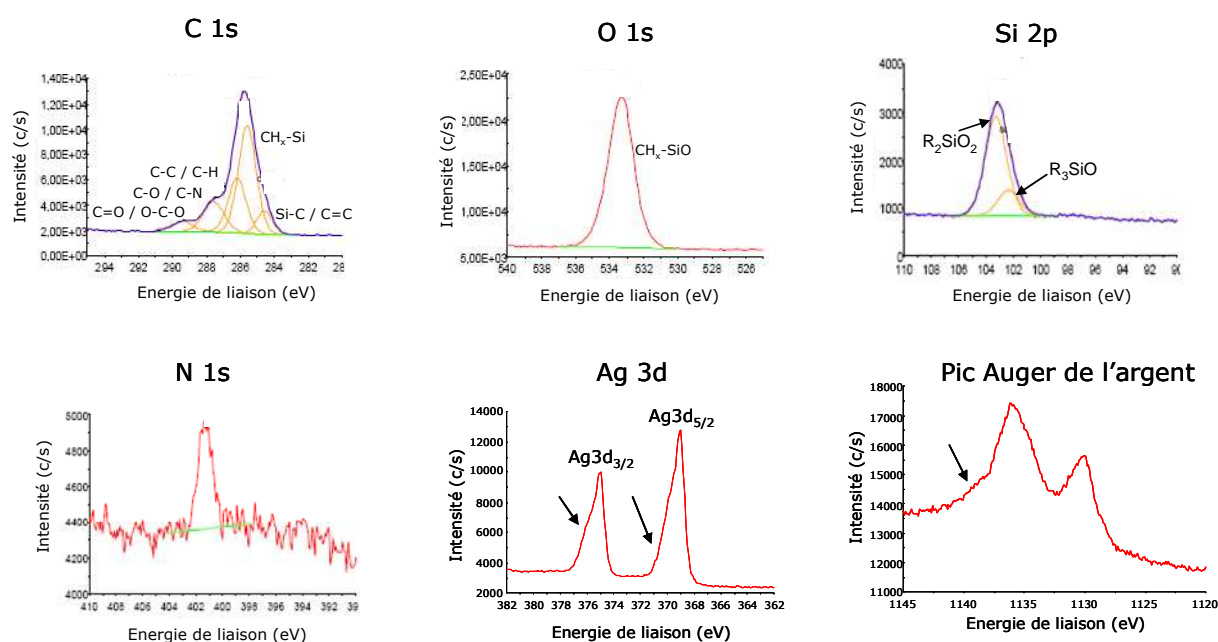


Figure 77. Spectres de haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s, Si 2p, N 1s, Ag 3d et pic Auger obtenus par analyse XPS du dépôt nanocomposite D après une première expérience de détachement.

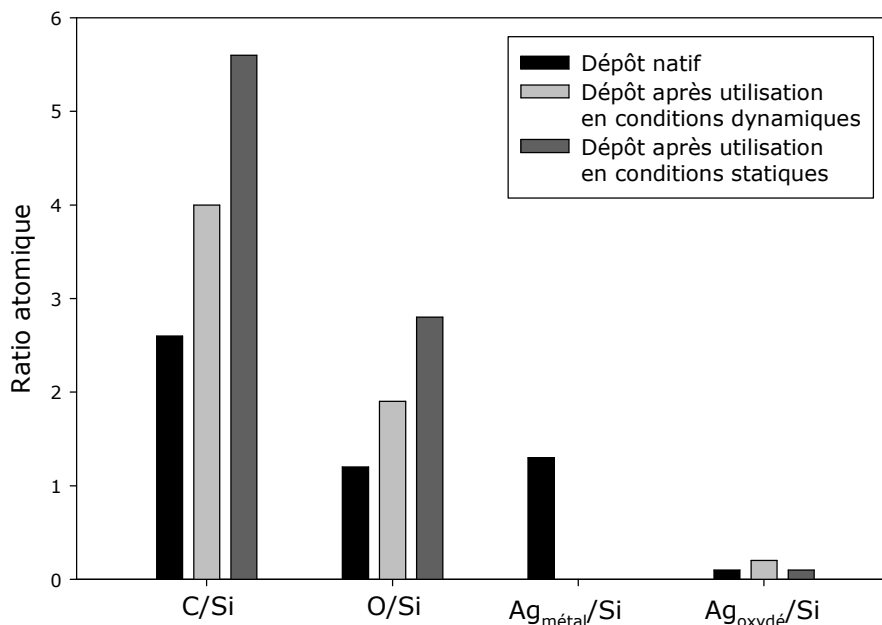


Figure 78. Evolution de la composition du dépôt nanocomposite D (ratios atomiques de C/Si, O/Si, Ag_{métal}/Si et Ag_{oxydé}/Si), avant et après utilisation en chambre à écoulement cisailé ou en test de toxicité.

L'analyse XPS réalisée sur les dépôts D après utilisation en chambre à écoulement cisailé ou en test de toxicité révèle que la matrice est toujours organosiliciée, comme dans le cas du dépôt natif. En effet, en utilisant la méthodologie employée au paragraphe III-A-1 du Chapitre II pour les dépôts natifs, le niveau de cœur Si 2p peut être décomposé en deux pics élémentaires, correspondant aux composés R₂SiO₂ et R₃SiO (Figure 77). De plus, la décomposition du spectre C 1s montre la présence majoritaires de liaisons Si-CH_x (x = 1, 2, 3) (Figure 77) et le pic O 1s correspond à une seule composante, attribuée aux liaisons O-Si-CH_x (Figure 77). Enfin, la valeur de l'écart en énergie de liaison $\Delta(\text{C } 1s - \text{Si } 2p)$, obtenue en se basant sur les positions en énergie de liaison définies précédemment, est égale à 182,2 eV, ce qui confirme la nature organosiliciée de la matrice constituant les dépôts D utilisés une fois.

Néanmoins, en comparant les pics élémentaires du niveau de cœur Si 2p obtenu pour le dépôt natif (Figure 44 du Chapitre II) et le dépôt après utilisation en chambre à écoulement (Figure 77), on remarque que la quantité de composés R₂SiO₂ a augmenté par rapport à celle de R₃SiO. Enfin, une faible diminution de la valeur de l'écart en énergie de liaison a été observée, par rapport au dépôt natif (pour lequel $\Delta(\text{C } 1s - \text{Si } 2p) = 182,5$ eV). Ces résultats indiquent une oxydation du silicium constituant les couches superficielles de la matrice des dépôts D, liée à leur immersion en milieu salin (NaCl 0,15 M). Des observations similaires ont été réalisées dans le cas de la matrice organosiliciée seule (dépôt A) native et après utilisation en chambre à écoulement (*i.e.*, proportion plus importante de composés R₂SiO₂ par rapport aux composés R₃SiO ; diminution de l'écart en énergie de liaison, qui passe de 182,5 eV à 182,3 eV), confirmant une oxydation du silicium présent en surface, suite au contact avec le milieu salin (environnement oxydant).

Après utilisation du dépôt D en chambre à écoulement cisailé, on constate également une augmentation significative de la quantité de carbone et d'oxygène en surface (C/Si passe de 2,6 à 4,0 et O/Si de 1,2 à 1,9 ; Figure 78), qui s'explique par la présence de liaisons $Si-C$ et/ou $C=C$, et de liaisons $C-C/C-H$, $C-O/C-N$ et $C=O/O-C-O$, déterminée par décomposition du niveau de cœur C 1s (Figure 77). Ce résultat indique la présence de contaminants organiques en surface des dépôts nanocomposites après utilisation, en quantité beaucoup plus importante qu'à l'état natif (seul un épaulement correspondant aux liaisons $C-C/C-H$ et $C-O/C-N$ a été observé dans ce cas sur le spectre C 1s ; cf. Figure 44 du Chapitre II). Il est possible que cette « pollution » provienne de l'atmosphère ambiante. Néanmoins, l'apparition d'une faible quantité d'azote (*i.e.*, $N/Si = 0,09$; Figure 77) laisse supposer que le contact avec les levures et/ou des composés excrétés par les cellules est plutôt à l'origine de la contamination détectée.

Dans le cas du dépôt A de matrice organosiliciée après utilisation en conditions dynamiques, bien que la quantité de carbone diminue légèrement (*i.e.*, C/Si passe de 2,6 à 2,1), la décomposition du niveau de cœur C 1s démontre la présence de liaisons $C-C/C-H$, $C-O/C-N$ et $C=O/O-C-O$ (en plus des liaisons $Si-CH_x$ ($x = 1, 2, 3$) ; spectre non présenté). Ce résultat démontre une contamination par des composés organiques, qui n'étaient pas détectés à la surface de la matrice à l'état natif (seule la composante attribuée à $Si-CH_x$ a été observée dans ce cas ; cf. Figure 41 du Chapitre II). Comme pour le dépôt nanocomposite, le contact avec la suspension cellulaire permet probablement d'expliquer la présence de ces contaminants, même si, du fait de la faible adhésion des levures à ce type de revêtement, aucune trace d'azote n'a pu être détectée en XPS. Comme exposé pour le dépôt D, l'augmentation du rapport O/Si (de 0,7 à 1,3) peut également être liée à cette contamination.

Contrairement au dépôt nanocomposite, les liaisons $Si-C$ et/ou $C=C$ n'ont pas été détectées en surface du dépôt A après vieillissement (données non présentées). Comme mentionné au paragraphe III-A-3.3 du Chapitre II, on peut supposer que la présence d'argent dans les dépôts nanocomposites a favorisé des transformations chimiques de la matrice, comme par exemple des réactions d'oxydation et/ou de déshydrogénation, lors des différentes étapes avant les analyses XPS (contact avec la solution saline lors de l'expérience de détachement, stockage dans l'atmosphère ambiante) (Hlidek *et al.*, 2008 ; Hanus *et al.*, 2009).

La modification la plus significative de la composition des dépôts D après utilisation concerne le contenu en argent (Figures 77 et 78). En effet, le rapport atomique $Ag_{\text{métal}}/Si$ passe de 1,3 pour le dépôt natif à 0,0 pour le dépôt « vieilli » et la totalité de l'argent est, dans ce cas, présente sous forme d'oxyde ($Ag_{\text{oxydé}}/Si = 0,2$; Figure 78). La valeur du paramètre Auger modifié (α') diminue de 726,0 eV, correspondant à de l'argent majoritairement sous forme métallique ($Ag_{\text{métal}}/Ag_{\text{oxydé}} = 13$), à 724,1 eV, valeur classiquement associée à de l'oxyde d'argent (Schön, 1973 ; Bera *et al.*, 2006). La diminution drastique du contenu en argent des dépôts, révélée sur le niveau de cœur Ag 3d (Figure 77), est confirmée par le fait que le niveau de cœur Ag 4s n'est plus

déecté à proximité du niveau de cœur Si 2p. De plus, le pic correspondant à l'oxygène de l'oxyde d'argent, observé dans le cas du dépôt à l'état natif, ne l'est plus après utilisation (Figure 77), ce qui s'explique par la faible quantité d'oxyde métallique présente en surface. La profondeur de pénétration de la technique d'analyse XPS étant inférieure à 12 nm, cela indique que les couches superficielles du dépôt nanocomposite ne contiennent plus qu'une proportion très faible d'argent, uniquement sous forme oxydée, après une seule expérience de détachement.

Lors des expériences de détachement en chambre à écoulement cisailé, le temps de contact entre le dépôt testé et la solution saline est d'environ 6 h. Les modifications de la composition du film nanocomposite D ont également été évaluées après utilisation en test de toxicité, c'est-à-dire pour une durée d'immersion plus longue (*i.e.*, 24 h). Comme précédemment, la matrice constituant le dépôt utilisé est toujours organosiliciée et le silicium présent en surface est oxydé ($R_2SiO_2 > R_3SiO$; données non présentées).

Les rapports atomiques C/Si et O/Si ont fortement augmenté (de 2,6 à 5,6 et de 1,2 à 2,8, respectivement), suite à l'utilisation du dépôt en test de toxicité (Figure 78). En outre, de l'azote est détecté en faible quantité ($N/Si = 0,15$). Par conséquent, la mise en contact du dépôt nanocomposite avec *S. cerevisiae* pendant 24 h a provoqué une augmentation significative de la contamination organique en surface. On remarque que la quantité de contaminants est plus importante dans le cas du dépôt utilisé en test de toxicité que dans celui du film utilisé en chambre à écoulement (Figure 78), ce qui s'explique vraisemblablement par les durées différentes de mise en contact avec les levures (*i.e.*, 24 h pour le test de toxicité et moins de 6 h pour l'expérience en conditions dynamiques, du fait du détachement des levures ; cf. paragraphe I-A-2 du Chapitre III).

Comme dans le cas du dépôt utilisé en chambre à écoulement, l'analyse XPS démontre que la quantité d'argent en surface du dépôt nanocomposite a fortement diminué : le ratio $Ag_{m\acute{e}tal}/Si$ passe de 1,3 à 0,0 et tout l'argent résiduel est oxydé ($Ag_{total}/Si = Ag_{oxyd\acute{e}}/Si = 0,1$) (Figure 78). La valeur du paramètre Auger modifié (724,2 eV) confirme l'état oxydé de l'argent. En comparant les résultats obtenus sur les dépôts après utilisation (Figure 78), on constate que la quantité de métal subsistant après le test de toxicité est plus faible que celle quantifiée après expérience de détachement, ce qui s'explique probablement là aussi par les différences de durée d'immersion.

2 – Evolution de la quantité d’argent en surface du dépôt D lors d’une immersion de courte durée en solution saline (NaCl 0,15 M)

Pour mieux comprendre les effets observés et déterminer plus précisément l’évolution de la composition en argent de la surface sur une durée courte, un essai complémentaire a été réalisé en immergeant un coupon recouvert du dépôt nanocomposite D dans la solution saline (NaCl 0,15 M) pendant 6 h, en conditions statiques. Ce choix a été fait sachant que le mode opératoire (système statique vs. système dynamique sous écoulement) peut influencer la cinétique de relargage de l’argent ionique. La présence de microorganismes peut également avoir un effet (oxydation, contamination organique), comme évoqué précédemment. Le temps d’immersion, égal à 6 h, a été sélectionné en se basant sur les résultats obtenus par ICP-MS (*i.e.*, relargage maximal entre 0 et 24 h), pour réduire la période d’investigation, et parce qu’il correspond à la durée de l’expérience de détachement. Au cours de ce stockage, une analyse par spectroscopie XPS a été réalisée à intervalles de temps réguliers (1, 3 et 6 h) et la composition de surface comparée à celle du dépôt D natif (Tableau 19).

Tableau 19. Evolution du contenu et de l’état d’oxydation de l’argent en surface du dépôt nanocomposite D, au cours de 6 h d’immersion dans la solution saline (NaCl 0,15 M).

Temps (h)	Ag _{total} /Si	α' (eV)	Cl/Ag
0	1,4	726,0	0,00
1	0,9	725,7	0,07
3	0,8	725,7	0,09
6	0,2	725,2	0,06

On constate qu’au bout d’une heure d’immersion, la quantité d’argent présente en surface a diminué d’environ 35 % (*i.e.*, le rapport Ag_{total}/Si passe de 1,4 à 0,9 ; Tableau 19). A l’issue des 6 h de stockage en solution saline, il ne reste plus que 15 % de l’argent initialement présent (soit Ag_{total}/Si = 0,2), de manière analogue aux tendances observées après expérience de détachement en chambre à écoulement cisaillé. De plus, ce résultat est cohérent par rapport à celui obtenu dans le cas du dépôt utilisé en test de toxicité, pour lequel la quantité d’argent est plus faible (Ag_{total}/Si = 0,1) du fait d’un stockage plus long (*i.e.*, 24 h).

Simultanément, une oxydation de l’argent a été mise en évidence (diminution de la valeur du paramètre Auger modifié ; Tableau 19). La valeur de α' (725,2 eV) reste néanmoins plus élevée que dans le cas des dépôts vieillis en présence de microorganismes, que ce soit en conditions dynamiques (α' = 724,1 eV) ou statiques (α' = 724,2 eV). L’interaction des levures avec les dépôts nanocomposites, de manière directe ou indirecte (relargage de composés), peut être une hypothèse expliquant ces différentes valeurs du paramètre Auger modifié, qui indiquent la présence de plusieurs types d’oxyde d’argent en surface (*i.e.*, AgO et/ou Ag₂O).

La diminution de la quantité d'argent en surface s'accompagne de l'apparition de chlore (pic Cl 2p à 198,7 eV) dès la première heure de stockage (Tableau 19). De même, du chlore a été détecté, par spectroscopie XPS, sur les dépôts nanocomposites D après utilisation en chambre à écoulement cisailé ou en test de toxicité (Cl/Ag = 0,1 dans les deux cas ; données non présentées). Ces résultats indiquent la présence de cet élément en surface des dépôts, certainement lié à l'argent résiduel, sous forme d'AgCl. De plus, l'analyse MEB-EDS effectuée en parallèle sur les deux dépôts vieilliss (cf. paragraphe III-A) a démontré une interaction du chlore avec l'argent présent en surface et au cœur du dépôt (profondeur d'analyse de cette technique de l'ordre de 1 μm).

3 – Evaluation du caractère hydrophile/hydrophobe de la surface des dépôts après utilisation

Pour compléter cette étude, des mesures d'angle de contact avec l'eau ont été réalisées sur les dépôts A et D après leur première utilisation en chambre à écoulement cisailé et comparées aux valeurs déterminées pour les surfaces natives. Rappelons que les films nanocomposites D présentent initialement une surface hydrophobe ($\theta_{\text{eau}} = 101,6 \pm 2,1^\circ$). Après la première utilisation, l'angle θ_{eau} est égal à $63,7 \pm 3,2^\circ$, ce qui démontre une modification importante des caractéristiques de surface. En comparaison, aucune variation de ce même angle de contact n'est observée dans le cas des dépôts A de matrice organosiliciée ($\theta_{\text{eau}} = 83,8 \pm 2,4^\circ$ et $83,9 \pm 1,8^\circ$ sur les dépôts natifs et après utilisation, respectivement). Une quantité d'argent très faible est détectée en surface du dépôt de type D après la première utilisation (cf. paragraphe III-B-1). Par conséquent, ce dépôt présente une surface proche de celle de la matrice organosiliciée. La valeur inférieure de θ_{eau} par rapport à la matrice peut être due au fait que l'argent résiduel est présent sous forme d'oxyde (cf. paragraphe III-B-1). La présence de contaminants organiques, vraisemblablement d'origine microbienne, en surface des dépôts nanocomposites utilisés, constitue une autre hypothèse pour expliquer la diminution de l'hydrophobicité de surface par rapport aux surfaces natives. Enfin, l'analyse XPS a révélé une légère oxydation des couches superficielles de la matrice du dépôt D, suite à l'expérience de détachement. Toutefois, ce phénomène a également été observé dans le cas du dépôt A de matrice seule, sans pour autant influencer la valeur de θ_{eau} .

En définitive, les analyses réalisées par spectroscopie XPS sur les dépôts nanocomposites D vieilliss (cf. paragraphes III-B-1 et 2) ont mis en évidence la perte de la quasi-totalité de l'argent initialement présent dans les couches superficielles, ainsi que l'oxydation de la matrice en surface, suite au contact avec la solution saline. Une investigation a donc été menée pour évaluer la présence résiduelle de nanoparticules dans les couches plus profondes du dépôt, après stockage prolongé en milieu salin, et pour déterminer l'impact de ce vieillissement sur la structure chimique de la matrice organosiliciée.

C – Morphologie et structure chimique interne du dépôt nanocomposite D après vieillissement en conditions statiques dans la solution saline

Deux dépôts nanocomposites D (l'un synthétisé sur coupon de silicium intrinsèque et l'autre sur coupon d'acier inoxydable) ont été immergés pendant 15 jours dans la solution saline (NaCl 0,15 M). A l'issue de ce stockage, le dépôt sur substrat de silicium a été aminci puis observé par MET, afin d'évaluer l'impact du stockage prolongé sur sa morphologie interne (vue en coupe). Ces observations ont été couplées à une analyse EDS, permettant une étude qualitative de la composition sur l'épaisseur du dépôt. Le dépôt D synthétisé sur acier inoxydable a, quant à lui, été analysé par spectroscopie Raman, afin de déterminer les modifications de la structure chimique de la matrice, par rapport au revêtement natif.

La comparaison des photographies, réalisées par MET sur les dépôts natif et vieilli deux semaines en solution saline (Figure 79), confirme qu'un grand nombre de nanoparticules n'est plus visible dans l'épaisseur du film. Des trous sont apparus aux emplacements initiaux des « clusters » d'argent, après libération soit sous forme d'ions Ag^+ , soit sous forme nanoparticulaire. On constate néanmoins que 20 à 40% des nanoparticules sont encore présentes, dans les couches moyennes et inférieures du dépôt et à proximité du substrat de silicium (Figure 79). On observe donc un gradient du contenu en argent sur l'épaisseur (*i.e.*, pas ou très peu d'argent en surface, concentration sensiblement plus importante dans les couches intermédiaires et plus élevée en profondeur), bien qu'il soit difficile de distinguer précisément les zones correspondantes. Il est également intéressant de remarquer que les particules restantes à l'issue du stockage en milieu salin sont en majorité de taille importante. On peut alors supposer que, contrairement aux « petites » particules, elles n'ont pas été totalement dissoutes, du fait de leur aire spécifique plus faible, ou n'ont pas été relarguées en raison de leur ancrage plus solide à la matrice organosiliciée.

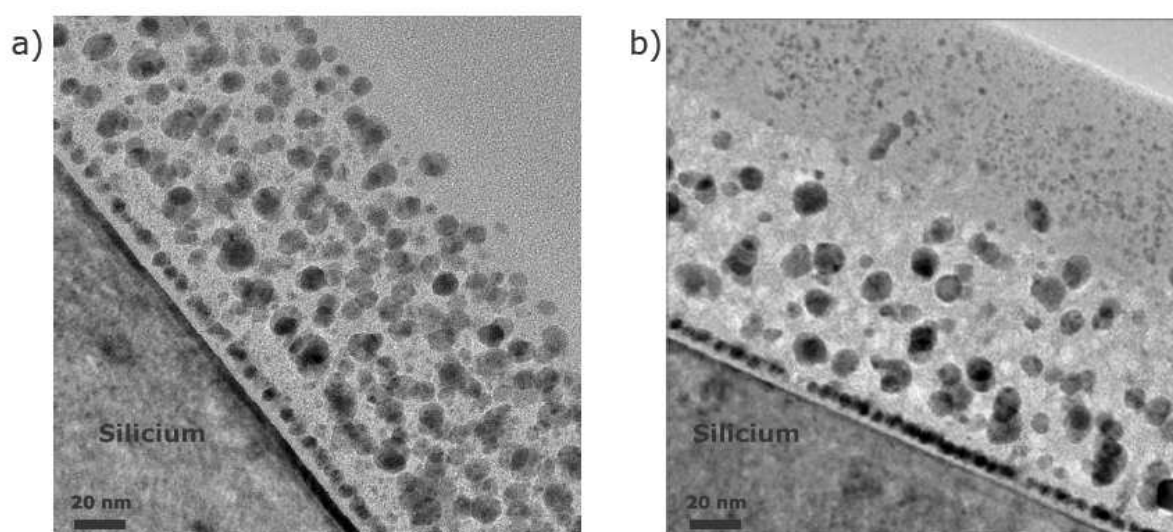


Figure 79. Photographies en MET du dépôt nanocomposite D : (a) natif et (b) vieilli 15 jours en solution saline (NaCl 0,15 M). Les deux photographies sont réalisées à la même échelle.

Une analyse qualitative de la composition du dépôt D après vieillissement a été réalisée sur différentes zones par spectroscopie EDS, simultanément à l'observation MET (Figure 80 ; surface de la zone d'analyse = $4 \mu\text{m}^2$). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux déterminés pour le dépôt natif (Figures 80 a et b). La présence de cuivre, correspondant à la grille métallique sur laquelle a été déposé l'échantillon aminci, est détectée dans tous les cas. La matrice organosiliciée du dépôt vieilli est constituée de C, O et Si, comme dans le cas du dépôt natif. Néanmoins, en comparant cette zone pour les deux dépôts, on peut remarquer une diminution significative de la quantité de carbone, par rapport au silicium (*i.e.*, le rapport d'intensité des deux pics C/Si passe d'une valeur supérieure à 4 à une valeur inférieure à 0,5 ; Figures 80 a et b). De même, le ratio O/Si semble plus élevé après vieillissement. Ces résultats confirment l'oxydation en profondeur de la matrice constituant le dépôt, déjà détectée par spectroscopie XPS au niveau de son extrême surface. Il faut toutefois noter que les durées d'immersion sont différentes.

L'intérêt de la zone correspondant à la nanoparticule réside dans l'étude du contenu en argent. En comparant les dépôts natif et vieilli, on constate une réduction importante de la quantité d'argent (*i.e.*, le rapport Ag/Si est supérieur à 1,5 dans le cas du dépôt natif et se réduit à 0,5 après stockage ; Figures 80 a et b). Cette analyse corrobore de manière définitive l'ensemble des observations réalisées précédemment par MEB et par spectroscopie XPS, concernant la libération de l'argent présent dans les couches superficielles, après contact avec le milieu biologique.

Sur le spectre EDS réalisé au niveau de la nanoparticule d'argent, après vieillissement du dépôt D (Figure 80 b), on confirme la présence de chlore, certainement sous forme d'AgCl, déjà détecté en extrême surface par XPS. Cet élément est également retrouvé en très faible quantité au niveau de la matrice (Figure 80 b). Cela signifie que des ions Cl^- ont migré à travers le dépôt lors de son stockage en milieu salin et se sont liés à l'argent résiduel, tout en interagissant avec les éléments constitutifs de la matrice. La solution saline a donc pu diffuser à travers le dépôt nanocomposite D, vraisemblablement *via* la dissolution progressive des nanoparticules d'argent et l'apparition de trous. Ce phénomène a ensuite favorisé la dissolution des nanoparticules situées dans les couches plus profondes, par l'intermédiaire d'un mécanisme de « percolation ».

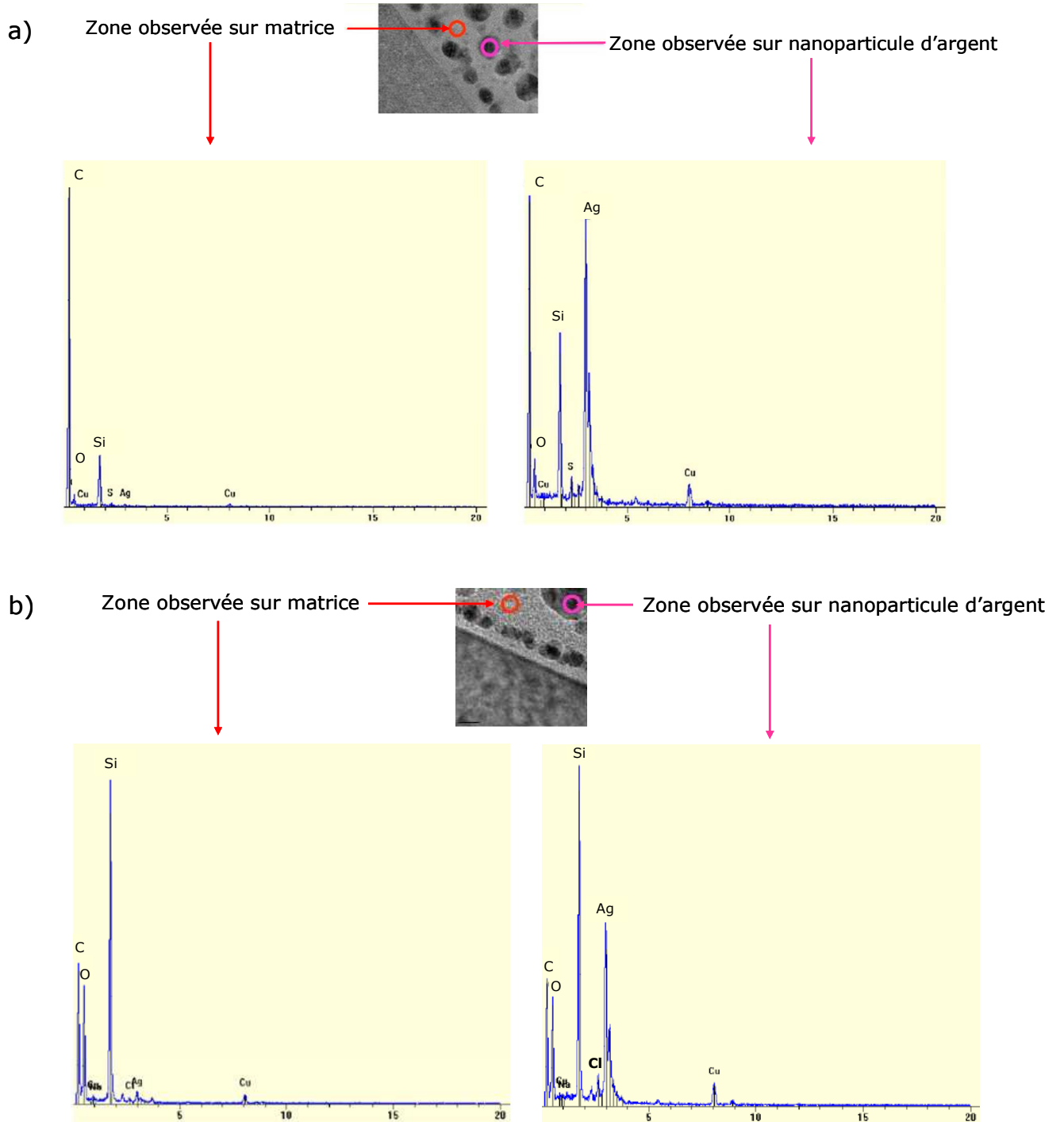


Figure 80. Analyses par spectroscopie EDS du dépôt nanocomposite D : a) natif et b) vieilli 15 jours en solution saline (NaCl 0,15 M).

Le second dépôt nanocomposite D (synthétisé sur acier inoxydable), immergé pendant 15 jours dans la solution saline, a été analysé par spectroscopie Raman, afin de déterminer les modifications de la structure chimique de la matrice le constituant. Le spectre obtenu a été normalisé par rapport à celui du dépôt natif (Figure 81).

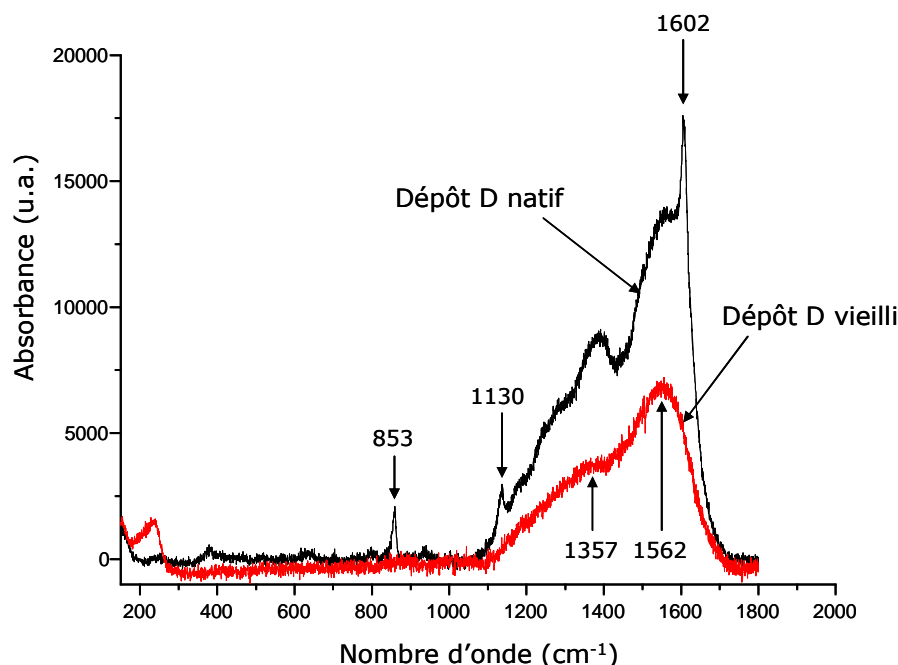


Figure 81. Spectres Raman du dépôt nanocomposite D natif et vieilli 15 jours en solution saline (NaCl 0,15 M).

Les deux massifs situés à 1357 cm^{-1} et 1562 cm^{-1} , correspondant respectivement aux bandes « D » et « G » (Veres *et al.*, 2006), sont retrouvés (Figure 81). Ceci indique que les domaines graphitiques (carbones sp^2) désordonnés (« D band ») et organisés (« G band ») sont toujours présents dans la matrice, suite au stockage dans la solution saline. Néanmoins, on constate que l'intensité de la bande « D » est plus faible dans le cas du dépôt vieilli, par rapport à l'état natif, ce qui pourrait être attribué à une diminution de la quantité de groupements CH_3 , liés aux carbones sp^2 (Veres *et al.*, 2006).

On remarque également une diminution générale de l'amplitude du spectre, après stockage en milieu salin, indiquant une réduction de l'effet SERS lié, en conditions natives, à la présence de nanoparticules métalliques. Ce résultat semble cohérent au vu de la diminution du nombre de nanoparticules d'argent dans le dépôt D après vieillissement.

D'autre part, les trois pics étroits, situés à 1602 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} et 853 cm^{-1} dans le cas du dépôt natif, ne sont plus observés (Figure 81). Comme décrit au paragraphe III-B-3.2 du Chapitre II, ces pics fins sont caractéristiques d'une organisation de petits domaines, contenant des doubles liaisons très structurées (empilement de cycles aromatiques (Veres *et al.*, 2006), défauts polyacétyléniques-trans (Pfeiffer *et al.*, 2003), liaisons C=C du graphite (Dresselhaus *et al.*, 2002)). On peut supposer que ces arrangements ont été supprimés, du fait de l'oxydation de la matrice.

D – Détermination du profil de composition en épaisseur par ToF-SIMS, suite à une immersion prolongée de 60 jours en solution saline

Les analyses XPS réalisées sur les dépôts nanocomposites D après utilisation ont démontré l'absence d'argent dans les couches superficielles des dépôts, quelle que soit la procédure de vieillissement mise en œuvre (conditions statiques vs. dynamiques, présence ou non de microorganismes). Par ailleurs, l'observation en MET du dépôt vieilli a confirmé la perte des nanoparticules d'argent en extrême surface, même si certaines sont toujours présentes en quantité importante dans les couches plus profondes. Pour s'en assurer, une analyse par ToF-SIMS a été réalisée sur un dépôt nanocomposite (type B) après 60 jours d'immersion dans la solution saline (NaCl 0,15 M), en conditions statiques. La durée importante de la période de vieillissement a été sélectionnée pour garantir *a priori* un relargage maximal de l'argent disponible.

Une attention particulière a également été portée aux éléments indicateurs de l'oxydation de la matrice (*i.e.*, silicium oxydé), phénomène mis en évidence en surface par spectroscopie XPS et confirmé en profondeur par spectroscopie Raman, afin d'évaluer son ampleur après un stockage de longue durée en milieu salin.

Suite à cette immersion prolongée, on remarque un changement de l'aspect visuel du dépôt : sa surface reste homogène et uniforme, mais la couleur est passée de grise à jaune (données non présentées), modification que l'on peut attribuer à la perte de métal en surface.

Les profils en épaisseur des différents éléments constituant le dépôt nanocomposite B (*i.e.*, Si, C, O et Ag) ont été déterminés à l'issue des 60 jours de stockage en solution saline, et comparés à ceux obtenus pour le dépôt natif. Comme décrit au paragraphe III-C du Chapitre II, seuls les ions négatifs ont été collectés, afin d'obtenir une meilleure détection des fragments provenant des espèces oxydées. La Figure 82 présente l'évolution des signaux correspondant aux ions Ag^- , Si^- , O^- , SiO^- , C^- , FeO^- et CrO^- , en fonction du temps de décapage (par des ions Cs^+). Les profils obtenus pour le dépôt natif, déjà présentés au Chapitre II, sont également indiqués, à titre de comparaison.

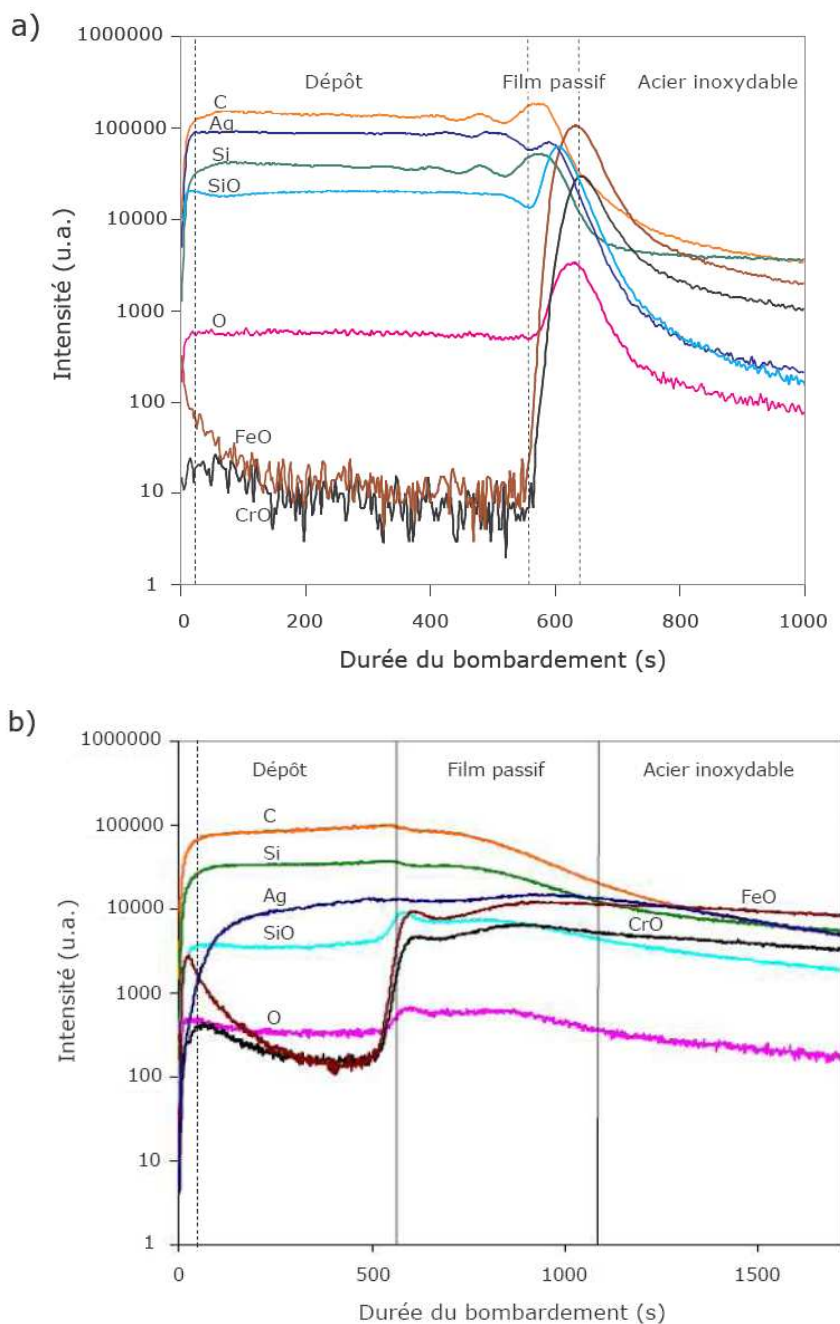


Figure 82. Profils en épaisseur des ions négatifs Ag^- , Si^- , O^- , SiO^- , C^- , FeO^- et CrO^- , obtenus par ToF-SIMS (analyse et décapage avec des ions Bi^+ et Cs^+ , respectivement), pour le dépôt nanocomposite B natif (a) et après 60 jours d'immersion dans la solution saline (NaCl 0,15 M) (b).

Comme pour le dépôt B natif (Figure 82 a), quatre régions ont été identifiées dans le cas du dépôt vieilli (Figure 82 b). La première partie des courbes (temps de décapage compris entre 0 et 30 s) correspond à la durée requise pour atteindre les conditions de stabilité de l'analyse et peut également s'expliquer par la présence d'une couche de contamination organique en surface. Après vieillissement, l'intensité des signaux correspondant aux oxydes/hydroxydes de fer et chrome (FeO et CrO) est plus élevée que pour le dépôt à l'état natif. Ceci indique une contamination de la

surface par ces éléments, qui ont certainement été relargués par les bords ou le dessous du coupon d'acier inoxydable, lors du stockage. Une quantité plus importante d'oxygène est également détectée en extrême surface (Figure 82 b), liée en partie à la présence des oxydes/hydroxydes et à la contamination de surface.

Entre 30 et 550 s de décapage ionique, zone correspondant au dépôt nanocomposite, on constate que le signal du carbone augmente sensiblement, celui du silicium stagne et ceux correspondant à l'oxygène et au silicium oxydé diminuent par rapport à l'interface extérieure (Figure 82 b). Cela indique que la matrice (plus particulièrement le silicium) est plus oxydée en extrême surface, du fait de l'immersion dans le milieu salin, confirmant les données obtenues précédemment par spectroscopie XPS. En outre, l'évolution du signal du carbone montre que cet élément est présent en quantité plus faible au niveau de l'extrême surface par rapport au cœur du dépôt. Cette diminution du contenu en carbone a également été observée par MET-EDS. La composition chimique de la matrice constituant le dépôt a donc évolué au cours du stockage dans la solution saline.

Toujours entre 30 et 550 s de décapage, on remarque que le signal correspondant à l'argent est très faible en extrême surface, puis augmente brutalement (d'un facteur 10 environ) entre 30 et 250 s de décapage, et s'accroît ensuite de manière plus progressive pour atteindre un plateau aux environs de 400-500 s d'ablation ionique (Figure 82 b). Ce résultat conforte d'une part le relargage de l'argent présent dans les couches supérieures du dépôt (observé précédemment par spectroscopie XPS), et d'autre part, la persistance des nanoparticules dans les couches inférieures. De manière intéressante, on remarque que la durée de décapage de la région correspondant au dépôt nanocomposite est similaire à l'état natif et après vieillissement, indiquant que l'exposition prolongée à la solution saline n'a aucune incidence sur l'intégrité du revêtement.

Les zones suivantes, observées sur le dépôt natif, sont ici retrouvées (Figures 82 a et b). Ainsi, à partir de 550 s de décapage, la diminution des signaux Si⁻ et C⁻ et l'augmentation simultanée des profils des ions O⁻, CrO⁻ et FeO⁻ traduisent l'apparition du film passif de l'acier inoxydable (Figure 82 b). Puis, au-delà, le cœur de l'alliage (> 1100 s) est observé.

Notons ici que, contrairement au dépôt natif (Figure 82 a), il est difficile de définir des limites franches et de distinguer précisément les zones. En effet, les profils du carbone, du silicium, du silicium oxydé et de l'argent montrent de faibles gradients (Figure 82 b). On peut également noter que, contrairement au dépôt natif (Figure 82 a), l'interface entre le film passif et le cœur de l'acier inoxydable 316L est plus difficile à distinguer (Figure 82 b). Ceci s'explique par l'augmentation de la rugosité de surface du matériau suite aux 60 jours d'immersion en milieu salin (observée par microscopie à force atomique), indiquant potentiellement une corrosion de l'acier inoxydable.

E – Conclusion relative aux mécanismes de vieillissement des dépôts nanocomposites

Au cours de cette étude, nous avons montré que le contact des dépôts nanocomposites avec un milieu biologique ou salin entraîne leur vieillissement, et ce, quelle que soit la procédure mise en œuvre (conditions statiques ou dynamiques, présence ou non de microorganismes). Ce processus de vieillissement se traduit par des modifications au niveau des deux entités constituant les dépôts nanocomposites, à savoir les nanoparticules d'argent et la matrice organosiliciée. Grâce aux techniques d'analyse complémentaires employées dans ce travail, il est possible de définir les mécanismes de vieillissement des dépôts nanocomposites, se produisant lors de leur immersion en milieu aqueux, et, par conséquent, d'expliquer l'évolution de leurs propriétés anti-adhésives et biocides après utilisation.

Une perte de l'argent, initialement présent en surface et dans les couches superficielles des dépôts, a ainsi été mise en évidence par spectroscopie XPS, par observation en MEB de la topographie de surface et en MET de l'épaisseur du dépôt. Les analyses effectuées par spectrométrie ToF-SIMS ont également confirmé ces résultats. Ceci s'explique par le fait que les nanoparticules s'oxydent au contact du milieu salin ou biologique et l'oxyde d'argent ainsi formé se dissout en ions Ag^+ . Nos résultats démontrent en effet que la faible quantité d'argent restant en surface des dépôts est totalement oxydée après vieillissement. Il est également possible que des nanoparticules aient été libérées directement. Au vu du suivi réalisé par XPS sur 6 h et de la cinétique de relargage de l'argent (Figure 60) déterminée précédemment par ICP-MS, on peut supposer que la quasi-totalité du métal disponible dans les couches superficielles du dépôt natif est libérée au bout d'une période courte, inférieure à 24 h. De ce fait, à l'issue de leur première utilisation, les dépôts nanocomposites D présentent une structure similaire à celle de la matrice organosiliciée sans argent (dépôt A), sur une profondeur d'au moins 10-15 nm (*i.e.*, profondeur d'analyse maximale de la spectroscopie XPS). La diminution de l'angle de contact avec l'eau, mesuré sur les dépôts nanocomposites après utilisation en chambre à écoulement cisailé, corrobore cette quasi-similarité avec les dépôts de matrice. Or, ces derniers se caractérisent par une efficacité anti-adhésive importante vis-à-vis de *S. cerevisiae* mais ne s'avèrent pas biocides, comme démontré dans le Chapitre III (cf. paragraphes I-A et I-B). Ceci explique l'augmentation de l'effet anti-adhésif et la diminution simultanée des propriétés antimicrobiennes des dépôts D, mises en évidence lors de leur seconde utilisation.

Néanmoins, cette perte des nanoparticules d'argent n'a pas lieu dans la totalité de l'épaisseur du dépôt nanocomposite. En effet, un gradient du contenu en argent a été observé par MET-EDS, puis confirmé de manière plus précise par spectrométrie ToF-SIMS, après une immersion de longue durée. Au vu de ces différentes données, il est réaliste de supposer que la dissolution des nanoparticules d'argent a lieu sur une profondeur estimée comprise entre 10-15 et 50 nm, selon la

durée d'immersion, alors que les nanoparticules métalliques localisées en profondeur sont encore présentes, même après 60 jours de stockage en milieu salin. Nos résultats indiquent toutefois que ce « réservoir » d'argent reste confiné au sein du dépôt.

Le vieillissement des dépôts, lié à leur utilisation ou à leur stockage, s'est également traduit par une oxydation de la matrice organosiliciée. Ce phénomène a été mis en évidence au niveau de l'extrême surface, mais également en profondeur. Ainsi, le silicium constituant la matrice est oxydé après contact avec le milieu salin ou biologique, comme déterminé par spectroscopie XPS (*i.e.*, augmentation de la proportion de composés R_2SiO_2 par rapport à celle de composés R_3SiO) et par analyse ToF-SIMS (quantité de SiO légèrement plus élevée en surface que dans le cœur du dépôt). Des modifications chimiques ont également été observées au niveau du carbone. Par exemple, des liaisons Si-C et C=C ont été détectées par XPS en extrême surface, après utilisation des dépôts D. De plus, une diminution de la quantité de carbone, par rapport au silicium, a été mise en évidence par MET-EDS et confirmée par spectroscopie Raman (*i.e.*, diminution probable de la quantité de groupements CH_3). L'analyse ToF-SIMS a également démontré une proportion plus faible de carbone en extrême surface par rapport au cœur du dépôt. Enfin, les arrangements carbonés structurés de type C=C, observés par spectroscopie Raman sur le dépôt natif, ne sont plus détectés après vieillissement. Ces différentes modifications chimiques peuvent peut-être expliquer l'augmentation de l'efficacité anti-adhésive des dépôts vis-à-vis de *S. cerevisiae*, attribuée néanmoins principalement à l'absence d'argent en surface.

L'oxydation des couches superficielles de la matrice est en grande partie provoquée par le contact direct avec la solution saline, qui constitue un environnement oxydant. De plus, la solution saline (NaCl 0,15 M) migre au sein du dépôt *via* la dissolution progressive des nanoparticules en surface, puis en profondeur, par l'intermédiaire des trous apparaissant aux emplacements initiaux des « clusters » (MET-EDS). Par conséquent, la diffusion du milieu salin au cœur de la matrice contribue à son oxydation et aux modifications de sa structure chimique, sur la totalité de l'épaisseur.

L'oxydation de la matrice peut également être attribuée à l'action catalytique de l'argent, sous formes métallique et ionique. En effet, l'argent métallique constituant les nanoparticules est un catalyseur provoquant l'oxydation des composés organiques avec lesquels il est en contact, comme mentionné par Hlidek et ses collaborateurs (2008). En outre, les ions Ag^+ , provenant de la solubilisation des nanoparticules situées dans les couches intermédiaires, diffusent à travers la matrice avant d'être libérés. Or, ces ions, tout comme l'argent métallique, présentent une activité catalytique sur les composés organosiliciés. Ainsi, d'après Hlidek *et al.* (2008), l'argent ionique catalyse l'oxydation des groupements hydrocarbonés, entraînant la formation de liaisons C-O, C=O, COO, voire même l'apparition de CO_2 , qui est relargué sous forme gazeuse. Ce phénomène pourrait expliquer la disparition du carbone, observée en MET-EDS. L'action catalytique des ions Ag^+ peut également être à l'origine de la disparition des arrangements carbonés très structurés de

type C=C, qui ne sont plus détectés par spectroscopie Raman suite au contact prolongé avec le milieu salin. Enfin, il est possible que l'oxydation du silicium ait été, du moins en partie, catalysée par ces ions. En outre, l'argent ionique provoque aussi des réactions de déshydrogénation des espèces hydrocarbonées (Hlidek *et al.*, 2008), ce qui peut expliquer la probable diminution de la quantité de groupements CH₃, observée par spectroscopie Raman.

Enfin, les résultats de l'analyse ToF-SIMS, corrélés aux observations réalisées en MET-EDS, indiquent que les dépôts nanocomposites ne sont pas parfaitement imperméables sur le long terme. Ceci s'explique par la présence de nanoparticules d'argent très proches les unes des autres, comme observé par MET. La dissolution de ces nanoparticules en ions Ag⁺ au cours de l'immersion prolongée des dépôts en milieu aqueux provoque l'apparition de trous, qui facilitent la diffusion progressive de la solution saline dans le dépôt (phénomène de « percolation »). La diffusion de la solution saline jusqu'à l'acier inoxydable peut potentiellement entraîner la corrosion de l'alliage, nécessitant par exemple de recouvrir le substrat avec un dépôt mince de matrice seule (constituant une couche « barrière », comme démontré au Chapitre II), avant la synthèse du film nanocomposite.

Conclusion

La comparaison, par un large spectre de techniques d'analyse multi-échelles, des caractéristiques physico-chimiques des dépôts nanocomposites natifs avec celles des revêtements après vieillissement, selon différentes procédures (conditions statiques vs. dynamiques, présence ou non de microorganismes), a permis de comprendre les processus impliqués dans les modifications observées et d'interpréter l'incidence de ces transformations sur l'efficacité des dépôts dans la prévention de la colonisation microbienne.

L'augmentation des propriétés anti-adhésives et la diminution simultanée de l'activité antimicrobienne des dépôts nanocomposites vis-à-vis de *S. cerevisiae* s'expliquent principalement par l'oxydation et la dissolution des nanoparticules d'argent en ions Ag⁺, qui sont libérés dans le milieu aqueux environnant lors de la première utilisation en solution saline. La possibilité d'un relargage direct des nanoparticules n'est également pas à exclure, au vu des observations par MEB et MET. À l'issue de la première utilisation, les dépôts présentent une composition similaire à celle de la matrice organosiliciée sans argent, sur une profondeur au moins égale à 10-15 nm. De ce fait, ils se caractérisent par une absence d'activité biocide, avec en contrepartie une efficacité anti-adhésive accrue. En outre, une oxydation de la matrice organosiliciée constituant les dépôts nanocomposites a été mise en évidence, l'argent pouvant jouer le rôle de catalyseur. Il est possible que ces transformations de la structure chimique du film « barrière » participent également à

l'augmentation de l'effet anti-adhésif. Les observations par MET et l'analyse par spectrométrie ToF-SIMS démontrent néanmoins que des nanoparticules d'argent sont toujours présentes en profondeur du dépôt, après immersion prolongée.

Dans ce chapitre, ainsi que dans le Chapitre III concernant les propriétés biocides des dépôts nanocomposites natifs, nous avons mis en évidence un relargage d'argent sous forme ionique, et très probablement sous forme nanoparticulaire, lors de l'immersion des revêtements en milieu aqueux. Le relargage d'argent dans l'environnement suscite de nombreuses interrogations et préoccupe la communauté scientifique, les instances politiques, ainsi que l'ensemble des concitoyens. Dans le cas de notre étude, l'argent n'est pas libéré sous forme de « nano-aérosols », évitant tout problème lié à une quelconque inhalation. Le relargage a lieu uniquement en milieu aqueux. Comme démontré par ICP-MS (cf. paragraphe I-B du Chapitre III), la concentration maximale d'argent (ionique et/ou métallique), libéré par le dépôt C, est atteinte au bout de 24 h et égale à $0,19 \pm 0,07 \mu\text{M}$. Cette valeur est plus de 15 fois inférieure à la CMI des ions Ag^+ , déterminée par Yang et Pon (2003) sur *S. cerevisiae*, en milieu de croissance synthétique (*i.e.*, $5 \mu\text{M}$; force ionique non précisée). Même si le dépôt nanocomposite D présente un contenu initial en argent supérieur (Ag/Si égal à 0,5 et 1,3 pour les dépôts C et D, respectivement), on peut légitimement supposer que le relargage serait plus faible que la CMI déterminée par Yang et Pon (2003). D'ailleurs, aucune perte de viabilité n'a été observée sur des levures planctoniques, après 24 h en suspension dans la solution saline (NaCl 0,15 M) ou dans de l'eau osmosée, en présence des dépôts D natifs (cf. paragraphe I-B du Chapitre III), confirmant les observations réalisées précédemment par Guillemot *et al.* (2008). Les dépôts nanocomposites D ne présentent donc pas de toxicité envers les microorganismes planctoniques, mais seulement sur les cellules parvenant à entrer en contact avec la surface (effet localisé et non systémique). Par conséquent, la probabilité d'un impact négatif de l'argent issu des dépôts nanocomposites sur l'environnement terrestre et aquatique semble faible. Pour déterminer plus précisément la concentration d'argent relarguée par ces revêtements, des analyses complémentaires devront être réalisées par ICP-MS, en ajustant la période d'échantillonnage au vu de la cinétique observée dans le cas du dépôt C (*i.e.*, relargage maximal entre 0 et 24 h).

Par extrapolation pour des applications dans les domaines agro-alimentaire ou biomédical, on peut estimer que l'argent ionique relargué en solution serait « piégé » par les différents composés des matrices alimentaires ou des fluides corporels (*i.e.*, sels, molécules biologiques, telles que les protéines) et de ce fait, n'induirait pas d'effet néfaste sur la flore technologique ou les cellules humaines (circulantes ou tissulaires). D'autre part, les nanoparticules d'argent éventuellement libérées, *a priori* en faible quantité, s'oxydent et se dissolvent dans les milieux aqueux, les ions Ag^+ ainsi formés pouvant également être « piégés ». En outre, sous forme particulaire, elles pourraient être « séquestrées » par les différents éléments cités ci-dessus, limitant l'impact négatif sur les

microorganismes « technologiques » planctoniques et les cellules humaines en circulation ou constituant les tissus alentours.

Ceci pose toutefois la question de l'efficacité des dépôts nanocomposites sur les microorganismes cibles, dans les milieux complexes cités précédemment. En effet, les tests réalisés dans notre étude ont été mis en œuvre dans un milieu « simple », où le seul agent en compétition avec les cellules est le sel. Dans un environnement aqueux riche, les interactions entre les nombreux composés biologiques et les espèces actives (ions Ag^+ et/ou nanoparticules), présentes en surface du dépôt ou libérées à proximité, pourraient minimiser, voire inhiber, l'activité antimicrobienne des films nanocomposites. Pour évaluer l'ampleur de cet impact, des tests devront être réalisés dans des fluides complexes.

D'autre part, la réutilisation des dépôts nanocomposites pose, outre la perte de l'argent en surface et sa « séquestration » à proximité de l'interface ou une fois relargué dans l'environnement, le problème du « piégeage » de l'argent résiduel encore présent dans les films minces. Du fait de sa forte réactivité, celui-ci peut en effet interagir avec des composés soufrés ou azotés, provenant de contaminants biologiques excrétés par les microorganismes ou présents dans l'atmosphère, et peut également être complexé sous forme de sels (ex. : formation d' AgCl). Le métal n'est donc plus disponible pour être libéré et provoquer une action antimicrobienne. Toutefois, certaines conditions environnementales peuvent augmenter la biodisponibilité de l'argent (ex : formation de complexes de type AgCl_2^- , AgCl_3^- , AgCl_4^- ; Gupta *et al.*, 1998). Ainsi, l'action biocide des dépôts nanocomposites et sa longévité dépendent fortement de la spéciation de l'argent dans la solution et de la composition de cette dernière.

Malgré ces limites, la modulation de l'efficacité biocide et anti-adhésive des dépôts nanocomposites, observée dans notre étude, peut s'avérer intéressante dans le cas d'applications au domaine biomédical, notamment pour la pose d'implants. En effet, le matériau ainsi traité présente une activité biocide au moment de l'insertion du dispositif. Puis le relargage d'argent s'atténue, permettant le développement des tissus cellulaires et évitant la survenue d'éventuels problèmes liés à la toxicité de l'argent, lorsqu'il est administré à des doses élevées sur une période longue (cf. Chapitre V de la partie bibliographique). Simultanément, l'efficacité anti-adhésive du revêtement limite toute prolifération microbienne. Cette dernière caractéristique, qui a tendance à s'accroître puis à se maintenir au fur et à mesure des utilisations successives, constitue également un atout pour des applications dans le secteur agro-alimentaire, bien qu'une colonisation soit vraisemblablement inévitable à moyen terme, nécessitant alors la mise en œuvre d'une approche curative.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de la lutte contre le développement des biofilms, source de graves problèmes sanitaires, industriels et économiques, notre étude s'est focalisée sur l'étape initiale du processus de formation, à savoir l'adhésion des microorganismes aux surfaces solides. L'acier inoxydable 316L, principal matériau d'équipement industriel, également utilisé dans le domaine biomédical pour la fabrication d'outils et d'implants chirurgicaux, peut être colonisé par des microorganismes adhérents, parfois à l'origine de toxi-infections alimentaires ou d'infections nosocomiales.

Dans ce contexte, l'objectif fondamental de ce travail de thèse était la prévention de l'adhésion microbienne aux surfaces d'acier inoxydable austénitique, par :

- la mise au point et l'optimisation d'un traitement de surface sur l'acier 316L, basé sur un procédé de dépôt plasma et combinant une efficacité anti-adhésive à des propriétés antimicrobiennes ;
- l'évaluation, la compréhension et la comparaison des mécanismes à l'origine de l'efficacité des traitements de surface réalisés vis-à-vis de l'adhésion et de la viabilité cellulaire, sur un panel de microorganismes cibles (*S. cerevisiae*, *S. aureus* et *E. coli*) présentant des caractéristiques différentes (surface, paroi, réactivité).

Une adhésion forte et spécifique de *S. cerevisiae* aux surfaces d'acier inoxydable ayant été observée précédemment au LISBP, la première partie de notre étude a été consacrée à la modification de la composition et des caractéristiques physico-chimiques de surface du matériau, afin de limiter l'attachement des levures. Dans ce cadre, différents traitements par voie chimique (décapage dans un mélange H_2O_2/H_2SO_4) ou physique (bombardement ionique par plasma d'argon) ont été mis en œuvre. Des modifications significatives de la composition, de l'épaisseur et de l'état d'oxydation de la couche de contamination organique et du film passif, ont été mises en évidence par spectroscopie XPS. Elles se sont accompagnées d'une augmentation importante de l'hydrophilie de surface, mais n'ont eu aucune incidence sur l'adhésion des levures, évaluée *in vitro* via leur aptitude au détachement sous hydrodynamique contrôlée, en chambre à écoulement cisailé. La spécificité de ce matériau, indépendamment de son énergie de surface, par rapport à d'autres supports non métalliques (verre, plastiques) a donc été confirmée par notre étude. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette forte adhésion de *S. cerevisiae* à l'acier inoxydable. Ainsi, il est possible que le processus d'adhésion soit lié à des interactions locales, telles qu'un mécanisme de transfert de charges, impliquant les éléments métalliques du film passif et certains composés de la surface microbienne, notamment les protéines pariétales. La première stratégie mise en œuvre n'ayant pas permis de limiter l'adhésion de *S. cerevisiae* à l'acier inoxydable, une seconde approche a été adoptée pour atteindre l'objectif visé.

Des surfaces d'acier 316L ont ainsi été recouvertes d'un film nanocomposite, dans le but de coupler une efficacité anti-adhésive à une activité antimicrobienne, vis-à-vis des microorganismes cibles. Cette double fonctionnalité constitue l'originalité de notre approche, par rapport à d'autres

types de traitements de surface ne présentant que l'une ou l'autre des propriétés. Le procédé mis en œuvre pour synthétiser ces revêtements, basé sur les potentialités des plasmas froids, combine la polymérisation par PE-CVD d'un précurseur organosilicié, l'hexaméthylsiloxane (HMDSO), à la pulvérisation d'une cible d'argent par bombardement ionique, dans une décharge radiofréquence. La deuxième partie de notre travail s'est donc focalisée sur la mise en œuvre et l'optimisation du procédé, dans le but de définir les conditions opératoires adéquates pour la synthèse des dépôts. Nous avons ensuite réalisé une caractérisation quasi-exhaustive de ces derniers, par le couplage de techniques d'analyse complémentaires, à différentes échelles (spectroscopies XPS, FTIR, Raman, observations en microscopie électronique, analyse ToF-SIMS). Ainsi, les revêtements synthétisés sont des films minces (~ 175 nm), constitués d'une matrice organosiliciée de type $\text{SiC}_x\text{O}_y\text{H}_z$, présentant des potentialités anti-adhésives, dans laquelle sont incluses, de manière homogène, des nanoparticules d'argent sphériques et facettées, dotées d'une forte réactivité antimicrobienne. Grâce au réglage adéquat des paramètres opératoires, des dépôts de matrice sans argent ont également été synthétisés, afin de dissocier les effets respectifs de l'argent et des composés organosiliciés sur les phénomènes observés. D'autre part, les propriétés physico-chimiques de la matrice (caractère hydrophobe/hydrophile) ont été modulées, en jouant sur sa nature organique/inorganique *via* l'injection d'oxygène dans la décharge, simultanément au HMDSO, permettant d'obtenir des dépôts de type SiO_x . Cette étude rigoureuse de l'ensemble des films nanocomposites a été accomplie dans le but de corrélérer leurs propriétés physiques et physico-chimiques à leur activité anti-adhésive et biocide.

La suite de notre travail a donc été consacrée à l'évaluation de l'efficacité anti-adhésive des revêtements sur *S. cerevisiae*, en chambre à écoulement cisailé, et à la détermination de leur activité biocide vis-à-vis des trois microorganismes modèles sélectionnés (*S. cerevisiae*, *S. aureus* et *E. coli*). Par comparaison avec les surfaces d'acier inoxydable vierge, les dépôts nanocomposites se sont avérés efficaces pour limiter, voire inhiber totalement, l'adhésion des levures au support solide. Cette propriété est liée à la matrice organosiliciée, qui forme une couche « barrière » inerte non conductrice, empêchant les interactions potentielles de type transfert de charges entre le film passif de l'acier inoxydable et les composés pariétaux des cellules. L'augmentation de son caractère hydrophile (dépôt inorganique et silicié), obtenue par ajout d'oxygène lors du procédé, s'est logiquement accompagnée d'une amélioration de l'efficacité anti-adhésive. Enfin, bien que l'inclusion de nanoparticules d'argent diminue les propriétés anti-adhésives des dépôts, ils restent néanmoins efficaces pour prévenir l'adhésion microbienne, par rapport aux surfaces d'acier inoxydable non revêtues. Pour valider ces différences de comportement bio-adhésif, liées au contenu en argent et au type de matrice considérée, une investigation par microscopie à force atomique pourrait être envisagée, afin de quantifier de manière directe, à l'échelle de la cellule unique, la force d'interaction entre la levure et les différents revêtements mis au point.

L'intérêt de l'incorporation de ces nanoparticules d'argent dans la matrice réside dans les propriétés antimicrobiennes qu'elles confèrent aux dépôts nanocomposites. L'activité biocide des films contenant 20-25% at. d'argent, quantifiée indirectement par récupération des cellules puis évaluation de la reprise de croissance sur milieu gélosé, a été clairement démontrée *in vitro* sur *S. cerevisiae*, avec un abattement de 1,9 log de la population viable cultivable, dans les conditions expérimentales testées (*i.e.*, après 24 h de contact entre les cellules et le support, en solution saline). L'effet a pu être attribué au relargage d'ions Ag^+ , lié à la dissolution de l'oxyde d'argent formé en périphérie des nanoparticules, au contact du milieu biologique. En outre, il est possible que l'argent sous forme nanoparticulaire contribue directement à l'activité biocide. Nos investigations ont prouvé que les dépôts nanocomposites n'exercent pas d'activité antimicrobienne sur les cellules planctoniques, mais uniquement sur les microorganismes réussissant à entrer en contact direct avec les supports, malgré leurs propriétés anti-adhésives. Ceci constitue un atout pour une action biocide localisée, ciblée sur la prévention de la colonisation microbienne des surfaces.

Pour comprendre les mécanismes d'action de l'argent, impliqués dans l'activité antifongique des dépôts nanocomposites par contact direct avec les cellules, l'analyse *in situ* des changements cellulaires a été réalisée chez *S. cerevisiae*, par microspectroscopie FTIR avec rayonnement Synchrotron (résolution spatiale sub-cellulaire), puis corrélée à une observation de l'ultra-structure de la levure par microscopie électronique en transmission, couplée à une analyse EDS. Nos résultats ont démontré que l'action antimicrobienne de l'argent est ciblée sur les protéines pariétales et intracellulaires de *S. cerevisiae* et s'effectue probablement *via* des interactions avec les groupements thiols et les fonctions phosphorylées de ces protéines. Sur la base de cette étude, mise en œuvre pour la première fois sur des microorganismes exposés à un stress « argent », nous avons émis une hypothèse concernant le mode d'action des dépôts nanocomposites sur les levures. Ainsi, il est probable que les ions Ag^+ (et probablement les nanoparticules d'argent), relargués par ces dépôts, se lient aux protéines pariétales, perforent la paroi et la membrane cellulaires et pénètrent à l'intérieur de la levure. Ils altèrent alors le fonctionnement des enzymes et des organites intracellulaires, provoquant une inhibition de certaines voies métaboliques clés, telles que la respiration mitochondriale ou les mécanismes de défense face au stress oxydant. L'effet multi-factoriel de l'argent, largement décrit dans la littérature chez les bactéries, a ainsi été retrouvé chez la levure *S. cerevisiae*.

L'activité antimicrobienne des dépôts nanocomposites a ensuite été quantifiée sur les deux modèles procaryotes, *S. aureus* et *E. coli*, afin de comparer l'efficacité biocide par rapport au modèle eucaryote et d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués. Les valeurs obtenues (abattement maximal de 1,5 et 2,4 log pour *E. coli* et *S. aureus*, respectivement) confirment les propriétés antimicrobiennes des dépôts nanocomposites. Pourtant, à même contenu

en argent, une efficacité antibactérienne plus faible a été observée dans le cas d'*E. coli*. Ce dernier résultat a été interprété par corrélation avec les propriétés physico-chimiques des surfaces cellulaires. En effet, les bactéries *E. coli*, présentant une surface hydrophile, n'ont que faiblement adhéré à la surface des dépôts, limitant la pénétration des ions Ag^+ (et des nanoparticules d'argent). Au contraire, en raison de son hydrophobicité de surface, *S. aureus* a fortement adhéré aux dépôts nanocomposites. Les tendances ainsi observées confirment le fait qu'un contact étroit et direct entre cellules et support est essentiel pour garantir une efficacité biocide, ce qui fournit une indication supplémentaire sur le mode d'action des dépôts nanocomposites. Pour compléter et valider ces observations sur le rôle joué par les caractéristiques bio-adhésives des souches microbiennes, en relation avec leurs propriétés de surface, des expériences *in situ* pourront être menées par méthode hydrodynamique en chambre à écoulement cisailé, en adaptant le protocole mis en œuvre sur *S. cerevisiae*.

D'autre part, la technique utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des dépôts nanocomposites sur les différents modèles microbiens est basée sur une détermination indirecte de la viabilité par reprise de croissance en milieu gélosé et peut engendrer des artéfacts, liés notamment à la récupération des cellules en contact avec le support et à la sélection d'une fraction de la population microbienne. Pour pallier à ce problème, des essais complémentaires en microscopie à épifluorescence ont été réalisés au Centre de Recherche du site d'Arcelor-Mittal (partenaire du projet ANR « Biopleasure ») situé à Isbergues. Cette technique permet de visualiser les microorganismes en contact avec les surfaces testées, après coloration par des fluorochromes, indicateurs de viabilité. Elle constitue donc un outil intéressant pour évaluer de manière directe l'activité antimicrobienne des dépôts nanocomposites sur les microorganismes adhérents et caractériser les éventuelles hétérogénéités spatiales de l'effet biocide. Les résultats préliminaires obtenus à ce stade de l'étude confirment les propriétés antimicrobiennes sur les trois microorganismes d'intérêt.

Suite aux résultats obtenus sur les dépôts nanocomposites natifs, il nous a semblé essentiel d'évaluer la stabilité des propriétés anti-adhésives et antimicrobiennes des dépôts nanocomposites vis-à-vis de *S. cerevisiae*, étude de « vieillissement » rarement exposée dans la littérature relative aux traitements de surface destinés à prévenir la colonisation microbienne. Des cycles d'expérimentations/nettoyages répétés ont mis en évidence une diminution significative de l'activité antifongique, liée à une augmentation de l'efficacité anti-adhésive, à l'issue de la première utilisation. Grâce au large spectre de techniques d'analyse déjà déployé sur les dépôts natifs, ces résultats ont été corrélés à la disparition des nanoparticules d'argent initialement présentes dans les couches superficielles des dépôts nanocomposites, relarguées dans les premières 24 h sous forme d'ions Ag^+ (ou directement libérées). D'autre part, les modifications de la structure chimique de la matrice organosiliciée, notamment son oxydation par l'immersion dans la solution saline et

l'effet catalytique de l'argent métallique et ionique, ont pu accentuer l'effet anti-adhésif. L'efficacité antimicrobienne des dépôts nanocomposites est donc limitée sur le court terme, ce qui peut s'avérer intéressant dans le cas d'une application nécessitant une action biocide ponctuelle, comme la pose d'une prothèse.

Nous avons néanmoins mis en évidence le fait qu'un « réservoir » de nanoparticules d'argent est encore présent au niveau des couches inférieures du dépôt, après un stockage prolongé en solution saline. Ceci démontre la nécessité de moduler les propriétés la matrice, afin d'obtenir un réseau moins dense permettant la libération de la totalité de l'argent présent. La diminution de la tension d'auto-polarisation lors de la synthèse du dépôt pourrait par exemple conduire à ce type de matrice. Une autre piste envisagée pour la suite de l'étude consiste à inclure des nanoparticules d'argent dans la matrice siliciée inorganique, synthétisée *via* l'introduction d'oxygène dans la décharge et présentant l'efficacité anti-adhésive la plus importante. Les propriétés anti-adhésives et antimicrobiennes de ces films minces SiO_x pourront être évaluées sur les trois microorganismes modèles. Les données ainsi déterminées permettront d'apprécier les bénéfices apportés par ces dépôts, en termes de compromis entre les deux caractéristiques (par exemple, possibilité d'augmenter le contenu en argent du dépôt, tout en évitant sa détérioration et en conservant une efficacité anti-adhésive prononcée). Les premiers résultats obtenus à ce stade de l'étude sont prometteurs (cohésion mécanique à des concentrations atomiques en argent de l'ordre de 40%). Dans tous les cas, une possibilité de modulation dans la cinétique de relargage devra être apportée aux films nanocomposites, par exemple en synthétisant une couche mince de porosité contrôlée en surface, immédiatement après le procédé de dépôt, permettant une libération d'argent plus progressive en fonction de l'application visée (effet ponctuel/effet à long terme). De plus, pour éviter tout phénomène de corrosion du substrat d'acier inoxydable lors de l'utilisation des films nanocomposites, le revêtement de l'échantillon vierge par une première couche de matrice organosiliciée seule pourrait être envisagé, préalablement à la synthèse du dépôt proprement dit.

Le procédé de dépôt par plasma employé dans ce projet offre donc de nombreux avantages, non seulement la réalisation du traitement de surface en une seule étape (ou plusieurs, sans ouverture du réacteur), mais aussi les nombreuses possibilités de modulation de la composition et des caractéristiques physico-chimiques des revêtements. On constate également qu'il est possible de découpler l'effet anti-adhésif de l'activité biocide, en fonction des applications visées. Néanmoins, l'introduction d'un agent antimicrobien sous forme nanoparticulaire sur un matériau inaccessible au nettoyage, ou dont la contamination peut s'avérer préjudiciable pour la santé, constitue un atout supplémentaire pour prévenir le développement microbien.

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur l'efficacité anti-adhésive et biocide des dépôts nanocomposites dans les premières étapes de l'adhésion microbienne et ce, de manière découplée. Il pourrait être intéressant d'évaluer conjointement ce double potentiel à plus long terme et,

notamment, de tester si les microorganismes parviennent, ou non, à former un biofilm mature sur ce type de support. A cette fin, la microscopie confocale, sous cisaillement contrôlé, pourrait s'avérer utile pour observer *in situ* et en temps réel la structuration du biofilm et évaluer les différences entre les surfaces d'acier vierge et modifié. Le modèle pour cette étude sera la bactérie à Gram négatif *E. coli*.

Pour approfondir notre compréhension du mécanisme d'action des dépôts nanocomposites, une étude transcriptomique sera réalisée en parallèle. Elle permettra d'identifier les gènes impliqués dans la réponse adaptative de la bactérie face au stress « argent », en bénéficiant des compétences du LISBP sur les approches de biologie intégrative. Dans la continuité des travaux menés dans ce travail de thèse sur *S. cerevisiae*, la nature et la localisation des modifications cellulaires, induites par l'argent sur la bactérie, seront investiguées *in situ* par microspectroscopie FTIR, grâce aux potentialités du rayonnement Synchrotron (*i.e.*, résolution spatiale sub-cellulaire). Ces deux stratégies complémentaires, basées sur des techniques analytiques de pointe, permettront de caractériser et d'interpréter les relations entre l'exposition d'*E. coli* à l'argent et sa réponse à l'échelle cellulaire.

L'originalité du travail de thèse présenté réside dans sa forte interdisciplinarité, au croisement entre la microbiologie, la physique, la science des matériaux et la physico-chimie des surfaces, études qui se sont déroulées en partie dans le cadre du projet ANR « Biopleasure » et ont également nécessité la mise en place de collaborations internes et externes au LISBP pour leur expertise complémentaire. L'approche intégrative mise en œuvre, aussi bien pour la caractérisation des surfaces à l'état natif et après vieillissement, que pour l'évaluation et la compréhension des phénomènes biologiques observés, a permis de progresser dans la définition d'une stratégie préventive innovante, visant à limiter la colonisation microbienne des supports. Le traitement des surfaces d'acier inoxydable, par dépôt d'un film mince nanocomposite conjuguant efficacité anti-adhésive et activité biocide, constitue une approche pertinente dans le cadre de cette problématique. Les nombreuses perspectives du projet, déclinées autour des aspects « ingénierie des surfaces et biologie intégrative », s'effectueront toujours dans cette optique interdisciplinaire.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abreu C.M., M.J. Cristóbal, R. Losada, X.R. Novoa, G. Pena, M.C. Pérez (2004). Comparative study of passive films of different stainless steels developed on alkaline medium, *Electrochem. Acta*, 49, 3049-3056.
- Adam B., G.S. Baillie, L.J. Douglas (2002). Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*, *J. Med. Microbiol.*, 51, 344-349.
- Ahmed N.M., D.E. Conner, D.L. Huffman (1995). Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition, *J. Food Sci.*, 60, 606-610.
- Adoue M., P. Bacchin, S. Lorthois, D. Combes, P. Schmitz, M. Mercier-Bonin (2007). Experimental methodology for analysing macromolecular interactions in the context of marine bacterial adhesion to stainless steel, *Chem. Eng. Res. Des.*, 85, 792-799.
- Alexander M.R., R.D. Short, F.R. Jones, W. Michaeli, C.J. Blomfield (1999). A study of HMDSO/O₂ plasma deposits using a high-sensitivity and -energy resolution XPS instrument: curve fitting of the Si 2p core level, *Appl. Surf. Sci.*, 137, 179-183.
- Alexandrov S.E. and M.L. Hitchman (2005). Chemical vapor deposition enhanced by atmospheric pressure non-thermal non-equilibrium plasmas, *Chem. Vap. Deposition*, 11, 457-468.
- Alt V., T. Bechert, P. Steinrücke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann, R. Schnettler (2004). An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement, *Biomaterials*, 25, 4383-4391.
- An Y.H. and R.J. Friedman (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces, *J. Biomed. Mat. Res.*, 43, 338-348.
- Anaissie E.J., S.L. Stratton, M.C. Dignani, R.C. Summerbell, J.H. Rex, T.P. Monson, T. Spencer, M. Kasai, A. Francesconi, T.J. Walsh (2002). Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study, *Clin. Infect. Dis.*, 34, 780-789.
- Arnold J.W., G.W. Bailey (2000). Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study, *Poult. Sci.*, 79, 1839-1845.
- Arocha M.M., M. McVey, S.D. Loder, J.H. Rupnow, L. Bullerman (1992). Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese, *J. Food Protect.*, 55, 379-381.
- Atabek A., T.A. Camesano (2007). Atomic force microscopy study of the effect of lipopolysaccharides and extracellular polymers on adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.*, 189, 8503-8509.

B

- Baba T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community acquired MRSA, *The Lancet*, 359, 1819-1827.
- Bachmann B.J. (1996). Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, p. 2460-2488. In: "*Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology", F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H.E. Umbarger (Eds.), ASM Press, Washington, D.C.
- Bagge-Ravn D., Y. Ng, M. Hjelm, J.N. Christiansen, C. Johansen, L. Gram (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries – analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection, *Int. J. Food Microbiol.*, 87, 239-250.
- Balazs D.J., K. Triandafillu, P. Wood, Y. Chevolut, C. Van Delden, H. Harms, C. Hollenstein, H.J. Mathieu (2004). Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments, *Biomaterials*, 25, 2139-2151.
- Balazs D.J., K. Triandafillu, E. Sardella, G. Iacoviello, P. Favia, R. d'Agostino, H. Harms, H.J. Mathieu (2005). PE-CVD modification of medical-grade PVC to inhibit bacterial adhesion: PEO-like and nanocomposite Ag:PEO-like coatings, *Plasma Process. Polym.*, 2, 351-372.
- Barth A., C. Zscherp (2002). What vibrations tell us about proteins, *Quart. Rev. Biophys.*, 35, 369-430.
- Behrens S. H. and D. G. Grier (2001). The charge of glass and silica surface, *J. Chem. Phys.*, 115, 6716-6721.
- Bellon-Fontaine M.N., J. Rault, C.J. van Oss (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron donor/electron acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells, *Coll. Surf. B Biointerf.*, 7, 47-53.
- Beloin C., A. Houry, M. Froment, J.M. Ghigo, N. Henry (2008). A short time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics and adhesin-dependent behaviours, *PLoS Biology*, 6(7), e167, 15449-1558.
- Benitez F., E. Martinez, J. Esteve (2000). Improvement of hardness in plasma polymerized hexamethyldisiloxane coatings by silica-like surface modification, *Thin Solid Films*, 377-378, 109-114.
- Benn T.M. and P. Westerhoff (2008). Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics, *Environ. Sci. Technol.*, 42(11), 4133-4139.
- Bera S., P. Gangopadhyay, K.G.M. Nair, B.K. Panigrahi, S.V. Narasimhan (2006). Electron spectroscopic analysis of silver nanoparticles in a soda-glass matrix, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, 152, 91-95.
- Bertrand N., B. Drévillon, P. Bulkin (1997). *In situ* infrared ellispometry study of the growth of plasma deposited silica thin films, *J. Vac. Sci. Technol. A*, 16(1), 63-71.

- Biederman H., R.P. Howson, D. Slavinska, V. Stundzia, J. Zemek (1997). Composite metal/C:H films prepared in an unbalanced magnetron, *Vacuum*, 48(10), 883-886.
- Biederman H., D. Slavinska (2000). Plasma polymer films and their future prospects, *Surf. Coat. Technol.*, 125, 371-376.
- Blaser S.A., M. Scheringer, M. MacLeod, K. Hungerbühler (2008). Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles, *Sci. Total Environ.*, 390(2-3), 396-409.
- Blaise G. (1988). Aspects Cinématiques de l'Interaction Ions-Surface. In: « Interactions plasmas froids-matériaux », Editions de Physique, C. Lejeune (Eds.), CNRS, Les Ulis, France, pp. 259-282.
- Blattner F.R., G.I. Plunkett, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau, Y. Shao (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science*, 277, 1453-1474.
- Boulangé-Petermann L., B. Baroux, M.N. Bellon-Fontaine (1993). The influence of metallic surface wettability on bacterial adhesion, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 7(3), 221-230.
- Boulangé-Petermann L., J. Rault, M.N. Bellon-Fontaine (1997). Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness, *Biofouling*, 11, 201-216.
- Bordjih K., J.-Y. Jouzeau, D. Mainard, E. Payan, J.-P. Delagoutte, P. Netter (1996). Evaluation of the effect of three surface treatments on the biocompatibility of 316L stainless steel using human differentiated cells, *Biomaterials*, 17(5), 491-500.
- Borras A., A. Barranco, A.R. Gonzales-Elipe (2008). Reversible superhydrophobic to superhydrophilic conversion of Ag/TiO₂ composite nanofiber surfaces, *Langmuir*, 24(15), 8021-8026.
- Bos R., H.C. van der Mei, H.J. Busscher (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study, *FEMS Microbiol. Rev.*, 23(2), 179-230.
- Bosetti M., A. Massè, E. Tobin, M. Cannas (2002). Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity, *Biomaterials*, 23, 887-892.
- Bren L., L. English, J. Fogarty, R. Policoro, A. Zsidi, J. Vance, J. Drelich, N. Istphanous, K. Rohly (2004). Hydrophilic/electron-acceptor surface properties of metallic biomaterials and their effect on osteoblast activity, *J. Sci. Technol.*, 18, 1711-1722.
- Bretagnol F., M. Lejeune, A. Papadopoulou-Bouraoui, M. Hasiwa, H. Rauscher, G. Ceccone, P. Colpo, F. Rossi (2006). Fouling and non-fouling surfaces produced by plasma polymerization of ethylene oxide monomer, *Acta Biomater.*, 2, 65-172.
- Briandet R., V. Leriche, B. Carpentier, M.N. Bellon-Fontaine (1999). Effects of growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel, *J. Food Prot.*, 62, 994-998.

- Briggs D. and M.P. Seah (1996). In: "Practical surface analysis: Auger and X-Ray Photoelectron Spectroscopy", John Wiley & Son Ltd (Eds.), New York.
- Brooks J.D. and S.H. Flint (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 43, 2163-2176.
- Brugnoni L.I., J.E. Lozano, M.A. Cubitto (2007). Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry, *Food Res. Int.*, 40, 332-340.
- Bruinsma G.M., H.C. van der Mei, H.J. Busscher (2001). Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses, *Biomaterials*, 22(24), 3217-3224.
- Burnett S.L., J. Chen, L.R. Beuchat (2000). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4679-4687.
- Busscher H.J., M. van der Kuijl-Booij, H.C. van der Mei (1996). Biosurfactants from thermophilic dairy streptococci and their potential role in the fouling control of heat exchanger plates, *J. Ind. Microbiol.*, 16, 15-21.
- Busscher H.J., A.H. Weerkamp, H.C. van der Mei, A.W. van Pelt, H.P. de Jong, J. Arends (1984). Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 980-983.

C

- Callewaert M., P.A. Gerin, M.J. Genet, L. Boulangé-Petermann, P.G. Rouxhet (2005). Contamination carbonée détectée par XPS : quantité, nature chimique et origine, Première Conférence Francophone sur les Spectroscopies d'Electrons, ELSPEC 2004, Edition SFV, Paris, 139-143.
- Carpentier B. and O. Cerf (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry, *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 499-511.
- Carr J. (2005). Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services, Public Health Image Library (PHIL), <http://phil.cdc.gov/Phil/home.asp>.
- Catherine Y. (1988). Croissance de Couches Minces sous Flux d'Ions. In: « Interactions plasmas froids-matériaux, Editions de Physique, C. Lejeune (Eds.), CNRS, Les Ulis, France, pp. 319-340.
- Chandra J., D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick, M.A. Ghannoum (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance, *J. Bacteriol.*, 183, 5385-5394.
- Charlot A., V. Sciannaméa, S. Lenoir, E. Faure, R. Jérôme, C. Jérôme, C. Van De Weerd, J. Martial, C. Archambeau, N. Willet, A.-S. Duwez, C.-A. Fustin, C. Detrembleur (2009). All-in-one strategy for the fabrication of antimicrobial biomimetic films on stainless steel, *J. Mater. Chem.*, 19, 4117-4125.

- Chayani M., H. Caquineau, B. Despax, J. Bandet, R. Berjoan (2005). Variations in the physico-chemical properties of near-stoichiometric silica deposited from SiH₄-N₂O and SiH₄-N₂O-He radiofrequency discharges, *Thin Solid Films*, 471, 53-62.
- Chen G. and K.A. Strevett (2001). Impact of surface thermodynamics on bacterial transport, *Environ. Microbiol.*, 3(4), 237-245.
- Chohan Z.H., M. Arif, M.A. Akhtar, C.T. Supuran (2006). Metal-based antibacterial and antifungal agents: synthesis, characterization, and in vitro biological evaluation of Co(II), Cu(II), Ni(II), and Zn(II) complexes with amino acid-derived compounds, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 1-13.
- Choi O., K.K. Deng, N.J. Kim, L. Ross, R.Y. Surampalli, Z. Hu (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth, *Water Res.*, 42, 3066-3074.
- Chu P.K. (2009). Applications of plasma-based technology to microelectronics and biomedical engineering, *Surf. Coat. Technol.*, 203, 2793-2798.
- Chu P.K., J.Y. Chen, L.P. Wang, N. Huang (2002). Plasma-surface modification of biomaterials, *Mat. Sci. Eng.*, 36, 143-206.
- Chu C.C., D.F. Williams (1984). Effects of physical configuration and chemical structure of suture materials on bacterial adhesion, *Am. J. Surg.*, 147, 197-204.
- Cioffi N., L. Torsi, N. Ditaranto, G. Tantillo, L. Ghibelli, L. Sabbatini, T. Bleve-Zacheo, M. D'Alessio, P.G. Zambonin, E. Traversa (2005). Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties, *Chem. Mater.*, 17(21), 5255-5262.
- Clarkson T.W. (1997). The toxicology of mercury, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 34(4), 369-403.
- Clayton C.R. and I. Olefjord (1995). Passivity of Austenitic Stainless Steels. In: "Corrosion mechanisms in theory and practice", P. Marcus and J. Oudar (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp.175-199.
- Clayton C.R. and I. Olefjord (2002). In: "Corrosion mechanisms in theory and practise, 2nd edition", P. Marcus and M. Dekker (Eds.), New York, USA.
- Compère C., M.-N. Bellon-Fontaine, P. Bertrand, D. Costa, P. Marcus, C. Poleunis, C.-M. Pradier, B. Rondot, M.G. Walls (2001). Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in sea water, *Biofouling*, 17(2), 129-145.
- Combina M., C. Daguerre, A. Massera, L. Mercado, M.E. Sturm, A. Ganga, C. Martinez (2007). Yeast identification in grape juice concentrates from Argentina, *Lett. Appl. Microbiol.*, 46(2), 192-197.
- Corvec S. (2009). Anatomie fonctionnelle bactérienne – La paroi bactérienne, <http://www.sante.univ-nantes.fr/med/ticem/ressources/1438.pdf>.
- Cucarella C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa, J.R. Penades (2001). BAP, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation, *J. Bacteriol.*, 183, 2888-2896.

D

- Dabosi F., G. Béranger, B. Baroux (1994). In: "Corrosion localisée", Les Editions de Physique.
- Darouiche R.O. (1999). Anti-infective efficacy of silver-coated medical prostheses, *Clin. Infect. Dis.*, 29, 1371-1377.
- Deak T. (2007). In: "Handbook of food spoilage yeasts, 2nd edition", CRC Press, New York, USA.
- Demling R.H. and M.D.L. DeSanti (2002). The rate of re-epithelialisation across meshed skin grafts es increased with exposure to silver, *Burns*, 28, 264-266.
- Denes A.R., E.B. Somers, A.C.L. Wong, F.S. Denes (2001). 12-crown-4-ether and tri(ethylene glycol) dimethyl-ether plasma-coated stainless steel surfaces and their ability to reduce bacterial biofilm deposition, *J. Appl. Polymer Sci.*, 81, 3425-3438.
- Derjaguin B. and L. Landau (1941). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes, *Acta. Physiochim.*, 14, 733-762.
- Despax B., E. Cambriil, J.L. Flouttard, J. Akinifessi (1990). Optical studies of gold-carbon plasma deposition, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 23, 861-866.
- Despax B. and J.L. Flouttard (1989). Synthesis of gold-carbon composites by simultaneous sputtering and plasma polymerization of propane in R.F. capacitively coupled diode system, *Thin Solid Films*, 168, 81-88.
- Despax B. et P. Raynaud (2007). Deposition of "polysiloxane" thin films containing silver particles by an RF asymmetrical discharge, *Plasma Process. Polym.*, 4, 127-134.
- De Vito E., P. Marcus (1992). XPS study of passive films formed on molybdenum-implanted austenitic stainless steels, *Surf. Interface Anal.*, 19, 403-408.
- Disegi J.A. and L. Eschbach (2000). Stainless steel in bone surgery, *Injury*, 31(4), 2-6.
- Donelli G., I. Francolini, V. Ruggeri, E. Guaglianone, L. D'Ilario, A. Piozzi (2006). Pore formers promoted release of an antifungal drug from functionalized polyurethanes to inhibit *Candida* colonization, *J. Appl. Microbiol.*, 100, 615-622.
- Dong B., S. Manolache, E.B. Somers, A.C.L. Wong, F.S. Denes (2005). Generation of antifouling layers on stainless steel surfaces by plasma-enhanced crosslinking of polyethylene glycol, *J. Appl. Polymer Sci.*, 97, 485-497.
- Donlan R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerg. Infect. Dis.*, 8(9), 881-890.
- Douglas L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.*, 11, 30-36.
- Doyle M.P. (1991). *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in food, *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 289-301.
- Drake P.L. and K.J. Hazelwood (2005). Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review, *Ann. Occup. Hyg.*, 49(7), 575-585.
- Dranginis A.M., J.M. Rauceo, J.E. Coronado, P.N. Lipke (2007). A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71(2), 282-294.

Drelich J., J.D. Miller, R.J. Good (1996). The effect of drop (bubble) size on advancing and receding contact angles for heterogeneous and rough solid surfaces as observed with sessile-drop and captive-bubble techniques, *J. Coll. Interf. Sci.*, 179(1), 37-50.

Dresselhaus M.S., G. Dresselhaus, A. Joriod, A.G. Souza Filhobe R. Saitof (2002). Raman spectroscopy on isolated single wall carbon nanotubes, *Carbon*, 40, 2043– 2061.

Dufrêne Y.F. (2002). Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology, *J. Bacteriol.*, 184(19), 5205-5213.

E

Egger S., R.P. Lehmann, M.J. Height, M.J. Loessner, M. Schuppler (2009). Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(9), 2973-2976.

Ehling-Schulz M., M. Fricker, S. Scherer (2004). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness, *Mol. Nutrit. Food Res.*, 48(7), 479-487.

el-Azizi M., N. Khardori (1999). Factors influencing adherence of *Candida* spp. to host tissues and plastic surfaces, *Indian. J. Exp. Biol.*, 37, 941–951.

Emerson R.J. and T.A. Camesano (2004). Nanoscale investigation of pathogenic microbial adhesion to a biomaterial, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(10), 6012-6022.

Enache-Angoulvant A. and C. Hennequin (2005). Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review, *Clin. Infect. Dis.*, 41, 1559-1568.

Epstein L. and R.L. Nicholson (2006). Adhesion and adhesives of fungi and oomycetes, In: "Biological adhesives", A.M. Smith and J.A. Callow (Eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 41-62.

Ercal N., H. Gurer-Orhan, N. Aykin-Burns (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage, *Curr. Top. Med. Chem.*, 1(6), 529-539.

Euro Inox – The European Stainless Steel Development Association (<http://www.euro-inox.org/>).

Everaert E.P.J.M., B. van de Belt-Gritter, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, G.J. Verkerke, F. Dijk, H.F. Mahieu, A. reitsma (1998). *In vitro* and *in vivo* microbial adhesion and growth on argon plasma-treated silicone rubber voice prostheses. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 9(3), 147-157.

Ewald A., S.K. Glückermann, R. Thull, U. Gbureck (2006). Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium, *Biomed. Eng.*, 5, 22-32.

F

Faille C., F. Fontaine, C. Lelievre, T. Benezech (2003). Adhesion of *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from milk: consequence on the efficiency of sanitation procedures, *Water Sci. Technol.*, 47(5), 225-231.

Farrell D.J., I. Morrissey, D. De Rubeis, M. Robbins, D. Felmingham (2003). A UK multicentre study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection, *J. Infect.* 46(2), 94-100.

- Favia P., M. Vulpio, R. Marino, R. d'Agostino, R.P. Mota, M. Catalano (2000). Plasma-deposition of Ag-containing polyethyleneoxide-like coatings, *Plasmas and Polymers*, 5(1), 1-14.
- Feng Q.L., J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 52, 662-668.
- Fletcher M. (1976). The effect of proteins on bacterial attachment to polystyrene, *J. Gen. Microbiol.*, 94, 400-404.
- Fletcher M. (1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance, *J. Bacteriol.*, 170(5), 2027-2030.
- Flint S.H., J.D. Brooks, P.J. Bremer (1997). The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainless steel, *J. Appl. Microbiol.*, 83, 508-517.
- Flint S.H., J.D. Brooks, P.J. Bremer (2000). Properties of the stainless steel substrate influencing the adhesion of thermo-resistant *Streptococci*, *J. Food Eng.*, 43, 235-242.
- Fogarassy E., C. Fuchs, A. Slaoui, S. de Unamuno, J.P. Stoquert, W. Marine, B. Lang (1994). Low-temperature synthesis of silicon oxide, oxynitride and nitride films by pulsed excimer laser ablation, *J. Appl. Phys.*, 76(5), 2612-2619.
- Fonnesbech Vogel B., H.H. Huss, B. Ojeniyi, P. Ahrens, L. Gram (2001). Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2586-2595.
- Fox C.L. and S.M. Modak (1974). Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 5(6), 582-588.
- Francolini I., V. Ruggeri, A. Martinelli, L. D'Iorio, A. Piozzi (2006). Novel metal-polyurethane complexes with enhanced antimicrobial activity, *Macromol. Rapid Commun.*, 27, 233-237.
- Franke S., G. Grass, C. Rensing, D.H. Nies (2003). Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 185, 3804-3812.
- Fridkin S.K. and W.R. Jarvis (1996). Epidemiology of nosocomial fungal infections, *Clin. Microbiol. Rev.*, 9(4), 499-511.
- Fu J., J. Ji, W. Yuan, J. Shen (2005). Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan, *Biomaterials*, 26, 6684-6692.
- Furno F., K.S. Morley, B. Wong, B.L. Sharp, P.L. Arnold, S.M. Howdle, R. Bayston, P.D. Brown, P.D. Winship, H.J. Reid (2004). Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?, *J. Antimicrob. Chemother.*, 54, 1019-1024.

G

- Galichet A., G.D. Sockalingum, A. Belarbi, M. Manfait (2001). FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype, *FEMS Microbiol. Lett.*, 197, 179-186.
- Gallardo-Moreno A.M., M.L. Gonzales-Martin, C. Perez-Giraldo, J.M. Bruque, A.C. Gomez-Garcia (2004). The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials, *J. Colloid Interface Sci.*, 271, 351-358.
- Gao L. and T.J. McCarthy (2006). Contact angle hysteresis explained, *Langmuir*, 22(7), 6234-6237.
- Ghigo J.M. (2003). Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Res. Microbiol.*, 154, 1-8.
- Gibbins B. and L. Warner (2005). The role of antimicrobial silver nanotechnology, *Med. Dev. Diagnos. Ind.*, 112-116
- Gorman R., S. Bloomfield, C.C. Adley (2002). A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland, *Int. J. Food Microbiol.*, 76(1-2), 143-150.
- Götzinger M., B. Weigl, W. Peukert, K. Sommer (2007), Effect of roughness on particle adhesion in aqueous solutions: a study of *Saccharomyces cerevisiae* and a silica particle, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 55, 44-50.
- Granier A., M. Vervloot, K. Aumaille, C. Vallée (2003). Optical emission spectra of TEOS and HMDSO derived plasmas used for thin film deposition, *Plasma Sources Sci. Technol.*, 12, 89-96.
- Gray J.E., P.R. Norton, R. Alnouno, C.L. Marolda, M.A. Valvano, K. Griffiths (2003). Biological efficacy of electroless-deposited silver on plasma activated polyurethane, *Biomaterials*, 24, 2759-2765.
- Griffin P.M. and R.V. Tauxe (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome, *Epidemiol. Rev.*, 13, 60-98.
- Grill A., D.A. Neumayer (2003). Structure of low dielectric constant to extreme low dielectric constant SiCOH films: Fourier transform infrared spectroscopy characterization, *J. Appl. Phys.*, 94(10), 6697-6707.
- Gristina A.G., C.D. Hobgood, E. Barth (1987). Biomaterial specificity, molecular mechanisms, and clinical relevance of *S. epidermidis* and *S. aureus* infections in surgery. In: "Pathogenesis and clinical significance of coagulase-negative staphylococci", Pulverer, Quie, Peters (Eds.), pp.143-157.
- Gross M., S.E. Cramton, F. Götz, A. Peschel (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces, *Infect. Immun.*, 69, 3423-3421.
- Gu Y. and D. Li (2000). Zeta potential of glass surface in contact with aqueous solutions, *J. Colloid Interf. Sci.*, 226, 328-339.

- Guillemot G., B. Despax, P. Raynaud, S. Zanna, P. Marcus, P. Schmitz, M. Mercier-Bonin (2008). Plasma deposition of silver nanoparticles onto stainless steel for the prevention of fungal biofilms: a case study on *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasma Process. Polym.*, 5, 228-238.
- Guillemot G., S. Lorthois, P. Schmitz, M. Mercier-Bonin (2007). Evaluating the adhesion force between *S. cerevisiae* yeast cells and polystyrene from shear-flow induced detachment experiments, *Chem. Eng. Res. Des.*, 85(6), 800-807.
- Guillemot G., G. Vaca-Medina, H. Martin-Yken, A. Vernhet, P. Schmitz, M. Mercier-Bonin (2006). Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: influence of yeast and solid surface properties, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 49, 126-135.
- Gupta A., M. Maynes, S. Silver (1998). Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (12), 5042-5045.
- Gupta A., L.T. Phung, D.E. Taylor, S. Silver (2001). Silver resistance genes in plasmids of the IncHII incompatibility group and on the *Escherichia coli* chromosome, *Microbiology*, 147, 3393-3402.

H

- Hamadi F., H. Latrache, M. Mabrouki, A. Elghmari, A. Outzourhit, M. Ellouali, A. Chtaini (2005). Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 19(1), 73-85.
- Han Y., A.M. Guentert, R.S. Smith, R.H. Linton, P.E. Neslon (1999). Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer for tanks used for aseptic juice storage, *Food Microbiol.*, 16, 53-61.
- Hanus J., M. Drabik, P. Hlidak, H. Biederman, G. Radnoczi, D. Slavinska (2009). Some remarks on Ag/C:H nanocomposite films, *Vacuum*, 83, 454-456.
- Harden V.P., J.O. Harris (1953). The isoelectric point of bacterial cells, *J. Bacteriol.*, 65(2), 198-202.
- Hasan F., I. Xess, X. Wang, N. Jain, B.C. Fries (2009). Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence, *Microbes Infect.*, 11, 753-761.
- Haupt S. and H.-H. Strehblow (1995). A combined surface analytical and electrochemical study of the formation of passive layers on Fe/Cr alloys in 0.5 H₂SO₄, *Corr. Sci.*, 37(1), 43-54.
- Haynes K. (2001). Virulence in *Candida* species, *Trends Microbiol.*, 9(12), 591-596.
- Hazen K.C. (1995). New and Emerging Yeast Pathogens, *Clin. Microbiol. Rev.*, 8(4), 462-478.
- Hegemann D., H. Brunner, C. Oehr (2003). Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement, *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B*, 208, 281-286.
- Hendricks S.K., C. Kwok, M. Shen, T.A. Horbett, B.D. Ratner, J.D. Bryers (2000). Plasma-deposited membranes for controlled release of antibiotic to prevent bacterial adhesion and biofilm formation, *J. Biomed. Mater. Res.*, 50, 160-170.

- Hinton A., J.A. Cason, K.D. Ingram (2002). Enumeration and identification of yeasts associated with commercial poultry processing and spoilage of refrigerated broiler carcasses, *J. Food Protect.*, 65(6), 993-998.
- Hlidek P., H. Biederman, A. Choukourov, D. Slavinska (2008). Behavior of polymeric matrices containing silver inclusions, 2 – Oxidative aging of nanocomposite Ag/C:H and Ag/C:H:O films, *Plasma Process Polym.*, 6, 34-44.
- Holah J. and H. Gibson (2000). Food industry biofilms. In: "Community Structure and co-operation in biofilms", D. Allison, J.P. Gilbert, H. Lappin-Scott, M. Wilson (Eds.), pp. 211-235.
- Holder I.A., P. Durkee, A.P. Supp, S.T. Boyce (2003). Assessment of a silver-coated barrier dressing for potential use with skin graft on excised burns, *Burns*, 29, 445-448.
- Holt K.B. and A.J. Bard (2005). Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺, *Biochemistry*, 44, 13214-13223.
- Houmard M., G. Berthomé, L. Boulangé, J.C. Joud (2007). Surface physico-chemistry of an austenitic stainless steel: effect of a simple cold rolling treatment on surface contamination, *Corr. Sci.*, 49, 2602-2611.
- Hume E.B.H., J. Baveja, B. Muir, T.L. Schubert, N. Kumar, S. Kjelleberg, H.J. Griesser, H. Thissen, R. Read, L.A. Poole-Warren, K. Schindhelm, M.D.P. Willcox (2004). The control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and in vivo infection rates by covalently bound furanones, *Biomaterials*, 25, 5023-5030.
- Husmark U., U. Rönner (1990). Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions, *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 557-562.
- Hussain S.M. and J.J. Schlager (2009). Safety evaluation of silver nanoparticles: inhalation model for chronic exposure, *Toxicol. Sci.*, 108(2), 223-224.

I

- Iler R.K. (1979). "The Chemistry of Silica", R.K. Iler Eds., Wiley and Sons Inc., New York.
- Ip M., S.L. Lui, V. Poon, I. Lung, A. Burd (2006). Antimicrobial activities of silver dressings: an *in vitro* comparison, *J. Med. Microbiol.*, 55, 59-63.
- Ivanov-Omskii V.I., L.K. Panina, S.G. Yastrebov (2000). Amorphous hydrogenated carbon doped with copper as antifungal protective coating, *Carbon*, 38(4), 494-499.

J

- Jackson M. and H.H. Mantsch (1995). The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30(2), 95-120.
- Janocha B., D. Hegemann, C. Oehr, H. Brunner, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer (2001). Adsorption of protein on plasma-polysiloxane layers of different surface energies, *Surf. Coat. Technol.*, 142-144, 1051-1055.

- Jeon H.J., S.C. Yi, S.G. Oh (2003). Preparation and antibacterial effects of Ag-SiO₂ thin films by sol-gel method, *Biomaterials*, 24, 4921-4928.
- Jespersen L., A. van der Aa Kühle, K.M. Petersen (2000). Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts, *Int. J. Food Microbiol.*, 60, 43-53.
- Jilkine K., K.M. Gough, R. Julian, S.G.W. Kaminskyj (2008). A sensitive method for examining whole-cell biochemical composition in single cells of filamentous fungi using synchrotron FTIR spectromicroscopy, *J. Inorg. Biochem.*, 102, 540-546.
- Jorgensen H.J., T. Mathisen, A. Lovseth, K. Omoe, K.S. Qvale, S. Loncarevic (2005). An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk, *FEMS Microbiol. Lett.*, 252(2), 267-272.
- Jucker B.A., H. Harms, A.J.B. Zehnder (1996). Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and teflon, *J. Bacteriol.*, 178, 5472-5479.
- Jullien C., T. Benezech, B. Carpentier, B. Leuret, C. Faille (2002). Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry, *J. Food Eng.*, 56, 77-87.
- Jung W.K., S.H. Kim, H.C. Koo, S. Shin, J.M. Kim, Y.K. Park, S.Y. Hwang, H. Yang, Y.H. Park (2007). Antifungal activity of the silver ion against contaminated fabric, *Mycoses*, 50, 265-269.
- Jung W.K., H.C. Koo, K.W. Kim, S. Shin, S.H. Kim, Y.H. Park (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(7), 2171-2178.

K

- Kallay N., D. Kovacevic, I. Dedic, V. Tomasic (1994). Effect of corrosion on the isoelectric point of stainless steel, *Corr. Sci.*, 50(8), 598-602.
- Kaminskyj S.G.W., K. Jilkine, A. Szeghalmi, K.M. Gough (2008). High spatial resolution analysis of fungal cell biochemistry-bridging the analytical gap using synchrotron FTIR spectromicroscopy, *FEMS Microbiol. Lett.*, 284, 1-8.
- Kaper J.B., J.P. Nataro, H.L.T. Mobley (2004). Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 123-140.
- Katsikogianni M., I. Spiliopoulou, D.P. Dowling, Y.F. Missirlis (2006). Adhesion of slime producing *Staphylococcus epidermidis* strains to PVC and diamond-like carbon/silver/fluorinated coatings, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 17, 679-689.
- Keddam M. (1995). Anodic Dissolution. In: "Corrosion mechanisms in theory and practice", P. Marcus and J. Oudar (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 97-170.
- Khadori N. and M. Yassien (1995). Biodilms in device-related infections, *J. Indus. Microbiol.*, 15, 141-147.

- Kierans M., A.M. Staines, H. Bennett, G.M. Gadd (1991). Silver tolerance and accumulation in yeasts, *Biol. Metals*, 4, 100-106.
- Kim Y.S., J.S. Kim, H.S. Cho, D.S. Rha, J.M. Kim, J.D. Park, B.S. Choi, R. Lim, H.K. Chang, Y.H. Chung, I.H. Kwon, J. Jeong, B.S. Han, I.J. Yu (2008). Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity and gender-related tissue ditribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats, *Inhal. Toxicol.*, 20(6), 575-583.
- Kim J.S., E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, Y.H. Park, C.Y. Hwang, Kim Y.K., Y.S. Lee, D.H. Jeong, M.H. Cho (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, 3, 95-101.
- Kirk C.T. (1988). Quantitative analysis of the effect of disorder-induced mode coupling on infrared absorption in silica, *Phys. Rev. B*, 38(2), 1255-1273.
- Klasen H.J. (2000). Historical review of the use of silver in the treatment of burns I. Early uses, *Burns*, 26, 117-130.
- Klueh U., V. Wagner, S. Kelly, A. Johnson, J.D. Bryers (2000). Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation, *J. Biomed. Mater. Res.*, 53, 621-631.
- Knowles J. and S. Roller (2001). Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel, *J. Food Prot.*, 64(10), 1542-1548.
- Kohler A., J. Sulé-Suso, G.D. Sockalingum, M. Tobin, F. Bahrami, Y. Yang, J. Pijanka, P. Dumas, M. Cotte, D.G. van Pittius, G. Parkes, H., Martens (2008). Estimating and correcting Mie scattering in synchrotron-based microscopic FTIR spectra by extended multiplicative signal correction (EMSC), *Appl. Spectrosc.*, 62 (3), 259-266.
- Kuchma S.L. and G.A. O'Toole (2000). Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11(5), 429-433.
- Kumar C.G. and S.K. Anand (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review, *Int. J. Food Microbiol.*, 42, 9-27.
- Kwok S.C.H., W. Zhang, G.J. Wan, D.R. McKenzie, M.M.M. Bilek, P.K. Chu (2007). Hemocompatibility and anti-bacterial properties of silver doped diamond-like carbon prepared by pulsed filtered cathodic vacuum arc deposition, *Diam. Rel. Mat.*, 16, 1353-1360.

L

- Landolt D. (1990). Contributions of surface analysis to corrosion science: selective dissolution and oxidation phenomena in alloy corrosion, *Surf. Interface Anal.*, 15, 395-404.
- Landoulsi J., M.J. Genet, C. Richard, K. El Kirat, S. Pulvin, P.G. Rouxhet (2008). Evolution of the passive film and organic constituents at the surface of stainless steel immersed in fresh water, *J. Colloid Interface Sci.*, 318, 278-289.

- Lansdown A.B.G. (2002 a). Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action, *J. Wound Care*, 11(4), 125-130.
- Lansdown A.B.G. (2002 b). Silver II: toxicity in mammals and how its products aid wound repair, *J. Wound Care*, 11(5), 173-177.
- Lass-Flörl C., A. Mayr, S. Perkhofer, G. Hinterberger, J. Hausdorfer, C. Speth, M. Fille (2008). Activities of antifungal agents against yeasts and filamentous fungi: assessment according to the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52(10), 3637-3641.
- Lebert I., S. Leroy, R. Talon (2007). Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm, *Food Microbiol.*, 24, 281-287.
- Lecleroq-Perlat M.N., M. Lalande (1994). Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries, *J. Food Eng.*, 23, 501-517.
- Lee K.J., P.D. Nallathamby, L.M. Browning, C.J. Osgood, X.H.N. Xu (2007). In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos, *ACS Nano*, 28, 133-143.
- Legeay G., F. Poncin-Epaillard, C.R. Arciola (2006). New surfaces with hydrophilic/hydrophobic characteristics in relation to (no)bioadhesion, *Int. J. Artif. Organs*, 29, 453-461.
- Lehocky M., P.F.F. Amaral, M.A.Z. Coelho, P. Stahel, A.M. Barros-Timmons, J.A.P. Coutinho (2006). Attachment/detachment of *Saccharomyces cerevisiae* on plasma deposited organosilicon thin films, *Czech. J. Phys.*, 56(B), 1256-1262.
- Le Loir Y., F. Baron, M. Gautier (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning, *Genet. Mol. Res.*, 2(1), 63-76.
- Li Y., P. Leung, L. Yao, Q.W. Song, E. Newton (2006). Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles, *J. Hospital Inf.*, 62, 58-63.
- Li X.Z., H. Nikaido, K.E. Williams (1997). Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins, *J. Bacteriol.*, 179, 6127-6132.
- Li F. and S.P. Palecek (2003). EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells, *Eukaryot. Cell*, 2, 1266-1273.
- Li F., M.J. Svarovsky, A.J. Karlsson, J.P. Wagner, K. Marchillo, P. Oshel, D. Andes, S.P. Palecek (2007). Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*, *Eukaryot. Cell*, 6, 931-939.
- Liang Q. and B. Zhou (2007). Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways, *Mol. Biol. Cell.*, 18, 4741-4749.
- Liau S.Y., D.C. Read, W.J. Pugh, J.R. Furr, A.D. Russell (1997). Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions, *Lett. Appl. Microbiol.*, 25, 279-283.

- Linden J.V., S.M. Hopfer, H.R. Gossling, F.W. Sunderman (1985). Blood nickel concentrations in patients with stainless steel hip prostheses, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 15(6), 459-464.
- Lo W.S. and A.M. Dranginis (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudophyphae formation and invasion by *S. cerevisiae*, *Mol. Biol. Cell*, 9, 161-171.
- Lohrer S., O.D. Schneider, T. Maienfisch, S. Bokorny, W.J. Stark (2008). Microorganism-triggered release of silver nanoparticles from biodegradable oxide carriers allows preparation of self-sterilizing polymer surfaces, *Small*, 4(6), 824-832.
- Long G., P. Zhu, Y. Shen, M. Tong (2009). Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on deposition kinetics of bacteria, *Environ. Sci. Technol.*, 43(7), 2308-2314.
- Lopez-Salido I., D.C. Lim, Y.D. Kim (2005). Ag nanoparticles on highly ordered pyrolytic graphite (HOPG) surfaces studied using STM and XPS, *Surf. Sci.*, 588, 6-18.
- Loureiro V. (2000). Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control, *Food Res. Int.*, 33(3-4), 247-256.
- Loureiro V. and M. Malfeito-Ferreira (2003). Spoilage yeasts in the wine industry, *Int. J. Food Microbiol.*, 86(1-2), 23-50.
- Loureiro V. and A. Querol (1999). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages, *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 356-365.
- Luo K., T.P. St. Clair, X. Lai, D.W. Goodman (2000). Silver growth on TiO₂ (110) (1x1) and (1x2), *J. Phys. Chem. B*, 104, 3050-3057.

M

- Mansfeld F. (2007). The interaction of bacteria and metal surfaces, *Electrochimica. Acta.*, 52(27), 7670-7680.
- Mantel M., Y.I. Rabinovitch, J.P. Wightman, R.-H. Yoon (1995). A study of hydrophobic interactions between stainless steel and silanated glass surface using Atomic Force Microscopy, *J. Colloid Interface Sci.*, 170, 203-214.
- Mantel M., J.P. Wightman (1994). Influence of the surface chemistry on the wettability of stainless steel, *Surf. Interface Anal.*, 21, 595-605.
- Martin-Yken H., A. Lagorce, J. François (2002). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: molecular architecture, regulatory pathways, remodelling mechanism in response to environmental conditions, and biotechnological values, *Recent Res. Devel. Microbiol.*, 6, 503-526.
- Maslanka S.E., J.G. Kerr, G. Williams, J.M. Barbaree, L.A. Carson, J.M. Miller, B Swaminathan (1999). Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne disease outbreak investigations, *J. Clinical Microbiol.*, 37(7), 2209-2214.
- Matsutani T., T. Asanuma, C. Liu, M. Kiuchi, T. Takeuchi (2003). Ion beam-induced chemical vapor deposition with hexamethyldisilane for hydrogenated amorphous silicon carbide and silicon carbonitride films, *Surf. Coat. Technol.*, 169-170, 624-627.

- Maurice V., W.P. Yang, P. Marcus (1996). XPS and STM study of passive single crystal surfaces, *J. Electrochem. Soc.*, 143(4), 1182-1200.
- McAllister E.W., L.C. Carey, P.G. Brady, R. Heller, S.G. Kovacs (1993). The role of polymeric surface smoothness of biliary stents in bacterial adhesion, biofilm deposition, and stent occlusion, *Gastrointest. Endosc.*, 39, 422-425.
- McDonald D.-D., S.R. Biaggio, H. Song (1992). Point defect model for passive films – Identification of charge carriers, *J. Electrochem. Soc.*, 139, 170-177.
- McDonald D.M., M. Fyfe, A. Paccagnella, A. Trinidad, K. Louie, D. Patrik (2004). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999, *Epidemiol. Infect.*, 132(2), 283-289.
- McEldowney S. and M. Fletcher (1986). Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(3), 460-465.
- Mei L., H.C. van der Mei, Y. Ren, W. Norde, H.J. Busscher (2009). Poisson analysis of streptococcal bond strengthening on stainless steel with and without a salivary conditioning film, *Langmuir*, DOI: 10.1021/la9000494.
- Mercier-Bonin M., K. Ouazzani, P. Schmitz, S. Lorthois (2004). Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system, *J. Colloid Interf. Sci.*, 271, 342-350.
- Meylheuc T., C. Methivier, M. Renault, J.M. Herry, C.M. Pradier, M.N. Bellon-Fontaine (2006). Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by Gram negative and Gram positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 52(2), 128-137.
- Minier M., M. Salmain, N. Yacoubi, L. Barbes, C. Méthivier, S. Zanna, C.M. Pradier (2005). Covalent immobilization of lysozyme on stainless steel. Interface spectroscopic characterization and measurement of enzymatic activity, *Langmuir*, 21, 5957-5965.
- Monnartz P. (1911). Iron-chromium alloys with special consideration of resistance to acids, *Métallurgie*, 8, 161-176.
- Moore G., C. Griffith, A. Peters (2000). Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant, *J. Food Prot.*, 63(8), 1100-1106.
- Morones J.R., J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramirez, M.J. Yacaman (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 16, 2346-2353.
- Mota R.P., D. Galvao, S.F. Durrant, M.A. Bica de Moraes, S. de Oliveira Dantas, M. Cantao (1995). HMDSO plasma polymerization and thin film optical properties, *Thin Solid Films*, 270, 109-113.
- Moulder J.-F. (1992). "Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy 2nd ed.", J.-F. Moulder, W.F. Stickle, P.E. Sobol, K. Bomben, Eds., Perkin-Elmer Corporation (Physical Electronics Division), Eden Prairie.
- Mozes N., F. Marchal, M. P. Hermesse, J. L. Van Haecht, L. Reuliaux, A. J. Leonard, P. G. Rouxhet (1987). Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions, *Biotechnol. Bioeng.*, 30(3), 439-450.

Mueller N.C. and B. Nowack (2008). Exposure modelling of engineered nanoparticles in the environment, *Environ. Sci. Technol.*, 42(12), 4447-4453.

Müller B., M. Riedel, R. Michel, S.M. De Paul, R. Hofer, D. Heger, D. Grützmacher (2001). Impact of nanometer-scale roughness on contact-angle hysteresis and globulin adsorption, *J. Vac. Sci. Technol. B*, 19(5), 1715-1720.

Murphy A. and K. Kavanagh (1999). The emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen: implications for biotechnology, *Enzyme Microb. Tech.*, 25, 551-557.

N

Nablo B.J., H.L. Prichard, R.D. Butler, B. Klitzman, M.H. Schoenfisch (2005). Inhibition of implant-associated infections via nitric oxide release, *Biomaterials*, 26, 6984-6990.

Naudé N., J.P. Cambronne, N. Gherardi, F. Massines (2005). Electrical model of an atmospheric pressure Townsend-like discharge (APTD), *Eur. Phys. J. Appl. Phys.*, 29, 173-180.

Nejadnik M.R., H.C. van der Mei, H.J. Busscher, W. Norde (2008). Determination of the shear force at the balance between bacterial attachment and detachment in weak-adherence systems, using a flow displacement chamber, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(3), 916-919.

Newson T. (2002). Stainless steel – a family of medical device materials, *Med. Dev. Manufact. Technol.*, 1-3.

Nichols R.L., I.I. Raad (1999). Management of bacterial complications in critically ill patients: surgical wound and catheter-related infections, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 33(2), 121-130.

Ng K.M., W.K. Li, S.K. Wo, C.W. Tsang, N.L. Ma (2004). Silver(I) affinities of amides: a combined *ab initio* and experimental study, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6, 144-153.

O

Olsson C.-O.A. and D. Landolt (2003). Passive films on stainless steels-chemistry, structure and growth, *Electrochimica Acta.*, 48(9), 1093-1104.

Osumi M. (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation, *Micron.*, 29, 207-233.

O'Toole G., H.B. Kaplan, R. Kolter (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, 49-79.

P

Pal S., Y.K. Tak, J.M. Song (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles? A study of the Gram negative bacterium *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(6), 1712-1720.

Palmer J.S., S.H. Flint, J. Brooks (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 577-588.

- Panyala N.R., E.M. Pena-Mendez, J. Havel (2008). Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?, *J. Appl. Biomed.*, 6, 117-129.
- Parkar S.G., S.H. Flint, J.D. Brooks (2004). Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel, *J. App. Microbiol.*, 96, 110–116.
- Parkar S.G., S.H. Flint, J.S. Palmer, J.D. Brooks (2001). Factors influencing attachment of thermophilic *Bacilli* to stainless steel, *J. App. Microbiol.*, 90, 901–908.
- Pedersen K. (1990). Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water, *Water Res.*, 24, 239-243.
- Percival S.L., P.G. Bowler, D. Russell (2005). Bacterial resistance to silver in wound care, *J. Hospital Infect.*, 60, 1-7.
- Perrone G.G., S.X. Tan, I.W. Dawes (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1783, 1354-1368.
- Pfeiffer R., H. Kuzmany, P. Knoll, S. Bokova, N. Salk, B. Günther (2003). Evidence for trans-polyacetylene in nano-crystalline diamond films, *Diam. Rel. Mat.*, 12, 268-271.
- Piérard-Franchimont C., P. Quatresooz, P. Paquet, F. Henry, G.E. Piérard (2004). Comment je traite... la colonisation bactérienne critique d'un ulcère de jambe – Le Yin et le Yang des pansements argentiques, *Rev. Med. Liège*, 59 (6), 403-406.
- Piette J.-P.G. and E.S. Idziak (1992). A model study of factors involved in adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to meat, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(9), 2783-2791.
- Pompermayer D.M.C., C.C. Gaylarde (2000). The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene, *Food Microbiol.*, 17(4), 361-365.
- Poon V.K.M. and A. Burd (2004). In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care, *Burns*, 30, 140-147.
- Poortinga A.T., R. Bos, H.J. Busscher (1999). Measurement of charge transfer during bacterial adhesion to an indium tin oxide surface in a parallel plate flow chamber, *J. Microbiol Meth.*, 38, 183-189.
- Poortinga A.T., R. Bos, W. Norde, H.J. Busscher (2002). Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces, *Surf. Sci. Rep.*, 47, 1-32.
- Pradier C.M., C. Rubio, C. Poleunis, P. Bertrand, P. Marcus, C. Compère (2005). Surface characterization of three marine bacterial strains by Fourier transform IR, X-ray photoelectron spectroscopy, and time-of-flight secondary-ion mass spectrometry, correlation with adhesion on stainless steel surfaces, *J. Phys. Chem. B Condens. Matter Mater. Surf. Interfaces Biophys.*, 109, 9540-9549.
- Prasad G. R., S. Daniels, D.C. Cameron, B.P. McNamara, E. Tully, R. O'Kennedy (2005). PECVD of biocompatible coatings on 316L stainless steel, *Surface Coatings Technology*, 20(1-4), 1031-1035.
- Pratt L.A. and R. Kolter (1998). Genetic analysis of *E. coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili, *Mol. Microbiol.*, 30, 285–293.

Prigent-Combaret C., O. Vidal, C. Dorel, P. Lejeune (1999). Abiotic surface sensing and biofilm dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 181, 5993-6002.

Pringle J.H. and M. Fletcher (1983). Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(3), 811-817.

R

Rai M., A. Yadav, A. Gade (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnol. Adv.*, 27, 76-83.

Ramage G., K. Vande Walle, B.L. Wickes, J.L. Lopez-Ribot (2001). Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45(9), 2475-2479.

Rau C. and W. Kulish (1994). Mechanisms of plasma polymerization of various silico-organic monomers, *Thin Solid Films*, 249(1), 28-37.

Raynaud P., B. Despax, Y. Segui, H. Caquineau (2005). FTIR plasma phase analysis of hexamethyldisiloxane discharge in microwave multipolar plasma at different electrical powers, *Plasma Process. Polym.*, 2, 45-52.

Reynolds T.B. and G.R. Fink (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation, *Science*, 291, 878-881.

Rijnaarts H.H.M., W. Norde, J. Lyklema, A.J.B. Zehnder (1999). DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths, *J. Colloid. Interface Sci.*, 14, 179-185.

Rodriguez A., W.R. Autio, L.A. McLandsborough (2008). Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation, *J. Food Protect.*, 71(1), 170-176.

Rosmaninho R., O. Santos, T. Nylander, M. Paulsson, M. Beuf, T. Benezech, S. Yiantsios, N. Andritsos, A. Karabelas, G. Rizzo, H. Müller-Steinhagen, L.F. Melo (2007). Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling – Evaluation of fouling by milk components, *J. Food Eng.*, 80, 1176-1187.

Rouxhet P.G. and N. Mozes (1990). Physical chemistry of the interface between attached microorganisms and their support, *Water Sci. Tech.*, 22(1/2), 1-16.

Rupp M.E., R. Fitzgerald, N. Marion, V. Helget, S. Puumala, J.R. Anderson, P.D. Fey (2004). Effect of silver-coated urinary catheters: efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance, *Am. J. Infect. Control.*, 32(8), 445-450.

Ryu J.H., H. Kim, J.F. Frank, L.R. Beuchat (2004). Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production, *Lett. Appl. Microbiol.*, 39, 359-362.

S

- Santos O., T. Nylander, R. Rosmaninho, G. Rizzo, S. Yiantsios, N. Andritsos, A. Karabelas, H. Müller-Steinhagen, L. Melo, L. Boulangé-Petermann, C. Gabet, A. Braem, C. Trägårdh, M. Paulsson (2004). Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling – surface characterization, *J. Food Eng.*, 64, 63-79.
- Sardella E., P. Favia, R. Gristina, M. Nardulli, R. d'Agostino (2006). Plasma-aided micro- and nanopatterning processes for biomedical applications, *Plasma Process. Polym.*, 3, 456-469.
- Sardella E., R. Gristina, G. Ceccone, D. Gilliland, A. Papadopoulou-Bouraoui, F. Rossi, G.S. Senesi, Detomaso L., P. Favia, R. d'Agostino (2005). Control of cell adhesion and spreading by spatial microarranged PEO-like and pdAA domains, *Surf. Coat. Technol.*, 200, 51-57.
- Sawada Y., S. Ogawa, M. Kogoma (1995). Synthesis of plasma-polymerized tetraethoxysilane and hexamethyldisiloxane films prepared by atmospheric pressure glow discharge, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 28, 1661-1669.
- Schembri M.A., K. Kjaergaard, P. Klemm (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms, *Mol. Microbiol.*, 48(1), 253-267.
- Schierholz J.M. and J. Beuth (2001). Implant infections: a haven for opportunistic bacteria, *J. Hosp. Inf.*, 49, 87-93.
- Schierholz J. M., L.J. Lucas, A. Rump, G. Pulverer (1998). Efficacy of silver-coated medical devices, *J. Hosp. Inf.*, 40(4), 257-262.
- Schön G. (1973). ESCA studies of Ag, Ag₂O and AgO, *Acta Chem. Scand.*, 27, 2623-2633.
- Schwarz J., M. Schmidt, A. Ohl (1998). Synthesis of plasma-polymerized hexamethyldisiloxane (HMDSO) films by microwave discharge, *Surf. Coat. Technol.*, 98, 859-864.
- Scofield J.H. (1976). Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, 8(2), 129-137.
- Sharma V.K., R.A. Yngard, Y. Lin (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities, *Adv. Colloid Interf. Sci.*, 145, 83-96.
- Shrivastava S., T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao and D. Dash (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18, doi:10.1088/0957-4484/18/22/225103.
- Silver S. (2003). Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds, *FEMS Microbiol. Rev.*, 27, 341-353.
- Silver S., L.T. Phung, G. Silver (2006). Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 627-634.
- Siow K.S., L. Britcher, S. Kumar, H.J. Griesser (2006). Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization – a review, *Plasma Process. Polym.*, 3, 392-418.
- Smith K. and I.S. Hunter (2008). Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drugs resistant clinical isolates, *J. Med. Microbiol.*, 57, 966-973.

Smith G.D. and E. Zysk (1987). Corrosion of the noble metals. In: "Metals Handbook", 9th ed., Vol. 13, Corrosion, pp. 793–807.

Sockalingum G.D., C. Sandt, D. Toubas, J. Gomez, P. Pina, I. Beguinot, F. Witthuhn, D. Aubert, P. Allouch, J.M. Pinon, M. Manfait (2002). FTIR characterization of *Candida* species: a study on some reference strains and pathogenic *C. albicans* isolates from HIV⁺ patients, *Vib. Spectrosc.*, 28, 137-146.

Sondi I. and B. Salopek-Sondi (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agents: a case study on *E. coli* as a model for Gram negative bacteria, *J. Colloid Interf. Sci.*, 275, 177-182.

Stocks G. and H.F. Janssen (2000). Infection in patients after implantation of an orthopedic device, *Infection and Orthopedic Devices, ASAIO J.*, 46, S41-S46.

Strevett K.A., G. Chen (2003). Microbial surface thermodynamics and applications, *Res. Microbiol.*, 154, 329-335.

Sung J.H., J.H. Ji, J.U. Yoon, D.S. Kim, M.Y. Song, J. Jeong, B.S. Han, J.H. Han, Y.H. Chung, J. Kim, T.S. Kim, H.K. Chang, E.J. Lee, J.H. Lee, I.J. Yu (2008). Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles, *Inhal. Toxicol.*, 20(6), 567-574.

Szeghalmi A., S.G.W. Kaminskyj, K.M. Gough (2007). A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and stressed conditions, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 1779-1789.

T

Taga Y. (1993). Recent progress of optical thin films in the automobile industry, *Appl. Opt.*, 32(28), 5519-5530.

Takenaka S., E. Karg, C. Roth, H. Schulz, A. Ziesenis, U. Heinzmann, P. Schramel, J. Heyder (2001). Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats, *Environ. Health Perspect.*, 109, 547-551.

Takeuchi K. and J.F. Frank (2000). Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability, *J. Food Prot.*, 63, 434-440.

Takeuchi K., C.M. Matute, A.N. Hassan, J.F. Frank (2000). Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. *J. Food Prot.*, 63: 1433-1437.

Tanuma S., C.J. Powell, D.R. Penn (1994). Calculations of electron inelastic mean free paths. V. Data for 14 organic compounds over the 50-2000 eV range. *Surf. Interface Anal.*, 21(3), 165-176.

Tauxe R.V. (1997). Emerging foodborne disease: an evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.*, 3(4), 425–434.

Terada A., A. Yuasa, T. Kushimoto, S. Tsuneda, A. Katakai, M. Tamada (2006). Bacterial adhesion to and viability on positively charged polymer surfaces, *Microbiology*, 152, 3575-3583.

Torok T.J., R.V. Tauxe, R.P. Wise, J.R. Livengood, R. Sokolow, S. Mauvais, K.A. Birkness, M.R. Skeels, J.M. Horan (1997). A large community outbreak of salmonellosis caused by intentional contamination of restaurant salad bars, *J. Am. Med. Assoc.*, 278(5), 389-395.

Toubas D., M. Essendoubi, I. Adt, J.M. Pinon, M. Manfait, G.D. Sockalingum (2007). FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 1729-1737.

Trachoo N. and J.D. Brooks (2005). Attachment and heat resistance of *Campylobacter jejuni* on *Enterococcus faecium* biofilm, *Pak. J. Biol. Sci.*, 8, 599-605.

Trachoo N., J.F. Frank, N.J. Stern (2002). Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. *J. Food Prot.*, 65: 1110-1116.

U

Uter W., A. Pfahlberg, O. Gefeller, J. Geier, A. Schnuch (2003). Risk factors for contact allergy to nickel – results of a multifactorial analysis, *Contact Dermatitis*, 48(1), 33-38.

V

Valle J., S. Da Re, N. Henry, T. Fontaine, D. Balestrino, P. Latour-Lambert, J.M. Ghigo (2006). Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(33), 12558-12563.

van der Borden A.J., H. van der Werf, H.C. van der Mei, H.J. Busscher (2004). Electric current-induced detachment of *Staphylococcus epidermidis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(11), 6871-6874.

Vanhaecke E., J.P. Remon, A. Van Peteghem, D. De Rudder, F. Raes, M. Moors (1990). Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(3), 788-795.

van Oss C.J. (1996). In: "Forces interfaciales en milieux aqueux", Elsevier-Masson (Eds.), Paris.

van Oss C.J., R.J. Good, M.K. Chaudhury (1986). The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces, *J. Colloid Interface Sci.*, 111, 378-390.

Vautrin-UI C., C. Boisse-Laporte, N. Benissad, A. Chausse, P. Leprince, R. Messina (2000). Plasma-polymerized coatings using HMDSO precursor for iron protection. *Prog. Organ. Coat.*, 38(1), 9-15.

Veres M., S. Toth, M. Füle, M. Koos (2006). Thickness dependence of the structure of a-C:H thin films prepared by rf-CVD evidenced by Raman spectroscopy, *J. Non-Cryst. Solids*, 352, 1348-1351.

Vernhet A., M.N. Bellon-Fontaine (1995). Role of bentonites in the prevention of *Saccharomyces cerevisiae* adhesion to solid surfaces, *Colloid Surf. B*, 3, 255-262.

Verran J. and R.D. Boyd (2001). The relationship between substratum surface roughness and microbiological and organic soiling: a review, *Biofouling*, 17(1), 59-71.

Verwey E.J.W. and J.T.G. Overbeek (1948). Theory of the stability of lyophobic colloids, Elsevier Eds., New York.

von Eiff C., C. Heilmann, G. Peters (1999). New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to *Staphylococci*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 18, 843-846.

W

Walker G.M. (1998). In: "Yeast: physiology and biotechnology", Wiley, Chichester, UK, pp. 101-264.

Wapner K. and G. Grundmeier (2005). Spectroscopic analysis of the interface chemistry of ultra-thin plasma polymer films on iron, *Surf. Coat. Technol.*, 200, 100-103.

Wataha J.C., P.E. Lockwood, A. Schedle (2000). Effect of silver, copper, mercury and nickel ions on cellular proliferation during extended, low-dose exposures, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 52(2), 360-364.

Wells T.N.C., P. Scully, G. Paravicini, A.E.I. Proudfoot, M.A. Payton (1995). Mechanism of irreversible inactivation of phosphomannose isomerases by silver ions and flomazine, *Biochemistry*, 34, 7896-7903.

Whittaker L.J. and C.M. Klier (1996). Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 513-552.

Whitehead K.A., J. Colligon, J. Verran (2005). Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 41, 129-138.

Williams V. and M. Fletcher (1996). *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 100-104.

Wright R. (2000). Transmission Electron Microscopy of yeast, *Microsc. Res. Tech.*, 51, 496-510.

Wright J.B., K.Lam, A.G. Buret, P.E. Olson, R.E. Burrell (2002). Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing, *Wound Rep. Reg.*, 10(3), 141-151.

X

Xu Y.Y., T. Muramatsu, M. Taniyama, T. Aoki, Y. Hatanaka (2000). Deposition of a a-SiC:H thin films from organosilicon material by remote plasma CVD method, *Thin Solid Films*, 368, 181-184.

Y

Yang H.C. and L.A. Pon (2003). Toxicity of metal ions used in dental alloys: a study in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Drug Chem. Toxicol.*, 26(2), 75-85.

Yang W., C. Shen, Q. Ji, H. An, J. Wang, Q. Liu, Z. Zhang (2009). Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA, *Nanotechnology*, 20(8), 085102-085108.

Yeo S.Y. and S.H. Jeong (2003). Preparation and characterization of polypropylene/silver nanocomposite fibres, *Polym. Int.*, 52(7), 1053-1057).

Yin H.Q., R. Langford, R.E. Burrell (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activity of Acticoat antimicrobial barrier dressing, *J Burn Care Rehabil.*, 20, 195-200.

Z

Zanna S., C. Compere, P. Marcus (2005). XPS characterization of BSA adsorption on stainless steel. In: "Passivation of Metals and Semiconductors and the Properties of Thin Oxide Layers", P. Marcus and V. Maurice (Eds.), Elsevier, Paris.

Zeng F., C. Hou, S.Wu, X. Liu, Z. Tong, S. Yu (2007). Silver nanoparticles directly formed on natural macroporous matrix and their anti-microbial activities, *Nanotechnology*, 18, 055605-055612.

Zhang W., P.K. Chu, J. Ji, Y. Zhang, X. Liu, R.K.Y. Fu, P.C.T. Ha, Q. Yan (2006 a). Plasma surface modification of poly vinyl chloride for improvement of antibacterial properties, *Biomaterials*, 27, 44-51.

Zhang F., E.T. Kang, K.G. Neoh, P. Wang, K.L. Tan (2001). Surface modification of stainless steel by grafting of poly(ethylene glycol) for reduction in protein adsorption, *Biomaterials*, 22(12), 1541-1548.

Zhang W., Y.H. Zhang, J.H. Ji, J. Zhao, Q. Yan, P.K. Chu (2006 b). Antimicrobial properties of copper plasma-modified polyethylene, *Polymer*, 47(21), 7441-7445.

Zhao Q. and Y. Liu (2006). Modification of stainless steel surfaces by electroless Ni-P and small amount of PTFE to minimize bacterial adhesion, *J. Food Eng.*, 72(3), 266-272.

Zhao Q., Y. Liu, C. Wang (2005). Development and evaluation of electroless Ag-PTFE composite coatings with anti-microbial and anti-corrosion properties, *Appl. Surf. Sci.*, 252, 1620-1627.

Zhao Q., Y. Liu, C. Wang, S. Wang, N. Peng, C. Jeynes (2008). Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces, *Med. Eng. Phys.*, 30(3), 341-349.

Zita A., M. Hermansson (1997). Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1168-1170.

Zodrow K., L. Brunet, S. Mahendra, D. Li, A. Zhang, Q. Li, P.J.J. Alvarez (2009). Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal, *Water Res.*, 43, 715-723.

ANNEXES

Annexe 1 – Principe de la photo-émission et de la spectroscopie XPS

L'échantillon à analyser est irradié par un flux de rayons X monochromatiques d'énergie déterminée ($h\nu$). En absorbant un photon X, les atomes situés dans les couches superficielles de l'échantillon reçoivent cette énergie $h\nu$. Ils émettent alors un électron appartenant à l'un de leurs niveaux de cœur, afin de conserver leur état de stabilité initial : c'est l'**ionisation par effet photo-électrique** (Briggs, 1996). L'électron éjecté se libère de l'atome, puis de la matière. Ainsi, une partie de l'énergie $h\nu$ sert à rompre la liaison de l'électron avec son atome : c'est l'**énergie de liaison E_L** . L'énergie restante est transférée à l'électron sous forme d'énergie cinétique E_C (Figure 83). En mesurant E_C , il est possible de déterminer E_L grâce à la relation suivante :

$$\text{Équation 4} \quad h\nu = E_L + E_C + \phi$$

où $h\nu$: énergie des rayons X incidents (h : constante de Planck et ν : fréquence de la radiation) ;

E_L : énergie de liaison de l'électron dans l'atome (définie par rapport au niveau de Fermi dans le cas des solides) ;

E_C : énergie cinétique de l'électron à la sortie de l'échantillon ;

ϕ : travail de sortie du spectromètre (énergie nécessaire pour amener un électron du niveau de Fermi au niveau du vide).

Par conséquent, cette technique nécessite de se placer sous des conditions d'ultravide (pression résiduelles de l'ordre de 10^{-10} mbar).

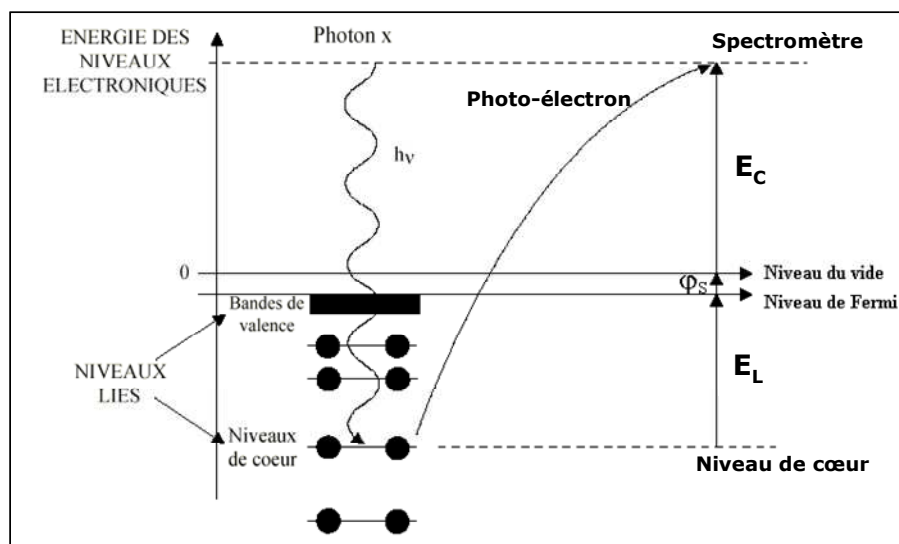


Figure 83. Schéma de principe de la photo-émission.

On obtient ainsi un **spectre XPS** représentant le nombre d'électrons détectés en fonction de l'énergie de liaison. E_L est caractéristique d'un **niveau de cœur donné** (couche électronique : 1s,

2s, 2p, 3s, etc.) **pour un atome donné**. Tous les atomes possédant des niveaux de cœur (sauf H et He) sont donc détectables par XPS.

Le nombre d'électrons détectés par le spectromètre (intensité du pic) est lié à la quantité d'atomes irradiés dans l'échantillon. Pour étudier le spectre XPS, il est nécessaire de le **décomposer en une série de pics élémentaires**, caractéristiques des états chimiques. Cette décomposition nécessite de déterminer ou de choisir différents paramètres, comme la position du pic, sa forme, son intensité, la largeur à mi-hauteur ou encore la fonction d'asymétrie. Ensuite, le signal XPS doit être corrigé en divisant l'intensité des pics par un facteur de sensibilité relatif, puis normalisé par rapport à l'ensemble des atomes détectés (sauf H et He). La surface des pics élémentaires permet d'obtenir les **pourcentages et ratios atomiques** et, par suite, la « formule chimique empirique » du matériau, lorsqu'il est peu contaminé en surface.

Cette méthode d'analyse renseigne également sur l'**état chimique** des éléments émetteurs de photo-électrons. En effet, lorsque l'atome participe à une liaison, il échange ses électrons de valence, ce qui perturbe les niveaux d'énergie des électrons de cœur. Cet effet se traduit par un **déplacement des positions des pics** des atomes engagés dans la liaison, permettant ainsi de déterminer le type de la liaison. Pour un élément donné, l'énergie de liaison d'un électron de cœur augmente avec le **degré d'oxydation** de l'atome, notamment dans le cas des métaux.

Annexe 2 – Principe de l'analyseur à temps de vol (ToF)

L'analyseur à temps de vol mesure le temps que met un ion secondaire, soumis à une tension d'accélération préalable, à parcourir une distance donnée. En effet, l'énergie cinétique de l'ion est

$E_c = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = \frac{1}{2} \cdot m \cdot \frac{l^2}{t^2}$ (m étant la masse de l'ion, v sa vitesse, l la distance parcourue pendant le vol et t le temps de vol).

Par ailleurs, un ion de charge z, soumis à une tension accélératrice V, gagne une énergie cinétique $E_c = z \cdot e \cdot V$ (e étant la charge élémentaire).

Ainsi, on déduit que $\frac{m}{z} = 2 \cdot e \cdot V \cdot \frac{t^2}{l^2}$. Donc, le rapport m/z est directement mesurable à partir du temps de vol. La séparation des ions secondaires dépend uniquement de la vitesse acquise sous l'effet de la tension d'accélération. Les ions de rapport m/z le plus petit parviendront au détecteur les premiers.

Annexe 3 – Formation du rayonnement Synchrotron dans l'accélérateur d'électrons SOLEIL (Gif-sur-Yvette)

Le rayonnement Synchrotron (Figure 84) est un rayonnement électromagnétique émis par des électrons accélérés à haute énergie et décrivant un mouvement circulaire. En effet, l'accélération occasionnée par la courbure de la trajectoire des électrons génère une émission d'énergie sous forme de photons (émission tangentielle à la trajectoire des électrons). Un paquet d'électrons est d'abord accéléré dans un accélérateur linéaire ① jusqu'à une vitesse proche de celle de la lumière. Puis ce faisceau d'électrons entre dans un accélérateur circulaire, appelé anneau d'accélération ②, qui permet d'augmenter l'énergie des électrons (jusqu'à 2,75 GeV). Enfin, les électrons sont injectés dans l'anneau de stockage ③ où ils vont effectuer plusieurs centaines de milliers de tours par seconde. L'ensemble du circuit est maintenu sous vide (10^{-8} Pa) pour éviter les collisions entre électrons et molécules d'air. Des aimants de courbure ④ et différents éléments magnétiques de guidage et de focalisation ⑤ et ⑥ permettent de dévier le faisceau d'électrons. Le rayonnement Synchrotron est collecté à différents endroits de l'anneau, appelés les lignes de lumière ⑦. Des dispositifs optiques (lentilles, miroirs, prismes) permettent de sélectionner la gamme de longueurs d'onde correspondant à l'infrarouge (2,5 à 25 μm). Le faisceau incident est alors focalisé sur l'échantillon et l'analyse est réalisée.

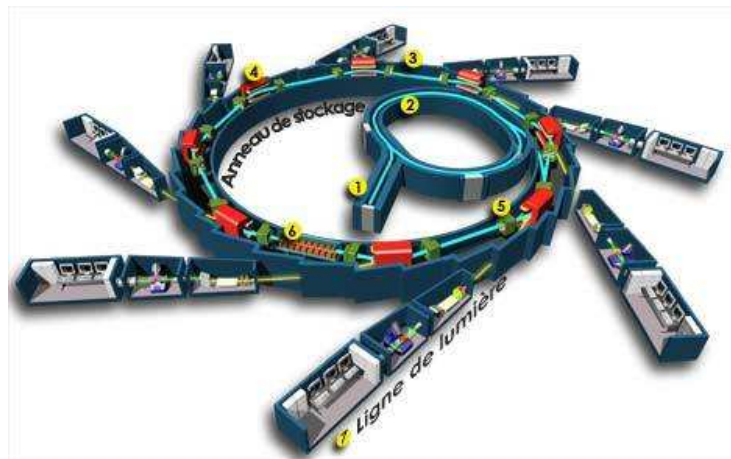


Figure 84. Schéma de principe de l'accélérateur d'électrons Synchrotron SOLEIL.

Evaluation of anti-adhesive and biocide properties of nanocomposite films with silver inclusions, deposited on stainless steel by a plasma process

ABSTRACT:

In the biomedical domain and the food industry, microbial adhesion to surfaces generates multiple negative consequences, in terms of human health, hygiene and safety of processed food. In this context, our approach is based on developing a 316L stainless steel surface treatment, to prevent microbial colonization. The surface modifications, mediated by chemical or physical treatment, did not promote *Saccharomyces cerevisiae* detachment, evaluated *in vitro* using a shear stress flow chamber. The interactions between the microbial surface and metallic elements of the passive film were hypothesized to play a predominant role in this strong adhesion. An original and dual strategy, based on a plasma process associating hexamethyldisiloxane polymerization and silver target bombardment in an asymmetrical radiofrequency discharge, was carried out and optimized. Stainless steel surfaces were thus coated with nanocomposite thin films (~ 175 nm), composed of an organosilicon matrix, exhibiting anti-adhesive properties towards *S. cerevisiae*, in which were embedded silver nanoparticles, displaying a high antimicrobial reactivity. A large set of complementary analytical techniques, operating at different scales, was used to correlate nanocomposite film characteristics with their anti-adhesive and antimicrobial efficiency. A total inhibition of yeast cell adhesion was achieved, by increasing the matrix polar character, through oxygen addition during the plasma process. In parallel, a 1.9 log reduction in viable counts was achieved for sessile yeast cells. Further experiments were dedicated to the thorough understanding of cellular changes induced by silver release. A deterioration of the secondary structure of proteins (cell wall, intracellular), combined with ultra-structure alterations, was observed. In addition, the biocide activity of the nanocomposite film was confirmed against two prokaryotic models (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*). The necessity of a direct contact between microorganisms and coating was demonstrated for a maximal antimicrobial efficiency. Lastly, the durability of the coating properties was assessed through a repeated use of the nanocomposite films. A decrease in the antifungal activity, coupled to an anti-adhesive property enhancement, was noticed and explained by the silver release during the first use.

KEY WORDS:

Surface hygiene, Stainless steel, microbial adhesion, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Surface treatment, Anti-adhesive and biocide properties, Radiofrequency plasma process, Physico-chemical characterization

AUTEUR : Claire SAULOU

TITRE : Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma

DIRECTEUR DE THESE : Muriel Mercier-Bonin

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : INSA de Toulouse, le 9 Décembre 2009

RESUME :

Dans le secteur biomédical et l'industrie agro-alimentaire, l'adhésion de microorganismes contaminants aux surfaces engendre de multiples impacts négatifs, à la fois en termes de santé publique, d'hygiène et de sécurité alimentaire. Dans ce contexte, l'objectif de l'étude est de mettre au point un traitement de surface de l'acier inoxydable 316L, afin de prévenir la colonisation microbienne. La modification des surfaces d'acier par traitement chimique ou physique n'a eu aucune incidence sur le détachement de *Saccharomyces cerevisiae*, évalué *in vitro* à l'aide d'une chambre à écoulement cisaillé. Les interactions entre la surface microbienne et les éléments métalliques du film passif semblent jouer un rôle prépondérant dans cette forte adhésion. Une stratégie originale, basée sur un procédé plasma couplant la polymérisation d'hexaméthylsiloxane au bombardement d'une cible d'argent dans une décharge asymétrique radiofréquence, a ensuite été mise en œuvre et optimisée. Les surfaces d'acier ont ainsi été recouvertes de films minces (~ 175 nm) nanocomposites, constitués d'une matrice organosiliciée, présentant des propriétés anti-adhésives vis-à-vis de *S. cerevisiae*, dans laquelle ont été induites des nanoparticules d'argent, dotées d'une forte réactivité antimicrobienne. Le couplage de techniques d'analyse complémentaires, opérant à différentes échelles, a permis de corrélérer les caractéristiques des films nanocomposites à leur efficacité anti-adhésive et antifongique. Une inhibition totale de l'adhésion des levures a ainsi été obtenue, en augmentant le caractère polaire de la matrice, par ajout d'oxygène dans le plasma. En parallèle, un abattement de la viabilité de 1,9 log a été atteint sur les levures sessiles. La suite de l'étude a été dédiée à la compréhension des mécanismes d'action de l'argent, impliqués dans l'activité antifongique des films nanocomposites. Une inactivation de certaines protéines pariétales et intracellulaires, corrélée à des altérations de l'ultra-structure cellulaire, a ainsi été mise en évidence. La confirmation de l'activité biocide des films nanocomposites, sur deux modèles procaryotes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*), a révélé par ailleurs la nécessité d'un contact étroit entre microorganismes et revêtement. Enfin, la stabilité des propriétés des films nanocomposites a été évaluée. Une utilisation répétée des dépôts a mis en évidence une réduction de l'activité antifongique, corrélée à une augmentation de l'efficacité anti-adhésive, liée au relargage d'argent lors de la première utilisation.

MOTS CLES :

Hygiène des surfaces, Acier inoxydable, Adhésion microbienne, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Traitement de surface, Propriétés anti-adhésives et biocides, Procédé plasma radiofréquence, Caractérisation physico-chimique

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Ingénieries Microbienne et Enzymatique

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

UMR5504 CNRS/INSA, UMR792 INRA/INSA

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4

Collaboration avec le Laboratoire Plasma et Conversion d'Énergie (LAPLACE)

UMR 5213 CNRS/UPS

Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9