

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Effet des chaînes de poly(4-vinylpyridinium) sur l'adhésion de
bactéries pathogènes aux surfaces

par

Roxane Racicot Guérard

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Avril, 2008



© Roxane Racicot Guérard, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effet des chaînes de poly(4-vinylpyridinium) sur l'adhésion de
bactéries pathogènes aux surfaces

présenté par :

Roxane Racicot Guérard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Ann Letellier, présidente-rapporteuse

Serge Messier, directeur de recherche

Louise Deschênes, co-directrice

Akier Assanta Maf, co-directeur

Maryam Tabrizian, membre du jury

RÉSUMÉ

L'adhésion des microorganismes aux surfaces constitue la première étape de la formation d'un biofilm. Cette accumulation de bactéries en microcolonies sur des surfaces est une source potentielle de contamination au niveau médical et agroalimentaire. Une excellente compréhension des facteurs influençant cette adhésion initiale s'avère donc essentielle. Cette étude a pour but d'évaluer l'effet de différentes modifications de surface sur la bioadhésion de protéines et de deux bactéries pathogènes : *Escherichia coli* O157:H7 et *Listeria monocytogenes*. Les surfaces étudiées ont été obtenues par transfert Langmuir-Blodgett (LB) de copolymères blocs à base de polystyrène (PS) et de poly(4-vinylpyridine) neutre (P4VP) ou quaternisé (P4VPQ) de formulations générales PS_m-P4VP_n et PS_m-P4VPQ_n respectivement. Différentes tailles de blocs ont été utilisées afin de déterminer l'impact du rapport PS/P4VP(Q) sur les auto-assemblages moléculaires et les films LB résultants. L'évaluation de la bioadhésion a été réalisée (1) par la méthode de Pierce dans le cas des protéines et (2) par comptes viables ainsi que par la quantification de la force de détachement des microorganismes à l'aide du microscope à force atomique (AFM) dans le cas des bactéries. Nous avons pu démontrer que le fait d'avoir peu de cellules adhérentes sur les surfaces n'était pas nécessairement relié à une plus faible force d'adhésion. Ainsi, peu d'*Escherichia coli* ont adhéré sur les surfaces malgré une force d'adhésion beaucoup plus grande que pour *Listeria monocytogenes*. Les chaînes pyridinium (P4VPQ) semblaient favoriser l'adhésion microbienne tant au niveau de la quantité qu'à la force d'adhésion. Cependant, aucune modification de surface n'a permis d'être plus résistante à l'adhésion que la surface non modifiée.

Mots-clés : Biofilm, Langmuir-Blodgett, polyélectrolytes, polymère, angle de contact, bioadhésion, modification de surface, micelles

ABSTRACT

The adhesion of microorganisms on surfaces is the first step of the biofilm formation. This accumulation of bacteria in microcolonies on surfaces is a potential source of medical and food contamination. A good comprehension of factors influencing cell initial attachment is consequently essential. The aim of this study was to evaluate the effect of different surfaces modifications on the bioadhesion of proteins and two bacteria: *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. The surfaces were obtained by Langmuir-Blodgett transfer of blocks copolymers composed of polystyrene (PS) and uncharged or quaternized poly(4-vinylpyridine) (P4VP and P4VPQ) represented by this general formulations PS_m -P4VP $_n$ and PS_m -P4VPQ $_n$. Different blocks sizes were used in order to investigate the effect of the PS/P4VP(Q) monomer ratio on the molecular self-assembly and the resulting LB films. The bioadhesion was quantified by (1) the Pierce method for the proteins and (2) viable counts for bacteria. Detachment force of microorganisms on surfaces was obtained using atomic force microscopy (AFM). Results showed that a small quantity of bacteria on surface was not necessary related to a weak adhesion force. Just a few *Escherichia coli* were adhered on the surfaces, despite a much stronger adhesion force than that of *Listeria monocytogenes*. The pyridinium chains (P4VPQ) seemed to promote microbial adhesion in term of quantity and attachment force. However, none of the surface modification was more resistant to bacterial adhesion than the unmodified surface. Most of them increase it, and the effect appears to depend more on the PS/P4VP(Q) ratio and surface concentration than on the chain length itself.

Keywords : Biofilm, Langmuir-Blodgett, polyelectrolyte, polymer, contact angle, bioadhesion, surface modification, micelles

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
REMERCIEMENTS	xvi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I (Recension de la littérature)	4
1.1 Quelques pathogènes alimentaires d'importance	4
1.1.1 <i>Escherichia coli</i> O157 :H7.....	5
1.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	6
1.2 Les biofilms.....	8
1.2.1 Composition d'un biofilm	8
1.2.2 Formation d'un biofilm	9
1.2.3 Impacts des biofilms.....	12
1.3 Facteurs influençant l'adhésion des microorganismes aux surfaces	13
1.3.1 Propriétés de la surface du substrat	13
1.3.2 Propriétés de la surface cellulaire.....	14
1.3.3 Propriétés du milieu de croissance	15
1.3.4 Phase de croissance des bactéries et temps de contact.....	16
1.3.5 Les forces d'interaction entre la surface et la bactérie	16
1.4 La modification de surface par la technique Langmuir-Blodgett	17
1.4.1 Les copolymères.....	17
1.4.2 Les polyélectrolytes.....	18
1.4.3 Technique Langmuir-Blodgett	18
1.4.4 Isotherme Π -A.....	21
1.4.5 Dépôt de la monocouche sur un substrat solide	22

1.4.6 Les micelles.....	24
1.5 Caractérisation des surfaces modifiées	26
1.5.1 Mesures d'angles de contact (CAM).....	26
1.5.2 La microscopie électronique à balayage (MEB).....	28
1.5.3 La microscopie à force atomique (AFM).....	30
1.5.4 Adsorption protéique et adhésion microbienne.....	34
HYPOTHÈSE ET OBJECTIF.....	35
CHAPITRE II (Méthodologie).....	36
2.1 Modifications de surface par la technique Langmuir-Blodgett.....	36
2.1.1 Préparation des solutions de copolymères	36
2.1.2 Préparation des surfaces.....	40
2.1.3 Les isothermes.....	41
2.1.4 Dépôt du film LB	42
2.2 Caractérisation des propriétés physico-chimiques des surfaces polymères.....	43
2.2.1 Mesures d'angles de contact sur les surfaces modifiées	43
2.2.2 Observation de la topographie des surfaces modifiées par AFM.....	44
2.3 Adsorption protéique sur les surfaces modifiées.....	45
2.3.1 Quantification de l'adsorption de BSA par la méthode Pierce BCA	45
2.3.2 Quantification de l'adsorption des protéines du milieu de culture TSB par la méthode Pierce BCA.....	46
2.4 Adhésion microbienne sur les surfaces modifiées	47
2.4.1 Souches bactériennes et milieux de culture.....	47
2.4.2 Contamination des surfaces modifiées.....	48
2.4.3 Quantification de l'adhésion microbienne	49
2.4.4 Analyses statistiques	49
2.4.5 Mesure des forces d'adhésion entre les microorganismes et les surfaces par AFM	50
2.5 Imagerie des surfaces et des bactéries.....	52
2.5.1 Microscopie électronique à balayage (MEB).....	52
2.5.2 Microscopie à force atomique (AFM).....	52

CHAPITRE III (Résultats)	53
3.1 Modification de surface par la technique Langmuir-Blodgett	53
3.1.1 Les isothermes.....	53
3.1.2 Les transferts	59
3.1.3 Les angles de contact des surfaces modifiées	62
3.1.4 Images AFM des surfaces modifiées	64
3.2 Adsorption protéique sur des surfaces modifiées.....	68
3.2.1 Quantification de l'adsorption de la protéine BSA	68
3.2.2 Quantification de l'adsorption des protéines du milieu de culture TSB	70
3.3 Adhésion microbienne sur des surfaces modifiées	72
3.3.1 Quantification de l'adhésion d' <i>Escherichia coli</i> et de <i>Listeria monocytogenes</i>	72
3.3.2 Mesures des forces d'adhésion surface-microorganismes par AFM	80
 CHAPITRE IV (Discussion)	 84
4.1 Organisation moléculaire	84
4.1.1 Arrangement des micelles	84
4.1.2 Transfert de la monocouche et angles de contact.....	91
4.2 Adsorption protéique sur des surfaces modifiées.....	94
4.2.1 Effet de modification de surface sur l'adsorption de la protéine BSA.....	94
4.2.2 Effet de modification de surface sur l'adsorption des protéines de TSB	96
4.3 Adhésion microbienne sur des surfaces modifiées	98
4.3.1 Effet de modification de surface sur l'adhésion d' <i>Escherichia coli</i> et de <i>Listeria monocytogenes</i>	98
4.3.2 Effet de modification de surface sur les forces d'adhésion surface- microorganismes	101
 CONCLUSION	 105
BIBLIOGRAPHIE	110
 ANNEXE I	 xviii
ANNEXE II	xxi

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I : Caractéristiques des différents copolymères blocs PS _m -P4VP _n utilisés.....	39
Tableau II : Caractéristiques de tension de surface des liquides utilisés pour les mesures d'angle de contact.....	43
Tableau III : Caractéristiques des isothermes Π-A (A_0 , A_{lim} , $A_{0\ P4VP}$) de l'homopolymère et des différents copolymères étudiés.....	55
Tableau IV : Pressions de surface sélectionnées pour les transferts de films LB de différents copolymères.....	58
Tableau V : Taux de transfert pour les différentes modifications de surface.....	60
Tableau VI : Résultats significatifs des analyses statistiques de la concentration de <i>E. coli</i> et de <i>L. monocytogenes</i> sur les surfaces modifiées.....	77
Tableau VII : Force d'adhésion par unité d'aire (nN/μm ²) de <i>E. coli</i> et de <i>L. monocytogenes</i> adhérees sur différentes surfaces.....	81
Tableau VIII : Ratio de déformation (k) du bloc PS pour chacun des copolymères.....	85

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Agents pathogènes impliqués dans les cas de toxi-infections alimentaires entre le 1 ^{er} avril 2006 et le 31 mars 2007, Québec (Ramsay et Trottier, 2007).....	5
Figure 2 : Représentation schématique du potentiel énergétique entre une particule et une surface (Schowalter et Eldsath, 2001).....	10
Figure 3 : Représentation schématique des étapes de formation d'un biofilm microbien (Ghigo, 2002).....	11
Figure 4 : Représentation schématique de différents types de polymères : copolymère tribloc de type A-B-A (A); polyélectrolyte (B) (Netz et Andelman, 2003).....	17
Figure 5 : Représentation schématique de la technique Langmuir-Blodgett : phase préliminaire (A); compression de la monocouche (B) (Hubin, 2003).....	19
Figure 6 : Schéma de la plaque de Wilhelmy à l'interface air-eau (Encyclopédie Wikipédia, 2007).....	20
Figure 7 : Isotherme Π -A (Deschênes, 2006).....	21
Figure 8 : Déposition d'une monocouche sur un substrat hydrophobe par la technique Langmuir-Blodgett (Deschênes, 2006).....	23
Figure 9 : Représentation schématique des deux types de micelles : 'starlike' (A); 'crew-cut' (B).....	24

Figure 10 :	Processus de micellisation du copolymère PS-P4VP à l'interface air-eau selon le modèle micelle-fleur (Deschênes <i>et al.</i> , 2008).....	25
Figure 11 :	Goniomètre électronique modèle FTA200 (Firt Ten Ångstroms, 2008).....	26
Figure 12 :	Mouillabilité d'une surface par une goutte d'un liquide (KSV Instruments, 2008).....	27
Figure 13 :	Angle de contact (θ_c) formé par une goutte d'un liquide sur un solide dans une atmosphère de vapeur (KSV Instruments, 2008).....	27
Figure 14 :	Schéma des éléments composant un microscope électronique à balayage (SCÉRÉN – CNDP, 2006).....	29
Figure 15 :	Schéma des éléments composant un microscope à force atomique (Encyclopédie Wikipédia, 2008).....	30
Figure 16 :	Schématisation des deux principaux modes d'imagerie en AFM : mode contact (A); mode 'tapping' (B) (Wang, 1997).....	32
Figure 17 :	Détachement d'une cellule bactérienne par l'augmentation de la force du microlevier d'un AFM (Sénéchal <i>et al.</i> , 2004).....	33
Figure 18 :	Structure chimique du copolymère poly(styrène- <i>b</i> -4-vinylpyridine).....	36
Figure 19 :	Structure chimique du copolymère poly(styrène- <i>b</i> -iodure de méthyle-N-4-vinylpyridinium).....	37
Figure 20 :	Spectre IRTF du copolymère PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁ quaternisé à 97,4 %.....	38
Figure 21 :	Organisation chimique d'une surface de mica silanisée.....	40

Figure 22 :	Bain Langmuir-Blodgett KSV 2000.....	41
Figure 23 :	Illustration d'un bioréacteur utilisé lors des tests d'adhésion microbienne.....	48
Figure 24 :	Isothermes Π -A de l'homopolymère P4VP ₁₇₂ et des copolymères PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁ , PS ₃₉₉ -P4VP ₁₆₆ et PS ₃₂ -P4VP ₁₇₈ à 25°C.....	53
Figure 25 :	Isotherme Π - Γ de l'homopolymère et des copolymères non quaternisés.....	54
Figure 26 :	Isothermes Π -A des copolymères PS ₁₉₂ -P4VPQ ₁₈₁ et PS ₃₉₉ -P4VPQ ₁₆₆ à 25°C.....	56
Figure 27 :	Isotherme Π - Γ des copolymères quaternisés.....	56
Figure 28 :	Effet de la pression de surface sur le taux de transfert pour différents copolymères.....	61
Figure 29 :	Effet de la pression de transfert sur les mesures d'angle de contact avec l'eau pour différents copolymères.....	62
Figure 30 :	Images AFM (5 μ m x 5 μ m) d'une surface non silanisée (A) et silanisée (B).....	64
Figure 31 :	Images AFM des surfaces modifiées avec les copolymères PS ₃₉₉ -P4VP ₁₆₆ (A à C) et PS ₃₂ -P4VP ₁₇₈ (D) à différentes pressions de transfert : 2,0 mN/m (A et B); 8,8 mN/m (C); 2,5 mN/m (D).....	65
Figure 32 :	Images AFM des surfaces modifiées avec PS ₃₉₉ -P4VPQ ₁₆₆ à différentes pressions de transfert : 1,2 mN/m (A); 7,0 mN/m (B).....	67

Figure 33 :	Effet de la modification de surface sur l'adsorption de BSA.....	68
Figure 34 :	Comparaison entre l'adsorption protéique de BSA et celle des protéines de TSB pour différentes surfaces modifiées.....	70
Figure 35 :	Effet des modifications de surface sur l'adhésion d' <i>Escherichia coli</i>	72
Figure 36 :	Courbes de tendance de l'adhésion d' <i>Escherichia coli</i> en fonction de l'adsorption protéique de BSA.....	73
Figure 37 :	Effet des modifications de surface sur l'adhésion de <i>Listeria monocytogenes</i>	75
Figure 38 :	Courbes de tendance de l'adhésion de <i>Listeria monocytogenes</i> en fonction de l'adsorption protéique de BSA.....	75
Figure 39 :	Attachement de <i>L. monocytogenes</i> sur une surface modifiée avec PS ₃₂ -P4VP ₁₇₈ à 6,0 mN/m (A) et de <i>E. coli</i> sur une surface modifiée avec PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁ à 6,3 mN/m (B à D).....	78
Figure 40 :	Attachement de <i>E. coli</i> (A) et de <i>L. monocytogenes</i> (B) sur des surfaces modifiées avec PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁ à 12,0 mN/m.....	79
Figure 41 :	Courbe de calibration de la force de la pointe sur une surface modifiée en fonction de son point de déflexion	80
Figure 42 :	Détachement d'une cellule de <i>L. monocytogenes</i> sur une surface modifiée avec PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁ à 12,0 mN/m.....	82
Figure 43 :	Images AFM de surfaces non modifiée (A) et modifiée (B) après le détachement d'une cellule de <i>Listeria monocytogenes</i>	83

- Figure 44 :** Schématisation de l'organisation des micelles 'starlike' des copolymères PS₃₂-P4VP₁₇₈ (A) et PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ (B).....86
- Figure 45 :** Organisation des chaînes à l'interface lors du dépôt des solutions de PS-P4VP (A) et PS-P4VPQ (B).....88
- Figure 46 :** Adsorption de la protéine BSA pour les copolymères PS₃₂-PEO₁₇₈ (A) et PS₃₉₉-PEO₁₆₆ (B) à faible et forte densité de recouvrement.....94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å	Angström
A_0	Aire moléculaire de commencement ($\text{Å}^2/\text{molécule}$)
AFM	Microscopie à force atomique
AHLs	N-acylated homoserine lactones
A_{lim}	Aire moléculaire limite ($\text{Å}^2/\text{molécule}$)
A_{PS}	Aire moléculaire du bloc PS non déformé ($\text{Å}^2/\text{molécule}$)
BCA	Acide bicinchoninique
BHI	Coeur-cervelle BIO MERIEUX
BSA	Albumine de sérum bovin
CAM	Mesure d'angles de contact
D	Diamètre des domaines
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
EPS	Exopolysaccharides
G_A	Interactions de Van der Waals
G_E	Interactions électrostatiques
G_{TOT}	Énergie de Gibbs
H	Hauteur des domaines
IR	Infrarouge
IRTF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
K	Constant de force (N/m)
k	Ratio de déformation du bloc PS
KGy	Kilogray
KV	Kilovoltage
LB	Langmuir-Blodgett
LPS	Lipopolysaccharides
\overline{M}_n	Masse moléculaire moyenne en nombre (g/mol)
MAPAQ	Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation du Québec

MEB	Microscopie électronique à balayage
mM	Millimolaire
mN/m	MilliNewton/mètre
M.S.	Mica silanisé
MW	Poids moléculaire (g/mol)
MΩ·cm	Mégohm·centimètre
N	Nombre de monomères
nN	NanoNewton
OTS	Octadecyltrichlorosilane
P4VP	Poly(4-vinylpyridine)
PAA	Poly(acrylamide)
PEO	Oxyde de polyéthylène
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PPO	Oxyde de polypropylène
PS	Polystyrène
PS-PEO	Poly(styrène-oxyde d'éthylène)
PS _m - <i>b</i> -P4VP _n	Poly(styrène- <i>b</i> -4-vinylpyridine)
PS _m - <i>b</i> -P4VPQ _n	Poly(styrène- <i>b</i> -iodure de méthyle-N-4-vinylpyridinium)
PSS	Poly(styrène sulfonate)
R	Chaînes alkyles
Rpm	Tour par minute
TIA	Toxi-infections alimentaires
TSA	Agar de tryptone de soya
TSB	Bouillon de tryptone de soya
UFC	Unité formant une colonie
χ	Coefficient d'interaction
Π	Pression de surface (mN/m)

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur, Dr. Serge Messier, pour m'avoir permis d'effectuer le présent travail de recherche ainsi que pour ses conseils académiques et ses expertises microbiologiques. Je voudrais aussi remercier profondément ma co-directrice, Dr. Louise Deschênes, du Centre de Recherche et de développement sur les Aliments de St-Hyacinthe (CRDA) de m'avoir encadrée tout au long de mon projet de maîtrise. Autant pour ses conseils scientifiques que pour ses encouragements, elle a su démontrer une sincère volonté de me transmettre sa passion pour la recherche. En plus de m'aider au niveau des expériences en laboratoire, elle m'a énormément appuyée lors de la rédaction de mon mémoire en apportant ses idées et ses expériences d'écriture. Elle m'a aussi soutenue financièrement durant deux années me permettant de subvenir à mes besoins tout en me faisant prendre conscience que ce projet contribuait à l'avancement des connaissances scientifiques. Je suis très reconnaissante à l'égard de mon second co-directeur, Dr. Maf Akier Assanta, d'Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) de m'avoir permis d'effectuer mes expérimentations microbiologiques dans son laboratoire et pour ses nombreux conseils et encouragements. De plus, je tiens à remercier la présidente du jury, Dr. Ann Letellier ainsi que le membre externe, Dr. Maryam Tabrizian d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail de maîtrise tout en me donnant divers conseils et commentaires.

J'adresse également mes remerciements à M. François St-Germain, M. Claude Danis et Mme Marie-Josée Lemay pour leur aide technique, leurs conseils scientifiques, mais surtout pour leurs perpétuelles petites pensées positives qui m'ont aidé à me rendre jusqu'au bout. Ces personnes m'ont accueillie au sein de leur équipe avec une grande ouverture d'esprit expliquant l'ambiance conviviale retrouvée tout au long de ces deux années de travail. Je garde d'excellents souvenirs de ces personnes et je crois sincèrement que sans leur présence, tout aurait été différent.

Je remercie également Mme Lucie Marcotte et Mme Diane Montpetit pour leur aide professionnelle quant aux analyses d'AFM et de MEB. Elles m'ont aussi soutenue moralement dans les moments les plus difficiles et m'ont apporté d'importantes expertises scientifiques. Je suis très reconnaissante de l'aide de M. Claude Laberge lors des analyses statistiques des données de mes expériences.

Je n'oublie pas la Fondation des Gouverneurs pour la bourse qui m'a été remise en 2006 ainsi que tout le personnel du CRDA qui m'a aidée de près ou de loin dans mon projet de maîtrise.

Finalement, j'ai une pensée toute spéciale pour ma famille ainsi que mon copain qui ont su m'encourager, me reconforter dans les moments les plus durs et qui ont cru en moi malgré toutes les difficultés rencontrées. Sans eux, j'aurais sûrement déclaré forfait à la recherche scientifique. Un gros merci!

INTRODUCTION

Plusieurs bactéries pathogènes sont responsables des toxi-infections alimentaires (TIA) notamment *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter* spp. et *Salmonella* spp. (CDC, 2007). Selon Santé Canada, il y aurait environ 11 à 13 millions de cas de toxi-infections alimentaires chaque année au Canada, mais seulement 3% d'entre elles seraient déclarées (Ramsay et Trottier, 2007). *Listeria monocytogenes*, quoique peu souvent impliquée dans les TIA, cause proportionnellement beaucoup de cas d'hospitalisation et le taux de mortalité des personnes infectées est très important (25% - 30%) (CDC, 2007). De son côté, *Escherichia coli* possède une prévalence plus élevée, mais un taux de létalité plus bas. La consommation d'aliments contaminés constitue la principale source de transmission de ces bactéries pathogènes. Lors du processus de transformation et de préparation des aliments, ceux-ci sont constamment en contact avec une multitude de surfaces de nature diverse (acier inoxydable, polystyrène, verre) sur lesquelles des microorganismes peuvent adhérer.

Depuis quelques années, l'adhésion microbienne sur des surfaces se révèle être un problème qui peut être lourd de conséquences. Que ce soit au niveau médical (prothèses, cathéters), alimentaire (surfaces, ustensiles) ou dans les conduites d'eau potable, la formation de biofilms bactériens, définie comme étant une agglomération de bactéries en microcolonies sur des surfaces, devient de plus en plus inquiétante. Ceux-ci seraient responsables de 65% à 80% des infections humaines (Trudel et Barbeau, 2005). En plus de les protéger contre divers agents bactéricides, ce mode de vie sessile permet aux microorganismes de coloniser de nouvelles zones contribuant à propager la contamination.

L'étape cruciale dans la formation d'un biofilm est l'adhésion initiale des bactéries. Elle est influencée par de nombreux paramètres : les propriétés physico-chimiques du support solide et celles de la surface des microorganismes (charge,

hydrophobicité, molécules de surfaces) sont les principaux facteurs qui affectent l'adhésion initiale (Bellon-Fontaine et Cerf, 1991). La phase de croissance microbienne et les conditions environnementales (température, pH, film de conditionnement) ont aussi un rôle à jouer au niveau de cette étape d'attachement cellulaire (Bridgett *et al.*, 1992).

La modification de surfaces à l'aide de polymères dans le but de réduire l'adhésion des bactéries est utilisée depuis une vingtaine d'années. Plusieurs types de polymères ont été étudiés dont l'oxyde de polypropylène (PPO) (Takei *et al.*, 1994), l'oxyde de polyéthylène (PEO) (Ista *et al.*, 1996, Kaper *et al.*, 2002) et le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) (Downer *et al.*, 2003). Le polymère ayant montré des capacités anti-biofilm les plus intéressantes est le PEO (Roosjen *et al.*, 2003). Plusieurs groupes se sont aussi intéressés au greffage de chaînes polymères comportant des groupements antimicrobiens reconnus tels les sulfonates (Berlot *et al.*, 2002), les ammoniums quaternaires et autres (Berrang *et al.*, 2008; Tiller *et al.*, 2001). Cependant, les résultats ne sont pas toujours concluants et certaines méthodes conduisent à la production d'enduits réticulés pour lesquels la bioadhésion est augmentée (Deschênes, 2006, projet industriel). Ces résultats ont soulevé l'hypothèse que la longueur de la chaîne sur laquelle se trouvent les groupements antibactériens, pourrait affecter leur capacité à contrer la bioadhésion. D'autre part, le manque d'information sur la structure moléculaire de ces enduits rend difficile la compréhension des facteurs influençant la bioadhésion et la capacité des chaînes greffées à jouer leur rôle d'agent bactéricide.

Ces considérations sont à la base de l'élaboration des objectifs du présent travail de recherche. Cette étude a donc été entreprise en vue de mieux comprendre l'impact de l'organisation de chaînes polymères portant des groupements antimicrobiens, sur l'adhésion de pathogènes alimentaires aux surfaces. L'approche choisie a été la fixation de chaînes copolymères composées de groupements pyridinium. Ces groupements sont déjà reconnus pour leur caractère antibactérien (Tiller *et al.*, 2001). Le mode de fixation des chaînes envisagé est la technique Langmuir-Blodgett. Cette méthode consiste à transférer des films moléculaires sur un support solide. Son grand avantage est la possibilité d'obtenir une monocouche de polymères parfaitement homogène de densité

connue et contrôlée, et, de ce fait, aider à mieux comprendre l'effet de différents paramètres sur les phénomènes d'interface. Les chaînes de pyridinium seront contrôlées et physisorbées via leur complexation covalente avec des chaînes de polystyrène. Ces systèmes de type copolymères blocs sont connus pour former des micelles de surface transférables sur des substrats solides (Zhu *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 2004). Les lacunes au niveau de l'effet d'une densité de recouvrement connue sur la bioadhésion donnant lieu à une compréhension plutôt abstraite de l'impact des modifications de surface sur l'attachement initial des bactéries, seront minimisées par une approche méthodologique incluant les éléments suivants :

- La déposition de copolymères blocs de type polystyrène-poly(4-vinylpyridine) (PS-P4VP) et polystyrène-poly(4-vinylpyridinium) (PS-P4VPQ) sur des substrats hydrophobes.
- La variation de la proportion de la longueur des blocs hydrophobes (PS) et hydrophiles (P4VP et P4VPQ).
- La variation des densités de recouvrement sur les substrats hydrophobes.
- Une analyse de l'organisation moléculaire de ces copolymères blocs à l'interface air-eau et sur les supports solides suite au transfert.
- La caractérisation des films obtenus par mesures d'angles de contact et microscopie à force atomique (AFM).
- L'évaluation de la capacité des films obtenus à contrer la bioadhésion de protéines (BSA) et de certains agents pathogènes (*Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes*).
- La quantification de la force d'adhésion des bactéries utilisées sur différentes surfaces modifiées à l'aide de l'AFM.

Cette approche a l'avantage de fournir des conditions aptes à l'évaluation de l'hypothèse de départ, soit que l'organisation moléculaire de chaînes portant des groupements antimicrobiens, peut affecter la capacité de ces derniers à contrer la bioadhésion.

CHAPITRE I

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1.1 Quelques pathogènes alimentaires d'importance

Les toxi-infections alimentaires (TIA) sont causées par plusieurs bactéries pathogènes comme par exemple *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. Entre le 1^{er} avril 2006 et le 31 mars 2007, 1 029 cas de toxi-infections alimentaires ont été répertoriés au Québec, affectant plus de 3 580 personnes (Ramsay et Trottier, 2007). Selon le Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), ces TIA sont principalement survenues suite à la consommation d'aliments contaminés dans les restaurants (47%) et au lieu de domicile (46%). Un des agents pathogènes le plus souvent signalé quant aux TIA est *Escherichia coli* O157:H7 (Ramsay et Trottier, 2007). Au total, une vingtaine de cas ont été déclarés entre 2006 et 2007 au Québec pour *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (**Figure 1**). Malgré la diminution de l'incidence des infections avec *Listeria* sp., ce microorganisme est largement étudié étant donné la gravité des conséquences d'une telle contamination particulièrement un taux de mortalité élevé (CDC, 2007). Sachant que les aliments peuvent être contaminés par des agents pathogènes, la contamination croisée lors de la manipulation des aliments est en grande partie responsable des TIA. Le nettoyage et les méthodes de désinfection ont aussi une importance cruciale pour réduire le risque de contamination humaine (Ramsay et Trottier, 2007).

Il est donc important d'étudier les microorganismes impliqués dans les TIA, plus précisément, leurs conditions de croissance, leur environnement ainsi que leurs mécanismes d'adhésion aux surfaces.

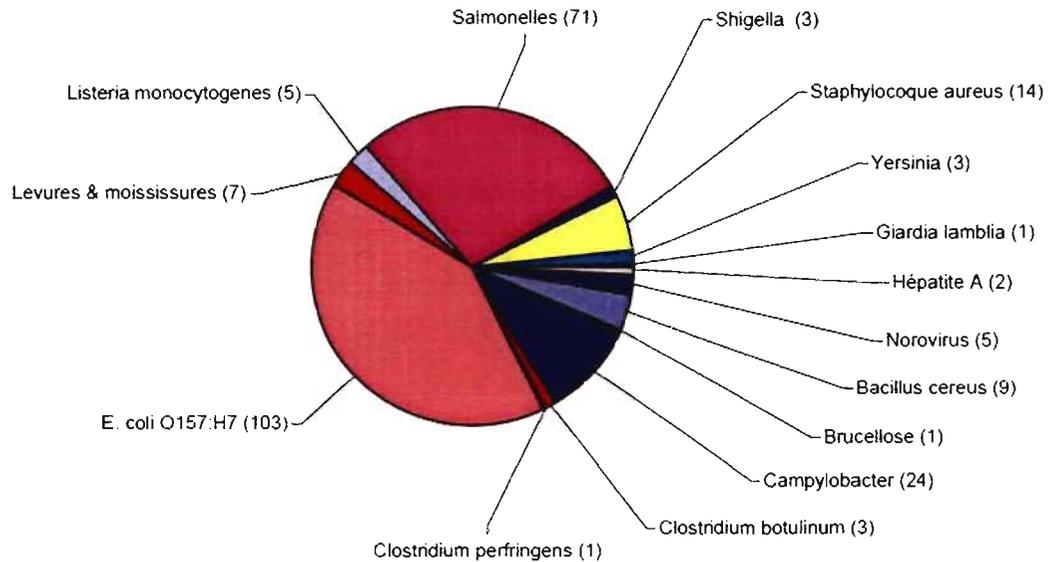


Figure 1 : Agents pathogènes impliqués dans les cas de toxi-infections alimentaires entre le 1^{er} avril 2006 et le 31 mars 2007, Québec (Ramsay et Trottier, 2007)

1.1.1 *Escherichia coli* O157 :H7

Escherichia coli O157 :H7 est un bacille à Gram négatif, mobile, aérobie facultatif, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Actuellement, les souches de *E. coli* responsables de diarrhées sont classées en cinq pathovars : les entérotoxigènes (ETEC), les entéroinvasives (EIEC), les entéropathogènes (EPEC), les entérohémorragiques (EHEC) et les entéroaggrégatives (EAggEC) (Le Bouguéneq, 1999). Découvert en 1982, le sérotype O157 :H7 de la famille des EHEC, est le plus incriminé dans les toxi-infections alimentaires avec une prévalence moyenne d'infection de 1,6/100 000 et un taux de létalité variant entre 3% à 5% (Parry et Palmer, 2000). La souche O157 :H7 se multiplie à des températures allant de 5°C à 50°C tout en possédant la capacité de survivre à la congélation. De plus, elle peut se développer dans des aliments acides ayant un pH entre 3,0 et 4,0.

Le réservoir de cet agent pathogène semble être le tube digestif des animaux domestiques, particulièrement les bovins. La transmission à l'être humain se fait principalement par la consommation d'aliments contaminés : viande hachée crue ou

insuffisamment cuite, produits laitiers non pasteurisés ou souillés par des bactéries fécales (Parry et Palmer, 2000). Plusieurs cas célèbres de TIA ont été répertoriés au cours des dernières années : des épinards contaminés par *E. coli* en 2007 au États-Unis, du bœuf haché souillé par *E. coli* en 2006 au Québec et l'eau contaminée à Walkerton en 2000. Au niveau industriel, l'environnement de travail, le matériel utilisé, les surfaces de travail ainsi que les conduites d'eau peuvent également être contaminés et contribuer à la dissémination de cette bactérie. En plus d'adhérer aux surfaces cellulaires, ce microorganisme colonise aussi des surfaces inertes peu importe leur composition : acier inoxydable, verre, polystyrène, cuivre (Tuttle *et al.*, 1999). Dépendamment des conditions environnementales et nutritionnelles, *E. coli* O157:H7 est susceptible de former des biofilms sur ces surfaces augmentant ainsi sa résistance aux désinfectants et aux autres agents antimicrobiens (Mafu *et al.*, 2002).

1.1.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est un petit bacille à Gram positif, mobile à 22°C, anaérobie facultatif, omniprésent (sol, eau, végétaux, aliments). Cette bactérie est intracellulaire facultative, signifiant qu'elle peut survivre et croître dans la plupart de cellules de l'hôte infecté. Cet agent pathogène provoque une maladie très grave nommée la listériose qui affecte surtout les personnes âgées, les femmes enceintes ainsi que les personnes immuno-supprimées. Chez ces personnes, l'infection peut se propager au cerveau (méningite), dans le sang (septicémie) et peut même provoquer des avortements spontanés. La prévalence moyenne d'infection de ce microorganisme est de 0,31/100 000, mais avec un taux de mortalité élevé de 25-30% (CDC, 2007). Une particularité importante de cette bactérie est sa capacité à croître à de basses températures (1°C - 4°C) lui permettant de résister à la réfrigération. D'autre part, *Listeria monocytogenes* peut se développer dans des aliments avec un pH de 4,5 et une teneur en sel entre 6% et 10% (INRA, 1998). Grâce à ses résistances physiologiques, on la retrouve plus fréquemment dans les produits laitiers, les légumes, les fruits, les charcuteries ainsi que les surfaces de travail lors de la préparation des aliments.

La transmission peut se faire directement entre la mère et le fœtus ou indirectement par la consommation de produits contaminés. Dans la majorité des cas, cette bactérie se retrouve au niveau des aliments lors de contacts avec des surfaces de travail, des machines et des instruments souillés (Schwarzkopf, 1996). La contamination peut donc survenir à tous les stades de la chaîne alimentaire, qu'il s'agisse de matières premières, de la transformation, de la distribution ou encore chez le consommateur. Un cas récent de TIA est survenu en 2002 au Québec où 17 personnes ont consommé du fromage au lait cru contaminé par cette bactérie (ASPC, 2003). Vers la fin des années 1990, il a été démontré que *Listeria monocytogenes* avait la capacité de former des biofilms sur différents types de surfaces (Hood et Zottola, 1997). Plus tard, plusieurs chercheurs se sont intéressés aux propriétés et aux conditions nécessaires à la formation de biofilms par ce microorganisme sur des surfaces inertes (Borucki *et al*, 2003 Lemon; *et al.*, 2007; Di Bonaventura *et al*, 2008). Ils en sont venus à la conclusion que l'adhésion initiale de cette bactérie sur un substrat dépendait de divers facteurs tels, la température, l'hydrophobicité de la surface ainsi que la présence du flagelle.

1.2 Les biofilms

Les biofilms microbiens sont des communautés de microorganismes provenant de la fixation de bactéries colonisatrices sur une surface et caractérisés par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice (Costerton *et al*, 1999). La plupart des microorganismes (99%) vivent sous ce mode de vie sessile alors que très peu sont retrouvés sous la forme libre aussi appelée 'planctonique' (Dreeszen, 2003). Un des biofilms les plus connus dans le domaine médical est *Pseudomonas aeruginosa* qui forme des amas de bactéries entourés d'une matrice extracellulaire au niveau des poumons causant ainsi la fibrose cystique (Yu et Head, 2002).

1.2.1 Composition d'un biofilm

Les biofilms sont rarement composés d'un seul type d'organismes. Généralement, ils sont formés d'une communauté dérivée de cultures microbiennes mixtes (pathogènes ou non) qui ne sont pas réparties de façon uniforme dans le biofilm (Busscher *et al*, 1995). Un biofilm mature est composé entre 70%-90% d'exopolysaccharides (EPS) soit une substance produite par les bactéries et constituée principalement d'eau, de polysaccharides et de glycoprotéines (Dreeszen, 2003). La nature hydratée des EPS protège les microorganismes contre la dessiccation et les fluctuations d'humidité relative de leur environnement. De plus, ces polymères limitent la pénétration des agents biocides (antimicrobiens, désinfectants) et des rayons ultraviolets (Trudel et Barbeau, 2005). Ainsi, les microorganismes formant les biofilms peuvent survivre à des conditions difficiles, sont protégés contre une multitude d'agents biocides et sont constitués d'une matrice multifonctionnelle. Les microcolonies communiquent entre elles grâce aux canaux aqueux prenant place au travers de la matrice extracellulaire, permettant ainsi l'échange et la diffusion des nutriments et de l'oxygène (Chmielewski et Frank, 2003). Un biofilm alimentaire est habituellement constitué de 10^6 à 10^7 bactéries par cm^2 , mais peut être plus dense sur des surfaces industrielles (Guyader *et al*, 1996).

1.2.2 Formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm débute d'abord par le conditionnement de la surface qui s'amorce souvent par une adsorption non-spécifique de molécules organiques présentes dans le milieu modifiant certaines propriétés du substrat (**Figure 3[1]**). Ce film de conditionnement a une influence certaine sur la vitesse et la qualité de l'attachement des bactéries aux surfaces (Trudel et Barbeau, 2005). La nature du film de conditionnement dépend principalement du milieu dans lequel la surface est présente. Les protéines de la salive par exemple, formeront une mince pellicule sur les dents influençant ainsi l'adhésion de différentes bactéries telles que *Streptococcus mutans* (Donlan, 2000).

Par la suite, les microorganismes sont transportés vers la surface selon différents mécanismes (Loosdrecht *et al*, 1990). La sédimentation est un processus lent qui est simplement dû aux forces de gravité. Le mouvement Brownien est plutôt basé sur un mouvement désordonné des particules microscopiques dans un liquide en raison de l'agitation thermique des molécules liquides. Les bactéries mobiles qui possèdent des flagelles, vont être entraînées vers la surface via une réponse chimiotactique se traduisant par une attraction vers certaines substances telles les glucides ou les acides aminés.

Vient ensuite l'adsorption initiale communément appelée l'adhésion réversible (**Figure 3[2]**), qui est basée sur les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques et les interactions hydrophobes (Dreeszen, 2003). Cette adhésion microbienne peut être expliquée par la théorie DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) qui suppose que la résultante des interactions de Van der Waals (attractives) (G_A) et des interactions électrostatiques (répulsives) (G_E), appelée énergie d'adhésion de Gibbs (G_{TOT}), gouverne l'adhésion initiale des microorganismes sur un substrat (Hermansson, 1999). G_{TOT} est dépendante de la distance entre la bactérie et le substrat ainsi que de la force ionique du milieu.

Lorsqu'une bactérie et la surface sont éloignées d'environ 10 nm, il y a un minimum secondaire d'attraction qui correspond à cette adhésion réversible (**Figure 2**). C'est un phénomène physique, généralement non spécifique au cours duquel les microorganismes sont facilement éliminés par un rinçage ou un nettoyage. À une distance de 5 nm entre la bactérie et la surface, la résultante devient supérieure à zéro et se traduit par une répulsion (**Figure 2**).

L'étape suivante consiste en une adhésion irréversible (**Figure 3[3]**) qui repose sur la production de filaments de polymères qui franchissent la zone de répulsion située à moins de 3 nm de la surface inerte (Bellon-Fontaine et Cerf 1991). Ce minimum primaire correspond à une attraction et les forces impliquées à ce niveau sont les interactions dipôle-dipôle, les liaisons covalentes et ioniques ainsi que les liaisons hydrogènes (Kumar et Anand, 1998). La présence du polymère extracellulaire permet de maintenir le biofilm assemblé tout en le protégeant contre les biocides et certaines conditions de vie défavorables (hautes températures, séchages). En plus, il agit comme un système d'échange d'ions afin de concentrer les nutriments pour la multiplication des cellules (Dreeszen, 2003).

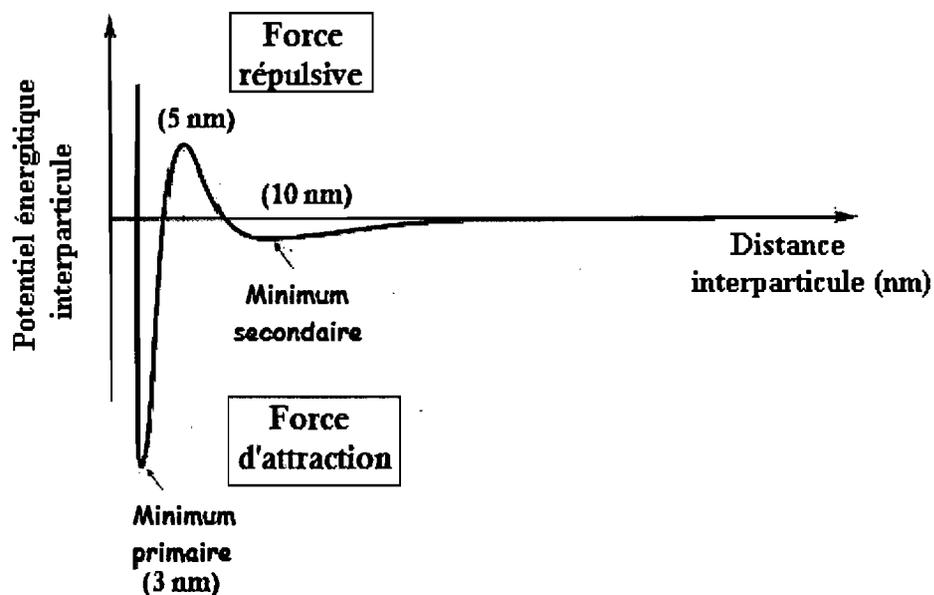


Figure 2 : Représentation schématique du potentiel énergétique entre une particule et une surface (Schowalter et Eldsath, 2001)

La cinquième étape correspond à la maturation et à la croissance du biofilm résultant à la formation de microcolonies (Bellon-Fontaine et Cerf, 1991). La couche cellulaire s'épaissit à mesure que le biofilm se développe pouvant atteindre quelques millimètres d'épaisseur (**Figure 3[4]**). Cela peut prendre plusieurs jours voir même des mois avant d'arriver à un état d'équilibre. Finalement, les cellules finissent par se disperser, colonisant de nouvelles zones et assurant ainsi leur pérennité (**Figure 3[5]**). Le détachement peut se produire soit par une communication inter-cellulaire via le « quorum sensing », par une séparation du biofilm causée par l'écoulement des fluides ou encore par abrasion (Dreeszen, 2003). Des recherches récentes ont démontré qu'une classe de molécules, les AHLs (N-acylated homoserine lactones), étaient relâchées par les bactéries des microcolonies et diffusaient dans l'environnement afin d'interagir avec les bactéries voisines déclenchant ainsi la transcription de certains gènes impliqués dans formation de biofilm (Sheng *et al.*, 2007).

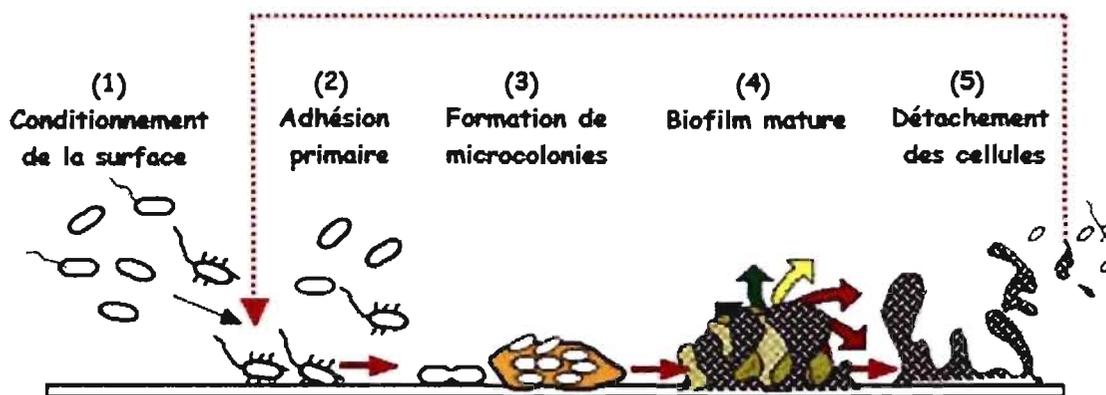


Figure 3 : Représentation schématique des étapes de formation d'un biofilm microbien (Ghigo, 2002)

1.2.3 Impacts des biofilms

Même si les biofilm peuvent avoir certains impacts positifs sur notre vie (diminution de la charge polluante des eaux usées, augmentation du rendement dans la récupération des métaux), ils sont surtout reconnus et étudiés pour leurs impacts négatifs. Une des principales conséquences négatives sont les infections causées par une accumulation de biofilm sur les prothèses, les cathéters, les dents, les gencives et bien d'autres endroits susceptibles d'une telle agglomération microbienne dont les surfaces alimentaires. Chez l'humain, les biofilms seraient responsables de 65% à 80% des infections (Trudel et Barbeau, 2005). Ils sont aussi retrouvés dans les conduites d'eaux propres et usées, provoquant une diminution de la qualité de l'eau potable, tout en étant une source potentielle de contamination. De plus, la présence de biofilms dans les réseaux d'aqueduc réduit l'efficacité de la distribution de l'eau due à une plus grande résistance lors de l'écoulement du liquide (Trudel et Barbeau, 2005). En milieu industriel, ils accélèrent la corrosion des équipements diminuant ainsi leur durée de vie.

1.3 Facteurs influençant l'adhésion des microorganismes aux surfaces

1.3.1 Propriétés de la surface du substrat

La surface inerte possède plusieurs caractéristiques importantes dans le processus d'attachement des bactéries. De façon générale, les bactéries adhèrent davantage sur des surfaces rugueuses en raison d'une plus grande surface de contact disponible (Donlan, 2000). Cependant, plusieurs auteurs contredisent cette corrélation entre la rugosité d'une surface et la colonisation bactérienne. Aucune relation dans l'étude de Mafu *et al.* en 1990 n'a pu être démontrée entre les irrégularités de plusieurs surfaces testées (verre, polypropylène, acier inoxydable, caoutchouc) observées au microscope électronique à balayage (MEB) et l'adhésion de *Listeria monocytogenes* Scott A. D'autres révèlent que les bactéries en bâtonnets envahissent surtout les surfaces lisses alors que celles en forme de cocci colonisent mieux les surfaces rugueuses (Chmielewski et Frank, 2003). Ces auteurs suggèrent que la composition distincte de leur paroi pourrait expliquer cette différence. L'influence de la rugosité d'une surface sur l'attachement des bactéries demeure un sujet controversé puisque récemment, certains chercheurs ont démontré que l'adhésion de *Staphylococcus aureus* diminuait sur des surfaces lisses (Allion *et al.*, 2006).

Les propriétés physico-chimiques ainsi que la nature de la surface exercent aussi une forte influence sur l'adhésion des microorganismes. La plupart des chercheurs reconnaissent que les bactéries s'attachent plus rapidement sur des surfaces hydrophobes non polaires telles que le téflon et autres plastiques que sur les surfaces hydrophiles comme le verre ou les métaux (Trudel et Barbeau, 2005). Malgré une certaine divergence d'opinions à ce sujet, il est évident que des interactions hydrophobes interviennent entre la surface et la cellule bactérienne dans le but de surmonter les forces répulsives et ainsi permettre à la bactérie de s'attacher. De plus, la charge et le caractère hydrophile/hydrophobe de la surface sont des facteurs à considérer dans l'étude de l'adhésion des microorganismes. Ainsi, une bactérie hydrophile adhère en plus grand nombre sur un support hydrophile et vice versa (Bellon-Fontaine et Cerf, 1991).

Une autre caractéristique importante de la surface du substrat est la présence du film de conditionnement. Toute surface exposée à un milieu humide deviendra inévitablement recouverte d'une pellicule formée de polymères et de molécules organiques du milieu. Cette modification physico-chimique affectera la vitesse et l'extension de l'adhésion (Trudel et Barbeau, 2005). La nature de cette couche primaire est très différente selon le milieu d'exposition. Le film formé sur les dents est plutôt de nature protéique et diversifié, alors que celui retrouvé sur les parois rocheuses sera beaucoup moins riche. Par ailleurs, cette pellicule peut modifier les propriétés de la surface pour augmenter ou diminuer l'adhésion microbienne. Un film de conditionnement concentré en cations (Na^+ , K^+ , Ca^+ ...) et en protéines favorisent l'adhésion (Sheng *et al.*, 2007). Des observations similaires ont été rapportées quant à l'adsorption de résidus organiques des produits de nettoyage et de désinfection responsables d'une modification de l'hydrophobicité des surfaces permettant une meilleure adhésion bactérienne (Sheng *et al.*, 2007).

1.3.2 Propriétés de la surface cellulaire

Tout comme la surface du substrat, la surface de la bactérie a un important rôle à jouer sur l'adhésion. Généralement, les bactéries ont une charge nette négative au niveau de leur membrane (Donlan, 2000). De plus, l'intensité de la charge peut varier d'une espèce à l'autre, voir même entre les souches elles-mêmes. Ce paramètre est par ailleurs influencé par les conditions de croissance (Chmielewski et Frank, 2003). Certains chercheurs ont démontré que l'adhésion de *Staphylococcus epidermidis* est directement proportionnelle à l'électronégativité d'une surface de verre alors que l'attachement d'*Escherichia coli* est inversement proportionnel au degré de la charge négative de la surface (Carpentier et Cerf, 1993).

L'hydrophobicité de la surface des microorganismes est reconnue comme un facteur déterminant de l'adhésion microbienne sur des surfaces inertes. Toutefois, cette caractéristique est dépendante de la phase de croissance et des conditions de culture. Il semble que l'hydrophobicité diminue à mesure que le taux de croissance augmente

(Chmielewski et Frank, 2003). En outre, l'hydrophobicité de *Listeria monocytogenes* augmente à mesure que le milieu de croissance devient plus acide (Briandet *et al.*, 1999). Pour certaines bactéries, l'hydrophobicité de surface semble être clairement reliée à l'adhésion alors que pour d'autres, cette caractéristique n'a que très peu d'influence sur l'attachement des microorganismes (Chmielewski et Frank, 2003).

Les molécules de surfaces des bactéries semblent être impliquées au niveau de l'adhésion initiale. En ce qui concerne les flagelles, plusieurs études se contredisent quant à leur implication dans l'attachement des microorganismes aux surfaces. Certaines mentionnent que ces organites servent seulement au transport des bactéries vers les surfaces inertes (Chmielewski et Frank, 2003). D'autres expliquent qu'en plus de leur rôle de locomotion, les flagelles auraient une fonction importante lors des premières étapes de l'adhésion en permettant de surpasser les forces répulsives entre la bactérie et la surface (Vatanyoopaisarn *et al.*, 2000). Les fimbriae, appendices non-flagellées, contribuent à l'hydrophobicité de la surface puisque la majorité contiennent une haute proportion d'acides aminés hydrophobes (Trudel et Barbeau, 2005). Plusieurs équipes de recherche ont démontré que les fimbriae jouaient un rôle crucial lors des étapes précoces de l'attachement en surmontant la répulsion électrostatique qui existe entre la cellule et la surface (Bellon-Fontaine et Cerf, 1991; Donlan, 2000). Tout récemment, le fimbriae F9 de *Escherichia coli* O157:H7 a été identifié comme étant nécessaire à la formation de biofilm de cette bactérie (Ulett *et al.*, 2007). Finalement, les LPS chez les microorganismes à Gram négatif sont aussi reconnus dans la littérature comme molécules impliquées au niveau de l'adhésion des bactéries (Caro *et al.*, 2005).

1.3.3 Propriétés du milieu de croissance

Une température de croissance élevée est souvent associée à une augmentation de l'adhésion microbienne possiblement à cause de la production de protéines de stress associées à la surface cellulaire (Chmielewski et Frank, 2003). Le pH ainsi que la composition du milieu ont aussi un impact majeur sur l'attachement des microorganismes aux surfaces (Bridgett *et al.*, 1992). Il est souvent proposé que les biofilms se développent mieux en condition de limitation de nutriments (Dewanti et

Wong, 1995). La vitesse d'écoulement du liquide dans lequel se trouve le substrat a une certaine influence sur le processus d'adhésion. Plus la vitesse augmente, plus la colonisation se fera rapidement, jusqu'à une certaine vitesse où les cellules vont commencer à se détacher de la surface (Soini *et al.*, 2002).

1.3.4 Phase de croissance des bactéries et temps de contact

Puisque les bactéries n'ont pas les mêmes propriétés physiologiques selon leur phase de croissance, celle-ci aurait donc une certaine influence au niveau de la formation d'un biofilm (Chmielewski et Frank, 2003). De plus, la concentration bactérienne initiale affecte l'adhésion de façon proportionnelle jusqu'à une certaine saturation (Bridgett *et al.*, 1992). Le temps de contact entre les bactéries et la surface inerte semble avoir un effet sur la quantité de microorganismes adhérents. Généralement, plus le temps de contact est long, plus le nombre de bactéries adhérentes sera élevé (Mafu *et al.*, 2002). Cependant, certains microorganismes peuvent s'attacher plus rapidement que d'autres, comme par exemple *Aeromonas hydrophila* qui possède la capacité d'adhérer après un court temps de contact entre une et quatre heures (Mafu *et al.*, 1998).

1.3.5 Les forces d'interaction entre la surface et la bactérie

Comme mentionné dans la section 1.2.2, plusieurs interactions physico-chimiques sont impliquées au niveau de l'adhésion microbienne dépendamment de la distance à laquelle se trouve la bactérie de la surface. Les forces de Van der Waals sont toujours attractives et constamment présentes. Les forces électrostatiques sont plutôt dépendantes des charges portées par les microorganismes et la surface ainsi que les ions présents dans le milieu. Puisque la plupart des bactéries et les surfaces inertes sont chargées négativement, ces forces sont souvent répulsives (Busscher et Van Der Mei, 1997). À plus courtes distances, les liaisons hydrogènes ainsi que les interactions dues au mouvement brownien contribuent à l'attachement bactérien sur des surfaces (Faille *et al.*, 2002).

1.4 La modification de surface par la technique Langmuir-Blodgett

Les polymères sont des molécules constituées de la répétition d'un motif de base appelé monomère. Ils sont omniprésents dans notre vie quotidienne puisqu'ils composent plusieurs matériaux : plastiques, caoutchoucs, adhésifs, fibres textiles et films d'emballage (Dubreuil, 2001). C'est au début des années 1990, alors que le nombre d'infections causées par la formation de biofilms ne cessait d'augmenter, que plusieurs équipes de recherche ont eu l'idée de modifier des surfaces à l'aide de différents polymères (PEO) dans le but de diminuer l'adhésion bactérienne (Desai *et al.*, 1992; Bridgett *et al.*, 1992). Quelques années plus tard, l'utilisation de polymères chargés (complexe chitosan/héparine) pour la modification de surface a révélé une importante diminution de l'adsorption protéique ainsi que de l'adhésion de *Pseudomonas aeruginosa* (Lin *et al.*, 2004).

1.4.1 Les copolymères

Les copolymères sont des polymères composés de monomères différents liés entre eux par des liaisons covalentes. Les plus simples sont formés de deux ou trois chaînes distinctes (blocs), les plus connus étant les diblocs et les triblocs (**Figure 4 A**). Ils se conduisent comme une molécule amphiphile lorsqu'ils sont constitués d'une portion hydrophobe (chaîne carbonée) et d'une portion hydrophile (segment polaire) (Romet-Lemonne, 2002). Lorsque le bloc hydrophile porte une charge, on parle d'un copolymère chargé ou d'un polyelectrolyte (**Figure 4 B**).

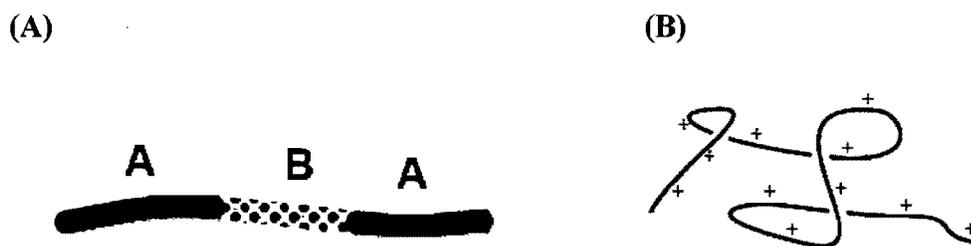


Figure 4 : Représentation schématique de différents types de polymères : copolymère tribloc de type A-B-A (A); polyelectrolyte (B) (Netz et Andelman, 2003)

1.4.2 Les polyélectrolytes

Un polyélectrolyte est un polymère généralement soluble dans l'eau constitué d'un groupement ionique soit positif soit négatif (Lee et Obukhov, 2004). C'est donc des poly-ions accompagnés de contre-ions libres qui assurent la neutralité électrique globale du système (Romet-Lemonne, 2002). La répulsion électrostatique entre les charges oblige les chaînes de ces polymères à adopter une conformation beaucoup plus imposante. Que ce soit dans le traitement des eaux, dans la fabrication de savons ou dans l'industrie de l'agroalimentaire, l'utilisation des polyélectrolytes se fait à divers niveaux (Dubreuil, 2001). Plusieurs biomolécules sont des polyélectrolytes naturels, comme l'ADN, l'ARN ainsi que la majorité des protéines. Les polyélectrolytes se retrouvent aussi sous forme de divers produits synthétiques comme le poly(styrène sulfonate) (PSS) ou le poly(acrylamide) (PAA) (Netz et Andelman, 2003). Généralement, ils sont utilisés au voisinage des interfaces air-eau ou liquide-solide dans le but d'étudier leurs caractéristiques ou de contrôler les phénomènes d'interface (Dubreuil, 2001). La partie neutre hydrophobe du copolymère sert d'encrage à l'interface alors que la partie hydrophile chargée est soluble dans l'eau et les chaînes qui la composent sont flexibles. Il est donc possible d'obtenir une monocouche d'un copolymère chargé pour ensuite la transférer sur un support solide dans le but de modifier les caractéristiques du substrat. Les polyélectrolytes sont souvent reconnus dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes (Kawabata et Nischiguchi, 1988; Tiller *et al.*, 2001). La technique Langmuir-Blodgett est un procédé bien connu pour l'obtention de films de copolymères chargés ou non.

1.4.3 Technique Langmuir-Blodgett

Irving Langmuir fut le premier, en 1920, à étudier les monocouches à l'interface air-eau et conçoit un système permettant de mesurer les forces impliquées pendant la compression de la monocouche (Deschênes, 2006). Vers les années 1935, Katharine Burr-Blodgett découvre comment transférer de tels films sur des surfaces de métal et de verre de manière contrôlée. En collaboration avec le Dr. Langmuir, elle démontre

comment procéder à la déposition de multicouches sur un support solide, d'où le nom connu dans la littérature de films Langmuir-Blodgett ou films LB.

La technique Langmuir-Blodgett permet de préparer des couches ultra-minces ayant une épaisseur dont la limite minimale est la taille des monomères dont elles sont constituées (Simonyan *et al.*, 2004). Le principe général de cette technique consiste en la déposition d'une quantité de solution d'un composé organique amphiphile sur une nappe d'eau ultra-pure reposant dans une cuve de Téflon (Deschênes, 2006). Suite à l'évaporation du solvant, la molécule amphiphile va former un film monomoléculaire à l'interface air-eau (**Figure 5 A**). Par la suite, les deux barrières mobiles vont comprimer le film obligeant les molécules à s'orienter progressivement jusqu'au point de ne laisser aucun espace libre à la surface. Dans de telles conditions, toutes les molécules, d'un surfactant classique de type C_n-x où C_n est une chaîne d'hydrocarbure et x une tête polaire, se disposent parallèlement les unes aux autres et perpendiculairement au plan de la surface liquide, avec l'extrémité hydrophile en contact avec l'eau alors que la partie hydrophobe est orientée vers l'air (**Figure 5 B**).

(A)



(B)

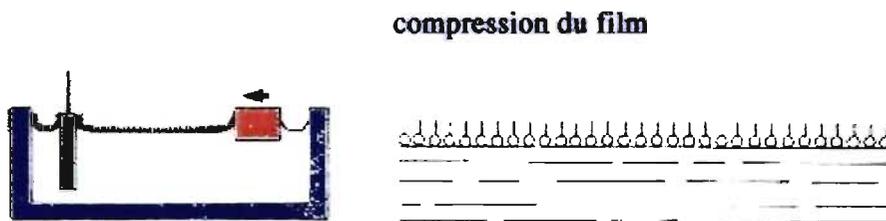


Figure 5 : Représentation schématique de la technique Langmuir-Blodgett : phase préliminaire (A); compression de la monocouche (B) (Hubin, 2003)

La tension de surface d'un liquide γ (exprimée en mN/m) est la force qui existe à la surface de séparation de deux milieux. Autrement dit, c'est la résultante des forces intermoléculaires qui agissent sur les molécules de la pellicule et qui sont différentes des forces qui agissent à l'intérieur de l'eau (Moraille, 2002). La tension de surface sera donc affectée par la concentration des molécules amphiphiles présentes à la surface de la nappe d'eau, créant une pression de surface (Π) définie par :

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{Éq. 1})$$

où γ_0 est la tension superficielle de l'eau ultra-pure à une température de 25°C ($\gamma_{\text{eau}} = 72,8$ mN/m) et γ est la tension superficielle en présence de la monocouche (KSV Instruments, 2008). La pression de surface (mN/m) est mesurée à l'aide de la balance de Wilhelmy pendant toute la durée de l'expérimentation. Il s'agit d'une mince plaque en platine partiellement immergée (au 2/3) dans l'eau et connectée à une microbalance électronique (Moraille, 2002). Différentes forces opèrent sur cette plaque (**Figure 6**) permettant d'enregistrer les variations de pression de surface tout au long de la compression du film LB.

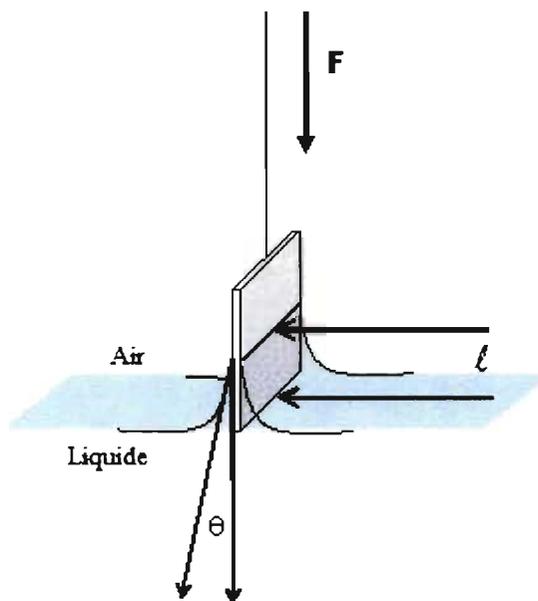


Figure 6 : Schéma de la plaque de Wilhelmy à l'interface air-eau
(Encyclopédie Wikipédia, 2007)

1.4.4 Isotherme Π -A

On nomme l'isotherme Π -A (**Figure 7**) la courbe de la pression de surface en fonction de l'aire occupée par une molécule de la monocouche (Deschênes, 2005). Cette isotherme est enregistrée par la compression du film de Langmuir et par conséquent, par la réduction de l'aire moléculaire, à une vitesse constante. L'isotherme permet d'obtenir de l'information concernant les interactions intermoléculaires ainsi que la structure et la stabilité de la monocouche puisque lors de la compression, les molécules sont constamment en réarrangement.

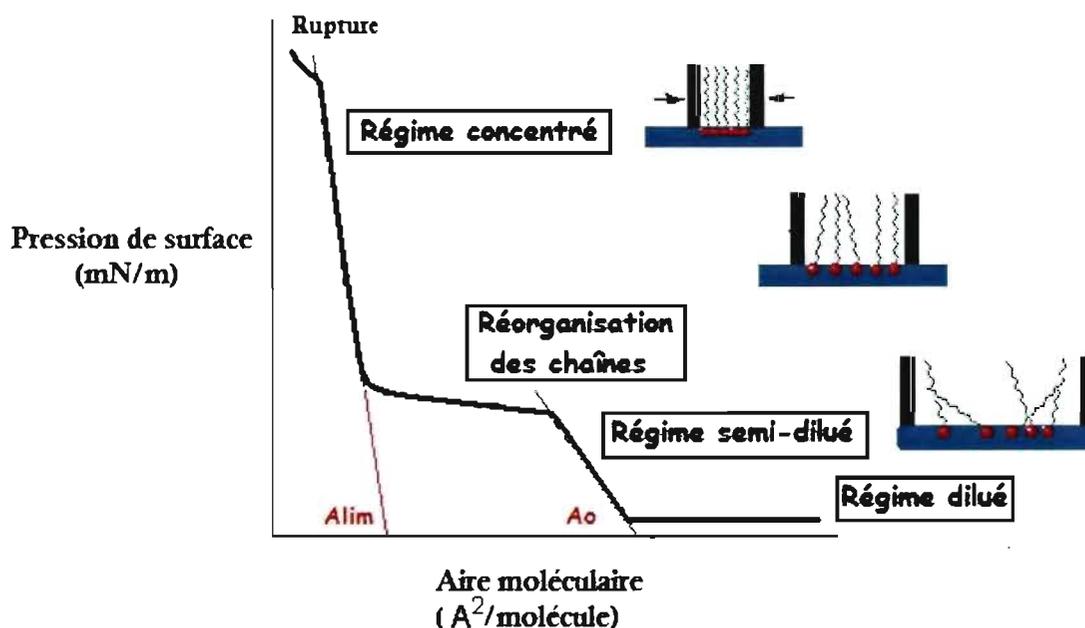


Figure 7 : Isotherme Π -A (Deschênes, 2006)

L'isotherme de la **Figure 7** se compose de trois principaux régimes de concentration ainsi qu'une phase de transition. À très basse pression, les molécules sont éloignées les une des autres et occupent une aire moléculaire relativement grande. Cela leur permet donc une entropie maximale sans contrainte imposée par les molécules voisines. Cette région correspond à un régime dilué pour un polymère adsorbé à l'interface. À pression intermédiaire, lorsque les molécules commencent à être

restreintes dans leur mouvement dû à la proximité relative des molécules adjacentes, on atteint un régime semi-dilué qui entraîne une augmentation de la pression de surface. Par la suite, un régime de concentration prend place et celui-ci peut donner lieu à une réorganisation des chaînes. Une telle réorganisation est en général caractérisée par une faible augmentation de la pression de surface, qui s'exprime sous forme de pseudo-plateau. Suivant ce plateau, la pression de surface augmente et les molécules sont de plus en plus rapprochées. Finalement, à pression très élevée, lorsque la pente devient abrupte, les molécules sont alignées de façon compacte et ordonnée. Cette région est désignée phase solide ou régime concentré. La compression de la couche au-delà de cette phase donne lieu à une rupture de la monocouche qui se distingue par une fluctuation de la pression de surface en raison de la formation de multicouches (Moraille, 2002). Il peut aussi y avoir dissolution de la molécule en solution ou formation de micelles dans le cas de copolymères blocs.

L'analyse d'une isotherme permet d'extraire une multitude d'informations sur le comportement et l'arrangement moléculaire. Pour un polymère, l'aire à pression nulle (A_0) correspond à l'aire moléculaire des chaînes effondrées non déformées. Dans le cas d'un copolymère bloc, deux régimes denses successifs peuvent prendre place, soit un pour le bloc hydrophile (A_0) et un second pour le bloc hydrophobe (A_{lim}). Comme mentionné précédemment, le plateau de transition durant lequel la pression de surface change peu, caractérise une réorientation des molécules à l'interface (Moraille, 2002).

1.4.5 Déposition de la monocouche sur un substrat solide

Il est possible de transférer, à pression constante, la monocouche sur un support solide soit hydrophobe soit hydrophile. L'avantage d'utiliser une telle technique pour modifier une surface est sans aucun doute la production d'une monocouche parfaitement homogène et pour laquelle il est possible de contrôler la densité de recouvrement. Une fois transférée sur un substrat solide, la couche monomoléculaire prend le nom de film de Langmuir-Blodgett (LB). La démarche à suivre pour la déposition du film LB dépend de la nature du substrat. En effet, un transfert sur un support hydrophobe se réalise par

trempage vertical à vitesse constante alors que pour un substrat hydrophile, celui-ci doit être extrait de l'eau de façon perpendiculaire puisqu'il y est déjà immergé (Deschênes, 2005). Dans les deux cas, au fur et à mesure que les molécules s'adsorbent sur la surface, les barrières assurent une compression de façon à maintenir la pression de surface constante et permettre au substrat d'être recouvert d'une monocouche de densité uniforme (**Figure 8**). Si le support est hydrophobe, la partie hydrophile du film LB résultant est orientée vers l'air alors que les chaînes carbonées hydrophobes sont adhérentes au substrat. L'inverse est obtenu si le support est hydrophile.

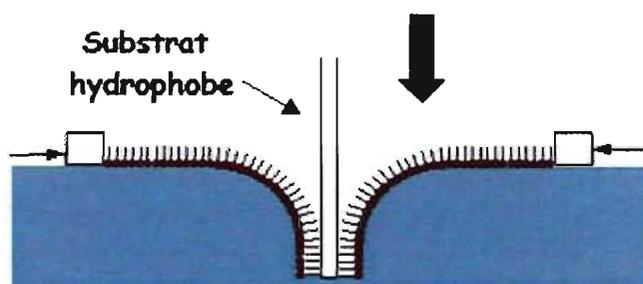


Figure 8 : Déposition d'une monocouche sur un substrat hydrophobe par la technique Langmuir-Blodgett (Deschênes, 2006)

Dans la méthode de Langmuir-Blodgett, le taux de transfert permet de confirmer si le film LB est parfaitement transféré sur le support solide. Celui-ci se définit comme étant le rapport entre la réduction de l'aire de la monocouche flottante et l'aire réceptrice du substrat du film (Deschênes, 2005). Un transfert optimal est caractérisé par un taux de l'ordre de l'unité.

1.4.6 Les micelles

En milieu aqueux, une micelle est un agrégat, habituellement sphéroïdale, de molécules possédant une partie hydrophile dirigée vers le solvant et une partie hydrophobe orientée vers l'intérieur (Deschênes, 2006). Lorsque le bloc hydrophobe ne s'étale pas à l'interface et que le coefficient d'interaction Flory-Huggins χ entre les blocs hydrophile et hydrophobe d'un copolymère bloc est élevé, la déposition d'une solution de tels copolymères sur une nappe d'eau peut entraîner la formation de micelles. Les premières études rapportant l'existence de micelles à l'interface air-eau pour le copolymère poly(styrène-*b*-4-vinyl-pyridine) (PS-*b*-P4VP) datent du début des années 1980 (Price, 1982). Ce n'est qu'au début des années 1990 que l'organisation micellaire du copolymère PS-P4VPQ quaternisé a davantage été approfondie (Zhu *et al.*, 1991). Trois morphologies de micelles ont été différenciées pour un film LB de PS-P4VPQ à l'interface air-eau : circulaire, cylindrique et lamellaire (Zhu *et al.*, 1992). Cette même équipe de recherche a démontré la présence d'une phase de transition au niveau de la courbe de l'isotherme associée à une réorientation des chaînes hydrophiles P4VPQ vers la sous-phase aqueuse. C'est aussi à partir de ce moment que l'utilisation du microscope à force atomique (AFM) a permis de visualiser précisément les différents types de micelles. De façon générale, les micelles circulaires peuvent adopter deux formes différentes en 2D : la forme 'starlike' (**Figure 9 A**) représentée par un petit corps de chaînes hydrophobes (PS) entouré de longues chaînes hydrophiles (P4VP) ou la forme 'crew-cut' (**Figure 9 B**) qui constitue un large centre hydrophobe autour duquel on retrouve de petites chaînes hydrophiles (Zhang et Eisenberg, 1998).



Figure 9 : Représentation schématique des deux types de micelles : 'starlike' (A); 'crew-cut' (B)

Le nombre d'agrégation (N_{agg}) caractérisant une micelle se définit comme étant le nombre moyen de molécules la constituant (Calderara, 1995). De plus, la forme de la micelle, de même que le nombre d'agrégation, dépendent du ratio de monomères de chacun des blocs du copolymère ($N_S/N_{4VP(Q)}$).

Tout récemment, une équipe de recherche a analysé le processus de micellisation de copolymères (PS-PEO) à l'interface air-eau selon le modèle micelle-fleur (Deschênes *et al.*, 2008). Ainsi, lorsque le nombre de monomères (N) du bloc hydrophobe (PS) est plus grand que celui du bloc hydrophile (PEO), la formation de micelles lors de l'évaporation du solvant se traduit par une déformation verticale de la partie PS, puisque les chaînes hydrophiles occupent moins d'espace à l'interface (**Figure 10 A**). Ces micelles adoptent donc une configuration 'crew-cut' avec un nombre d'agrégation plus élevé. À l'inverse, si la partie hydrophile du copolymère est plus importante que celle hydrophobe, les chaînes PS sont déformées dans l'axe horizontal en raison d'une plus grande espace occupée par les chaînes hydrophiles à l'interface (**Figure 10 B**) provoquant l'apparition de micelles 'starlike'.

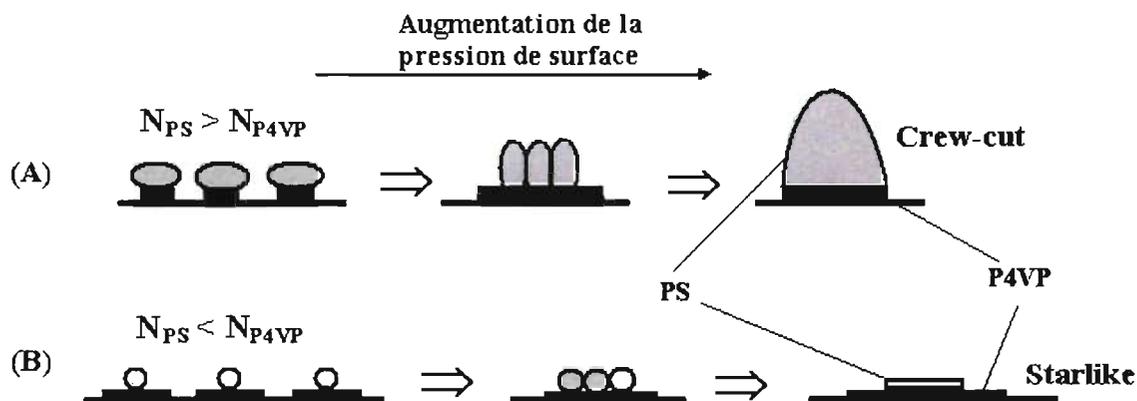


Figure 10 : Processus de micellisation du copolymère PS-P4VP à l'interface air-eau selon le modèle micelle-fleur (Deschênes *et al.*, 2008)

1.5 Caractérisation des surfaces modifiées

Une fois les modifications réalisées, il est intéressant de caractériser ces surfaces modifiées dans le but de les comparer avec celles d'origine et d'évaluer les impacts physico-chimiques de ces modifications.

1.5.1 Mesures d'angles de contact (CAM)

Une première méthode de caractérisation est la mesure d'angle de contact (CAM) sur les surfaces qui est en fait une mesure quantitative de la mouillabilité d'un solide par un liquide. En d'autres mots, c'est l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface (Skłodowska *et al.*, 1999). La technique consiste à déterminer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat avec la surface solide. La méthode de la goutte sessile est la plus courante pour les surfaces planes en raison de sa simplicité et sa rapidité. L'appareil utilisé est un goniomètre électronique muni d'un système vidéo pour l'enregistrement des données d'angles de contact (**Figure 11**).

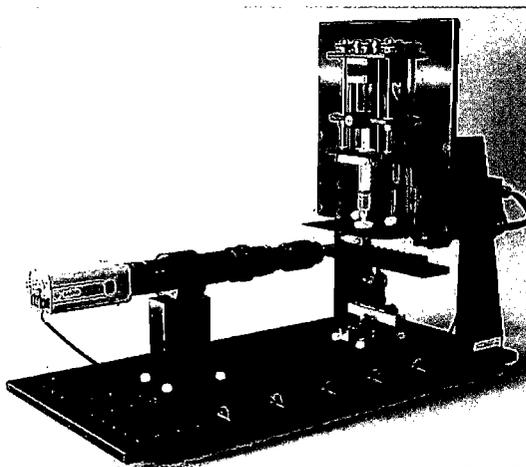


Figure 11 : Goniomètre électronique modèle FTA200 (Firt Ten Ångstroms, 2008)

Cette mesure permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface en utilisant plusieurs liquides de référence différents (eau ultra-pure, formamide, α -bromonaphtalène). De plus, elle permet la discrimination de la nature polaire ou apolaire

Dans des conditions idéales, ces trois tensions interfaciales sont reliées par l'équation de Young :

$$\gamma_{LV} \cos\theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (\text{Éq. 2})$$

où γ_{LV} est la tension interfaciale liquide-vapeur, γ_{SV} la tension interfaciale solide-vapeur, γ_{SL} est la tension interfaciale solide-liquide et θ est l'angle de contact. La dérivation de l'équation de Young assume que la surface solide est parfaitement lisse, homogène et chimiquement inerte (Marmur, 1996). Cela est rarement le cas étant donné qu'habituellement les surfaces présentent une certaine rugosité due à la présence de contaminants (polymères, bactéries, protéines) ou à la nature des matériaux et leur mise en forme (cristallinité des polymères, polissage, etc). En fait, les angles de contact macroscopiques mesurés sont des angles de contact apparents ou phénoménologiques (KSV Instruments, 2008).

1.5.2 La microscopie électronique à balayage (MEB)

Un autre procédé de caractérisation des surfaces modifiées est la microscopie électronique à balayage. Cette technique est basée sur le principe des interactions électrons-matière capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon (SCÉRÉN – CNDP, 2006). Un faisceau d'électrons (filament de tungstène) balaie la surface à caractériser ce qui provoque une émission de particules qui sont ensuite analysées par différents détecteurs permettant la reconstruction d'une image en trois dimensions de la surface. La résolution d'un tel appareil se situe entre 10 nm et 20 nm et le grossissement varie de 20 à 10^5 . Les premiers microscopes électroniques à balayage ont été mis au point au début des années 1940, mais ce n'est qu'au milieu des années 1960 que ces appareils ont été commercialisés.

Le faisceau est émis par un canon à électrons à une température de l'ordre de 2 000 °C. L'anode porte ensuite ce filament à une tension négative ce qui permet de définir l'énergie des électrons émis. L'échantillon placé dans la chambre objet est éclairé

par une lentille magnétique, le condenseur. La seconde lentille de courte distance focale, l'objectif, donne une première image de l'objet agrandie quelques dizaines de fois. Finalement, la lentille de projection fournit l'image définitive (agrandie 10 000 fois) sur un écran fluorescent observable visuellement sur une plaque photographique. L'ensemble de ces éléments est enfermé dans une enceinte sous vide (**Figure 14**). L'observation des surfaces modifiées par MEB donne une excellente idée de la topographie superficielle puisqu'il fournit une bonne résolution et une excellente profondeur de champ. Il ne fournit toutefois pas une résolution aussi fine que l'AFM pour des domaines dont la taille (hauteur) est inférieure à 10 nm.

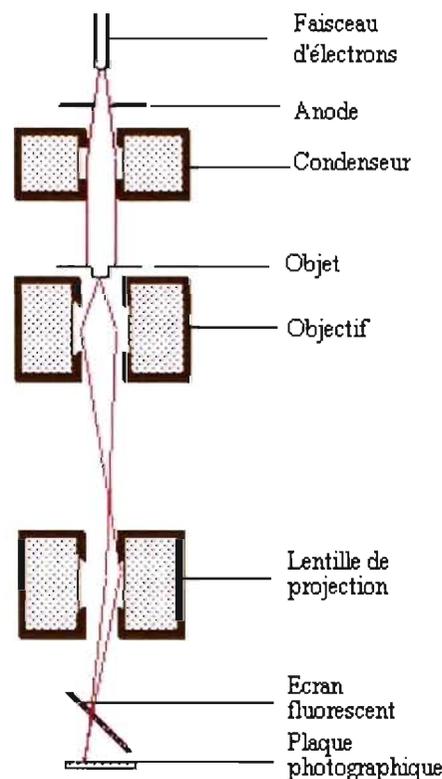


Figure 14 : Schéma des éléments composants un microscope électronique à balayage (SCÉRÉN – CNDP, 2006)

1.5.3 La microscopie à force atomique (AFM)

L'utilisation de la microscopie à force atomique, (AFM) pour la caractérisation de surfaces modifiées date du début des années 1990. Le microscope est constitué principalement de six différentes parties : un faisceau laser, un microlevier sur lequel est montée une pointe atomique, un scanner piézoélectrique porteur de l'échantillon et se déplaçant en x, y et z, un détecteur à photodiodes à quatre cadrans et enfin un mécanisme de rétroaction électrique (**Figure 15**). Le principe repose sur les interactions entre l'échantillon et une pointe qui balaie la surface de celui-ci donnant lieu à des forces répulsives ou attractives. La déflexion du microlevier lors du balayage est suivie en positionnant un faisceau laser sur sa face supérieure. Ce faisceau est réfléchi sur un miroir pour ensuite être capté par les photodiodes qui enregistrent le signal lumineux afin de mettre en image la topographie tridimensionnelle de la surface à l'échelle nanométrique. Une boucle de rétroaction entre le microlevier et le scanner permet de balayer la surface en gardant constante soit la force ou la distance entre la pointe et l'échantillon.

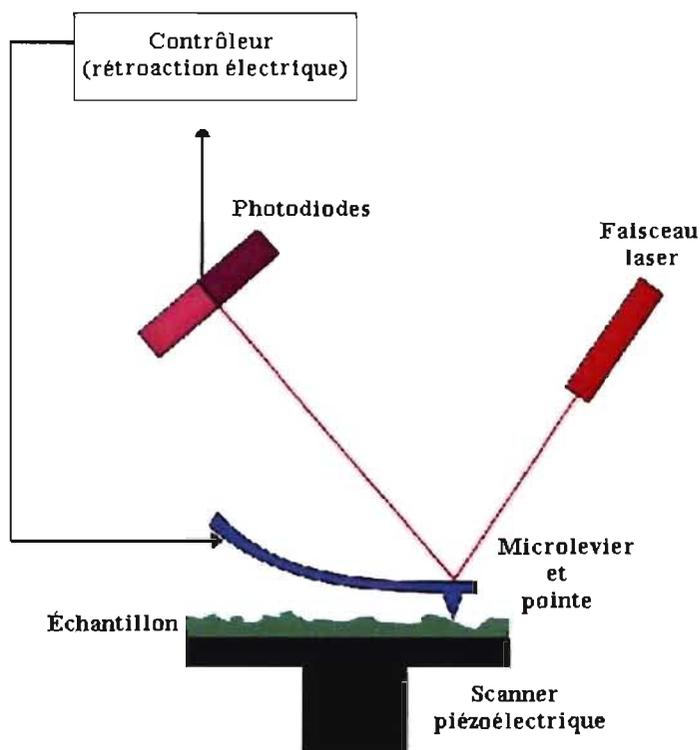


Figure 15 : Schéma des éléments composant un microscope à force atomique (Encyclopédie Wikipédia, 2008)

Il existe plusieurs modes d'imagerie en l'AFM, mais deux sont plus souvent utilisés : le mode contact et le mode contact intermittent dit 'tapping' (Moraille, 2002). En mode contact, la pointe est continuellement en contact avec la surface de l'échantillon à analyser (**Figure 16 A**). Les principales forces d'interactions impliquées entre la pointe et la surface sont des forces répulsives de très courte portée. Pour ce type de mode, deux façons d'imageries sont possibles : le mode hauteur et le mode force. Le mode hauteur est le plus fréquemment utilisé en microscopie à force atomique. Les conditions de force constante sont obtenues en maintenant la déflexion du microlevier immobile grâce à une boucle d'asservissement qui agit sur la tension du piézoélectrique faisant varier son déplacement (Wang, 1997). La topographie de la surface est ainsi obtenue puisque les variations de la tension sont directement proportionnelles aux variations de la hauteur de la surface. Pour le mode force, la hauteur de l'échantillon est gardée constante alors que la déflexion du microlevier est enregistré tout au long du balayage. Ce mode donne également les informations topographiques de la surface, mais limite le choix de l'échantillon. En effet, ce dernier doit être peu rugueux de manière à ce que le microlevier n'endommage pas la surface lors du balayement.

Le mode 'tapping', de loin le plus employé, consiste à faire vibrer le microlevier à sa propre fréquence de résonance avec une amplitude suffisamment élevée (**Figure 16 B**). Contrairement au mode contact, la pointe entre en contact de façon discontinue avec la surface en la tapotant. Lorsque la pointe interagit avec la surface de façon répulsive, l'amplitude décroît due à un changement de la fréquence de résonance et la rétroaction se fait alors sur l'amplitude d'oscillation du microlevier. Les forces de friction disparaissent complètement et il est alors possible d'examiner des échantillons mous (polymères, protéines, microorganismes) en évitant leur détérioration causée par le frottement de la pointe (Wang, 1997).



Figure 16 : Schématisation des deux principaux modes d'imagerie en AFM : mode contact (A); mode 'tapping' (B) (Wang, 1997)

Pour les deux types de modes, il est possible de travailler en milieu liquide à condition de choisir une pointe beaucoup moins rigide avec une constante de force (K) plus petite. La multitude d'avantages offerts par cette technique justifie son choix pour la caractérisation des surfaces modifiées. La microscopie à force atomique permet de sonder en temps réel les films de copolymères ainsi que tout changement de morphologie avec une résolution latérale de l'ordre du nanomètre (nm) et une résolution verticale de moins d'un angström (0,01 nm). Cette technique est aussi capable de donner une image tridimensionnelle de la topographie de même que des informations sur les propriétés des surfaces (élasticité, forces d'adhésion, composantes magnétiques) avec une résolution atomique. L'AFM s'applique dans des environnements multiples (air, liquide, vide) et les études peuvent être réalisées sur plusieurs types d'échantillons (métaux, polymères, molécules adsorbées). De plus, les surfaces analysées n'ont pas besoin de traitement spécial au préalable comme dans le cas de la microscopie électronique à balayage.

Par ailleurs, il a été démontré que l'AFM pouvait s'avérer un outil analytique intéressant pour l'étude de l'attachement des bactéries sur une surface inerte par la quantification de la force d'adhésion microbienne (Razatos *et al.*, 1998). Cette mesure de force d'attachement est réalisée en augmentant progressivement la force avec laquelle le microlevier balaie la surface de l'échantillon jusqu'à ce qu'elle soit suffisante pour détacher les cellules bactériennes (Fang *et al.*, 2000). Dans une récente étude, Sénéchal *et al.* ont décrit une nouvelle méthode d'utilisation de l'AFM en milieu liquide afin de

quantifier les forces de détachement d'une bactérie isolée adhérente sur différentes surfaces polymères (Sénéchal *et al.*, 2004). À faible force, la déflexion du microlevier est peu élevée et la pointe anticipe beaucoup la cellule bactérienne. Une augmentation de la force du microlevier amène une amélioration dans le tracé de la pointe jusqu'à ce que cette force soit assez élevée pour détacher la cellule (**Figure 17**). Comparativement aux recherches précédentes, cette application permet d'évaluer les forces latérales d'adhésion d'un microorganisme isolé sur une surface, soit des forces influencées par la composition chimique de la surface ainsi que par la rugosité de celle-ci. Cette technique permet donc d'analyser l'impact de la nature de la surface sur l'adhésion microbienne.

La force (F) nécessaire pour détacher une cellule bactérienne sur une surface est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$F = KZ \quad (\text{Eq. 3})$$

où K est la constante de force du microlevier et Z sa déflexion.

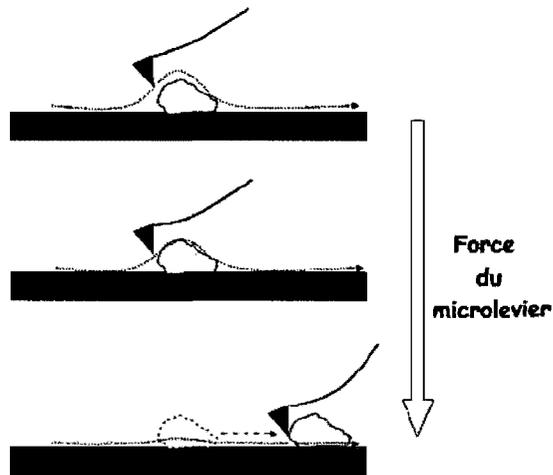


Figure 17 : Détachement d'une cellule bactérienne par l'augmentation de la force du microlevier d'un AFM (Sénéchal *et al.*, 2004)

1.5.4 Adsorption protéique et adhésion microbienne

Une façon indirecte de caractériser des surfaces modifiées est d'évaluer l'adsorption protéique et l'adhésion microbienne sur celles-ci. Les méthodes les plus souvent utilisées pour la quantification de l'adsorption protéique sur des surfaces sont la spectroscopie infrarouge (IR), la fluorométrie et la méthode Pierce BCA (Salloum et Schlenoff, 2004; Bosker *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2006). Dans le cas de l'adhésion bactérienne, la quantification peut s'effectuer par microscopie électronique à balayage (Bellon-Fontaine et Cerf, 1991), mais cette technique est fastidieuse et plutôt approximative. Par contre, le dénombrement des comptes viables est beaucoup plus précis et facilement réalisable (Hu *et al.*, 2005; Hall-Stoodley *et al.*, 2006). L'utilisation d'un bioréacteur à coupons permet d'exposer plusieurs surfaces à une culture bactérienne constamment en agitation, reproduisant ainsi un contexte plus réel en regard aux procédés employés dans le secteur agroalimentaire.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIF

Hypothèse

L'hypothèse de ce travail est basée sur le principe que les propriétés antimicrobiennes de groupements fonctionnels greffés sur des surfaces sont compromises soit par le développement d'un film de conditionnement qui les recouvre, soit par le fait que la longueur des chaînes sur lesquelles se trouvent ces groupements antibactériens ne leur permet pas de franchir la membrane cellulaire pour agir.

Objectif

Cette étude a donc pour objectif de mieux comprendre l'impact de l'organisation des chaînes de copolymères portant des groupements antimicrobiens, sur l'adhésion de pathogènes alimentaires aux surfaces. En d'autres mots, ce travail a pour but de mieux connaître les facteurs déterminant l'interaction entre les groupements actifs greffés sur des surfaces et l'adhésion bactérienne, afin de mettre en évidence les conditions qui permettraient de limiter l'adhésion de pathogènes aux surfaces alimentaires.

CHAPITRE II

MÉTHODOLOGIE

2.1 Modifications de surface par la technique Langmuir-Blodgett

2.1.1 Préparation des solutions de copolymères

Les blocs copolymères poly(styrène-*b*-4-vinylpyridine), PS_m-*b*-P4VP_n (**Figure 18**), utilisés pour ce projet, ont été obtenus de la compagnie Polymer Source, Inc. (Dorval, Qc). Les copolymères diffèrent par la masse moléculaire moyenne en nombre (\overline{M}_n) de chacun des composants du dibloc, soit polystyrène (PS) soit poly(4-vinylpyridine) (P4VP). Ils ont été sélectionnés en fonction de la longueur des chaînes des deux éléments, identifiée par le nombre de monomères de chacune des parties du copolymère : PS₁₉₂-P4VP₁₈₁, PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ et PS₃₂-P4VP₁₇₈. Un homopolymère P4VP₁₇₂ a aussi été utilisé dans le cadre de cette étude.

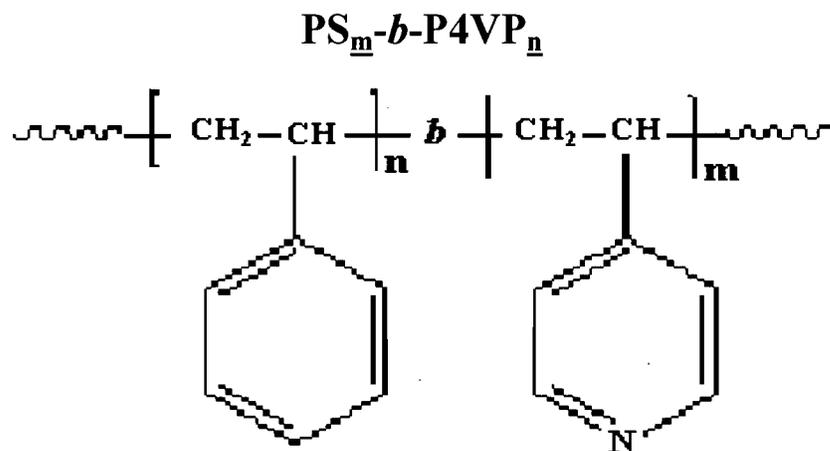


Figure 18 : Structure chimique du copolymère poly(styrène-*b*-4-vinylpyridine)

Une certaine quantité de PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ et PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ solubilisée dans du chloroforme de grade ACS spectrophotométrique (Sigma-Aldrich, Oakville, On), a été quaternisée à l'aide d'iodométhane de grade "Reagent" (Sigma-Aldrich, On) pendant 48 heures. Pour des raisons expliquées ultérieurement, le copolymère PS₃₂-P4VPQ₁₇₈ quaternisé n'a pas été utilisé pour cette étude.

Cette quaternisation a été réalisée suite à l'addition d'un dérivé, l'iodure de méthyle, qui permet la transformation de l'amine tertiaire en amine quaternaire par l'ajout covalent d'un groupement R4 (CH₃) sur l'azote, lui conférant ainsi une charge positive (**Figure 19**).

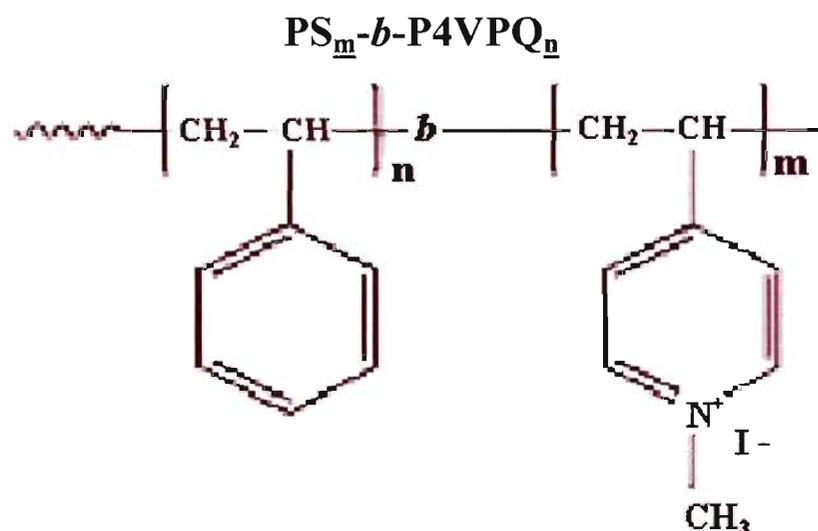


Figure 19 : Structure chimique du copolymère poly(styrène-*b*-iodure de méthyle-N-4-vinylpyridinium)

Le rendement de quaternisation a été déterminé par spectroscopie infrarouge (IR) à l'aide d'une cellule KBr et d'un appareil IRTF Excalibur FTS-3000 (Bio-Rad, Mississauga, On). La présence d'amine tertiaire forme une bande d'absorbance à 1600 cm^{-1} sur le spectre alors que celle de l'amine quaternaire, correspond à une bande à 1640 cm^{-1} (**Figure 20**). Ainsi, pour un copolymère quaternisé à 100%, la bande à 1600 cm^{-1} devrait disparaître complètement et une nouvelle devrait être détectée à 1640 cm^{-1} . Des taux entre 95-99 % ont été obtenus pour les deux copolymères quaternisés. La **Figure 20** montre un exemple d'un spectre IRTF pour le copolymère $\text{PS}_{192}\text{-P4VP}_{181}$ quaternisé à 97,4 %. Le pourcentage de quaternisation a été calculé en divisant la valeur d'absorbance de l'amine quaternaire (7,662) par la valeur totale d'absorbance des deux types d'amines ($7,662 + 0,203 = 7,865$).

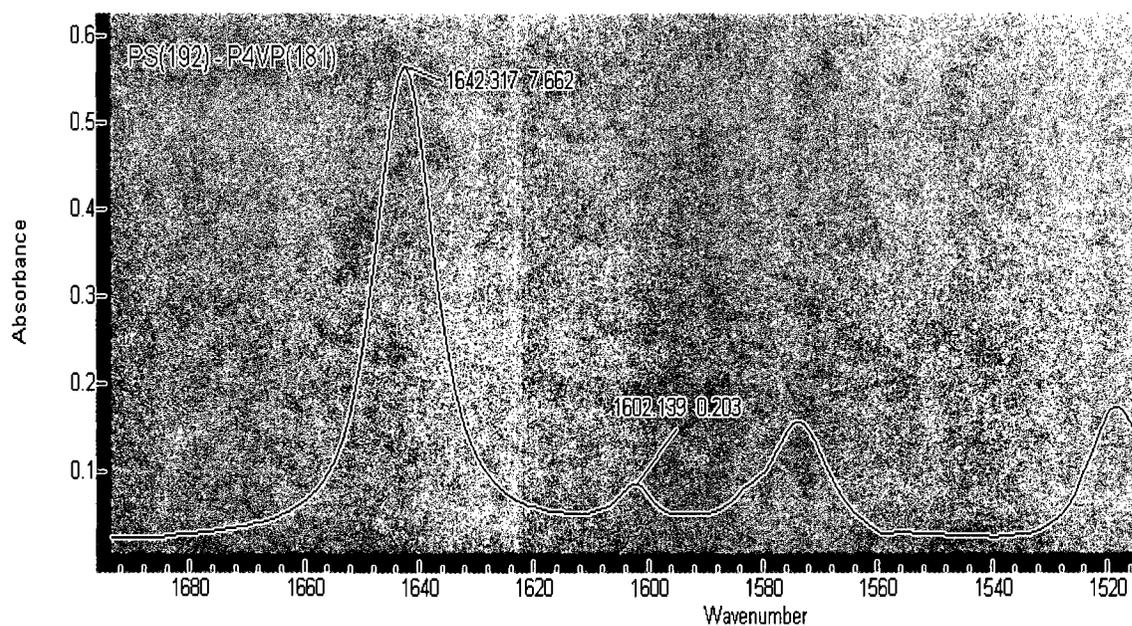


Figure 20 : Spectre IRTF du copolymère $\text{PS}_{192}\text{-P4VP}_{181}$ quaternisé à 97,4 %

Les caractéristiques concernant les masses molaires de l'homopolymère ainsi que des blocs copolymères $PS_m-b-P4VP_n$ utilisés pour ce projet, sont présentées dans le **Tableau I** ci-dessous.

Tableau I : Caractéristiques des différents copolymères blocs PS_m-P4VP_n utilisés

Échantillons $PS_m-b-P4VP_n$	(\overline{M}_n) de P4VP (g/mol)	(\overline{M}_n) de PS (g/mol)	(\overline{M}_n) total (g/mol)	Indice de polydispersité*
P4VP ₁₇₂	18 100	SO	18 100	1,11
PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁	19 000	20 000	39 000	1,09
PS ₁₉₂ -P4VPQ ₁₈₁	44 650	20 000	64 650	SO
PS ₃₉₉ -P4VP ₁₆₆	17 500	41 500	59 000	1,07
PS ₃₉₉ -P4VPQ ₁₆₆	41 125	41 500	82 625	SO
PS ₃₂ -P4VP ₁₇₈	18 700	3 300	22 000	1,14

SO : sans objet

(\overline{M}_n) : masse moléculaire moyenne en nombre (g/mol)

* Les indices de polydispersité ont été obtenus du fournisseur Polymer Source Inc.

Pour chacun des six copolymères, des solutions de 1 mg/mL ont été préparées à l'aide de chloroforme anhydre (Sigma-Aldrich, On) dans des fioles fermées de 25 mL et conservées à 4°C.

2.1.2 Préparation des surfaces

Des surfaces de mica (S & J Trading, NY, USA) mesurant 2,5 cm X 7,5 cm fraîchement clivées, ont été silanisées par greffage covalent d'organosilanes, provenant de l'octadécyltrichlorosilane (OTS) (Sigma-Aldrich, On) afin de les rendre hydrophobes (**Figure 21**). Ces surfaces ont d'abord été immergées dans une solution réactionnelle composée de toluène et d'OTS, concentrée à 0,90 mM pendant 24 heures, à un taux d'humidité inférieur à 5 % et à température ambiante. Par la suite, les surfaces ont été lavées durant cinq à six heures dans des soxhlets contenant du chloroforme. Le principe général de la silanisation est basé sur l'hydrolyse du groupement SiCl_3 issue de la solution d'OTS, créant une liaison covalente entre les silanes et l'oxygène de la surface de mica (Si-O-Si). Cette réticulation permet d'obtenir une surface hydrophobe, puisque les chaînes alkyles (R) sont orientées vers l'extérieur.

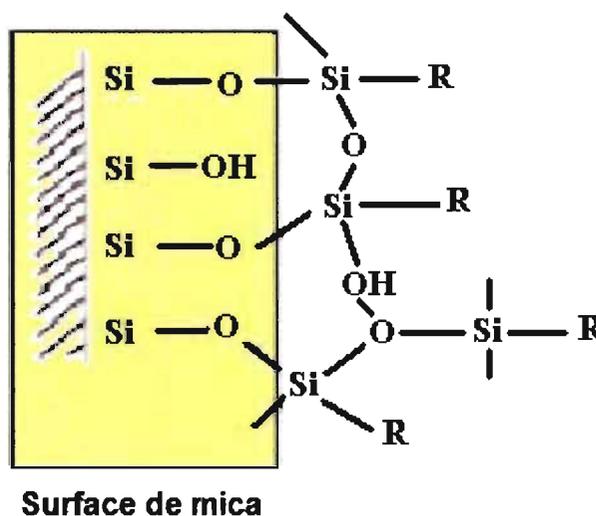


Figure 21 : Organisation chimique d'une surface de mica silanisée

L'efficacité de la silanisation a été vérifiée par des mesures d'angles de contact avec de l'eau à l'aide d'un goniomètre FTA200 de la compagnie First Ten Ångströms (Portsmouth, CB). Un angle de contact supérieur à 90° signifie que la surface est hydrophobe.

2.1.3 Les isothermes

Des isothermes ont été générées à température ambiante à l'aide d'un bain Langmuir-Blodgett (LB) KSV 2000 (**Figure 22**) de la compagnie KSV Instruments Ltd. (Helsinki, Finlande). La pression de surface est calculée par une plaque de Wilhelmy faite de platine, reliée à une microbalance électronique ayant une sensibilité de $\pm 4 \times 10^{-3}$ mN/m.

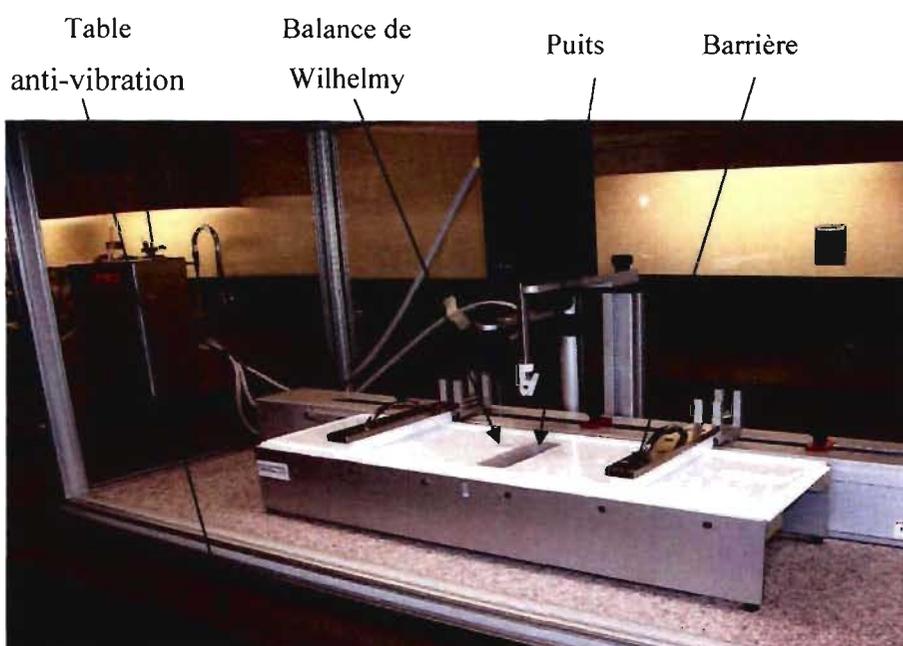


Figure 22 : Bain Langmuir-Blodgett KSV 2000

Avant chaque utilisation, tout l'équipement du bain a été nettoyé trois fois au méthanol de grade ACS spectrophotométrique (Sigma-Aldrich, On.). Puis, la cuve du bain a été remplie d'eau ultra-pure (18,2 M Ω ·cm, Milli-Q Easypure). Pour s'assurer de la propreté de la sous-phase aqueuse, une isotherme sans aucun dépôt a d'abord été enregistré pour vérifier si la pression de surface (Π) était inférieure à 0,1 mN/m. Une fois cette valeur obtenue, une quantité variable des solutions (25 μ L à 200 μ L, selon le copolymère) a été déposée goutte à goutte sur la nappe d'eau à l'aide d'une microseringue Hamilton (Chromatographic Specialities Inc., Brockville, On.). Afin de laisser

le solvant s'évaporer, un temps d'attente d'environ 30 minutes a été requis pour permettre la dispersion uniforme des diblocs à l'interface air-eau. La monocouche a été ensuite comprimée symétriquement à une vitesse constante de 5 mm/min. Toutes les isothermes furent répétées trois fois de manière à vérifier leur reproductibilité.

L'enregistrement des isothermes pour chacun des copolymères a ainsi permis de sélectionner différentes pressions de surface qui serviront à la prochaine étape, soit la déposition de la monocouche sur le substrat.

2.1.4 Déposition du film LB

Une fois les pressions de transferts déterminées pour chacun des copolymères, la monocouche a pu être transférée à ces différentes densités de recouvrement sur les surfaces de mica silanisées.

Comme pour l'isotherme, un blanc avec seulement de l'eau ultra-pure a d'abord été effectué en vue de s'assurer de la propreté de la sous-phase. Avant le dépôt de la solution, trois surfaces de mica silanisées ont été placées côte à côte sur le support conçu à cet effet à quelques millimètres de la nappe de l'eau. Dépendamment des copolymères et de la pression de transfert, une certaine quantité de solution a ensuite été déposée délicatement sur la nappe d'eau. Après environ 30 minutes d'attente, la compression de la monocouche a été effectuée à une vitesse constante de 5 mm/min jusqu'à la pression de surface sélectionnée. Une fois cette pression atteinte, la monocouche a été transférée sur les trois substrats de mica silanisés à une vitesse constante de 1 mm/min ou de 3 mm/min selon la nature de la solution ainsi que de la pression de déposition. Une fois le transfert terminé, la nappe d'eau a été nettoyée jusqu'à l'obtention d'une pression de surface inférieure à 0,1 mN/m après avoir remis à zéro la balance de Wilhelmy. Les surfaces ont alors pu être retirées du bain pour être conservées à 4°C dans un contenant fermé. Pour les mêmes paramètres, l'expérience a été répétée trois fois pour recueillir 9 surfaces identiques nécessaires aux manipulations subséquentes.

2.2 Caractérisation des propriétés physico-chimiques des surfaces polymères

2.2.1 Mesures d'angles de contact sur les surfaces modifiées

Afin de caractériser les surfaces modifiées, des mesures d'angle de contact ont été effectuées sur les différentes surfaces à l'aide d'un goniomètre FTA200 de la compagnie First Ten Ångstroms (Portsmouth, CB). Trois seringues étanches de 50 mL (Chromatographic Specialities Inc., On) ont été utilisées pour déposer une goutte (1 μL) des différents agents mouillants : eau ultra-pure (18,2 $\text{M}\Omega\text{-cm}$), formamide et α -bromonaphtalène (Sigma-Aldrich, On.). Les caractéristiques de tension de surface pour ces trois liquides sont présentées dans le **Tableau II** (Mykhaylyk *et al.*, 2003). Les angles de contact ont été déterminés entre 1 à 3 secondes après le dépôt de la goutte. Cinq mesures ont été prises sur chacune des surfaces pour s'assurer de l'uniformité des résultats.

Tableau II : Caractéristiques de tension de surface des liquides utilisés pour les mesures d'angle de contact

Liquides	γ_L	γ_L^d	γ_L^p	γ_L^{p+}	γ_L^{p-}
Eau	72,8	21,8	51,0	25,5	25,5
Formamide	58,0	39,0	19,0	2,28	39,6
α-Bromonaphtalène	44,6	44,6	0	0	0

(Mykhaylyk *et al.*, 2003)

γ_L : Tension interfaciale totale (mJ/m^2)

γ_L^d : Composante de dispersion Lifshitz-van der Waals (mJ/m^2)

γ_L^p : Composante polaire (mJ/m^2)

γ_L^{p+} : Composante acide (mJ/m^2)

γ_L^{p-} : Composante basique (mJ/m^2)

2.2.2 Observation de la topographie des surfaces modifiées par AFM

Les observations au microscope à force atomique ont été réalisées à l'aide d'un AFM Nanoscope IIIa multimode (Digital Instruments, NY, USA) et du logiciel d'analyse version 5.12b49.

Certaines surfaces modifiées ont été choisies afin de visualiser la topographie des copolymères transférés à différentes pressions. Les images de ces surfaces ont été acquises en mode 'tapping' à l'aide d'un microlevier en silicone de 125 μm de longueur, possédant une constante de force (K) de 42 N/m (NCHR, Nanoworld AG). Quelques-unes de ces surfaces ont été irradiées à 10 kGy dans le but de vérifier l'effet de l'irradiation sur l'organisation moléculaire des copolymères transférés.

2.3 Adsorption protéique sur les surfaces modifiées

2.3.1 Quantification de l'adsorption de BSA par la méthode Pierce BCA

La méthode de Pierce BCA est basée sur la réduction du cuivre ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$) par les protéines. La quantité d'ions Cu^+ est ensuite détectée par l'ajout de l'acide bicinchoninique (BCA) formant un complexe hydrosoluble coloré qui possède une forte absorbance à 562 nm.

Les surfaces de mica silanisées modifiées ont d'abord été découpées de manière précise pour former des coupons de 0,5 cm x 2,5 cm. Trois coupons issus de la même surface ont été placés dans des fioles de 25 mL.

Une solution d'albumine sérique bovine (BSA, MW = 66 KDa; Sigma-Aldrich, On) concentrée à 1 mg/mL a été préparée à base d'une solution de NaCl 0,9 %. Pour chacune des fioles contenant les surfaces, 10 mL de BSA ont été ajoutés pour 24 heures d'incubation à température ambiante. Différents témoins ont été produits : des surfaces non modifiées avec du NaCl 0,9 %, des surfaces non modifiées avec du BSA et des surfaces modifiées avec du NaCl 0,9 %. Suite à cette mise en contact, les surfaces ont été rincées trois fois au NaCl 0,9 % dans des fioles propres dans le but de se débarrasser des protéines non adsorbées. Par la suite, les surfaces ont été placées dans des mini-fioles de 1,2 mL dans lesquelles 800 μL de réactif BCA (50 mL du réactif A pour 1 mL du réactif B) ont été ajoutés. Un standard de BSA préparé pour des concentrations variant entre 0 $\mu\text{g/mL}$ et 300 $\mu\text{g/mL}$ a également été mis en contact avec le réactif. Des blancs de réactif ont aussi été conservés pour vérifier sa pureté. La réaction a été produite à la température de la pièce pour une période de 24 heures à l'abri de la lumière. Puis, 300 μL de chacune des fioles (standard, réactif, témoins et échantillons) ont été placés, en duplicata, dans un puits d'une microplaque de 96 puits. L'absorbance des solutions a ensuite été mesurée à une longueur d'onde de 562 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques Power Wave X (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA).

2.3.2 Quantification de l'adsorption des protéines du milieu de culture TSB par la méthode Pierce BCA

En plus de vérifier l'adsorption de BSA sur les surfaces modifiées, une quantification de l'adsorption des protéines présentent dans le milieu de culture TSB (Tryptic Soy Broth; Difco Laboratories, Détroit, USA) a aussi été effectuées pour certaines surfaces modifiées.

Les surfaces mesurant 1 cm x 2,5 cm, ont d'abord été immergées dans du TSB (30 mg/mL) pendant 24 heures dans un bioréacteur (BST Model SC60 Suspend Reactor, BioSurface Technologies Corporation, Bozeman, Mt, USA) à la température ambiante sous faible agitation. Après cette période d'incubation, les surfaces ont été découpées précisément en coupons de 0,5 cm x 2,5 cm. Trois coupons provenant de la même surface ont été déposés dans des fioles de 25 mL afin d'être lavés trois fois avec du NaCl 0,9 % pour éliminer les protéines non adsorbées. Une fois placées dans les mini-fioles, 800 µL de réactif BCA (50 mL du réactif A pour 1 mL du réactif B) sont ensuite ajoutés à chacun des échantillons. Cette réaction de détection protéique a été effectuée à la température de la pièce durant 24 heures à l'abri de la lumière. Pour quantifier la présence de protéines sur les surfaces, 300 µL provenant de chacune des fioles ont été placés, en duplicata, dans un puits d'une microplaque. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 562 nm avec le même appareil utilisé précédemment pour la quantification de BSA. Une courbe de calibration pour TSB a été obtenue pour des concentrations allant de 0 µg/mL à 300 µg/mL.

2.4 Adhésion microbienne sur les surfaces modifiées

2.4.1 Souches bactériennes et milieux de culture

Deux souches bactériennes ont été sélectionnées pour cette étude : *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150 provenant de fèces humaines et *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 issu de tissu animal. Ces souches, conservées à -70°C dans du TSB contenant 20% de glycérol (Difco Laboratories, Détroit, USA), ont été mises en culture (1 % v/v) dans 10 mL de TSB (*Escherichia coli*) ou de BHI (*Listeria monocytogenes*) pour ensuite être incubées à 37°C pendant 24 heures. La croissance bactérienne a été effectuée dans 600 mL de TSB ou de BHI inoculé (1 % v/v) à partir de la souche fraîche. L'étude de l'adhésion microbienne en phase exponentielle a été choisie, puisque durant cette phase, les microorganismes sont au maximum de leur croissance et de leur prolifération alors qu'en phase stationnaire, les capacités d'adhérence des bactéries sont davantage réduites. Étant donné que cette étude porte sur l'attachement initial des bactéries aux surfaces, il est donc essentiel qu'elles soient au summum de leur forme. Un compte viable a été effectué sur TSA (Tryptic Soy Agar; Difco Laboratories, Détroit, USA) à partir des cultures bactériennes avant la mise en contact avec les surfaces modifiées. Les comptes totaux moyens étaient de $2,8 \times 10^7 \pm 4,1 \times 10^6$ UFC/mL pour *Escherichia coli* et de $9,1 \times 10^6 \pm 9,8 \times 10^5$ UFC/mL pour *Listeria monocytogenes*.

2.4.2 Contamination des surfaces modifiées

La contamination des surfaces a été effectuée dans un bioréacteur stérile à six tiges (BST Model SC60 Suspend Reactor, BioSurface Technologies Corporation, Bozeman, USA).

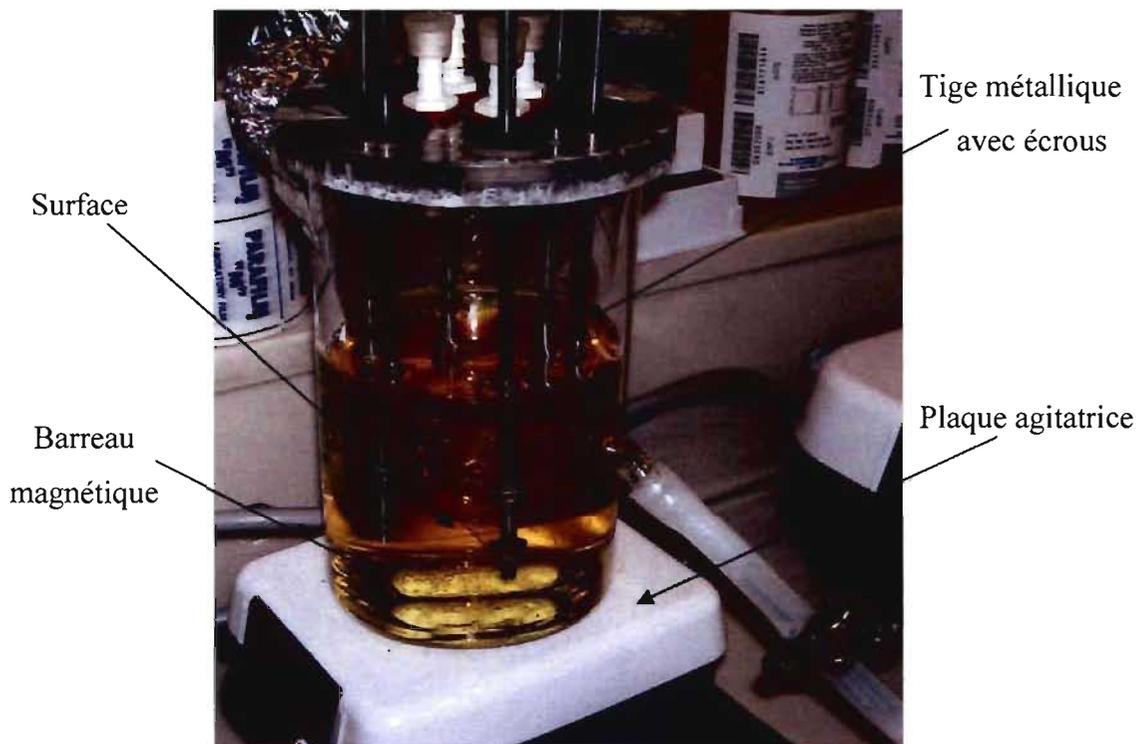


Figure 23 : Illustration d'un bioréacteur utilisé lors des tests d'adhésion microbienne

Les surfaces ont d'abord été stérilisées à 10,0 KGy par irradiation au cobalt-60 avec un irradiateur pilote (Nordion, Canada) à un débit de 6,93 KGy/heure. Par la suite, elles ont été installées entre deux écrous en acier inoxydable sur les tiges de métal par nombre de deux (12 surfaces par bioréacteur) à l'aide de gants et de pinces stériles sous une hotte à flux laminaire. Les cultures bactériennes ont été transférées dans les bioréacteurs dans lesquels se trouvaient les surfaces afin d'être incubées à 25°C pendant 24 heures sous faible agitation (90 rpm). Chaque expérience a été répétée trois fois.

2.4.3 Quantification de l'adhésion microbienne

Après 24 heures d'incubation, les surfaces ont été récupérées à l'aide de pinces stériles sous une hotte à flux laminaire. Elles ont été rincées deux fois dans des tubes contenant 10 mL d'eau peptonée stérile en retournant délicatement les tubes afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Une fois rincées, elles ont été déposées dans des tubes renfermant des billes de verre et 10 mL d'eau peptonée, pour ensuite être placées dans une cuve à ultrasons (VWR International Inc., West Chester, PA, USA) durant 10 minutes afin de décrocher les cellules bactériennes adhérentes tel que mentionné dans la littérature (Lindsay et Von Holy, 1997). Par la suite, les tubes ont été agités au vortex durant 1 minute avant de procéder aux diverses dilutions nécessaires aux dénombrements bactériens sur TSA. Un compte viable des cultures bactériennes incubées 24 heures a aussi été dénombré sur TSA. Les comptes totaux pour les deux types de bactéries étaient situés entre $7,8 \times 10^8$ UFC/mL et $9,8 \times 10^8$ UFC/mL.

2.4.4 Analyses statistiques

Les données ont été analysées avec la procédure GLM du logiciel SAS Version 9.1 (2007 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Une analyse de variance multifactorielle a d'abord été effectuée pour les deux microorganismes dans le but de déterminer s'il existait une interaction significative entre l'adhésion bactérienne et certains facteurs (copolymère, quaternisation, pression). Si c'était le cas, une seconde analyse de variance a été réalisée, mais de manière plus précise en ciblant les interactions significatives. De plus, un test de comparaison multiple de Duncan a servi à déterminer à quel niveau exactement se retrouvaient les différences significatives. Un intervalle de confiance de 95 % a été choisi pour ces analyses.

2.4.5 Mesure des forces d'adhésion entre les microorganismes et les surfaces par AFM

La quantification des forces latérales d'adhésion des microorganismes sur certaines surfaces modifiées a été effectuée à l'aide d'un AFM Nanoscope IIIa multimode (Digital Instruments, USA) par mode contact en milieu liquide (eau peptonée). Puisque le laboratoire (Université McGill, Montréal) dans lequel se trouvait l'AFM était de niveau de biosécurité I, les surfaces contaminées ont d'abord été irradiées à 10 KGy afin de tuer les microorganismes. Deux types de microleviers en silicone ont été utilisés pour mesurer les forces d'adhésion des bactéries : le premier, pour *L. monocytogenes*, d'une longueur de 196 μm avec une constante de force (K) de 0,06 N/m et le deuxième, pour *E. coli*, mesurant 115 μm avec une K de 0,32 N/m (NP, Veeco Instruments Inc., USA). L'utilisation de deux microleviers différents est due à une importante différence de force d'adhésion observée entre les deux microorganismes. Le microlevier ayant une constance de force de 0,06 N/m n'était pas suffisamment puissant pour détacher les cellules d'*Escherichia coli* adhérentes sur les surfaces testées, d'où l'usage d'un microlevier plus court et donc plus rigide.

Dans la littérature, il est fortement suggéré de calculer la constante de force exacte pour chacun des microleviers utilisés, puisque plusieurs auteurs ont observé une importante variabilité entre les microleviers, principalement ceux provenant de différents lots (Radmacher *et al.*, 1994). Comme le but de notre étude consiste à comparer de façon relative des forces d'adhésion de bactéries sur différentes surfaces modifiées, nous avons pu utiliser la valeur des constantes de force fournie par la compagnie, soit 0,06 N/m ou 0,32 N/m. De plus, la variabilité entre les constantes de force des microleviers est négligeable comparativement à celle des forces d'adhésion. La fréquence de résonance de chacune des pointes utilisées a été mesurée au début de chaque expérience afin de vérifier l'état de ces dernières. Par ailleurs, une courbe de calibration de la force d'adhésion en fonction du point de déflexion du microlevier a été générée chaque fois que le microlevier a été engagé sur l'échantillon. C'est grâce à cette courbe que les valeurs de force d'adhésion des cellules bactériennes ont pu être déterminées précisément.

La procédure à suivre pour mesurer la force latérale d'adhésion d'une bactérie, débute d'abord par l'engagement de la pointe sur une petite surface de l'échantillon (400 nm^2) avec une force minimale pour éviter d'endommager la surface. Ensuite, l'échantillon est scanné sur des dimensions de $40 \text{ }\mu\text{m} \times 40 \text{ }\mu\text{m}$ avec une force minimale dans le but de localiser les cellules bactériennes isolées. Lorsqu'une bactérie isolée a été localisée, la taille du scanneur a été ajustée en fonction de la grosseur de la cellule afin que le microlevier puisse scanner la cellule tout en augmentant sa force jusqu'au détachement complet de celle-ci. La force d'adhésion a ensuite été calculée à l'aide de la courbe de calibration de la force en fonction du point de déflexion du microlevier.

Afin de vérifier si l'irradiation modifiait la force d'adhésion des bactéries, une surface modifiée a été contaminée avec une bactérie *Escherichia coli* ATCC 700728 non pathogène sans subir d'irradiation. La force d'adhésion de cette bactérie a été comparée à celle d'une bactérie *Escherichia coli* pathogène adhérente sur la même surface modifiée, mais ayant été irradiée à $10,0 \text{ KGy}$ avant l'observation à l'AFM.

Étant donné que les bactéries n'occupent pas la même surface de contact sur les différents substrats, les résultats de la force d'adhésion (nN) ont été analysés en fonction d'unité d'aire (μm^2). L'aire occupée par chacune des bactéries adhérentes a été déterminée à l'aide du logiciel Image-Pro Plus, version 4.5.1 (Media cybernetics Inc., MD, USA). Ce même logiciel a aussi permis d'estimer le pourcentage d'occupation des domaines présents sur les surfaces silanisées.

2.5 Imagerie des surfaces et des bactéries

2.5.1 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Différentes surfaces contaminées ont été sélectionnées pour l'observation au microscope électronique à balayage (5 Kv) à l'aide d'un appareil de modèle S3000N (Hitachi, Tokyo, Japon).

Les surfaces ont d'abord été rincées 2 fois dans un tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,3 pendant 1 minute. Par la suite, les échantillons ont été fixés pendant 1h30 dans du glutaraldéhyde 2,5 %, puis rincés 4 fois pendant 10 minutes avec le tampon cacodylate. La déshydratation a été effectuée dans de l'éthanol à des concentrations croissantes (30 %, 50 %, 70 %, 80 % et 100 %) pendant 10 minutes pour chacune d'elles. L'étape de point critique de séchage n'a pas été fait afin d'éviter tout lessivage des copolymères transférés sur les surfaces. Les échantillons ont été montés sur une plate-forme d'aluminium pour ensuite être recouverts d'une couche de 10 nm d'or à l'aide d'un pulvérisateur cathodique (modèle 108auto, Cressington, USA). L'observation des surfaces a été effectuée à plusieurs grossissements.

Pour certains échantillons, la déshydratation à l'alcool n'a pas été réalisée, puisque la présence de peu de bactéries sur les surfaces nous laissait croire que cette étape en était la cause. Ces surfaces ont donc été séchées à l'air ambiant sous une hotte à flux laminaire durant 24 heures pour ensuite être directement recouvertes d'une couche de 10 nm d'or et observées au microscope électronique.

2.5.2 Microscopie à force atomique (AFM)

Des surfaces contaminées ont aussi été observées par AFM (Nanoscope IIIa multimode, Digital Instruments), mais en milieu liquide (eau peptonée) en mode contact dans le but d'imager les bactéries. Pour les raisons mentionnées précédemment, les surfaces ont d'abord été irradiées à 10,0 KGy avant l'observation. Les deux microleviers utilisés sont les mêmes que ceux qui ont permis de mesurer les forces d'adhésion des microorganismes.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Modification de surface par la technique Langmuir-Blodgett

3.1.1 Les isothermes

Pour chacun des copolymères, des isothermes ont été obtenues afin de déterminer les pressions de surface correspondant aux différents régimes de concentration. Ces informations sont nécessaires pour définir les pressions de transferts dans le but d'obtenir des films LB. Les isothermes Π -A de l'homopolymère et des copolymères non quaternisés sont présentées à la **Figure 24** alors qu'à la **Figure 25**, la relation entre la pression (Π) et la concentration de surface (Γ) est illustrée afin de visualiser l'effet du ratio N_S/N_{4VP} sur les changements de régimes.

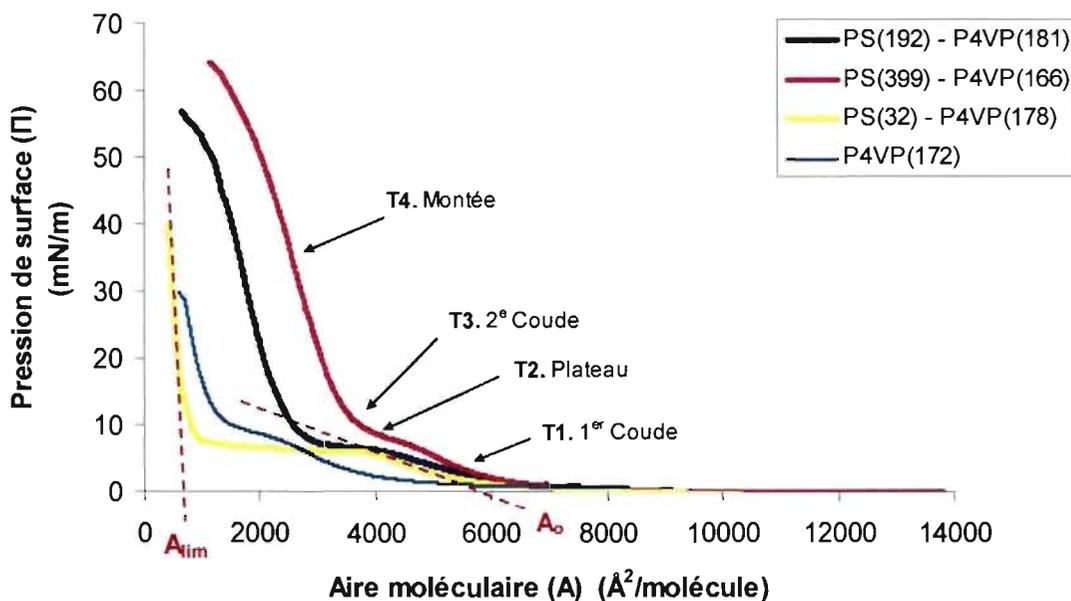


Figure 24 : Isothermes Π -A de l'homopolymère P4VP₁₇₂ et des copolymères PS₁₉₂-P4VP₁₈₁, PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ et PS₃₂-P4VP₁₇₈ à 25°C

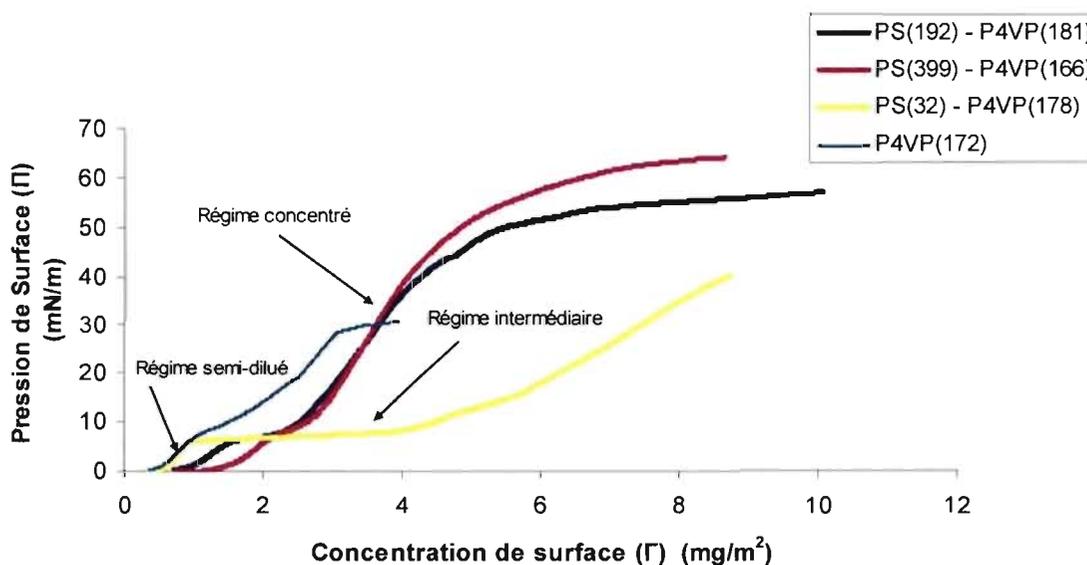


Figure 25 : Isotherme Π - Γ de l'homopolymère et des copolymères non quaternisés

Notons d'abord à la **Figure 24** que l'aire moléculaire à pression nulle (A_0) est similaire pour les trois copolymères non quaternisés ($6\,063 \pm 698 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$). L'homopolymère, quant à lui, occupe une aire A_0 plus petite ($3\,806 \pm 708 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$) (**Tableau III p. 54**). De plus, on remarque que le plateau, soit la concentration de surface à laquelle les chaînes hydrophiles (P4VP) se réorganisent, diffère d'un copolymère à l'autre. PS₃₂-P4VP₁₇₈ présente la phase de transition la plus longue alors que dans le cas du copolymère PS₃₉₉-P4VP₁₆₆, cette transition correspond à un changement d'aire beaucoup plus limité. L'aire limite (A_{lim}), c'est-à-dire l'aire moléculaire correspondant à la taille du bloc PS à pression nulle en régime concentré, varie entre les copolymères. PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ possède l'aire limite la plus élevée, soit environ $3\,680 \pm 133 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, alors que celle de PS₃₂-P4VP₁₇₈ est d'environ $908 \pm 226 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (**Tableau III p. 54**). La **Figure 25** permet de constater que le régime semi-dilué se termine approximativement à la même pression de surface pour tous les copolymères (environ à 5,0 mN/m) alors que la concentration de surface associée à ce changement de régime varie selon le rapport N_S/N_{4VP} du copolymère. Une concentration de surface plus élevée est nécessaire pour entamer le régime intermédiaire pour le dibloc PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ (environ 2 mg/cm²).

Suite à l'obtention de ces isothermes, quatre pressions de surfaces ont été sélectionnées pour chacun des copolymères non quaternisés afin de procéder au transfert du film LB sur les surfaces de mica silanisées pour différents régimes de concentration. Les pressions de transfert présentées au **Tableau IV** (p.57) sont des valeurs moyennes, qui tiennent compte des variations induites par plusieurs facteurs dont la température, les manipulations lors du dépôt, ainsi que le vieillissement des solutions de copolymères.

La **Figure 26** présente les isothermes Π -A obtenues pour les copolymères quaternisés. L'effet de la concentration de surface sur la pression de surface est illustré à la **Figure 27** dans le but de discerner plus précisément les changements de régimes. Le copolymère quaternisé PS₃₂-P4VPQ₁₇₈ n'a pas été utilisé pour cette étude puisqu'il n'était pas stable à l'interface. L'isotherme obtenue suggère qu'il pourrait y avoir formation d'unimicelle lors du dépôt de la solution sur la nappe d'eau (résultats non présentés). Ayant un important bloc hydrophile (P4VPQ) comparé au bloc hydrophobe (PS), les chaînes P4VPQ peuvent entourer les chaînes PS formant une boule de chaînes hydrophiles chargées positivement et possédant une forte affinité pour l'eau. Ainsi, ce dibloc a une structure lui permettant de transiter et d'être stable en sous-phase. Les tentatives de transfert de ce copolymère sur des surfaces de mica silanisées se sont avérées infructueuses.

Tableau III : Caractéristiques des isothermes Π -A (A_0 , A_{lim} , $A_{0\ P4VP}$) de l'homopolymère et des différents copolymères étudiés

	A_0	A_{lim}	$A_{0\ P4VP}^*$
PS₁₉₂-P4VP₁₈₁	6 125 ± 656	2 489 ± 301	3 636 ± 721
PS₃₉₉-P4VP₁₆₆	6 163 ± 112	3 680 ± 133	2 483 ± 173
PS₃₂-P4VP₁₇₈	5 901 ± 211	908 ± 226	4 993 ± 309
P4VP₁₇₂	3 806 ± 708	1 600 ± 325	2 206 ± 779
PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁	SO	710 ± 84	SO
PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆	SO	2 851 ± 313	SO

SO : Sans objet

* $A_{0\ P4VP} = A_0 - A_{lim}$

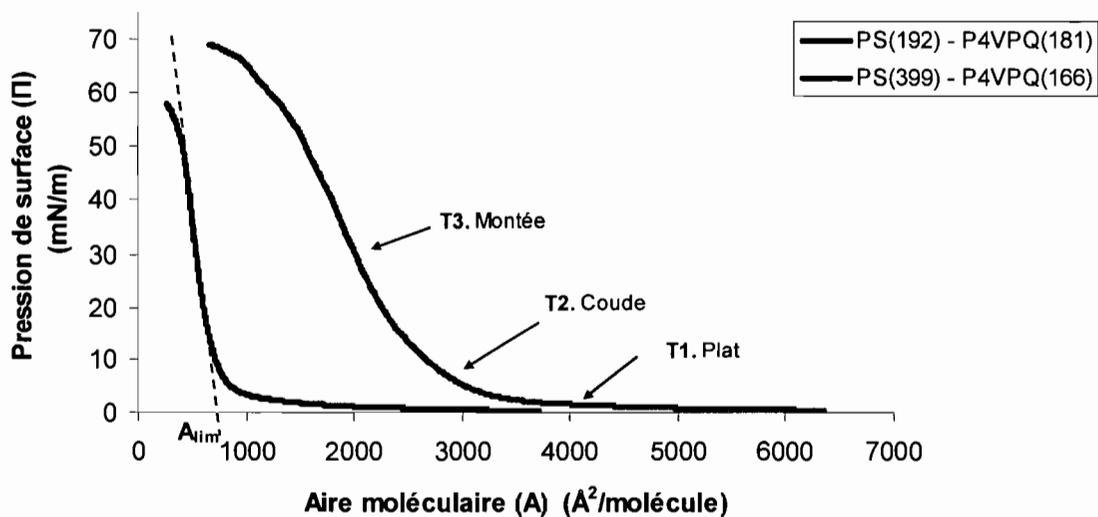


Figure 26 : Isothermes Π -A des copolymères PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁ et PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ à 25°C

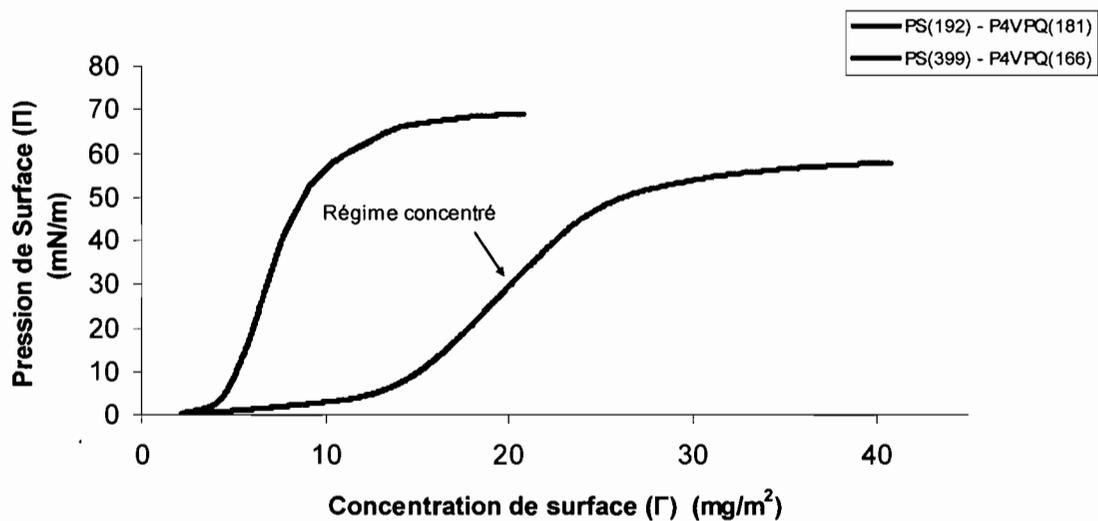


Figure 27 : Isothermes Π - Γ des copolymères quaternisés

On remarque tout d'abord à la **Figure 26** que la quaternisation des chaînes P4VP entraîne la disparition du pseudo-plateau en régime de concentration intermédiaire. Ceci est une indication que le comportement de la chaîne quaternisée est différent de celui de la chaîne non-ionique et que les chaînes quaternisées sont moins actives à l'interface. Les aires limites des copolymères de la **Figure 26** sont plus faibles que les A_{lim} correspondantes de la **Figure 24**, mais celle de PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ ($2\,851 \pm 313$) reste tout de même plus élevée que l' A_{lim} de PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁ (710 ± 84) (**Tableau III p.54**). En comparaison avec les diblocs non-ioniques, le régime concentré des copolymères quaternisés débute à des concentrations de surface plus élevées, ce qui supporte l'hypothèse que les chaînes quaternisées P4VPQ occupent moins d'espace à l'interface étant donné qu'elles ne sont pas en bon solvant ($\nu = 0,56$) comme les chaînes P4VP. Ces résultats pourraient aussi suggérer qu'une partie des chaînes ioniques pénètrent en sous-phase suite au dépôt de la solution à l'interface.

Une fois ces isothermes obtenues, trois pressions de surface ont été sélectionnées, pour chacun des copolymères quaternisés, afin de procéder au transfert de la monocouche. Les valeurs moyennes ont été déterminées à partir de triplicatas (**Tableau IV**).

Tableau IV : Pressions de surface sélectionnées pour les transferts de films LB de différents copolymères

Copolymères	Pressions de transfert (mN/m)
PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁	<u>T1. 1^{er} coude</u> : 2,5 <u>T2. Plateau</u> : 6,3 <u>T3. 2^e coude</u> : 7,5 <u>T4. Montée</u> : 12,0
PS ₃₉₉ -P4VP ₁₆₆	<u>T1. 1^{er} coude</u> : 2,0 <u>T2. Plateau</u> : 7,0 <u>T3. 2^e coude</u> : 8,8 <u>T4. Montée</u> : 12,0
PS ₃₂ -P4VP ₁₇₈	<u>T1. 1^{er} coude</u> : 2,5 <u>T2. Plateau</u> : 6,0 <u>T3. 2^e coude</u> : 7,0 <u>T4. Montée</u> : 10,0
PS ₁₉₂ -P4VPQ ₁₈₁	<u>T1. Plat</u> : 1,5 <u>T2. Coude</u> : 4,0 <u>T3. Montée</u> : 10,0
PS ₃₉₉ -P4VPQ ₁₆₆	<u>T1. Plat</u> : 1,2 <u>T2. Coude</u> : 3,0 <u>T3. Montée</u> : 7,0

3.1.2 Les transferts

Une fois les pressions de surface sélectionnées, des transferts ont été effectués simultanément sur trois surfaces de mica silanisées. Le taux de transfert, soit le rapport entre la réduction de l'aire de la monocouche et l'aire réceptrice de la surface modifiée, nous permet d'évaluer la qualité du transfert (Deschênes, 2005). L'obtention d'un taux de transfert de valeur égale à 1 se traduit par une déposition relativement uniforme. Un taux inférieur à 1, révèle soit une certaine instabilité du système, soit que la surface du substrat n'est pas entièrement recouverte du film LB laissant ainsi certains endroits non modifiés. Un taux supérieur à 1, s'explique par un transfert double couche pour certaines régions de la surface occasionnant ainsi des dépositions non uniformes.

Le **Tableau V** présente uniquement les moyennes des taux de transfert des surfaces modifiées utilisées pour le projet. Les résultats complets des taux de transfert pour chacun des copolymères se trouvent à l'annexe I.

Tableau V : Taux de transfert pour les différentes modifications de surface

Copolymères	Pression de transfert (mN/m)	Taux de transfert
PS₁₉₂-P4VP₁₈₁		
T1	2,5	1,02 ± 0,11
T2	6,3	0,96 ± 0,10
T3	7,5	0,63 ± 0,06
T4	12,0	0,66 ± 0,03
PS₃₉₉-P4VP₁₆₆		
T1	2,0	1,06 ± 0,03
T2	7,0	0,94 ± 0,15
T3	8,8	0,81 ± 0,02
T4	12,0	0,60 ± 0,02
PS₃₂-P4VP₁₇₈		
T1	2,5	1,18 ± 0,01
T2	6,0	1,02 ± 0,18
T3	7,0	0,79 ± 0,01
T4	10,0	0,83 ± 0,04
PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁		
T1	1,5	0,82 ± 0,13
T2	4,0	0,68 ± 0,12
T3	10,0	0,60 ± 0,13
PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆		
T1	1,2	1,08 ± 0,06
T2	3,0	0,62 ± 0,09
T3	7,0	0,64 ± 0,12

La variation du taux de transfert en fonction de la pression de surface est illustrée à la **Figure 28** ci-dessous.

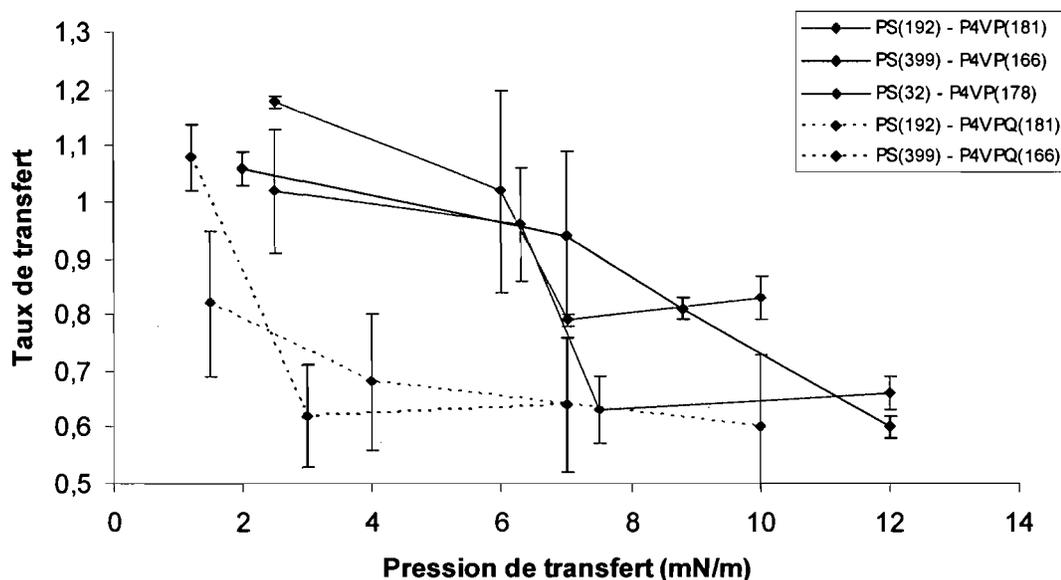


Figure 28 : Effet de la pression de surface sur le taux de transfert pour différents copolymères

Dans l'ensemble, les transferts des copolymères non quaternisés donnent de meilleurs taux à basse pression, soit au niveau du 1^{er} coude (2,0 à 2,5 mN/m) et du plateau (6,0 à 7,0 mN/m). Au-delà de cette pression de surface, les taux de transferts chutent sauf dans le cas du PS₃₂-P4VP₁₇₈ qui semble moins affecté que les copolymères présentant un rapport N_s/N_{4vp} plus important. Le tableau général du comportement de la variance indique que les taux des copolymères ioniques varient beaucoup, peu importe la pression de transfert, alors que ceux des diblocs non quaternisés ont une très faible variation sauf aux pressions correspondants au pseudo-plateau (T2). Pour les copolymères quaternisés la chute des taux de transfert est observée à plus basses pressions de surface, soit aux alentours de 3,0 mN/m. Dans tous les cas, la pression de surface à laquelle le taux de transfert chute correspond à la transition vers le régime concentré.

3.1.3 Les angles de contact des surfaces modifiées

Afin d'examiner l'uniformité des modifications de surfaces et d'estimer leur caractère hydrophobe/hydrophile, des mesures d'angles de contact ont été effectuées à l'aide de trois agents mouillants : eau ultra-pure ($18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$), le formamide et l' α -bromonaphtalène. L'agent le plus hydrophile, soit l'eau, a un petit angle de contact sur une surface hydrophile, alors que l'angle est supérieur à 90° sur une surface hydrophobe. Inversement, l' α -bromonaphtalène, le liquide le plus hydrophobe, démontre qu'une surface est hydrophile si l'angle obtenu est obtus et une surface hydrophobe si l'angle de contact est aigu. Les données d'angles de contact obtenues à l'aide des trois agents mouillants pour chacune des surfaces modifiées sont rapportées à l'annexe II. La **Figure 29** ci-dessous, présente les valeurs des angles de contact avec l'eau en fonction de la pression de transfert.

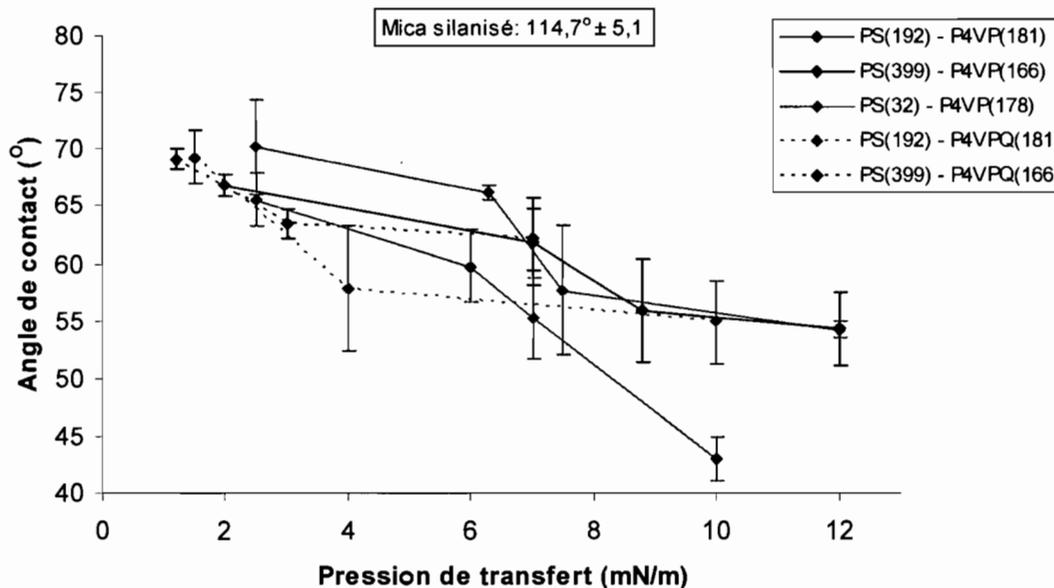


Figure 29 : Effet de la pression de transfert sur les mesures d'angles de contact avec l'eau pour différents copolymères

Peu importe l'agent mouillant et le polymère, on remarque que les angles de contact diminuent à mesure que la pression de transfert augmente. Toutefois, cette corrélation est moins évidente lorsqu'il s'agit des copolymères quaternisés. À partir de la deuxième pression de transfert, soit dans le coude de l'isotherme, la diminution des angles devient beaucoup plus subtile, voir presque nulle. La modification qui semble générer la surface la plus hydrophile est celle avec PS₃₂-P4VP₁₇₈, puisque c'est pour ce copolymère qu'on observe la diminution des angles de contact la plus importante (65° à 43°). Cette relation n'a pas son pendant inverse avec l' α -bromonaphtalène comme agent mouillant. Dans ce dernier cas, les pressions de surface ont moins d'impact sur les taux de transfert. Ceux-ci semblent dépendent principalement de la présence de charges. Puisque ce solvant est hydrophobe, les angles de contact devraient en principe augmenter à mesure que la pression de transfert augmente. Or, on observe plutôt une tendance de diminution des angles de contact à mesure que les surfaces deviennent plus hydrophiles (Annexe II).

3.1.4 Images AFM des surfaces modifiées

L'imagerie AFM des surfaces modifiées a permis d'examiner l'organisation des micelles en fonction de la densité de recouvrement et de la structure des copolymères.

Dans le but de vérifier si le processus de silanisation permettait d'obtenir des surfaces uniformes, une surface de mica non silanisée (**Figure 30 A**) ainsi qu'une surface de mica silanisée (**Figure 30 B**) ont été observées au même grossissement ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m} \times 50\ \text{nm}$).

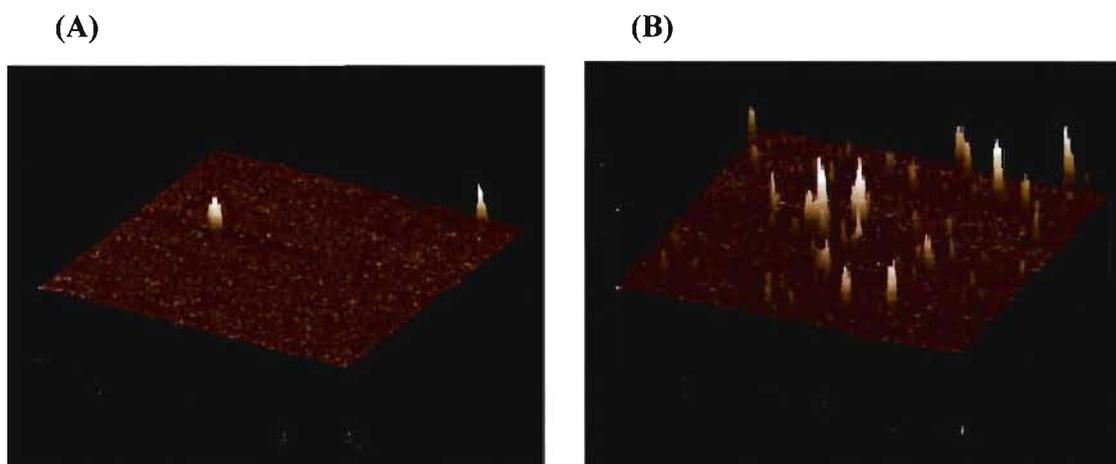


Figure 30 : Images AFM ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) d'une surface non silanisée (A) et silanisée (B)

La surface non silanisée présente une surface très lisse et uniforme, pratiquement exempte de toutes formes de particules. Dans le cas de la surface silanisée, les images révèlent qu'elle est recouverte de plusieurs domaines d'une hauteur moyenne de l'ordre de $35 \pm 10\ \text{nm}$ et d'une largeur d'environ $145 \pm 20\ \text{nm}$. Ces domaines occupent approximativement 3,15 % de la surface de mica. Ces observations sont davantage qualitatives, puisqu'elles donnent une idée de l'uniformité des surfaces suite au processus de silanisation. L'importance de leurs dimensions dépend des dimensions des domaines qui les couvrent.

Différentes surfaces modifiées ont été analysées afin de caractériser l'arrangement des micelles des copolymères transférés. La **Figure 31** montre la topographie des surfaces modifiées avec $\text{PS}_{399}\text{-P4VP}_{166}$ et $\text{PS}_{32}\text{-P4VP}_{178}$ pour différentes pressions de transfert. La hauteur (H) ainsi que le diamètre (D) sont rapportés pour chacun des domaines observés.

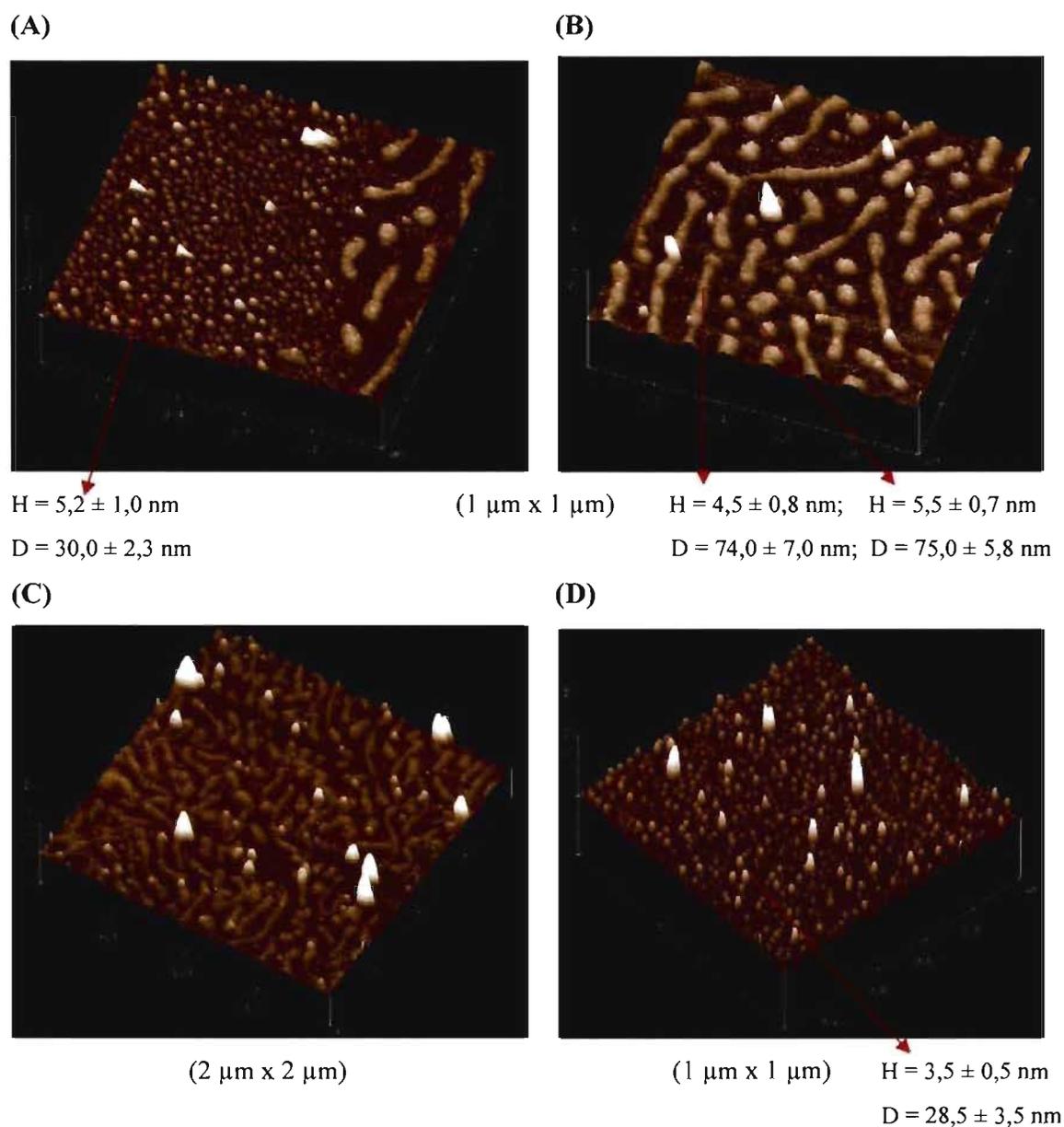


Figure 31 : Images AFM des surfaces modifiées avec les copolymères $\text{PS}_{399}\text{-P4VP}_{166}$ (A à C) et $\text{PS}_{32}\text{-P4VP}_{178}$ (D) à différentes pressions de transfert : 2,0 mN/m (A et B); 8,8 mN/m (C); 2,5 mN/m (D)

Les micelles du copolymère PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ transférées à basse pression (2,0 mN/m), adoptent deux formes différentes : circulaire et bâtonnets. La **Figure 31 B** illustre la prédominance des micelles en bâtonnets côtoyant quelques unes circulaires apparaissant plus grosses que celles de la **Figure 31 A** qui sont beaucoup plus petites ($30,0 \pm 2,3$ nm). La hauteur (H) des domaines est sensiblement la même pour les deux types de micelles alors que le diamètre (D) de celles en bâtonnets est plus important que celui des petites micelles sous forme circulaire de la **Figure 31 A**. Lorsqu'on augmente la pression de transfert (**Figure 31 C**), les micelles se rapprochent les unes des autres occupant ainsi individuellement une aire moléculaire plus petite. On remarque aussi que les micelles circulaires sont pratiquement disparues. De plus, la surface de la **Figure 31 C** présente une partie non recouverte par la monocouche de copolymère. Le dibloc PS₃₂-P4VP₁₇₈ adopte quant à lui, une conformation unique, circulaire (**Figure 31 D**). La hauteur de ces domaines est de $3,5 \pm 0,5$ nm et leur diamètre est de $28,5 \pm 3,5$ nm. Plusieurs observations à l'AFM ont permis de constater que ce copolymère présentait les surfaces les plus uniformes autant pour des basses pressions de surfaces que pour des plus élevées.

L'organisation des micelles du copolymère quaternisé PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ transféré à différentes pressions sur des surfaces de mica silanisées est représentée à la **Figure 32**.

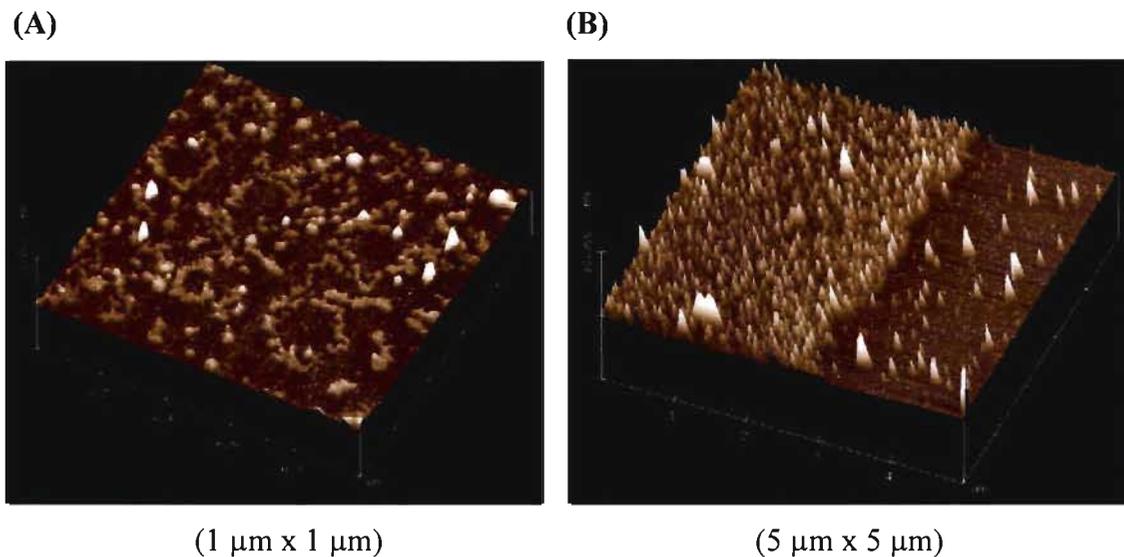


Figure 32 : Images AFM des surfaces modifiées avec PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ à différentes pressions de transfert : 1,2 mN/m (A); 7,0 mN/m (B)

En ce qui a trait au copolymère PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ transféré à basse pression (1,2 mN/m), nous avons constaté la présence d'agrégats de formes variées. On remarque une certaine organisation circulaire constituée d'un assemblage de plusieurs micelles au niveau de leur centre hydrophobe, tout en étant entouré des chaînes P4VPQ (**Figure 32 A**). Lorsqu'on transfère ce même copolymère à plus haute pression (7,0 mN/m), les agrégats sont plutôt uniformes. Cependant, on observe une rupture de la monocouche et une partie de la surface est non recouverte par le copolymère quaternisé (**Figure 32 B**). Les domaines de la **Figure 32 B** ont une hauteur moyenne de $6,0 \pm 1,0$ nm. Aucune analyse AFM n'a été effectuée sur les systèmes PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ et PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁.

3.2 Adsorption protéique sur des surfaces modifiées

3.2.1 Quantification de l'adsorption de la protéine BSA

Dans le but de vérifier l'impact des différentes modifications de surfaces sur l'adsorption protéique, les échantillons modifiés ont été mis en contact pendant 24 heures avec une solution protéique de 1 mg/mL de BSA. Les résultats de l'adsorption protéique en fonction de la pression de transfert sont présentés à la **Figure 33**. Une marge d'erreur moyenne de 9 % a été calculée pour l'ensemble de ces résultats.

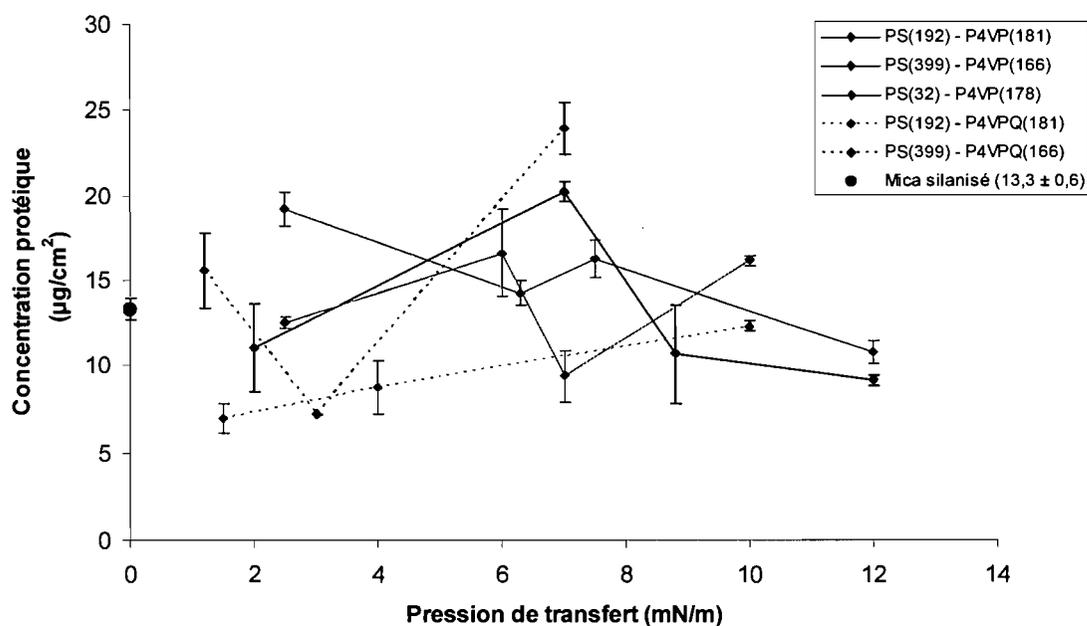


Figure 33 : Effet de la modification de surface sur l'adsorption de BSA

Globalement, la concentration protéique diminue à mesure que la pression de transfert augmente pour le copolymère non quaternisé PS₁₉₂-P4VP₁₈₁. Cette même corrélation est observée pour PS₃₉₉-P4VP₁₆₆, mais seulement pour les pressions de transfert supérieures à 7,0 mN/m, ce qui correspond au début du pseudo-plateau (**Figure 24**). Par contre, on note l'effet inverse pour PS₃₂-P4VP₁₇₈ qui montre une légère augmentation de l'adsorption protéique avec une élévation de pression. Pour les copolymères quaternisés, la concentration protéique a aussi tendance à augmenter à mesure que la densité de recouvrement s'intensifie. Il est cependant intéressant de remarquer qu'il y a une diminution considérable de l'adsorption protéique sur les surfaces modifiées avec PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ à faible densité (entre 1,5 à 3,0 mN/m).

La valeur de la surface témoin (mica silanisé) ($13,3 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), est relativement centrée par rapport à l'ensemble des résultats. Par contre, la concentration protéique sur cette surface est significativement plus élevée ($P < 0,05$) que sur les surfaces modifiées avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ et PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ à haute pression (12,0 mN/m). La quantité de protéines adsorbées est aussi plus élevée ($P < 0,05$) sur la surface témoin que les surfaces sur lesquelles PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁ ainsi que PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ ont été transférés à basse pression (1,5 à 3,0 mN/m). Quant au copolymère PS₃₂-P4VP₁₇₈, il induit une adsorption protéique plus importante à haute pression (10,0 mN/m) comparativement à la surface non modifiée ($P < 0,05$). Enfin, une modification de surface avec PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ à forte pression de transfert (7,0 mN/m) présente une concentration protéique plus élevée ($P < 0,05$) que la surface témoin.

3.2.2 Quantification de l'adsorption des protéines du milieu de culture TSB

Afin d'évaluer l'impact de l'adsorption des protéines présent dans le milieu de culture sur la prévalence de l'adhésion bactérienne, nous avons mis certaines surfaces modifiées dans du TSB pendant 24 heures. La restriction quant à la quantité de surfaces modifiées disponibles, nous a obligés à utiliser une seule surface pour chacun des copolymères. Une comparaison entre l'adsorption de BSA et celle des protéines de TSB pour les mêmes types de surfaces, est illustrée à la **Figure 34**.

La surface témoin est identifiée M.S. (mica silanisé). Toutes les autres surfaces correspondent à une modification avec un type de copolymère pour une pression de transfert précise. Une marge d'erreur d'environ 5 % a été calculée pour l'ensemble des résultats de la concentration des protéines du TSB.

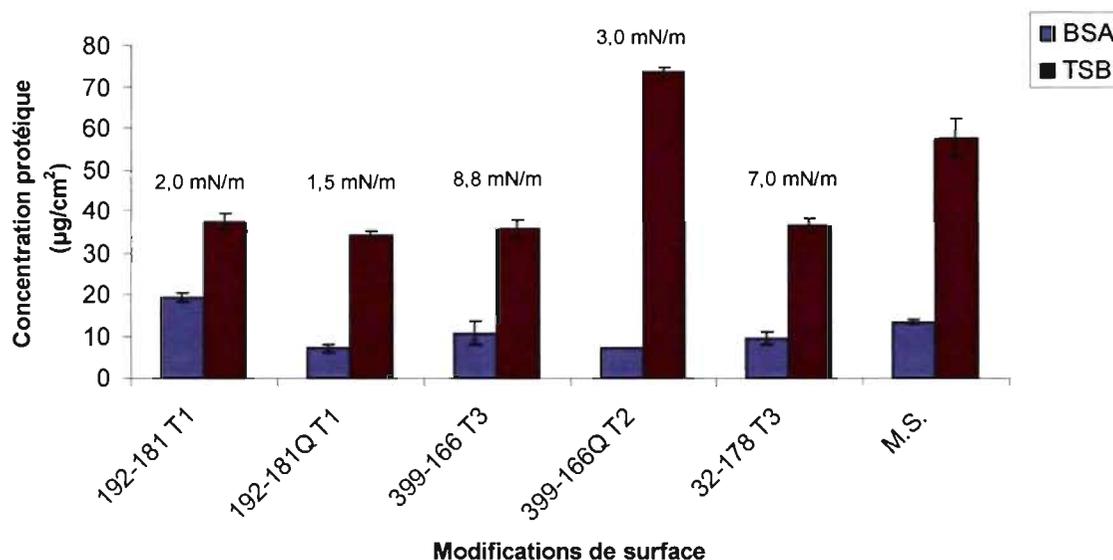


Figure 34 : Comparaison entre l'adsorption protéique de BSA et celle des protéines de TSB pour différentes surfaces modifiées

Les résultats obtenus indiquent que la quantité de protéines du milieu de culture TSB adsorbée sur les différentes surfaces modifiées est beaucoup plus élevée que celle de BSA. Dans le cas de TSB, toutes les surfaces modifiées résistent mieux à l'adsorption que le contrôle, sauf la surface modifiée avec PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ à 3,0 mN/m qui présente une plus forte adsorption protéique de TSB (**Figure 34**). Quant à BSA, l'adsorption protéique est significativement moins élevée sur les surfaces modifiées avec les copolymères quaternisés. Une plus grande variation de la quantité de BSA est observée pour les diblocs non ioniques puisque PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ transféré à basse pression permet une meilleure adsorption, alors que PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ et PS₃₂-P4VP₁₇₈ transférés à haute pression ne semblent pas affecter la quantité de BSA adsorbée.

3.3 Adhésion microbienne sur des surfaces modifiées

3.3.1 Quantification de l'adhésion d'*Escherichia coli* et de *Listeria monocytogenes*

Les surfaces modifiées, ont été mises en contact avec deux bactéries différentes pendant 24 heures dont une à Gram négatif, *Escherichia coli* et une autre à Gram positif, *Listeria monocytogenes*. Un dénombrement a ensuite été effectué dans le but d'évaluer l'efficacité des modifications de surfaces sur l'adhésion de ces bactéries. Les résultats de la quantification de l'adhésion bactérienne en fonction de la pression de transfert pour les divers copolymères, sont rapportés dans les **Figures 35** et **37**. En raison d'un manque de disponibilité de surfaces, l'adhésion microbienne n'a pas été analysée sur une surface modifiée avec PS₃₂-P4VP₁₇₈ transféré à basse pression (2,5 mN/m). L'adhésion des microorganismes a aussi été analysée en fonction de l'adsorption protéique de BSA pour chacune des modifications de surfaces. Seules les courbes de tendance sont présentées aux **Figures 36** et **38**.

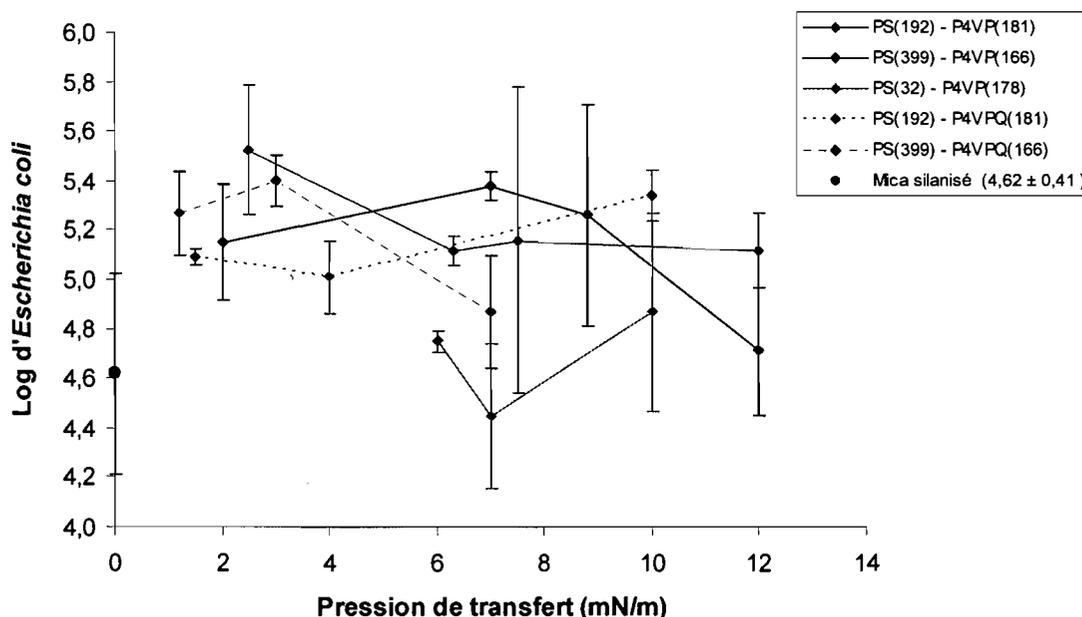


Figure 35 : Effet des modifications de surface sur l'adhésion d'*Escherichia coli*

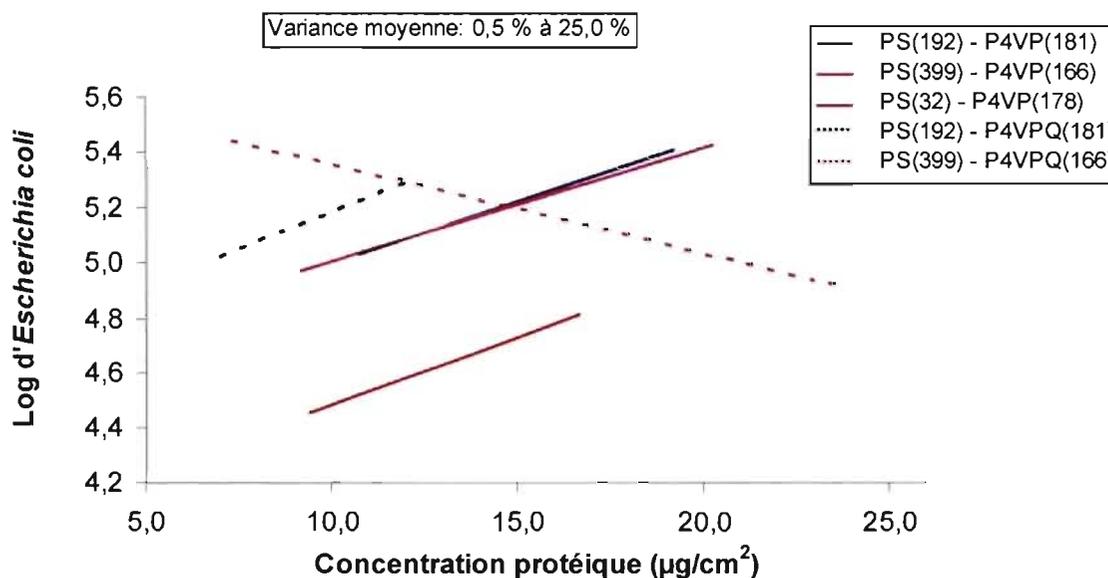


Figure 36 : Courbes de tendance de l'adhésion d'*Escherichia coli* en fonction de l'adsorption protéique de BSA

En premier lieu, il est important de noter que les barres d'erreurs de la **Figure 35** sont considérables, surtout à des pressions plus élevées, ce qui rend l'interprétation des résultats difficile. Une marge d'erreur variant entre 0,5 % et 12,0 % a été calculée pour l'ensemble des résultats du log de la concentration de *E. coli* (**Figure 35**).

La relation entre l'adhésion de *E. coli* et la pression de transfert pour les surfaces modifiées avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁, est semblable à celle de l'adsorption protéique (**Figure 33**), soit une tendance de diminution de l'adhésion avec une élévation de pression. Cependant, les valeurs de la concentration microbienne pour cette modification de surface ne sont pas significativement différentes les unes des autres, ce qui ne permet pas d'établir un lien entre l'adhésion de *E. coli* et la pression de transfert. Pour ces mêmes surfaces, on observe une tendance d'accroissement de la concentration microbienne à mesure que l'adsorption protéique de BSA augmente (**Figure 36**). Une courbe presque identique est obtenue pour les surfaces du système PS₃₉₉-P4VP₁₆₆, mais avec une variance moyenne toute aussi importante. Les surfaces modifiées avec PS₃₂-P4VP₁₇₈ révèlent plutôt une tendance d'adhésion légèrement croissante à mesure que la pression de transfert augmente, demeurant tout de même la surface sur laquelle les

bactéries adhèrent le moins comparativement aux autres supports modifiés. La concentration de *E. coli* semble quant à elle proportionnelle à celle de la concentration de BSA pour les surfaces modifiée avec PS₃₂-P4VP₁₇₈. En ce qui concerne les copolymères quaternisés, PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁ montre une tendance d'augmentation de l'adhésion microbienne avec une hausse de pression, relation comparable à celle de l'adsorption protéique. Dans le cas de PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆, on observe plutôt l'effet inverse de l'adsorption protéique, soit une tendance de diminution de l'adhésion de *E. coli* suivant l'augmentation de la pression de transfert. De plus, c'est le seul système qui présente une corrélation négative entre l'adhésion bactérienne et l'adsorption de BSA (**Figure 36**).

Dans l'ensemble, la surface témoin ($4,62 \pm 0,41$) présente moins d'adhésion par rapport aux autres surfaces modifiées, sauf pour PS₃₂-P4VP₁₇₈. L'adhésion de *E. coli* est significativement plus élevée ($P < 0,05$) sur les surfaces modifiées avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ et PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ à faible pression de transfert que sur la surface de mica silanisée. Cette adhésion est aussi plus élevée ($P < 0,05$) pour le système PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁ transféré à haute pression (**Tableau VI**).

Les **Figures 37** et **38** ci-dessous présentent les résultats d'adhésion de *Listeria monocytogenes* en fonction de la pression de transfert et de l'adsorption protéique de BSA.

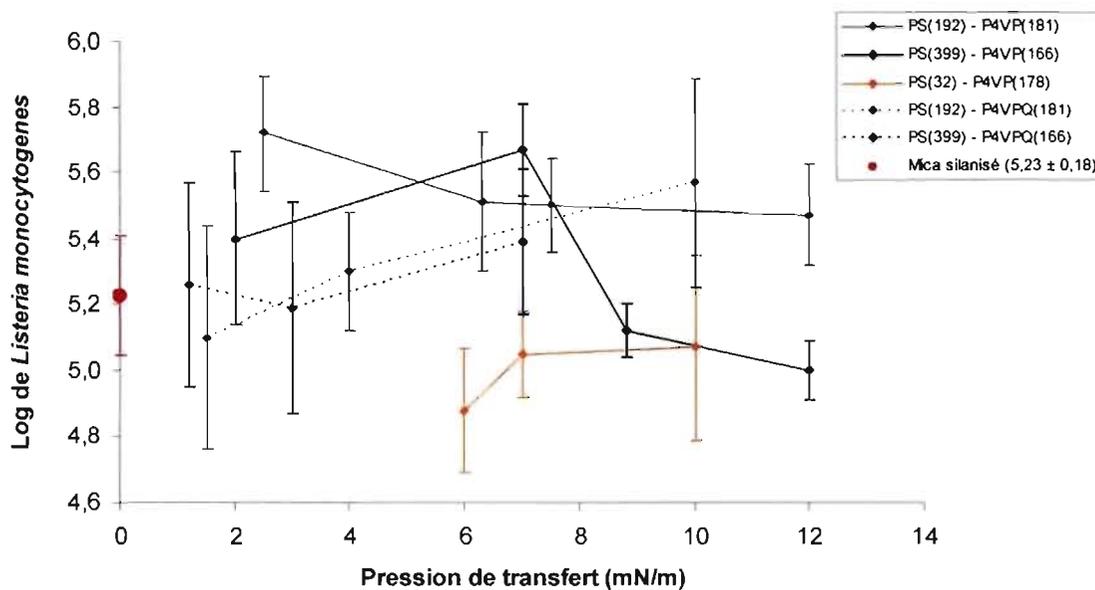


Figure 37 : Effet des modifications de surface sur l'adhésion de *Listeria monocytogenes*

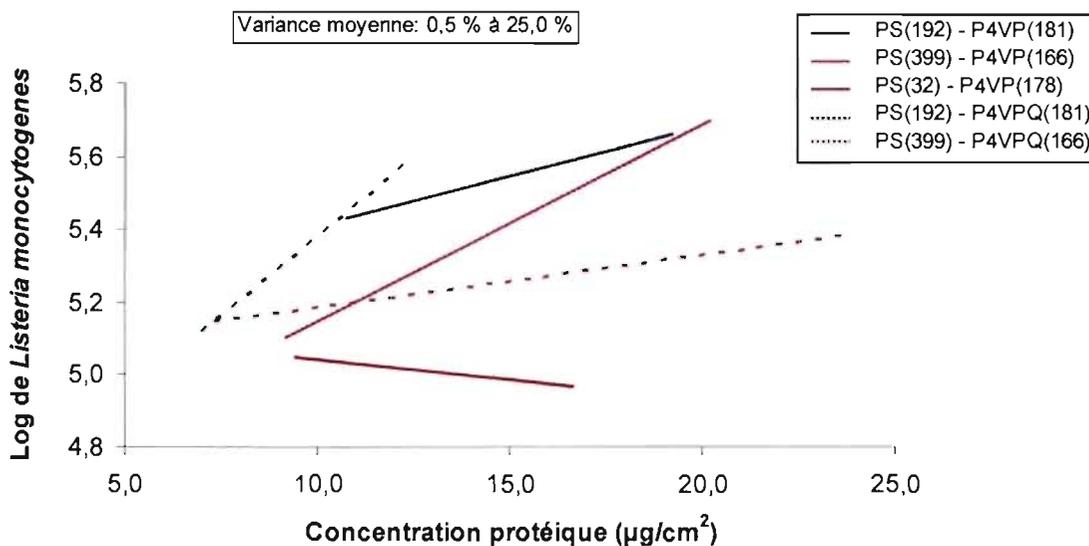


Figure 38 : Courbes de tendance de l'adhésion de *Listeria monocytogenes* en fonction de l'adsorption protéique de BSA

Une marge d'erreur variant entre 1,5 % et 6,5 % a été calculée pour la totalité des résultats d'adhésion de *L. monocytogenes* (**Figure 37**). Tout comme précédemment, la variabilité des mesures est assez importante, ce qui ne permet pas de conclure quant à la relation entre l'adhésion de *L. monocytogenes*, la pression de surface et l'adsorption de BSA.

Les surfaces modifiées avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ présentent une tendance d'attraction moins importante pour l'adhésion de *L. monocytogenes* à mesure que la pression de transfert augmente, tout comme pour l'adhésion de *E. coli* et l'adsorption de BSA. Quant aux surfaces sur lesquelles PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ a été transféré, elles montrent d'abord une tendance d'augmentation de l'adhésion suivie d'une tendance de réduction à plus haute pression. Une relation similaire est observée pour ce même système aux **Figures 33** et **35**. Par ailleurs, un nombre plus élevé de *L. monocytogenes* adhèrent sur les surfaces lorsque la concentration protéique s'accroît pour les systèmes PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ et PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ alors que l'effet inverse est observé dans le cas de PS₃₂-P4VP₁₇₈ (**Figure 38**). Une modification de surface avec PS₃₂-P4VP₁₇₈ montre une tendance de la concentration bactérienne légèrement croissante avec une élévation de la pression. Des résultats semblables ont été enregistrés pour *E. coli* et les protéines, mais la forme de la courbe diffère au niveau du transfert à 7,0 mN/m puisque la quantité de *L. monocytogenes* augmente alors que celle de *E. coli* et BSA diminue. Pour leur part, les copolymères quaternisés présentent une tendance d'adhésion plus importante de la bactérie à Gram positive à mesure que la pression de transfert s'élève. Dans les deux cas, cette corrélation est similaire à l'adsorption de BSA, mais est opposée à celle de l'adhésion de *E. coli* sur les surfaces modifiées avec PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆.

Étant donné que la surface non modifiée est assez centrale ($5,23 \pm 0,18$) par rapport à l'ensemble des valeurs et que la variance est assez importante, peu de différences significatives ont été observées pour l'adhésion de *L. monocytogenes*. Cependant, des modifications de surface avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ et PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ à faible pression, montrent une adhésion plus élevée ($P < 0,05$) que la surface témoin (**Tableau VI**).

Des analyses statistiques ont aussi été réalisées à l'aide des résultats d'adhésion des deux souches bactériennes pour les différentes surfaces modifiées. Le **Tableau VI** présente uniquement les différences significatives au niveau de la concentration microbienne de chacune des modifications de surface versus la surface de référence M.S. (mica silanisé).

Tableau VI : Résultats significatifs des analyses statistiques de la concentration de *E. coli* et de *L. monocytogenes* sur les surfaces modifiées

Modification de surface	Différence significative	Valeur de <i>P</i>
<i>E. coli</i>		
192-181 T1 (2,5 mN/m)	Plus d'adhésion que sur M.S.	0,032
399-166 T2 (7,0 mN/m)	Plus d'adhésion que sur M.S.	0,033
192-181Q T3 (10,0 mN/m)	Plus d'adhésion que sur M.S.	0,042
399-166Q T2 (3,0 mN/m)	Plus d'adhésion que sur M.S.	0,032
<i>L. monocytogenes</i>		
192-181 T1 (2,5 mN/m)	Plus d'adhésion que sur M.S.	0,029
399-166 T2 (7,0 mN/m)	Plus d'adhésion que sur M.S.	0,030

M.S. = Surface de mica silanisée non modifiée

Puisque l'intervalle de confiance a été fixé à 95 %, une différence significative est déterminée lorsque $P < 0,05$.

Dans le but d'observer les bactéries adhérentes et de vérifier leur dispersion sur les surfaces, le microscope électronique à balayage (MEB) ainsi que le microscope à force atomique (AFM) ont été utilisés. Les figures ci-dessous illustrent l'adhésion des deux types de bactéries sur différentes surfaces modifiées.

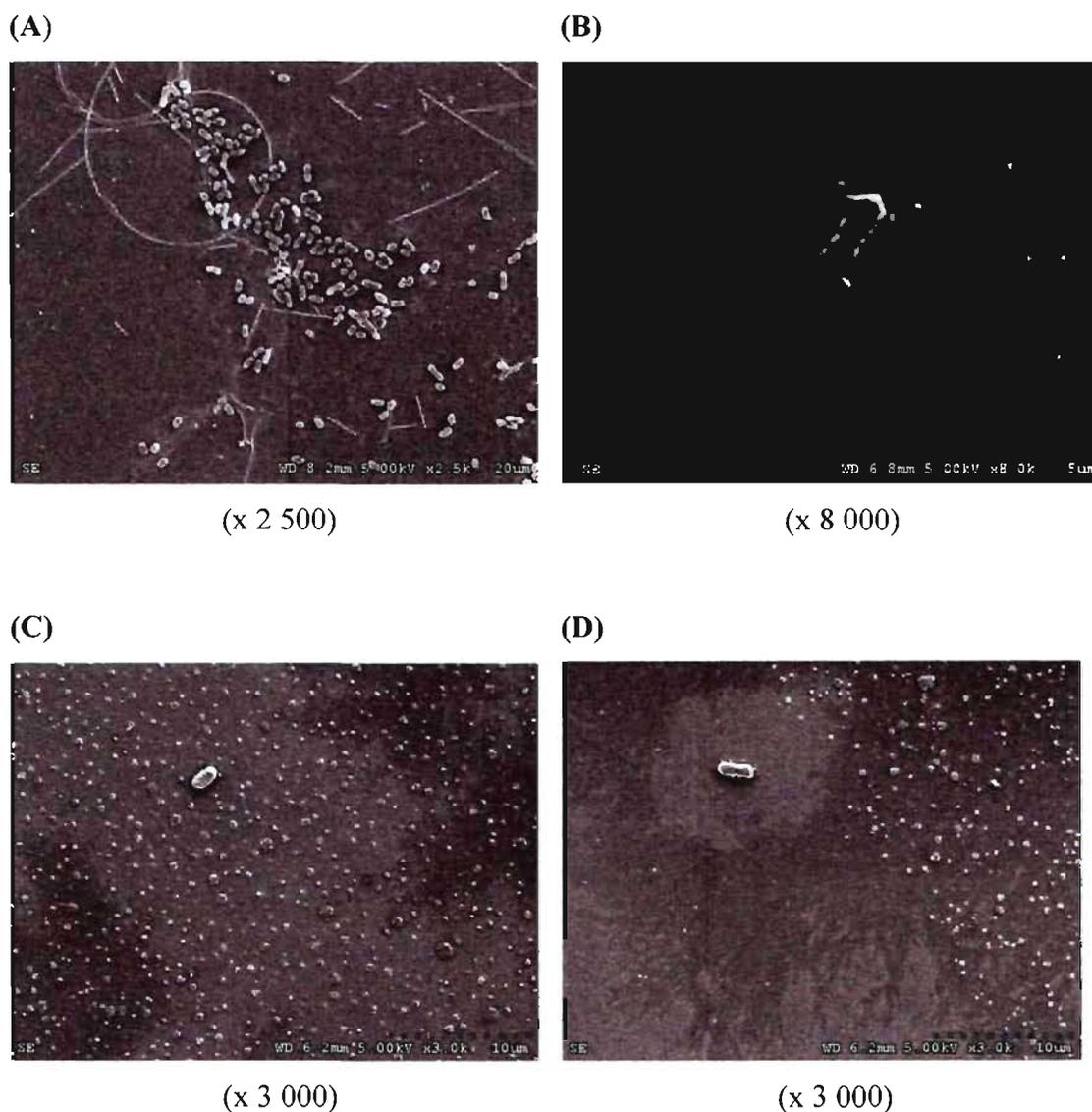


Figure 39 : Attachement de *L. monocytogenes* sur une surface modifiée avec PS₃₂-P4VP₁₇₈ à 6,0 mN/m (A) et de *E. coli* sur une surface modifiée avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ à 6,3 mN/m (B à D)

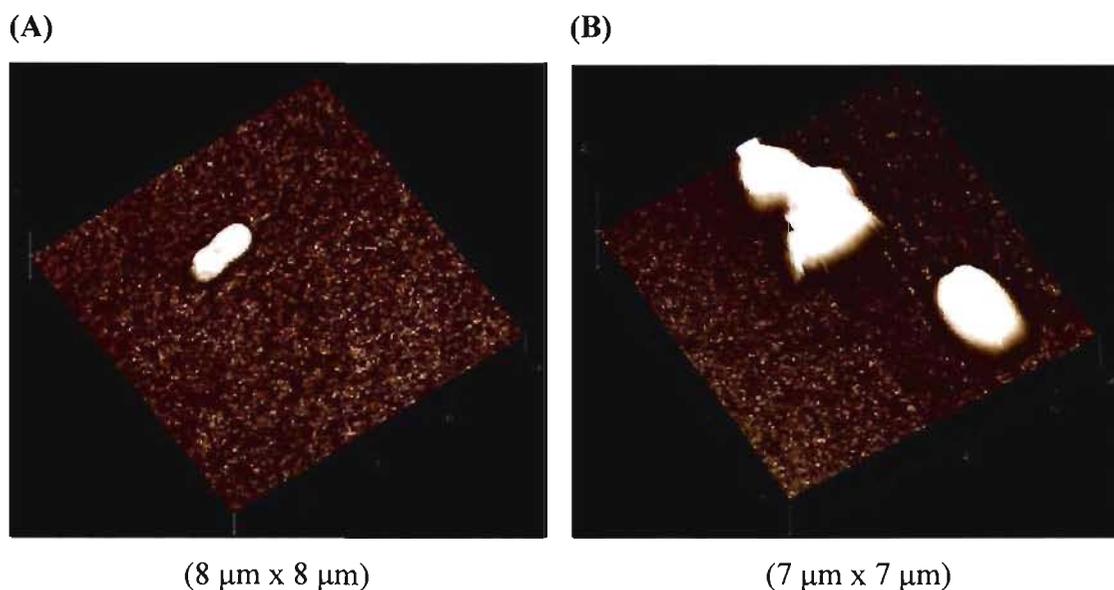


Figure 40 : Attachement de *E. coli* (A) et de *L. monocytogenes* (B) sur des surfaces modifiées avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ à 12,0 mN/m

Les cellules de *L. monocytogenes* étaient généralement disposées en amas et plus nombreuses que celles de *E. coli* qui semblaient complètement isolées (**Figure 39**). Généralement, l'observation de *E. coli* s'est avérée très difficile, surtout sur la surface non modifiée. Finalement, les cellules de *L. monocytogenes* étaient plus faciles à discerner malgré le fait qu'elles paraissaient plus petites.

3.3.2 Mesures des forces d'adhésion surface-microorganismes par AFM

Pour quantifier la force d'adhésion d'une bactérie sur une surface par AFM, on doit d'abord établir la relation entre la force et le point de déflexion du levier pour chacun des échantillons analysés. La **Figure 41** présente une courbe linéaire typique de calibration utilisée pour calculer la force de détachement d'une cellule. Ainsi, il existe une relation proportionnelle entre le point de déflexion du levier et la force que ce dernier applique sur une surface.

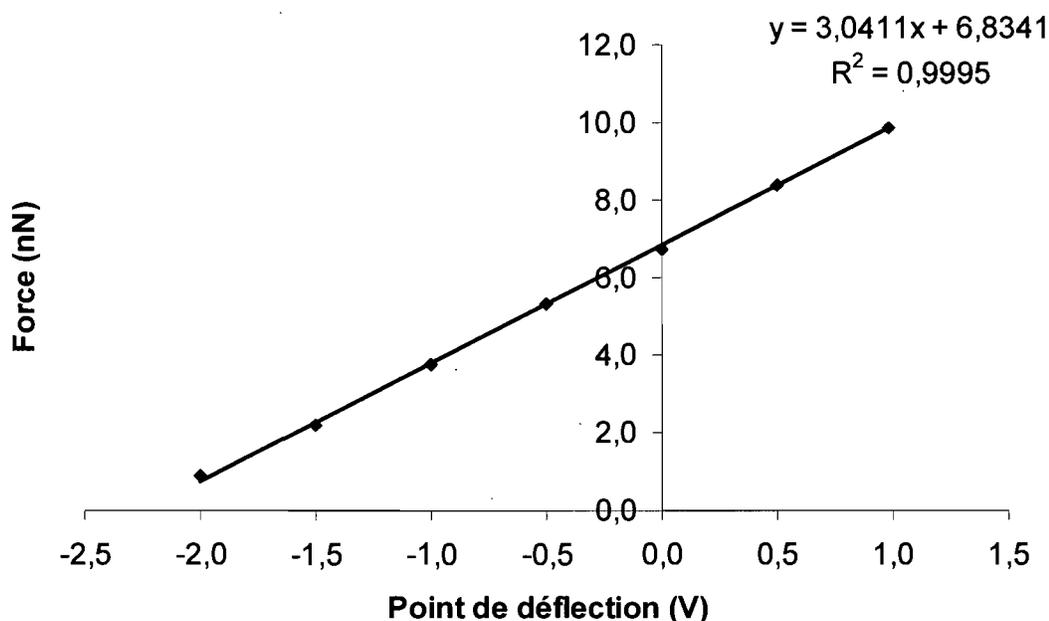


Figure 41 : Courbe de calibration de la force de la pointe sur une surface modifiée en fonction de son point de déflexion

Une fois cette courbe obtenue, il suffit d'employer la valeur du point de déflexion du levier à laquelle la bactérie est détachée et l'insérer dans l'équation de la courbe. Le **Tableau VII** montre les moyennes ainsi que les écarts-types des résultats de force d'adhésion par unité de surface ($\text{nN}/\mu\text{m}^2$) de *E. coli* et de *L. monocytogenes* sur différentes surfaces modifiées, en plus de présenter celle d'une souche non pathogène de *E. coli* non irradiée sur une surface modifiée avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ à haute pression.

Tableau VII : Force d'adhésion par unité d'aire (nN/μm²) de *E. coli* et de *L. monocytogenes* adhérees sur différentes surfaces

Surfaces	Force/Unité d'aire (nN/μm ²)
<i>E. coli</i>	
Mica silanisée	2,81 ± 1,20 ^{a b}
PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁ T4 (12,0 mN/m)	1,52 ± 0,71 ^a
PS ₃₉₉ -P4VPQ ₁₆₆ T2 (3,0 mN/m)	3,01 ± 0,74 ^b
PS ₃₉₉ -P4VPQ ₁₆₆ T3 (7,0 mN/m)	40,24 ± 21,28 ^c
<i>E. coli</i> non pathogène	
PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁ T4 (12,0 mN/m)	7,72 ± 2,55 ^d
<i>L. monocytogenes</i>	
Mica silanisée	1,28 ± 0,31 ^a
PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁ T4 (12,0 mN/m)	0,22 ± 0,05 ^b
PS ₃₉₉ -P4VPQ ₁₆₆ T3 (7,0 mN/m)	1,45 ± 0,09 ^a

a-d : Pour une bactérie donnée, les valeurs avec une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$)

Si on compare les deux types de bactéries, on remarque que de façon générale, les cellules de *E. coli* adhèrent plus fortement que celles de *L. monocytogenes*. Dans le cas de *E. coli*, la modification de surface pour laquelle la force d'adhésion est la plus élevée est celle avec le copolymère quaternisé PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ transféré à 7,0 mN/m (40,24 ± 21,28 nN/μm²). Malgré un écart-type important, la force d'adhésion demeure tout de même significativement supérieure aux autres surfaces ($P < 0,05$). La force d'adhésion de *E. coli* sur la surface de mica silanisée n'est cependant pas significativement différente de celle des systèmes PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ T4 et PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ T2. La souche non pathogène de *E. coli* non irradiée adhère plus fortement ($P < 0,05$) sur la surface modifiée PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ T4 que la souche pathogène adhéree sur la même surface. Finalement, *L. monocytogenes* adhère moins fortement ($P < 0,05$) sur la surface PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ T4 que sur les deux autres surfaces testées (M.S. et PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ T3).

La **Figure 42** ci-dessous illustre parfaitement le détachement d'une cellule de *L. monocytogenes* adhérente sur une surface modifiée avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁. On peut voir que la cellule bactérienne est complètement décrochée de la surface suite à une augmentation suffisante de la force du levier.

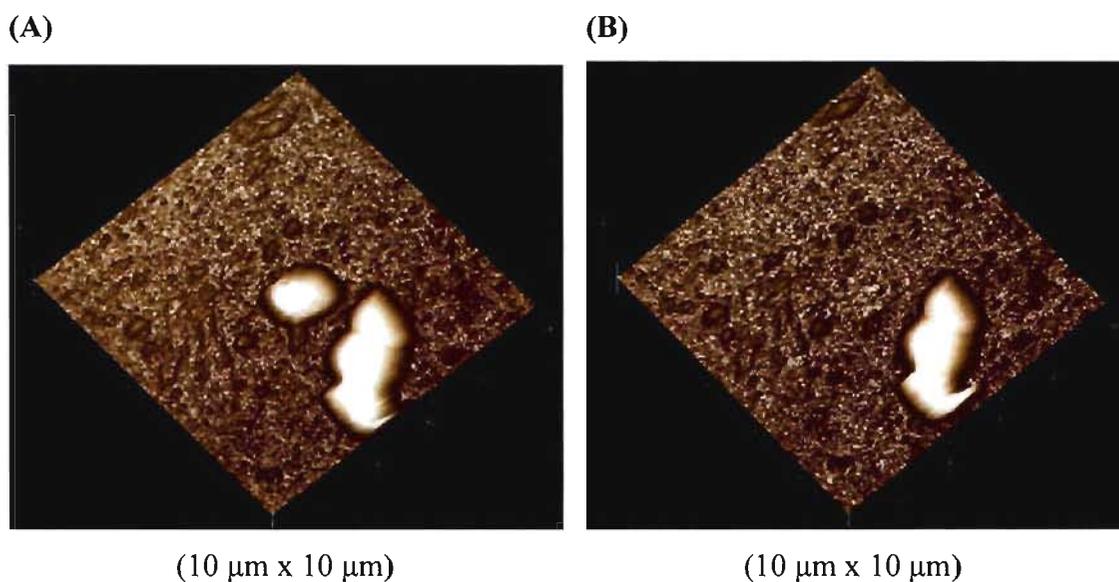


Figure 42 : Détachement d'une cellule de *L. monocytogenes* sur une surface modifiée avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ à 12,0 mN/m

Un fort grossissement de la surface en dessous de la bactérie, une fois celle-ci détachée, est illustré pour une surface non modifiée (**Figure 43 A**) et pour une surface modifiée avec PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ transféré à 7,0 nN (**Figure 43 B**). La hauteur de l'image est la même dans les deux cas, soit 20 nm.

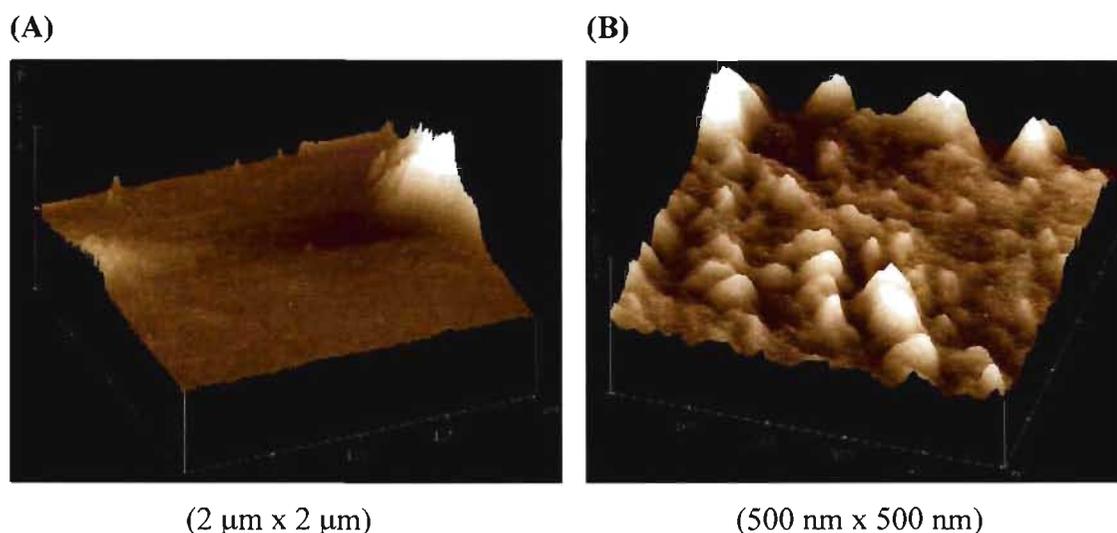


Figure 43 : Images AFM de surfaces non modifiée (A) et modifiée (B) après le détachement d'une cellule de *Listeria monocytogenes*

La **Figure 43 A** démontre plutôt une surface plane sans relief apparent. La **Figure 43 B** expose parfaitement la modification de la surface sur laquelle la bactérie était adhérente par la présence de domaines circulaires d'environ 5,0 à 8,0 nm de hauteur. L'apparence de la surface sous les bactéries était similaire à celle de la zone périphérique.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Organisation moléculaire

4.1.1 Arrangement des micelles

L'observation des surfaces modifiées au microscope à force atomique nous a permis de vérifier que les copolymères utilisés se regroupent sous forme d'agrégats (**Figures 31 et 32**). Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs qui ont étudié des systèmes apparentés (Zhang et Eisenberg, 1998; Choi *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2006). Une analyse plus précise des images AFM sera détaillée au cours de cette section.

La comparaison des valeurs d'aires moléculaires limites (A_{lim}) avec les aires moléculaires du bloc PS non déformé (A_{PS}), peut fournir une indication du type d'agrégats et de leur stabilité (Deschênes *et al.*, 2008). Pour chacun des copolymères, l'aire occupée par une molécule de PS non déformée en mauvais solvant a été calculée à l'aide de la formule du rayon de Flory : $R_{PS} = aN^{1/3}$ où a est la longueur du segment PS (4,0 Å) et N le nombre de monomères. Cette valeur peut ensuite être utilisée pour déterminer le ratio de déformation (k) du bloc PS avec la formule suivante : $(A_{PS} - A_{lim})/A_{PS}$ (Deschênes *et al.*, 2008). Le **Tableau VIII** présente les résultats des A_{PS} , A_{lim} ainsi que le ratio de déformation PS (k) permettant de prédire le type de micelle formée à l'interface pour les copolymères utilisés si on considère que les aires limites correspondent à celles du bloc PS. En d'autres mots, pour que les A_{lim} du **Tableau VIII** représentent celles du PS, elles doivent être déterminées à partir d'isothermes se terminant à des pressions plus élevées (30-60 mN/m) que l'homopolymère P4VP. Sinon, il pourrait bien s'agir des A_{lim} du bloc P4VP puisque celui-ci collapse environ à 30 mN/m (**Figure 24**).

Tableau VIII : Ratio de déformation (k) du bloc PS pour chacun des copolymères

Copolymères	A_{PS} ($\text{\AA}^2/\text{molécule}$)	A_{lim}^* ($\text{\AA}^2/\text{molécule}$)	Ratio de déformation PS (k)
PS ₃₂ -P4VP ₁₇₈	507	908 ± 226	- 0,79
PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁	1672	2 489 ± 301	- 0,49
PS ₃₉₉ -P4VP ₁₆₆	2724	3 680 ± 133	- 0,35
PS ₁₉₂ -P4VPQ ₁₈₁	1672	710 ± 84	0,58
PS ₃₉₉ -P4VPQ ₁₆₆	2724	2 851 ± 313	- 0,05

* Un pourcentage d'erreur variant entre 5 % et 25 % a été calculé pour ces résultats

* Déterminées entre 4,5 et 21,5 mN/m

Les valeurs limites correspondant à l'aire de PS du **Tableau VIII** ont été déterminées entre 4,5 et 21,5 mN/m. Elles révèlent que les trois copolymères non quaternisés formeraient des micelles 'starlike' puisque leur ratio de déformation k est négatif, indiquant que la déformation du bloc PS s'effectue de manière parallèle à l'interface (Deschênes *et al.*, 2008). L'importance de l'étirement des chaînes PS de ces micelles augmente lorsque le ratio N_S/N_{4VP} diminue, comme dans le cas de PS₃₂-P4VP₁₇₈ qui présente la déformation parallèle la plus importante ($k = - 0,79$). Par conséquent, on présume que plus le ratio N_S/N_{4VP} est faible, plus le nombre d'agrégation est petit et plus les micelles sont aplaties. C'est d'ailleurs ce qui est observé expérimentalement à la **Figure 31 D** puisque les micelles de PS₃₂-P4VP₁₇₈ sont moins hautes que celles du PS₃₉₉-P4VP₁₆₆. En 2006, l'équipe de Chung *et al.* a observé une relation similaire entre le ratio des chaînes hydrophobes/hydrophiles pour le copolymère PS-P2VP. Toujours en tenant compte de l'hypothèse que l' A_{lim} dépend du bloc PS, le rapport de déformation plus faible de PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ ($k = - 0,35$) suppose que le nombre d'agrégation de ces micelles 'starlike' est plus grand que les autres diblocs non ioniques (**Figure 44**). De plus, le régime intermédiaire de ce copolymère débute à des concentrations de surface plus élevées (environ 2 mg/m²), signifiant que les chaînes P4VP occupent moins d'espace à l'interface avant d'entamer la phase de transition (**Figure 25**). Ceci pourrait aussi indiquer que le nombre de segments P4VP entourant la

micelle est proportionnellement plus faible pour les copolymères ayant un ratio N_S/N_{4VP} plus important comme dans le cas de $PS_{399}\text{-}P4VP_{166}$. La réduction de l'aire de la couronne des micelles lors du démouillage du P4VP sur le mica silanisé pourrait expliquer le phénomène de super-agrégation de ces micelles. Ce phénomène est également favorisé par les hautes pressions de transfert. À 8,8 mN/m (**Figure 31 C**), les petites micelles individuelles sont pratiquement disparues.

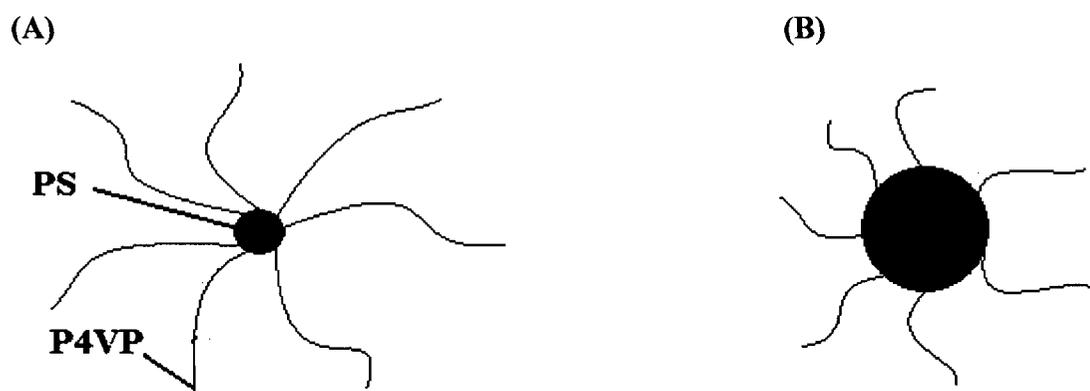


Figure 44 : Schématisation de l'organisation des micelles 'starlike' des copolymères $PS_{32}\text{-}P4VP_{178}$ (A) et $PS_{399}\text{-}P4VP_{166}$ (B)

Les images AFM du copolymère $PS_{399}\text{-}P4VP_{166}$ démontrent la coexistence des deux formes de micelles (circulaires et bâtonnets), mais avec une prédominance de la forme en 'ver de terre' qui résulte de la super-agrégation des micelles circulaires (**Figure 31 A et B**). L'insolubilité des chaînes P4VP en solution aqueuse pour des pH supérieurs à 4,7 (Sidorov *et al.*, 2004) est confirmée par l'isotherme de l'homopolymère (**Figure 24**) qui présente un régime concentré jusqu'à une pression de surface d'environ 30 mN/m. Le coefficient d'interaction $\chi_{P4VP\text{-}eau}$ ($\approx 3,848$) (Cong *et al.*, 2005) pourrait aussi être impliqué dans la formation de micelles bâtonnets, puisqu'il a été démontré que χ est proportionnel à la concentration de surface du polymère à l'interface lorsque celui-ci est en mauvais solvant (Barton, 2000). Ainsi, les chaînes non quaternisées P4VP s'étalent en 2D jusqu'à la fin du régime semi-dilué en bon solvant où elles demeurent à l'interface, mais en se concentrant en quasi 2D jusqu'au début du pseudo-plateau.

Malgré l'insolubilité du P4VP dans l'eau ($\chi_{\text{P4VP-eau}} \approx 3,848$), la formation de liaisons hydrogènes entre l'eau et le P4VP est responsable du gonflement de ce polymère en milieu aqueux (Cong *et al.*, 2005). On peut ainsi supposer que lorsque la concentration de surface devient trop grande (fin du régime intermédiaire), les chaînes P4VP doivent se concentrer à l'interface sous et autour des chaînes PS.

Comme mentionné précédemment, le phénomène de super-agrégation des micelles possédant un nombre d'agrégation plus élevé (PS₃₉₉-P4VP₁₆₆) pourrait expliquer la formation dominante des bâtonnets observés à l'AFM. La hauteur des deux types de micelles observées est sensiblement la même (4,5 à 5,5 nm), tandis que les domaines circulaires sont plus petits (30 à 33 nm) que ceux en bâtonnets (64 à 81 nm). Ces valeurs s'apparentent à celles retrouvées dans la littérature (Choi *et al.*, 2004). Une augmentation de la pression de transfert (8,8 mN/m) provoque une densité de recouvrement plus élevée et une disparition presque complète des domaines circulaires (**Figure 31 C**). De plus, cette augmentation de densité engendre l'apparition de portions non recouvertes par la monocouche pouvant s'expliquer par une instabilité de celle-ci à plus haute pression de surface ou lors du transfert. Ces images suggèrent donc que les micelles de PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ peuvent s'organiser de façon différente une fois transférées sur la surface de mica silanisée. Cette hétérogénéité de recouvrement pourrait avoir un effet sur l'adhésion protéique et microbienne. Pour leur part, les micelles du copolymère PS₃₂-P4VP₁₇₈ sont caractérisées uniquement sous la forme circulaire (**Figure 31 D**) en raison d'une plus grande espace à l'interface occupée par les chaînes P4VP prévenant ainsi le phénomène de super-agrégation entre les micelles. Elles sont néanmoins plus petites (28 à 35 nm) et moins hautes (2,5 à 4,0 nm) étant donné leur nombre d'agrégation moins élevé. Aucune observation AFM n'a été réalisée pour le copolymère PS₁₉₂-P4VP₁₈₁.

La valeur positive du ratio de déformation du copolymère PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ (**Tableau VIII**) démontre que le bloc polystyrène s'étire perpendiculairement à l'interface. Ce type de déformation est associé à des micelles de type 'crew-cut' étant donné que leurs segments hydrophiles sur lesquelles les chaînes PS sont installées, occupent une aire relativement réduite à l'interface et très peu de segments entourent la

micelle (Deschênes *et al.*, 2008). Il est possible que les chaînes P4VP chargées positivement pénètrent directement en sous-phase lors du dépôt de la solution vue leur forte affinité pour l'eau et provoquant ainsi une déformation verticale du bloc PS (**Figure 45 B**). Les chaînes hydrophiles des micelles 'starlike' formées par les copolymères non quaternisés occupent davantage d'espace à l'interface permettant aux chaînes hydrophobe de s'étirer horizontalement sur les chaînes P4VP (**Figure 45 A**). Aucune analyse AFM n'a été effectuée pour le copolymère quaternisé PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁.

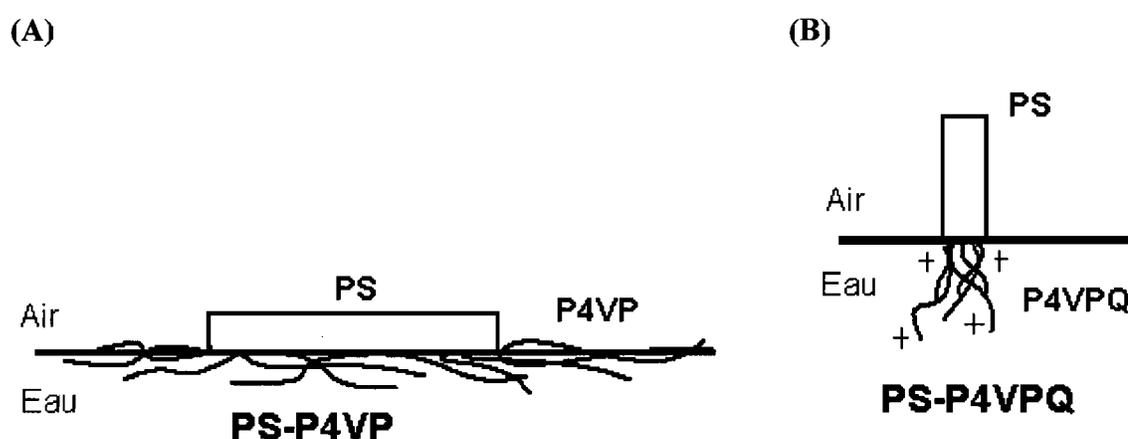


Figure 45 : Organisation des chaînes à l'interface lors du dépôt des solutions de PS-P4VP (A) et PS-P4VPQ (B)

Les courbes d'isotherme des **Figures 24** et **26** supportent cette hypothèse quant à la disposition des chaînes à l'interface. La présence d'un pseudo-plateau pour les copolymères non quaternisés signifie qu'il se produit une réorganisation impliquant qu'une partie des segments (P4VP) ne participent plus à l'augmentation de la pression de surface. Le phénomène de super-agrégation, réduisant la déformation des chaînes, pourraient expliquer cette observation. Si c'est le cas, ce phénomène serait plus important pour les micelles les plus instables et se produirait à une pression de surface d'environ 5,0 mN/m. Possédant le ratio N_S/N_{4VP} le plus petit et par le fait même, le nombre d'agrégation le plus faible, on s'attend à ce que le copolymère PS₃₂-P4VP₁₇₈ présente le pseudo-plateau le plus long si on considère que l' A_{lim} dépend du bloc PS. C'est effectivement ce qui est observé à la **Figure 24**. Ainsi, les chaînes P4VP de ce

dibloc occupent proportionnellement plus d'espace à l'interface dans les régimes semi-dilué et intermédiaire. Par contre, si l' A_{lim} correspond au bloc P4VP, on peut supposer que le plus long pseudo-plateau serait associé aux micelles les moins stables à cause du phénomène de super-agrégation. Choi *et al.* ont mentionné que plus le bloc hydrophile est long, plus le pseudo-plateau de l'isotherme est important. Les conclusions de Choi *et al.* sont vraies si on augmente la longueur du bloc hydrophile tout en conservant une taille similaire pour la portion hydrophobe. Les résultats obtenus dans le cadre de la présente étude démontrent que ce n'est pas la longueur de la chaîne hydrophile qui compte, mais le rapport des monomères présents dans chacun des blocs.

L'absence d'un pseudo-plateau pour les copolymères ioniques semble indiquer que les chaînes hydrophiles ne restent pas ancrées à l'interface et passent directement en sous-phase. Certaines études ont démontré que les chaînes P4VPQ chargées positivement peuvent se maintenir à l'interface et que certains copolymères ioniques présentent un pseudo-plateau (Shin *et al.*, 2001). Ces mêmes auteurs suggèrent que la présence de la phase de transition est déterminée par la longueur de la chaîne alkyle du copolymère quaternisé. Une chaîne alkyle trop courte ($n < 6$) ne permet pas aux chaînes ioniques de demeurer ancrées à l'interface (Shin *et al.*, 2001). L'absence du pseudo-plateau en régime de concentration intermédiaire pour les deux copolymères quaternisés peut être expliquée par leurs courtes chaînes alkyles ($n = 1$) qui ne permettent pas de maintenir P4VPQ à l'interface. Comme les chaînes quaternisés ne s'étendent pas en 2D à l'interface, le rapport des aires PS/P4VPQ est augmenté considérablement ce qui favorise des nombres d'agrégation plus grands que pour les copolymères non ioniques.

Le ratio de déformation du dibloc PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ calculé est pratiquement nul (**Tableau VIII**). Il a été observé, pour les systèmes PEO-PS-PEO, que lorsque des micelles instables changent de conformation via le phénomène de super-agrégation, il y a relaxation des chaînes PS qui peut mener à une réduction, et même à une élimination de la déformation de ces chaînes (Deschênes *et al.*, 2008). Ceci peut conduire à la formation d'une monocouche hétérogène parsemée d'espaces non recouverts entre les super-agrégats. Selon Deschênes *et al.*, cette fragmentation du film LB peut se produire avant son transfert sur un support solide et elle serait associée à une asymétrie

importante du copolymère bloc. Les images AFM prouvent cette disparité de l'organisation micellaire ainsi qu'une rupture du film LB particulièrement à haute pression de transfert (**Figure 32**). Ces analyses viennent donc confirmer que les surfaces sur lesquelles le copolymère PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ a été transféré ne sont pas modifiées uniformément. Les résultats d'adhésion protéique et microbienne peuvent être affectés par cette hétérogénéité de transfert et seront analysés en tenant compte de ce facteur.

4.1.2 Transfert de la monocouche et angles de contact

Quatre pressions de surface ont été sélectionnées pour les transferts des copolymères non quaternisés alors que seulement trois ont été choisies pour les quaternisés en raison de l'absence du pseudo-plateau. Les taux de transfert obtenus (**Tableau V**) nous renseignent sur la qualité des transferts. Ces données indiquent que les pressions de surface élevées ainsi que la quaternisation affectent grandement les taux de transfert. Des travaux antérieurs (Deschênes *et al.*, 2008) ont suggéré que le procédé de transfert de film LB sur un substrat pouvait entraîner des phénomènes de démouillage, favorisant des changements de conformation pour des micelles métastables de copolymères de polystyrène et de poly(oxyde d'éthylène) (PS-PEO). Dans la présente étude, les transferts du dibloc PS-P4VP(Q) sur un substrat hydrophobe pourraient donner lieu à deux phénomènes, soit le démouillage du P4VP(Q) sur le mica silanisé, soit le mouillage du PS sur ce même substrat. Dans l'étude de Deschênes *et al.*, il est également rapporté qu'une importante asymétrie dans le rapport N_S/N_{EO} induit une déformation du bloc PS identifiée comme facteur de métastabilité. La relaxation des chaînes par changement de morphologie serait favorisée à pression de surface élevée. Cette instabilité expliquerait la diminution de la qualité des transferts des copolymères non quaternisés à mesure que la concentration de surface augmente conduisant à une hétérogénéité de recouvrement.

En ce qui concerne les copolymères ioniques, cette diminution des taux est davantage remarquée, même à basses pressions. Les transferts effectués à des pressions supérieures à 1,5 mN/m présentent une instabilité attribuée aux interactions répulsives

entre les chaînes hydrophiles chargées positivement tel que proposé par Zhang et Eisenberg en 1998. Ces micelles de type 'starlike' seraient également plus sensibles au phénomène de démouillage favorisant les super-agrégations en raison de la faible épaisseur de la couronne de la micelle. Les images AFM permettent de valider cette supposition, puisque malgré une faible pression de surface, une importante disparité de recouvrement est observée (**Figure 32 A**) ainsi qu'une rupture marquante de la monocouche (**Figure 32 B**).

Les mesures d'angles de contact (**Figure 29**) ont permis de soutenir cette hypothèse quant à la dégradation des transferts lors d'une élévation de pression de surface. La faible diminution des angles de contact, principalement pour les copolymères quaternisés, peut être en partie expliquée par l'hétérogénéité des surfaces obtenues pour des transferts effectués à hautes pressions. Les angles de contact mesurés avec l' α -bromonaphtalène (Annexe II) devraient théoriquement augmenter pour des modifications de surfaces à pressions plus élevées vu sa nature hydrophobe. Pourtant, l'effet inverse est observé et la surface non modifiée présente l'angle le plus élevé ($40,3^\circ \pm 0,9^\circ$) de tous les angles de contact mesurés avec ce solvant (Annexe II). Ce phénomène peut être expliqué par une orientation des chaînes P4VP dépendante du solvant étalé sur celles-ci. On peut ainsi supposer que si on dépose une goutte d'eau sur une surface modifiée, l'eau ira se loger sur la partie hydrophile de la molécule, soit l'azote chargé ou non. Par contre, si on dépose une goutte d' α -bromonaphtalène sur la même surface, le liquide sera cette fois-ci attiré par la partie hydrophobe de la molécule, soit le noyau aromatique. Les chaînes greffées aux surfaces s'orienteraient de façon à favoriser la mouillabilité de ces dernières, peu importe la nature de l'agent mouillant utilisé. Puisque ces molécules adoptent différentes configurations selon le solvant, nous les avons qualifiées de 'molécules schizophrènes'. Étant donné que ces molécules favorisent en quelque sorte la mouillabilité des surfaces, on peut penser qu'elles pourraient aussi s'orienter de manière à faciliter l'adhésion des protéines et des bactéries.

Une autre hypothèse à cette observation serait qu'à mesure que la monocouche est comprimée, les chaînes P4VP, insolubles dans l'eau, modifie leur conformation de manière à expulser l'eau du complexe. Celui-ci devient donc plus hydrophobe à mesure

que la pression de surface augmente et pourrait expliquer la diminution des angles de contact avec l' α -bromonaphtalène sur les surfaces modifiées avec le copolymère PS-P4VP.

La silanisation partielle des surfaces de mica peut être aussi une possibilité expliquant les résultats d'angles de contact mesurés avec l'eau et l' α -bromonaphtalène. Les images AFM (**Figure 30**) montrent que la surface silanisée est recouverte de plusieurs domaines assez hauts (35 ± 10 nm) alors que celle non silanisée présente une surface uniforme avec deux minuscules particules (10 ± 1 nm) semblables à des poussières collées sur le mica hydrophile qui peuvent provenir de débris lors du clivage du mica. La polymérisation de l'OTS à un taux d'humidité trop élevé pourrait causer cette silanisation partielle qui risque aussi de provoquer des hétérogénéités de recouvrement comme celles observées à la **Figure 32**.

Cependant, les données dont nous disposons ne permettent pas d'estimer les contributions individuelles respectives de la nature des molécules et de la silanisation partielle sur les résultats d'angles de contact observés. Compte tenu de la taille des gouttes utilisées pour les mesures d'angles de contact, cette technique nous fournit des renseignements d'ordre plutôt macroscopique. L'obtention d'hystérèse d'angles de contact pourrait sûrement être utile dans ce cas-ci.

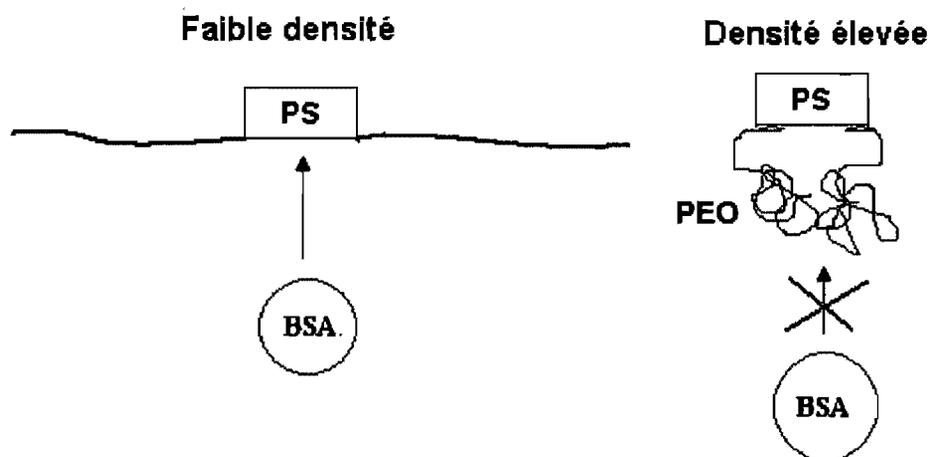
4.2 Adsorption protéique sur des surfaces modifiées

4.2.1 Effet de modification de surface sur l'adsorption de la protéine BSA

De façon générale, la concentration protéique diminue à mesure que la densité de recouvrement augmente pour le copolymère PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ et pour PS₃₉₉-P4VP₁₆₆ transférés à des pressions supérieures à 7,0 mN/m. Cependant, une relation opposée est observée pour PS₃₂-P4VP₁₇₈ qui présente globalement une minime augmentation de la concentration de BSA avec une élévation de la pression (**Figure 33**). On peut donc penser que plus le ratio N_S/N_{4VP} est petit, moins l'augmentation de la densité de recouvrement aura un effet sur l'adsorption protéique. Cette hypothèse va à l'encontre des résultats de Bosker *et al* qui observent une forte adsorption de BSA à faible densité de recouvrement suivit d'une diminution drastique de celle-ci à densité plus élevée pour le copolymère PS₃₇-PEO₇₇₀. Il faut cependant tenir compte que les chaînes PEO s'étendent en 3D en sous-phase comparativement à celles de P4VP qui restent à l'interface, du moins pour des pressions inférieures à 30 mN/m tel que suggéré par l'isotherme de l'homopolymère (**Figure 24**). De plus, il est souvent mentionné dans la littérature que plus une surface est hydrophile plus elle sera résistante à l'adsorption protéique (Salloum et Schlenoff, 2004). Pourtant, la surface la plus hydrophile est celle modifiée avec PS₃₂-P4VP₁₇₈ (**Figure 29**) pour laquelle l'adsorption de BSA augmente légèrement et ne semble pas être significativement plus résistante à l'adsorption protéique que les autres surfaces modifiées. Ces résultats suggèrent que les copolymères ayant un ratio N_S/N_{4VP} élevé, par exemple PS₃₉₉-P4VP₁₆₆, forment des micelles de configuration inadéquate pour l'adsorption de BSA ayant un poids moléculaire de 66 KDa (Salloum et Schlenoff, 2004). Un modèle d'adsorption protéique pour le dibloc PS-PEO est proposé à la **Figure 46** dans le but d'aider à la compréhension de l'adsorption de BSA sur le copolymère PS-P4VP. Avec un nombre d'agrégation plus petit et une densité de recouvrement élevée, les longues chaînes hydrophiles en sous-phase (PEO) sont en régime semi-dilué limitant l'adsorption de BSA par effet de pression osmotique (**Figure 46 A**). Par contre, plus le segment passant en sous-phase est court, moins il y aura possibilité de régime semi-dilué pour les chaînes de PEO, laissant ainsi des ouvertures pour l'adsorption de BSA (**Figure 46 B**). Dans le cas de P4VP, puisqu'il ne

se transfère pas en sous-phase, ce sont les coefficients d'interaction $\chi_{P4VP-PS}$, χ_{PS-BSA} et $\chi_{P4VP-BSA}$ qui pourraient expliquer les taux d'adhésion protéiques observés.

(A)



(B)

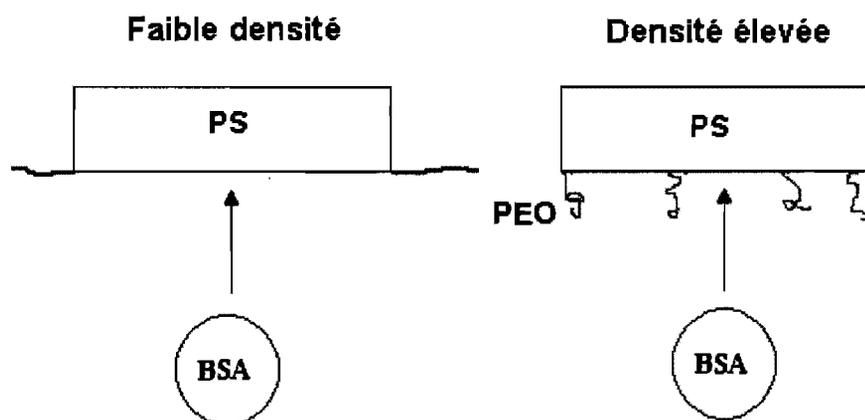


Figure 46 : Adsorption de la protéine BSA pour les copolymères $PS_{32}-PEO_{178}$ (A) et $PS_{399}-PEO_{166}$ (B) à faible et forte densité de recouvrement

En ce qui concerne les deux copolymères quaternisés, la concentration protéique augmente à mesure que la pression de surface s'élève (**Figure 33**). Sachant que la protéine BSA est chargée négativement (Salloum et Schelenoff, 2004), on peut s'attendre à ce qu'elle soit attirée par les chaînes P4VPQ chargées positivement. Les ratios de déformation du **Tableau VIII** suggèrent que $PS_{399}-P4VPQ_{166}$ possède un nombre d'agrégation plus élevé que $PS_{192}-P4VPQ_{181}$. Les charges positives sont donc plus nombreuses et par le fait même, adsorbent davantage de protéines BSA sur les

surfaces modifiées. L'augmentation de la densité de recouvrement des copolymères justifie une adsorption protéique plus importante étant donné une densité de charges positives également augmentée.

4.2.2 Effet de modification de surface sur l'adsorption des protéines de TSB

L'analyse de l'adsorption de BSA sur différentes surfaces modifiées a été comparée à l'adsorption des protéines présentes dans le milieu de culture TSB afin de vérifier la formation d'un film de conditionnement. La quantité de protéines adsorbées du milieu de culture est plus élevée puisque le milieu contenait au départ des concentrations en protéines plus élevées (30 mg/mL) que les solutions de BSA testées (1 mg/mL). Ceci est en accord avec les principes de la thermodynamique des phénomènes d'adsorption (Lipatov *et al.*, 1995). On peut également mentionner que le milieu est composé de plusieurs types de protéines chargées négativement telles la caséine et la protéine de soya (Santé Canada, 2006). Pour toutes les modifications de surfaces testées, sauf PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆, la concentration de protéines adsorbées est plus faible que sur la surface non modifiée (**Figure 34**). Cependant, toutes ces surfaces modifiées adsorbent significativement la même quantité de protéines du milieu de culture (environ 35 à 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), alors que des différences sont observées pour l'adsorption de BSA comme dans le cas de PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ transféré à basse pression qui permet une meilleure adsorption que les autres surfaces. De plus, la quantité de BSA adsorbée est diminuée sur les surfaces modifiées avec les copolymères ioniques transférés à haute pression.

La quantité de protéines présentes dans le milieu de culture TSB est telle, qu'il est possible que la quantité totale adsorbable soit atteinte quelque soit la surface modifiée avec les copolymères non quaternisés. Pour les copolymères ioniques, l'effet de la concentration des charges positives serait observable seulement pour des transferts effectués à plus grande pression de surface, comme dans le cas de PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆. Il est toutefois difficile de se baser sur cette hypothèse en raison des hétérogénéités de surface observées à l'AFM. Une autre possibilité est que la valeur d'adsorption maximale sur un substrat hydrophobe est plus élevée que sur un substrat hydrophile pour

les protéines du TSB. Par conséquent, la présence de trous non recouverts sur la surface modifiée avec PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ à haute pression donne des valeurs d'adsorption semblables à celles de la surface non modifiée. Une technique de détection plus précise ainsi qu'une comparaison d'un plus grand nombre d'échantillons seraient requis pour une meilleure interprétation des résultats d'absorption protéique.

4.3 Adhésion microbienne sur des surfaces modifiées

4.3.1 Effet de modification de surface sur l'adhésion d'*Escherichia coli* et de *Listeria monocytogenes*

La dernière partie de cette étude consiste à quantifier l'adhésion de deux types de bactéries sur les surfaces modifiées afin d'évaluer l'effet de la longueur des chaînes des copolymères ainsi que la présence de charges positives.

Autant pour les surfaces modifiées à l'aide du PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ qu'avec PS₃₉₉-P4VP₁₆₆, l'adhésion de *E. coli* ainsi que celle de *L. monocytogenes* diminue à mesure que la densité de recouvrement augmente (**Figures 35 et 37**). Par contre, pour une même modification de surface on retrouve davantage de *L. monocytogenes* que de *E. coli*, mais sans être significativement différent avec des écarts de log variant entre 0,2 et 0,6. Les surfaces modifiées ne sont toutefois pas plus résistantes à l'adhésion bactérienne que la surface de mica silanisée, même qu'à basse pression de transfert, on observe un nombre significativement plus élevé de bactéries. Pour les diblocs PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ et PS₃₉₉-P4VP₁₆₆, l'adhésion de *E. coli* et de *L. monocytogenes* est proportionnelle à l'adsorption de BSA (**Figures 36 et 38**) laissant présager que ces modifications de surfaces ont le même effet sur l'adsorption protéique que sur l'adhésion microbienne. Il ne faut cependant pas oublier que l'augmentation de concentration de surface provoque une hétérogénéité de recouvrement (**Figure 31 C**) surtout pour les micelles ayant un nombre d'agrégation plus élevé (PS₃₉₉-P4VP₁₆₆). Ceci pourrait justifier des valeurs d'adhésion bactérienne se rapprochant à celle de la surface non modifiée lorsque la pression de surface augmente.

Le système PS₃₂-P4VP₁₇₈ présente pour sa part une faible augmentation de l'adhésion des deux bactéries à mesure que la densité de recouvrement augmente. C'est néanmoins le copolymère qui permet une meilleure résistance à l'adhésion bactérienne tant pour *E. coli* que pour *L. monocytogenes*, mais sans montrer une adhésion inférieure à celle de la surface non modifiée. Le caractère plutôt hydrophile des surfaces modifiées avec ce copolymère (**Figure 29**) pourrait expliquer cette quantité plus faible de

microorganismes adhérents puisqu'il est mentionné dans la littérature que l'attachement initial des bactéries est défavorable sur des surfaces hydrophiles (Sénéchal *et al.*, 2004). Une adsorption plus importante de protéines sur ces surfaces est liée à une augmentation de l'adhésion de *E. coli*, mais à une diminution du nombre de *L. monocytogenes* (**Figures 36 et 38**). Cette différence suppose que les longues chaînes P4VP du copolymère PS₃₂-P4VP₁₇₈ interagissent différemment selon la souche bactérienne.

Ces résultats suggèrent que les copolymères formant des micelles bâtonnets, diminuent davantage l'adsorption protéique ainsi que l'adhésion microbienne à mesure que la densité de recouvrement augmente. Pour leur part, les micelles circulaires semblent augmenter les concentrations de protéines et de bactéries lorsque la pression de surface s'élève, mais tout en présentant les quantités les plus faibles pour toutes les modifications de surface. Il est cependant risqué de tabler cette hypothèse en raison de l'hétérogénéité de recouvrement observée à haute pression par AFM. Aucune de ces modifications n'a permis d'être plus résistante à l'adhésion que la surface non modifiée. Ceci va à l'encontre de plusieurs études (Gross *et al.*, 2001; Caro *et al.*, 2005) qui proposent que les surfaces hydrophobes permettent une meilleure adhésion bactérienne que les surfaces hydrophiles. Puisque toutes les surfaces modifiées sont plus hydrophiles que la surface de mica silanisée (Annexe II), elles devraient en principe présenter moins d'adhésion. Pourtant, ni pour *E. coli*, ni pour *L. monocytogenes*, nous n'avons pu détecter une modification de surface efficace contre l'adhésion microbienne. Ceci suggère que les bactéries sont davantage attirées par les chaînes du copolymère PS-P4VP que par les groupements OTS fixés sur les surfaces de mica. Une fois de plus, il faut rester prudent face à cette supposition, puisque la possibilité d'une silanisation partielle des surfaces ou des phénomènes de démouillage entraînant des changements de morphologie peuvent exposer des portions hydrophobes.

La quaternisation du copolymère PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁ ne semble pas réduire l'attachement des bactéries, car pour les deux souches bactériennes, l'adhésion augmente à mesure que les chaînes deviennent plus condensées sur les surfaces (**Figures 35 et 37**). À haute pression (10,0 mN/m), le nombre de *E. coli* est même significativement plus élevé que sur la surface non modifiée. De plus, l'adhésion de *E.*

coli ainsi que de *L. monocytogenes* est proportionnelle à l'adsorption protéique suggérant que les chaînes hydrophiles chargées positivement agissent de manière similaire sur les protéines et les bactéries (**Figures 36** et **38**). Une modification de surface avec le copolymère PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ quaternisé diminue la concentration de *E. coli* alors que celle de *L. monocytogenes* augmente lorsque la pression de transfert s'élève. On constate également une relation opposée quant à l'adhésion bactérienne en fonction de l'adsorption de BSA pour la souche à Gram négatif (**Figure 36**). Comme c'est la seule surface modifiée qui présente un résultat d'adhésion différent pour les deux souches microbiennes, on peut penser que l'hétérogénéité de recouvrement de surface observée à haute pression de transfert (**Figure 32 B**) expliquerait cette divergence. La présence de trous exposant des surfaces non modifiées par PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ à haute pression (7,0 mN/m) diminue l'adhésion de *E. coli* à une quantité semblable à celle de la surface de mica silanisée (**Figure 35**). On devrait plutôt s'attendre à ce que l'adhésion de *E. coli* tout comme celle de *L. monocytogenes*, augmente puisqu'une plus grande densité de charges positives des chaînes P4VPQ attirent davantage ces bactéries chargées négativement (Briandet *et al.*, 1999; Chmielewski et Frank, 2005).

Selon les résultats des comptes viables, aucune différence significative n'a été observée entre *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* par rapport au nombre de cellules bactériennes adhérees. La **Figure 39** démontre toutefois que les cellules de *E. coli* sont davantage éparpillées sur les surfaces alors que celles de *L. monocytogenes* sont plutôt regroupées et plus nombreuses. On peut ainsi supposer qu'une plus grande partie des cellules de *L. monocytogenes* adhérees sur les surfaces étaient mortes. Ceci pourrait expliquer la différence entre les comptes viables et les observations au MEB. Lors de la préparation des échantillons pour la microscopie électronique à balayage, nous avons omis volontairement l'étape de déshydratation à l'alcool afin de vérifier si ce solvant lessivait les copolymères transférés et par le fait même, les bactéries adhérees. Suite à plusieurs observations, nous nous sommes aperçus que la population microbienne sur les surfaces n'était pas plus nombreuse si on déshydratait les échantillons à l'air ambiant au lieu d'utiliser l'alcool. En conséquence, le faible nombre de bactéries adhérees selon les comptes viables, est un problème lié soit à la concentration bactérienne initiale, soit au temps de contact. Finalement, aucune

substance extracellulaire n'a été observée au microscope électronique à balayage, laissant croire que les bactéries n'ont pas été suffisamment longtemps en contact avec les surfaces pour produire une matrice d'exopolymères.

Le fait d'avoir évalué l'adhésion bactérienne selon les résultats des comptes viables ne nous permet cependant pas de nous prononcer quant à l'efficacité bactéricide des modifications de surfaces sur les microorganismes adhérents. Certaines études mentionnent qu'une surface chargée positivement est plus adhésive, mais affecte davantage la croissance des bactéries (Gottenbos, 2001). D'autres expliquent que l'effet antimicrobien des polymères cationiques est relié à la longueur des chaînes alkyles de P4VPQ avec une efficacité maximale de 4 à 10 carbones de long (Hu *et al.*, 2005; Denny *et al.*, 2005). Ceci suggère donc que la courte chaîne de méthyle des copolymères quaternisés PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁ et PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ n'était pas suffisamment longue pour pénétrer la membrane des bactéries et ainsi affecter leur survie sur les surfaces. Des tests de bactéricidité devraient être effectués afin de confirmer cette hypothèse.

4.3.2 Effet de modification de surface sur les forces d'adhésion surface-microorganismes

Dans la majorité des études portant sur l'adhésion bactérienne, seule la quantité de bactéries adhérentes est considérée. Nous avons donc voulu aller plus loin dans notre analyse en vérifiant l'effet des modifications de surfaces sur la force avec laquelle les microorganismes sont adhérents. Nous avons sélectionné trois types de surfaces : une non modifiée, la seconde modifiée avec un copolymère non quaternisé PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ à forte pression et finalement une sur laquelle le copolymère quaternisé PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ a été transféré à pression élevée.

Avant d'analyser les résultats recueillis, nous avons voulu vérifier si l'irradiation des bactéries avait un impact sur leur force d'adhésion. Nous avons donc quantifié la force d'attachement par unité d'aire d'une souche non pathogène de *E. coli* non irradiée adhérente sur la même surface modifiée que la souche pathogène irradiée. Une importante

différence significative a été observée entre les deux souches quant à leur force d'adhésion (**Tableau VII**). Il est donc possible que le fait d'irradier les bactéries dans le but de les tuer pour les observations par AFM dans un laboratoire de niveau de biosécurité I, ai eu un effet sur leur force d'adhésion dans les conditions expérimentales utilisées. Les bactéries vivantes pourraient adhérer plus fortement que celles qui sont mortes. Afin de valider cette hypothèse de façon plus certaine, une mesure de force d'adhésion de la bactérie non-pathogène irradiée aurait été nécessaire.

Rappelons que selon les comptes viables, aucune différence significative n'a été observée entre le nombre de cellules adhérees de *E. coli* et de *L. monocytogenes*. Les résultats du **Tableau VII** démontrent que les cellules de *E. coli* sont plus fortement adhérees comparativement à celles de *L. monocytogenes* sur les trois surfaces testées. On peut supposer que la nature et la configuration des entités extracellulaires diffèrent entre les deux souches bactériennes. Plusieurs auteurs suggèrent que les flagelles jouent un rôle crucial dans l'initiation de l'adhésion de *E. coli* sur des surface inertes en permettant aux bactéries de s'approcher de celles-ci tout en favorisant l'expansion du biofilm une fois arrivé à maturité (Pratt et Kolter, 1998; Chmielewski et Frank, 2003). D'autres expliquent que le pili de type I ainsi que le fimbriae F9 de cette bactérie ont aussi une certaine implication au niveau de son attachement aux surfaces en annulant la répulsion électrostatique entre la cellule et la surface (Donlan, 2000; Ulett *et al*, 2007). Les lipopolysaccharides (LPS) de la membrane des bactéries à Gram négatif seraient aussi un facteur important pour l'adhésion initiale des cellules aux surfaces inertes (Donlan, 2000). Les flagelles de *L. monocytogenes* présents à 20°C auraient la même responsabilité dans l'adhésion microbienne que ceux de *E. coli* (Chavant *et al*, 2002). Par contre, aucune molécule de surface ayant une fonction d'attachement cellulaire sur des surfaces inertes n'est connue dans la littérature pour *L. monocytogenes*. Récemment, une équipe de recherche a démontré qu'un gène (*lmo1462*), semblable aux gènes *era* de *E. coli*, serait impliqué dans l'adhésion de *Listeria monocytogenes* sur des surfaces abiotiques (Auvray *et al*, 2007). Il est aussi démontré que ce microorganisme forme des biofilms en s'associant avec d'autres types de bactéries comme par exemple *Pseudomonas spp.* (Belval *et al.*, 2006).

Au niveau du secteur industriel, cette différence entre la quantité de bactéries présentes sur une surface et la force avec laquelle elles y sont adhérentes, doit être sérieusement considérée. Ainsi, le fait d'avoir une seule bactérie solidement attachée sur une surface, peut être tout aussi une grande source de contamination, voir davantage, qu'un nombre important de cellules faiblement adhérentes. On a simplement qu'à penser aux procédés de sanitation des industries alimentaires qui sont évalués en fonction de la quantité de microorganismes éliminés. La présence d'une seule bactérie pathogène fortement adhérente qui résiste aux différentes techniques de nettoyage peut entraîner l'adultération des denrées alimentaires.

Si on compare les forces d'adhésion par unité d'aire pour une même bactérie, on remarque que la surface qui permet l'attachement le plus solide est celle modifiée avec le copolymère quaternisé PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ transféré à haute pression de surface (7,0 mN/m). Ceci est observé pour les deux souches bactériennes (**Tableau VII**). En plus d'augmenter le nombre de microorganismes adhérents, la quaternisation semble solidifier leur attachement, particulièrement pour *E. coli* qui expose une force d'adhésion par unité d'aire largement supérieure ($40,24 \pm 21,28$ nN/ μm^2). D'autres auteurs ont aussi obtenus de telles marges d'erreurs (environ 50 %) pour des résultats de force d'adhésion microbienne (Sénéchal *et al.*, 2004). Cette variance est toutefois moins grande que celle des valeurs de force entre les différentes surfaces ainsi qu'entre les souches bactériennes. Cette force d'adhésion par unité d'aire de *E. coli* peut être expliquée par les importantes forces attractives entre les charges positives des chaînes P4VPQ et les charges négatives des bactéries. La densité de recouvrement a aussi une influence sur la force d'adhésion des microorganismes aux surfaces, puisque celle-ci est significativement inférieure sur une surface modifiée avec le même copolymère quaternisé, mais transféré à plus faible pression, soit 3,0 mN/m (**Tableau VII**). De plus, cette bactérie à Gram négatif adhère aussi fortement sur la surface de mica silanisée que sur celle modifiée avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁. En 2005, Caro *et al.* sont arrivés à des conclusions différentes en démontrant que ce microorganisme adhère plus fortement sur une surface hydrophile (tel le mica) modifiée avec de l'OTS. La présence de trous exposant des surfaces non modifiées, principalement à haute pression, pourrait expliquer ces forces d'adhésion non significativement différentes. Dans le cas de *L. monocytogenes*, cette bactérie adhère

plus fortement sur la surface de mica silanisée que sur celle modifiée avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ transféré à 12,0 mN/m, mais la présence des charges positives des chaînes quaternisées (PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆) ne semble pas affecter sa force d'adhésion (**Tableau VII**). Il faut malgré tout se rappeler qu'une importante hétérogénéité de recouvrement a été observée pour les copolymères quaternisés transférés à haute pression de surface (**Figure 32 B**). On peut donc supposer que plusieurs portions de surface ne sont pas modifiées par le transfert de PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆, expliquant pourquoi une force d'adhésion non significativement différente est observée entre la surface de mica silanisée et celle modifiée avec ce copolymère quaternisé. Les résultats du **Tableau VII** confirment cependant que les charges positives des chaînes P4VP ont un effet important sur l'adhésion d'*Escherichia coli*.

CONCLUSION

L'adhésion des microorganismes et la formation de biofilms sur des surfaces inertes sont des sujets de grand intérêt tant dans le domaine médical qu'agroalimentaire. Cette agglomération de microorganismes aux supports leur permet de survivre à des conditions environnementales défavorables ainsi qu'à certains agents bactéricides. Bien que plusieurs études aient démontré le potentiel de certaines modifications de surface à réduire la bioadhésion (Tiller *et al.*, 2001; Kügler *et al.*, 2005), l'effet de l'organisation moléculaire de chaînes polymères portant des groupements antimicrobiens de type ammonium quaternaire est peu connue. C'est ce qui a fait l'objet de la présente étude de recherche. Les résultats obtenus ont permis d'apporter de nouvelles connaissances concernant les interactions entre des chaînes de polymères greffées sur des surfaces abiotiques et les bactéries pathogènes. Les principaux résultats de l'étude peuvent être résumés comme suit :

L'organisation moléculaire des copolymères utilisés fut déterminée à l'aide des isothermes et de l'imagerie AFM. Il a été déduit que les chaînes des copolymères non-quaternisés demeuraient ancrées à l'interface air-eau jusqu'à des pressions d'environ 40-50 mN/m. La présence d'un pseudo-plateau semble être associée à une réorganisation des chaînes P4VP non solubles dans l'eau, mais sans toutefois les faire transiter en sous-phase comme dans le cas des chaînes PEO. Le rapport N_S/N_{4VP} a un impact majeur sur la longueur de ce plateau. D'après les résultats, plus le rapport des monomères est petit, plus le plateau est long. Ce phénomène a pu être confirmé par l'utilisation de chaînes P4VP de taille similaire pour toutes les molécules PS-P4VP étudiées. En considérant que les A_{lim} correspondent au bloc PS, ces copolymères ont donné lieu à la formation de micelles de surfaces de type 'starlike', selon l'analyse faite à l'aide du modèle micelle-fleur (Deschênes *et al.*, 2008). Pour leur part, les copolymères quaternisés (PS-P4VPQ) ne présentaient pas de pseudo-plateau indiquant un comportement très différent pour les chaînes ionisées. L'analyse semble démontrer que la quaternisation des chaînes induit une réduction de la taille occupée par les chaînes hydrophiles à l'interface, ce qui

conduit à des morphologies micellaires de type 'crew-cut' dans les deux cas étudiés (PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁ et PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆). Que ce soit pour les polymères quaternisés ou non, une grande asymétrie de structure provoque des changements de morphologie en raison d'une déstabilisation des micelles circulaires.

L'imagerie AFM a permis de confirmer plusieurs conclusions de l'analyse des isothermes et a aussi mis en évidence plusieurs hétérogénéités dans les monocouches. Quatre facteurs principaux ont été identifiés pour expliquer ces hétérogénéités : (1) une importante asymétrie de structure induisant un stress de déformation trop grand dans les chaînes polymères, (2) des pressions de transfert élevées, (3) des phénomènes de mouillage et de démouillage et (4) des substrats dont le procédé de silanisation aurait laissé des zones non-hydrophobisées. Ces instabilités ont un effet direct sur les taux de transfert observés et elles ont rendu très difficile l'interprétation des mesures d'angles de contact. Tous les transferts ont permis la réduction des angles de contact, mais pour les chaînes quaternisées et les grandes pressions de transfert, l'hétérogénéité de surface n'a pas permis de réduire l'angle de moins de 40°. Toujours à l'aide de l'AFM, deux conformations de micelles ont été observées pour le copolymère PS₃₉₉-P4VP₁₆₆, soit les formes bâtonnets et circulaires. Cependant, la structure en bâtonnet était prédominante particulièrement lorsque la densité de recouvrement augmentait. L'apparition des formes bâtonnets pourrait être expliquée par une super-agrégation favorisée par le mouillage du PS sur le substrat hydrophobe accompagné par le démouillage simultané des blocs hydrophiles. L'organisation circulaire va même jusqu'à disparaître lorsque la concentration de surface est plus élevée et à ce stage, on constate la présence de parties non recouvertes par le copolymère PS₃₉₉-P4VP₁₆₆. L'observation de tous les types de surfaces modifiées et d'un plus grand nombre d'échantillons permettrait une analyse complète de l'organisation des micelles. En ce qui a trait au copolymère 'starlike' PS₃₂-P4VP₁₇₈, seule la forme circulaire a été observée. Le transfert du copolymère quaternisé PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ produisait une modification de surface plus ou moins uniforme, étant donné que certaines portions de surface étaient non recouvertes par la monocouche. D'après les résultats de Hu *et al.* et de Danny *et al.*, l'utilisation d'un groupement hexyle au lieu d'un méthyle pour la chaîne P4VPQ pourrait augmenter la stabilité du film LB, puisque les chaînes ioniques resteraient ancrées à l'interface plus longtemps.

En ce qui concerne l'adsorption protéique, peu de traitements présentent des différences significatives entre eux et avec la surface de référence. Parmi les traitements présentant des différences significatives avec le contrôle, il est d'intérêt de souligner le cas des polymères quaternisés qui comportent des chaînes pyridinium chargées positivement. Dans le cas du BSA qui est chargé négativement, les agrégats des petites micelles (PS₁₉₂-P4VPQ₁₈₁) induisent considérablement moins d'adhésion que celles de plus grosse taille (PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆). L'augmentation de la pression de transfert et donc, de la densité de recouvrement, augmentait significativement les taux d'adhésion. En raison des hétérogénéités de surface, il n'est pas possible de faire un lien certain entre la taille des polymères et les résultats d'adhésion observés à des taux de transfert élevés ainsi que pour des grandes asymétries de structure. Ceci est vrai pour tous les résultats de bioadhésion obtenus. Les taux d'adhésion supérieurs rapportés pour le TSB ont été attribués à la plus grande concentration protéique de départ. Sauf pour PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆ transféré à haute pression de surface, les résultats d'adsorption des protéines du TSB sont similaires entre eux, mais significativement moins élevés que la surface non modifiée. Dans le cas de PS₃₉₉-P4VPQ₁₆₆, la présence d'hétérogénéités de recouvrement provoquant l'exposition de portions de surfaces hydrophobes, pourrait expliquer un taux d'adsorption protéique du TSB semblable à celui de la surface contrôle.

Pour l'adhésion bactérienne, les variances sont relativement élevées et il y a peu de différence entre les taux observés. Cependant, l'analyse statistique a permis de mettre en évidence que, quelque soit le microorganisme, des chaînes non-ionisées organisées en micelles de petite taille (PS₃₂-P4VP₁₇₈) permettaient de réduire l'adhésion. Dans le cas de *Listeria monocytogenes*, une tendance à l'augmentation de l'adhésion est observée en présence de chaînes quaternisées. Cet effet semble nul dans le cas d'*Escherichia coli*. Mentionnons aussi que pour toutes les surfaces, la quantification de l'adhésion de *Listeria monocytogenes* n'était significativement pas différente de celle d'*Escherichia coli*.

Finalement, l'aspect le plus intéressant de cette étude est sans aucun doute les résultats de la force d'adhésion par unité d'aire des microorganismes sur les différentes surfaces modifiées. Les tests nous ont permis de vérifier que le nombre de bactéries

adhérées était un paramètre indépendant de la force d'adhésion. Dans les industries agroalimentaires, la présence d'une seule bactérie solidement adhérente sur une surface peut résister aux procédés de nettoyage et de désinfection augmentant ainsi le risque de contamination. Les diverses molécules de surfaces d'*Escherichia coli* (flagelles, pilis, LPS) pourraient être responsables de sa force d'adhésion plus élevée. L'utilisation de mutants de flagelles ou de pilis de *E. coli* pourrait confirmer l'implication de ces appendices au niveau des forces d'adhésion des microorganismes aux surfaces. Les chaînes ioniques semblent solidifier l'attachement des microorganismes en raison des forces attractives entre les charges négatives des bactéries et les charges positives des chaînes P4VPQ. L'hétérogénéité de recouvrement, principalement observée à haute pression de transfert, pourrait expliquer la différence non significative entre la force d'adhésion de *E. coli* sur la surface non modifiée et sur celle modifiée avec PS₁₉₂-P4VP₁₈₁ transféré à 12,0 mN/m. Cependant, une analyse plus approfondie serait nécessaire à ce niveau, puisque peu de surfaces ont été caractérisées pour l'évaluation de la force d'adhésion des bactéries aux supports inertes. Peu d'études se sont penchées sur cette question et pourtant, il est primordial en salubrité des aliments de connaître l'impact de la force d'adhésion par unité de surface des microorganismes aux surfaces.

En conclusion, malgré l'acquisition d'un certain nombre d'éléments importants, beaucoup de choses restent à faire et à découvrir. Par exemple, il serait intéressant d'évaluer l'adsorption de protéines impliquées dans la formation de biofilms, plus précisément, lors de l'adhésion initiale des bactéries. Les flagelles, les pilis ainsi que les fimbriae en sont quelques exemples. Puisque nous avons examiné l'adhésion microbienne uniquement d'après les comptes viables et la microscopie électronique à balayage, cette étude ne nous permet pas de conclure quant à l'efficacité bactéricide des surfaces modifiées. L'utilisation d'un procédé nommé Live/Dead *BacLight* Bacterial qui colore les cellules vivantes et mortes adhérentes sur des surfaces de deux différentes couleurs, permettrait d'évaluer la bactéricidie des copolymères transférés en fonction de la longueur de leurs chaînes ainsi que de leur densité de recouvrement. La mauvaise qualité des surfaces silanisées a peut-être aussi affectée les divers résultats d'adsorption et d'adhésion. C'est pourquoi il serait important de contrôler cet aspect en

utilisant soit un autre substrat hydrophobe (polystyrène, silice + acide fluorhydrique) ou en modifiant la technique de silanisation.

Les sujets de recherche portant sur l'adhésion des bactéries aux surfaces sont nombreux. Le film de conditionnement, le temps de contact, la température et la disponibilité des nutriments sont quelques exemples de paramètres qui pourraient être expérimentés lors d'études complémentaires. Il serait aussi intéressant d'étudier la formation de biofilms sur des surfaces inertes à l'aide d'un mélange de genres bactériens, comme par exemple *Pseudomonas* spp. et *Escherichia coli*. Une meilleure connaissance des facteurs et des processus de l'adhésion microbienne permettrait d'orienter l'élaboration de procédures beaucoup plus efficaces de nettoyage et de désinfection dans les industries agroalimentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- Agence de Santé Publique du Canada (ASPC). 2003. Première éclosion déclarée de *Listeria monocytogenes* dans la province de Québec, 2002. vol. 29-21. s.p.
- Allion, A., Baron, J.P., Boulange-Petermann, L. 2006. Impact of Surface Energy and Roughness on Cell Distribution and Viability. *Biofouling*. vol. 22. p. 269-278.
- Auvray, F., Chassaing, D., Duprat, C., Charpentier, B. 2007. The *Listeria monocytogenes* Homolog of the *Escherichia coli* era Gene is Involved in Adhesion to Inert Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 73. p. 7789-7792.
- Barton, A.F.M. 2000. Handbook of Polymer-Liquid Interaction Parameters and Solubility Parameters. 1^{ère} édition. Floride: *CRC-Press*. 768 p.
- Bellon-Fontaine, M-N., Cerf, O. 1991. Mécanismes d'adhésion des microorganismes aux surfaces : facteurs influant sur l'adhésion. Institut National de la Recherche Agronomique. Laboratoire de génie de l'hygiène et des procédés alimentaires. vol. 108. p. 13-17.
- Belval, S.C., Gal, L., Margiewes, S., Garmyn, D., Piveteau, P., Guzzo, J. 2006. Assessment of the Roles of LuxS, S-Ribosyl Homocysteine, and Autoinducer 2 in Cell Attachment During Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 72. p. 2644-2650.
- Berlot, S., Aissaoui, Z., Pavon-Djavid, G., Belleney, J., Jozefowicz, M., Héлары, G., Migonney, V. 2002. Biomimetic Poly(methyl methacrylate)-Based Terpolymers: Modulation of Bacterial Adhesion Effect. *Biomacromolecules*. vol. 3. p. 63-68.

- Berrang, M.E., Frank, J.F., Meinersmann, R.J. 2008. Effect of Chemical Sanitizers with and without Ultrasonication on *Listeria monocytogenes* as a Biofilm within Polyvinyl Chloride Drain Pipes. *J. Food Prot.* vol. 71. p. 66-69.
- Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Lodge, F., Call, D.R. 2003. Variation in Biofilms among Strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 69. p. 7336-7342.
- Bosker, W.T.E., Iakovlev, P.A., Norde, W., Cohen Stuart, M.A. 2005. BSA Adsorption on Bimodal PEO Brushes. *J. Colloid Interface Sci.* vol. 286. p. 496-503.
- Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., Bellon-Fontaine, M-N. 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A : Cell Surface Charge, Hydrophobicity and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 65. p. 5328-5333.
- Bridgett, M.J., Davies, M.C., Denyer, S.P. 1992. Control of Staphylococcal Adhesion to Polystyrene Surfaces by Polymer Surface Modification with Surfactants. *Biomaterials.* vol. 13. p. 411-416.
- Busscher, H.J., Bos, R., Van Der Mei, H.C. 1995. Initial Microbial Adhesion is a Determinant for the Strength of Biofilm Adhesion. *FEMS Microbiol. Lett.* vol. 128. p. 229-234.
- Busscher, H.J., Van Der Mei, H.C. 1997. Physico-Chemical Interactions in Initial Microbial Adhesion and Relevance for Biofilm Formation. *Adv. Dent. Res.* vol. 11. p. 24-32.
- Calderara, F. 1995. Synthèse et caractérisation de copolymères à blocs, à base de vinylpyridine et de latex acryliques. Réalisation de revêtements protecteurs temporaires et lubrifiants sur substrats métalliques. Thèse de doctorat. Paris. Université de Haute. 324 p.

- Caro, T., Tang, H., Liang, X., Wang, A., Auner, G.W., Salley, S.O., Simon Ng, K.Y. 2005. Nanoscale Investigation on Adhesion of *E. coli* to Surface Modified Silicone Using Atomic Force Microscopy. *Biotechnol. Bioeng.* vol. 94. p.167-176.
- Carpentier, B., Cerf, O. 1993. Biofilms and their Consequences with Particular References to Hygiene in the Food Industry. *J. Appl. Bacteriol.* vol. 75. p.499-511.
- CDC. 2007. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food – 10 States, 2006. United States. *MMWR.* vol. 56. p. 336-339.
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M-N., Hebraud, M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability to Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 68. p. 728-737.
- Chmielewski, R.A.N., Frank, J.K. 2003. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *CRFSFS.* vol. 2. p. 22-32.
- Choi, M., Chung, B., Chun, B., Chang, T. 2004. Surface Micelle Formation of Polystyrene-*b*-Poly(2-vinyl pyridine) Diblock Copolymer at Air-Water Interface. *Macromol. Res.* vol. 12. p. 127-133.
- Chung, B., Choi, M., Ree, M., Jung, J.C., Zin, W.C., Chang, T. 2006. Subphase pH Effect on Surface Micelle of Polystyrene-*b*-Poly(2-vinyl-pyridine) Diblock Copolymers at the Air-Water Interface. *Macromolecules.* vol. 39. p. 684-689.
- Cong, Y., Zhang, Z., Fu, J., Li, J., Han, Y. 2005. Water-Induced Morphology Evolution of Block Copolymer Micellar Thin Films. *Polymer.* vol. 46. p. 5377-5384.

- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial Biofilms: a Common Cause of Persistent Infections. *Science*. vol. 284. p. 1318-1322.
- Denny, B.J., Novotny, L., West, P.W., Blesova, M., Zamocka, J. 2005. Antimicrobial Activity of a Series of 1-Alkyl-2-(4-Pyridyl)Pyridinium Bromides against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Med. Princ. Prac.* vol. 14. p. 377-381.
- Desai, N.P., Hossainy, S.F., Hubbell, J.A. 1992. Surface-Immobilized Polyethylene Oxide for Bacterial Repellence. *Biomaterials*. vol. 13. p. 417-420.
- Deschênes, L. 2005. Mouillabilité, angles de contact et énergies de surface; principes de base et identification des points critiques. Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments. Saint-Hyacinthe. Rapport industriel. 15 p.
- Deschênes, L. 2006. Monocouches, films de Langmuir et films de Langmuir-Blodgett. Centre de recherche et développement sur les aliments (CRDA). Saint-Hyacinthe. Rapport industriel. 30 p.
- Deschênes, L., Bousmina, M., Ritcey, A.M. 2008. Micellization of PEO/PS Block Copolymers at the Air/Water Interface: a Simple Model for Predicting the Size and Aggregation Number of Circular Surface Micelles. *Langmuir*. vol. 24. p. 3699-3708
- Dewanti, R., Wong, A.C. 1995. Influence of Culture Conditions on Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 26. p. 147-164.
- Dhruv, H., Pepalla, R., Taveras, M., Britt, D.W. 2006. Protein Insertion and Patterning of PEG Bearing Langmuir Monolayers. *Biotechnol. Prog.* vol. 22. p. 150-155.

- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'Orio, V., Vergara, A., Conter, M., Ianieri, A. 2008. Influence of Temperature on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* on Various Food-Contact Surfaces : Relationship with Motility and Cell Surface Hydrophobicity. *J. Appl. Microbiol.* vol. 104. p. 1552-1561.
- Donlan, R.M. 2000. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* vol. 8. p. 881-890.
- Downer, A., Norris, N., Feast, W.J., Stickler, D. 2003. Polymer Surface Properties and their Effect on the Adhesion of *Proteus mirabilis*. *Proc. Instn. Mech. Engrs.* vol. 217. p. 279-289.
- Dreeszen, P.H. 2003. The Key to Understanding and Controlling Bacterial Growth in Automated Drinkingwater Systems, Second Edition. *Edstrom Industries Inc.*
« http://www.edstrom.com/DocLib/4230-DS3100_CompleteBiofilm.pdf ».
Consulté le 6 mars 2008.
- Dubreuil, F. 2001. Structure et déformation des films de Langmuir : application aux copolymères diblocs neutres-chargés. Thèse de doctorat. Paris.
Université de Paris 6. 206 p.
- Encyclopédie Wikipédia. 2008. Atomic Force Microscope. « http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_force_microscope ». Consulté le 19 mars 2008.
- Encyclopédie Wikipédia. 2007. Wilhelmy Plate. « http://en.wikipedia.org/wiki/Wilhelmy_plat ». Consulté le 18 mars 2008.
- Faille, C., Julien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.N., Slomianny, C., Benezech, T. 2002. Adhesion of *Bacillus* Spores and *Escherichia coli* Cells to Inert Surfaces: Role of Surface Hydrophobicity. *Can. J. Microbiol.* vol. 48. p. 728-738.

- Fang, H.H.P., Chan, K.Y., Xu, L.C. 2000. Quantification of Bacterial Adhesion Forces Using Atomic Force Microscopy (AFM). *J. Microbiol. Methods*. vol. 40. p. 89-97.
- Firt Ten Ångstroms. 2008. FTA200; Overview. « <http://www.firsttenangstroms.com/products/fta200/fta200.html> ». Consulté le 18 mars 2008.
- Ghigo, J-M. 2002. Rapport d'activité de l'unité génétique des biofilms pour l'année 2002. Institut Pasteur. « <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Ggb/Rapdac.pdf>. WEB/RapDac.2002.f.pdf ». Consulté le 8 mars 2008.
- Gottenbos, B., Grijpma, D.W., Van Der Mei, H.C., Feijen, J., Busscher, H.J. 2001. Antimicrobial Effects of Positively Charged Surfaces on Adhering Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* vol. 48. p. 7-13.
- Gross, M., Cramton, S.E., Götz, F., Peschel, A. 2001. Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surface. *Infect. Immun.* vol. 69. p. 3423-2326.
- Guyader, P., Amgar, A., Coignard, M. 1996. La désinfection. J. Microbiologie Alimentaire – Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 1. Tec et Doc. Paris. Partie V. Chap. 2. p. 442-459.
- Hall-Stoodley, L., Brun, O.S., Polshynya, G., Barker, L.P. 2006. *Mycobacterium marinum* Biofilm Formation Reveals Cording Morphology. *FEMS Microbiol. Lett.* vol. 257. p. 43-49.
- Hermansson, M. 1999. The DLVO Theory in Microbial Adhesion. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. vol. 14. p. 105-119.

- Hood, S.K., Zottola, E.A. 1997. Adherence to Stainless Steel by Foodborne Microorganisms During Growth in Model Food Systems. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 37. p. 145-153.
- Hu, F.X., Neoh, K.G., Cen, L., Kang, E.T. 2005. Antibacterial and Antifungal Efficacy of Surface Functionalized Polymeric Beads in Repeated Applications. *Biotechnol. Bioeng.* vol. 89. p. 474-484.
- Hubin, M. 2003. Technologie des couches minces; technologies pour capteur microchimiques. « http://pagesperso-orange.fr/michel.hubin/physique/couche/chap_pc3.htm ». Consulté le 12 mars 2008.
- Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). 1998. Listeria monocytogenes : une bactérie sous haute surveillance. Paris. « <http://www.inra.fr/internet/Directions/DIC/ACTUALITES/DOSSIERS/DOC/secualim/pdf98/listeria.pdf> ». Consulté le 3 mars 2008.
- Ista, L.K., Fan, H., Baca, O., Lopez, G.P. 1996. Attachment of Bacteria to Model Solid Surfaces: Oligo(ethylene glycol) Surfaces Inhibit Bacterial Attachment. *Microbiology Letters*. vol. 142. p. 59-63.
- Kaper, H.J., Busscher, H.J., Norde, W. 2002. Characterization of Poly(ethylene oxide) Brushes on Glass Surfaces and Adhesion of Staphylococcus epidermidis. *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* vol. 14. p. 313-324.
- Kawabata, N., Nishiguchi M. 1988. Antibacterial Activity of Soluble Pyridinium-Type Polymers. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 54. p. 2532-2535.
- KSV Instruments. 2008. Contact Angle. « <http://www.ksvltd.com/content/index/keyca> ». Consulté le 19 mars 2008.

KSV Instruments. 2008. Surface Tension (ST), γ . « <http://www.ksvltd.com/content/index/keys> ». Consulté le 31 janvier 2008.

KSV Instruments. 2008. Wettability. « <http://www.ksvltd.com/content/index/keywettability> ». Consulté le 19 mars 2008.

Kügler, R., Bouloussa, O., Rondelez, F. 2005. Evidence of a Charge-Density Threshold for Optimum Efficiency of Biocidal Cationic Surfaces. *Microbiology*. vol. 151. p. 1341-1348.

Kumar, C.G., Anand, S.K. 1998. Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: a Review. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 42. p. 9-27.

Le Bouguéneq, C. 1999. Diagnostic des différents pathovars de *Escherichia coli* responsables de diarrhées chez l'homme. *Revue Française des laboratoires*. vol. 1999. p. 33-37.

Lemon, K.P., Higgins, D.E., Kolter, R. 2007. Flagellar Motility is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* vol. 189. p. 4418-4424.

Lin, W.C., Liu, T.Y., Yang, M.C. 2004. Hemocompatibility of Polyacrylonitrile Dialysis Membrane Immobilized with Chitosan and Heparin Conjugate. *Biomaterials*. vol. 25. p. 1947-1957.

Lindsay, D., Von Holy, A. 1997. Evaluation of Dislodging Methods for Laboratory-Grown Bacterial Biofilms. *Food Microbiology*. vol. 14. p. 383-390.

Lipatov, Y.S., Tosiichuk, T.T., Chornava, V.N. 1995. Adsorption of Mixtures of Polymers from Dilute and Semi-dilute Solutions. *Russ. Chem. Rev.* vol. 64. p. 463-469.

- Lee, N.K., Obukhov, S. 2004. Collapse Dynamics of a Polyelectrolyte. *Europhys. Lett.* vol. 66. p. 350-356.
- Loosdrecht, M.S.M., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J.B., 1990. Influence of Interfaces on Microbial Activity. *Microbiol. Reviews.* vol. 54. p. 75-87.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J., Magny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel, Glass, Polypropylene and Rubber Surfaces After Short Contact Times. *J. Food Prot.* vol. 53. p. 742-746.
- Mafu, A.A., Roy, D., Montpetit, D. 1998. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* to Water Distribution System Pipes After Different Contact Times. *J. Food Prot.* vol. 61. p. 1321-1329.
- Mafu, A.A., Roy, D., Lemay, M-J., Montpetit, D. 2002. Evidence for *Escherichia coli* O157:H7 Attachment to Water Distribution Pipe Materials by Scanning Electron Microscopy. *J. Food Prot.* vol. 65. p. 1970-1975.
- Marmur, A. 1996. Equilibrium Contact Angles: Theory and Measurement. *Colloids and Surfaces A. Phys. Eng. Aspects.* vol. 116. p. 55-61.
- Moraille, P. 2002. Étude de miscibilité et séparation de phase de monocouches Langmuir et Langmuir-Blodgett pour les mélanges phospholipidiques DPPC/DLPC et DPPC/DLPC/cholesterol. Mémoire de maîtrise. Montréal. Université de Montréal. 97 p.
- Müller, R., Hiller, K.A., Schmalz, G., Ruhl, S. 2006. Chemiluminescence-Based Detection and Comparison of Protein Amounts Adsorbed on Differently Modified Silica Surfaces. *Analytical Biochemistry.* vol. 359. p. 194-202.

- Mykhaylyk, T.A., Evans, S.D., Fernyhough, C.M., Hamley, I.W., Henderson, J.R. 2003. Surface Energy of Ethylene-co-Butene Copolymers Determined by Contact Angle Methods. *J. Colloid Interface Sci.* vol. 260. p. 234-239.
- Netz, R.R., Andelman, D. 2003. Neutral and Charged Polymers at Interfaces.
« http://arxiv.org/PS_cache/cond-mat/pdf/0203/0203364v2.pdf ».
Consulté le 13 mars 2008.
- Parry, SM., Palmer, S.R. 2000. The public Health Significance of VTEC O157.
J. Appl. Microbiol. vol. 88 (supp). p. 1S-9S.
- Pratt, L.A., Kolter, R. 1998. Genetic Analysis of *Escherichia coli* Biofilm Formation: Roles of Flagella, Motility, Chemotaxis and Type I Pili. *Mol. Microbiol.*
vol. 30. p. 285-293.
- Price, C. 1982. Developments in Block Copolymers-1. Éd. I. Goodman.
Applied Science. Londre. 358 p.
- Radmacher, M., Cleveland, J.P., Fritz, M., Hansma, H.G., Hansma, P.K. 1994.
Mapping Interaction Forces with the Atomic Force Microscope. *Biophys. J.*
vol. 66. p. 2159-2165.
- Ramsay, D., Trottier, J. 2007. Bilan annuel des toxi-infections alimentaires et plaintes requérant des prélèvements alimentaires. 1^{er} avril 2006 au 31 mars 2007.
Centre d'inspection des aliments et de santé animale. Gouvernement du Québec.
p. 13-28.
- Razatos, A., Ong, Y.L., Sharma, M.N., Georgiou, G. 1998. Molecular Determinants of Bacterial Adhesion Monitored by Atomic Force Microscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. vol. 95. p. 11059-11064.

- Romet-Lemonne, G. 2002. Copolymères diblocs chargés aux interfaces liquides.
Thèse de doctorat. Paris. Université Paris XI Orsay. 200 p.
- Roosjen, A., Kaper, H.J., Van Der Mei, H.C., Norde, W., Busscher, H.J. 2003. Inhibition of Adhesion of Yeasts and Bacteria by Poly(ethylene oxide)-Brushes on Glass in a Parallel Plate Flow Chamber. *Microbiology*. vol. 149. p. 3239-3246.
- Salloum, D.S., Schlenoff, J.B. 2004. Protein Adsorption Modalities on Polyelectrolytes Multilayers. *Biomacromolecules*. vol. 5. p. 1089-1096.
- SCÉRÉN – CNDP. 2006. La microscopie électronique à balayage. « http://www.cndp.fr/themadoc/micro3/rep_meb.htm ». Consulté le 18 mars 2008.
- Schowalter, W.R., Eldsath, A.B. 2001. Brownian Flocculation of Polymer Colloids in the Presence of a Secondary Minimum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 98. p. 3644-3651.
- Schwarzkopf, A. 1996. Listeria monocytogenes--Aspects of Pathogenicity. *Pathol. Biol. (Paris)*. vol. 44. p. 769-774.
- Seckin, T., Önal, Y., Yesilada, Ö., Gültek, A. 1997. Preparation and Characterization of a Clay-Polyvinylpyridinium Matrix for the Removal of Bacterial Cells from Water. *J. Materials. Science*. vol. 32. p. 5993-5999.
- Sénéchal, A., Carrigan, S.D., Tabrizian, M. 2004. Probing Surface Adhesion Forces of Enterococcus faecalis to Medical-Grade Polymers Using Atomic Force Microscopy. *Langmuir*. vol. 20. p. 4172-4177.
- Sheng, X., Thing, Y.P., Pehkonen, S.O. 2007. Force Measurements of Bacterial Adhesion on Metals Using a Cell Probe Atomic Force Microscope. *J. Colloid Interface Sci.* vol. 310. p. 661-669.

- Shin, K., Lennox, R.B., Eisenberg, A., Gibaud, A., Huang, J., Hsu, S.L., Satija, S.K. 2001. Observation of Surface Ordering of Alkyl Side Chains in Polystyrene/Polyelectrolytes Diblock Copolymer Langmuir Films. *Langmuir*. vol. 17. p. 4955-4961.
- Sidorov, S.N., Bronstein, L.M., Kabachii, Y.A., Valetsky, P.M., Soo, P.L., Maysinger, D., Eisenberg, A. 2004. Influence of Metalation on the Morphologies of Poly(ethylene oxide)–Block-Poly(4-vinylpyridine) Block Copolymer Micelles. *Langmuir*. vol. 20. p. 3543-3550.
- Simonyan, L., Ritcey, A., Galstian, T. 2004. La préparation des couches minces fluorées par la technique de Langmuir-Blodgett. Université Laval. Québec.
« <http://www.copl.ulaval.ca/affiches/2004/Lsimonyan-mat.pdf> ». Consulté le 13 mars 2008.
- Skłodowska, A., Wazniak, M., Matlakowska, R. 1999. The Method of Contact Angle Measurements and Estimation of Work of Adhesion in Bioleaching of Metals. *Biol. Proc. Online*. vol. 1. p. 114-121. « <http://www.biologicalprocedures.com> ». Consulté le 13 mars 2008.
- Soini, S.M., Koskinen, K.T., Vilenius, M.J., Puhakka, J.A. 2002. Effects of Fluid-Flow Velocity and Water Quality on Planktonic and Sessile Microbial Growth in Water Hydraulic Wystem. *Water Res.* vol. 36. p. 3812-3820.
- Takei, Y.G., Yui, N., Okano, T., Maruyama, A., Sanui, K., Sakurai, Y., Ogata, N. 1994. Postadsorptive Behavior of Plasma Proteins on Poly(propylene oxide)-Segmented Nylon-610 Surfaces and its Implication in Preventing Contact-Induced Activation of Platelets on these Surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* vol. 6. p. 149-168.
- Tiller, J.C., Liao, C.J., Lewis, K., Klibanov, A.M. 2001. Designing Surfaces that Kill Bacteria on Contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 98. p. 5981-5985.

- Trudel, L., Barbeau, J. 2005. Les biofilms microbiens. Notes de cours de Pathogénèse Microbienne. Automne 2005. Université de Montréal. Faculté de Médecine Vétérinaire. Saint-Hyacinthe. 46 p.
- Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M.P., Wells, J.G., Zhao, T., Tauxe, R.V., Griggin, P.M. 1999. Lessons from a Large Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections: Insights Into the Infectious Dose and Method of Widespread Contamination of Hamburger Patties. *Epidemiol. Infect.* vol. 122. p. 185-192.
- Uekusa, T., Nagano, S., Seki, T. 2006. Sharp Temperature Dependency of 2D Spreading Behaviour in Amphiphilic Block Copolymer at the Air-Water Interface. *Colloids and Surfaces A. Phys. Eng. Aspects.* vol. 284-285. p. 207-211.
- Ulett, G.C., Mabbett, A.N., Fung, K.C., Webb, R.I., Schembri, M.A. 2007. The Role of F9 Fimbriae of Uropathogenic *Escherichia coli* in Biofilm Formation. *Microbiology.* vol. 153. p. 2321-2331.
- Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C.E.R., Rees, C.E.D., Waites, W.M. 2000. Effect of Flagella on Initial Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 66. p. 860-863.
- VWR. 2002. Trypticase Soja (Bouillon). « http://fr.vwr.com/fr_FR/content/thematics/Microbiology/pdf/microbio_manuel_086.pdf ». Consulté le 4 mars 2008.
- Wang, Z. 1997. Développement d'un microscope à force atomique multifonctionnel associé à un microscope électronique à balayage. Thèse de doctorat. Reims. Université de Reims. 190 p.
- Yu, H., Heand, N.E. 2002. Persistent Infections and Immunity in Cystic Fibrosis. *Front. Biosci.* vol. 7. p. 442- 457.

- Zhang, L., Eisenberg, A. 1998. Formation of Crew-Cut Aggregates of Various Morphologies from Amphiphilic Block Copolymers in Solution. *Polymer Adv. Tech.* vol. 9. p. 677-699.
- Zhu, J., Eisenberg, A., Lennox, R.B. 1991. Interfacial Behavior of Block Polyelectrolytes. 1. Evidence for Novel Surface Micelle Formation. *J. Am. Chem. Soc.* vol. 113. p. 5583-5588.
- Zhu, J., Hanley, S., Eisenberg, A., Lennox, R.B. 1992. Interfacial Behaviour of Block Polyelectrolytes, III. Formation of Surface Micelles. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* vol. 53. p. 211-220
- Zhu, J., Lennox, R.B., Eisenberg, A. 1992. Polymorphism of (Quasi) Two-Dimensional Micelles. *J. Phys. Chem.* vol. 96. p. 4727-4730.

ANNEXE I

Taux de transfert des surfaces modifiées avec différents copolymères

PS_m-P4VP(Q)_n

PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁	Pression de transfert (mN/m)	Taux de transfert
T1.1	2,5	1,03
T1.2	2,5	0,88
T1.3	2,5	1,01
T1.4	2,5	1,15
T2.1	6,3	1,03
T2.2	6,3	1,01
T2.3	6,3	0,84
T3.1	7,5	0,56
T3.2	8,3	0,68
T3.3	7,5	0,64
T4.2	15,0	0,62
T4.3	15,0	0,65
T4.4	15,0	0,70
T4.5	10,0	0,65

ANNEXE I

PS₃₉₉-P4VP₁₆₆	Pression de transfert (mN/m)	Taux de transfert
T1.1	2,5	1,04
T1.2	1,5	1,08
T2.1	7,0	0,78
T2.2	7,5	1,08
T2.3	7,8	0,95
T3.2	7,5	0,80
T3.3	7,1	0,80
T3.4	9,0	0,84
T4.1	10,0	0,62
T4.3	10,0	0,58
T4.5	9,5	0,61

PS₃₂-P4VP₁₇₈	Pression de transfert (mN/m)	Taux de transfert
T1.1	2,5	1,17
T2.1	5,8	0,61
T2.2	3,8	1,15
T2.3	5,8	0,89
T3.1	7,8	0,78
T3.3	6,6	0,80
T4.1	9,5	0,86
T4.2	8,0	0,80

ANNEXE I

PS ₁₉₂ -P4VPQ ₁₈₁	Pression de transfert (mN/m)	Taux de transfert
T1.1	1,5	0,80
T1.2	3,5	0,64
T1.3	1,0	0,96
T1.4	1,0	0,86
T2.1	4,0	0,66
T2.2	5,4	0,57
T2.4	3,8	0,80
T3.4	10,0	0,45
T3.5	5,8	0,68
T3.6	6,5	0,67

PS ₃₉₉ -P4VPQ ₁₆₆	Pression de transfert (mN/m)	Taux de transfert
T1.1	1,2	1,03
T1.2	1,0	1,12
T2.2	4,0	0,61
T2.4	2,5	0,51
T2.5	2,0	0,62
T2.6	2,2	0,74
T3.2	5,5	0,51
T3.4	5,0	0,70
T3.7	6,0	0,72

ANNEXE II

Angles de contact des surfaces modifiées mesurés avec trois liquides de référence

Transferts	Angles de contact (°)		
	Eau ultra-pure	Formamide	α -bromonaphtalène
M.S.	114,7 ± 5,1	79,9 ± 1,0	40,3 ± 0,9
PS ₁₉₂ -P4VP ₁₈₁			
T1	70,2 ± 6,2	70,3 ± 1,6	34,2 ± 0,4
T2	66,2 ± 0,7	68,9 ± 0,9	26,4 ± 2,8
T3	57,7 ± 5,6	58,6 ± 2,1	23,9 ± 1,8
T4	54,2 ± 0,7	64,0 ± 2,1	26,4 ± 2,2
PS ₃₉₉ -P4VP ₁₆₆			
T1	66,8 ± 1,0	68,4 ± 4,1	27,4 ± 1,5
T2	61,9 ± 3,8	63,8 ± 1,4	27,2 ± 3,4
T3	55,9 ± 4,5	65,2 ± 1,7	31,9 ± 2,0
T4	54,3 ± 3,2	62,4 ± 1,4	27,8 ± 1,5
PS ₃₂ -P4VP ₁₇₈			
T1	65,6 ± 2,3	SO	SO
T2	59,8 ± 3,1	67,3 ± 1,7	34,7 ± 2,7
T3	55,3 ± 3,5	67,1 ± 1,2	28,3 ± 3,4
T4	43,1 ± 1,9	43,6 ± 3,6	25,3 ± 2,7
PS ₁₉₂ -P4VPQ ₁₈₁			
T1	69,3 ± 2,3	72,4 ± 6,2	37,3 ± 2,6
T2	57,8 ± 5,5	68,1 ± 0,8	34,5 ± 2,5
T3	54,9 ± 3,6	68,7 ± 1,1	30,2 ± 4,5
PS ₃₉₉ -P4VPQ ₁₆₆			
T1	69,1 ± 0,9	70,8 ± 3,5	31,6 ± 1,7
T2	63,4 ± 1,3	67,5 ± 1,2	30,2 ± 1,6
T3	62,1 ± 2,7	64,6 ± 3,1	35,9 ± 1,5

SO : sans objet