

Des surfaces antibactériennes et autostériles

Francis Rondelez* directeur de recherche CNRS, Pascal Bezou** chercheur

Summary : *Self-sterile and antimicrobial surfaces*

A new approach of soft chemistry in solution is proposed which allows the elaboration of materials with exceptional biocidal properties. In the near future, they should offer better control of the bacteria growth in our surroundings. On the contrary to the systems presently available on the market, in which biocidal molecules are gradually released, the crux of the method is to functionalize the substrate with biocidal molecules covalently bonded to the solid surface. We have used the recent developments of self-assembled monolayers to form ultra-thin layers of long-chain quaternary ammonium compounds, with controlled architecture. The thickness is monomolecular and the grafting density is large. The high local concentration of biocidal molecules creates conditions rarely encountered in classical bacteriology. Such materials constitute a new weapon against bacteria infections in operating rooms, in our food, or in our living quarters.

Mot clés : *Prolifération bactérienne, monocouches greffées, chimie douce.*

Key-words : *Bacteria control, grafted monolayers, soft chemistry.*

Les bactéries existent depuis 3 milliards d'années. Ce sont les premières cellules capables de se diviser qui sont apparues sur la terre. Elles sont partout, aussi bien à l'état libre, dans l'eau, dans l'air et à la surface de notre peau, qu'à l'état domestiqué, dans les fermenteurs industriels ou dans les médicaments. Il en existe de nombreuses familles et, suivant les cas, elles peuvent être utiles ou nuisibles. Bonnes, elles nettoient les plages après une marée noire et assurent la production de certaines vitamines. Mauvaises, elles sont à l'origine de multiples maladies : angines, gastro-entérites, dysenteries, choléra, peste ou encore tuberculose. Elles peuvent aussi contaminer eau et aliments. Elles sont enfin les grandes responsables des infections nosocomiales qui chaque année affectent un million de personnes en France et sont la cause de 10 000 décès, plus que les accidents de la route [1, 2].

Les bactéries pathogènes les plus connues ont pour nom *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* dans les hôpitaux, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* dans le domaine de l'agro-alimentaire, et *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococci* un peu partout.

Combattre les bactéries n'est pas tâche facile. Ces êtres vivants, que l'on considère volontiers comme primitifs car ils ne comportent pas de noyau cellulaire, ont développé des mécanismes de défense extrêmement sophistiqués contre les agressions extérieures. Les bactéries sont entourées de multiples barrières de protection (parois, membranes...) et sont capables de mettre en œuvre des protéines spécialisées pour dégrader ou expulser les molécules chimiques qui leur

seraient toxiques. Elles peuvent aussi se regrouper au sein de colonies et former des biofilms impénétrables.

Des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à tous les antibiotiques connus à ce jour ont été découvertes au Japon et aux États-Unis [3, 5]. Le dernier rempart que formait la vancomycine vient de sauter sous la pression de sélection du monde bactérien. Il en est de même pour les sels biocides d'argent ou d'étain que les bactéries parviennent désormais à expulser de leur cytoplasme grâce à des pompes spécialisées [6].

Il est donc extrêmement important de trouver de nouvelles formes de lutte ou à tout le moins de contrôle de la prolifération bactérienne. C'est ce que propose notre équipe à l'Institut Curie sous la forme de surfaces dites « hyperbactéricides ». L'originalité de l'approche est qu'elle ne nécessite pas de molécules nouvelles mais qu'elle propose une utilisation plus rationnelle des molécules existantes. Elle consiste à regrouper toutes les molécules actives sur une même surface solide au lieu de les disperser dans une solution. L'action coopérative exercée sur les bactéries lorsqu'elles viennent au contact de la paroi traitée s'avère beaucoup plus efficace que la somme des actions individuelles et les effets obtenus sont spectaculaires [7]. Ces résultats ont pu être acquis grâce aux connaissances antérieures accumulées par notre groupe sur le dépôt contrôlé de molécules organiques en couche d'épaisseur monomoléculaire et qui ont déjà fait l'objet de plusieurs publications [8-11].

Principe de fabrication des matériaux hyperbactéricides

La méthode

La méthode que nous avons développée pour rendre un matériau hyperbactéricide consiste à couvrir sa surface avec un tapis continu et homogène de molécules biocides. Pour

* Laboratoire de physico-chimie « Curie » (UMR 168), Institut Curie, section Recherche, 26, rue d'Ulm, 75231 Paris Cedex 05. Tél. : 01.42.34.67.89. Fax : 01.40.51.06.36. E-mail : Francis.Rondelez@curie.fr

** Laboratoire de physico-chimie « Curie » (UMR 168), Institut Curie, section Recherche, 26, rue d'Ulm, 75231 Paris Cedex 05. Tél. : 01.42.34.67.73. Fax : 01.40.51.06.36. E-mail : Pascal.Bezou@curie.fr

être efficace, on doit être capable de former une couche dense, homogène et d'épaisseur monomoléculaire. De plus, l'orientation des molécules doit être contrôlée de façon à ce que leur partie active soit tournée vers le milieu extérieur (figure 1).

L'épaisseur totale du dépôt est de l'ordre de quelques nanomètres seulement. Les liaisons chimiques entre chaque bâtonnet et la surface du matériau, ainsi qu'entre un bâtonnet et son cône, sont des liaisons covalentes, permanentes et extrêmement résistantes. Le traitement est donc irréversible dans les conditions habituelles d'utilisation.

Le traitement comprend trois étapes. On commence par activer chimiquement la surface à traiter pour créer des sites réactifs. On fait ensuite réagir les groupes superficiels ainsi formés avec des molécules espaceurs qui vont jouer le rôle de « porte-greffe ». Enfin, on fait une dernière réaction chimique sur le tapis organique formé pour incorporer les fonctions biocides. A condition de procéder avec soin, on parvient ainsi à former une couche biocide d'épaisseur monomoléculaire et bien orientée à la surface du matériau. Les conditions à réaliser pour une telle réaction dépendent du substrat. Dans le cas du verre, elles ont été bien étudiées par notre groupe vers le milieu des années 1990. Nous avons montré qu'elles dépendent d'une part de l'état d'hydratation de la surface avant traitement et, d'autre part, de la température à laquelle est effectuée la réaction [9]. C'est ainsi qu'il existe une température critique à ne pas dépasser sous peine d'obtenir une couche mal définie, et qui dépend de la longueur de la molécule espaceur, généralement une chaîne hydrocarbonée et fonctionnalisée à ses 2 extrémités [8]. Le

détail des traitements et leur durée varient en fonction des matériaux à traiter, mais le principe reste toujours identique. Il est possible de visualiser la formation de la couche monomoléculaire par la technique optique dite d'ellipsométrie qui est basée sur l'analyse de la polarisation de la lumière laser réfléchie par la surface de l'échantillon. La figure 2 montre une cartographie de la surface d'un disque de silicium oxydé, aux différentes étapes du traitement.

Les matériaux

De nombreux matériaux peuvent être traités par ce procédé. Nous avons traité avec succès des matériaux minéraux comme le verre, des matériaux plastiques comme le polychlorure de vinyle (PVC), et enfin des matériaux du monde vivant comme la cellulose.

Comme le traitement se fait en phase liquide, la forme de la surface est également sans importance (figure 3). Des tubes ont pu être traités aussi bien que des billes, des plaques ou des objets de forme plus compliquée. La seule condition est que la surface puisse être mise en contact avec la solution de traitement. La paroi intérieure d'un tube creux pourra être traitée aussi facilement que la paroi extérieure si l'on plonge entièrement le tube dans le bain de traitement. Pour traiter uniquement la partie intérieure, il suffit de remplir le tube avec la solution et de boucher les 2 extrémités. Cette flexibilité est très supérieure à celle des traitements par plasma froid ou bombardement d'électrons qui imposent de ne traiter que les parties directement en regard de la source d'irradiation.

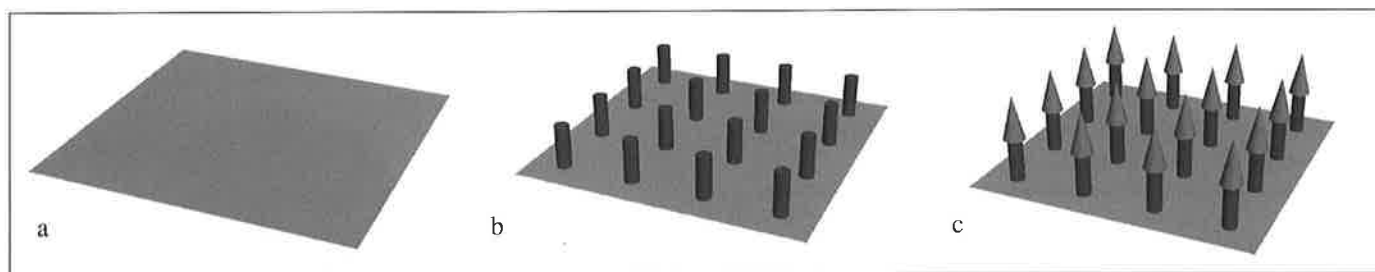


Figure 1 - Représentation schématique d'une surface traitée pour la rendre hyperbactéricide. La figure a montre une surface plane, initialement exempte de tout dépôt organique. Sur la figure b, on voit que des molécules, représentées par un cylindre, ont été déposées sur la surface et que leur orientation est verticale. Sur la figure c, les molécules ont été coiffées par un cône qui symbolise le principe actif biocide, capable de détruire les bactéries qui viendraient au contact de la surface traitée.

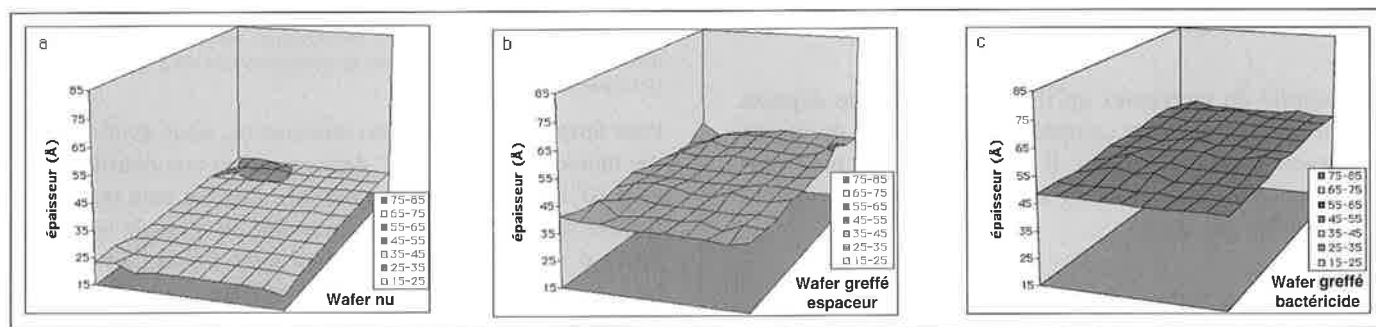


Figure 2 - Image ellipsométrique d'un disque plat de silicium oxydé aux trois étapes du dépôt de la couche biocide. La surface analysée est de 2x2 cm². La figure a montre le silicium recouvert par une couche de silice (d'où le nom de silicium oxydé) d'une épaisseur de 2,3 nm. Après greffage de la molécule espaceur (figure b), on détecte nettement une augmentation de 1,7 nm de la hauteur globale de la couche. Si l'on compare l'épaisseur du dépôt avec un modèle moléculaire, on peut vérifier que les molécules sont bien orientées verticalement et que leur densité dans le plan du substrat est proche de celle d'un empilement compact. La figure c, correspondant au greffage de la molécule biocide, montre une nouvelle augmentation d'épaisseur de 1 nm environ. Une constatation importante est qu'à chaque étape l'épaisseur du tapis moléculaire déposée est identique en tout point de la surface.

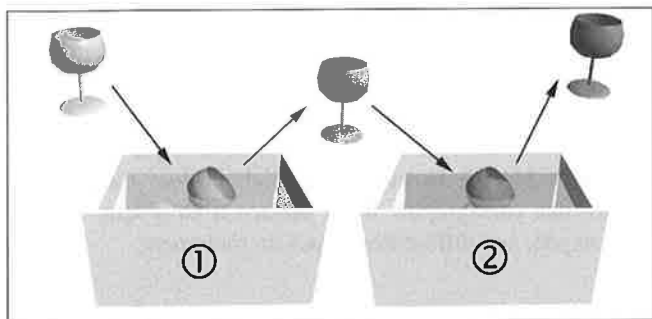


Figure 3 - Comme le traitement se fait en bain liquide, des objets de toutes forme et dimension peuvent être rendus hyperbactéricides.

Les traitements sont à base de chimie douce. Ils ne mettent en jeu que les groupes chimiques superficiels du matériau et, par voie de conséquence, ils ne changent ni les propriétés de volume du matériau initial, ni son apparence. Un tube souple et transparent en PVC ressortira du bain de traitement toujours souple et transparent. Seul leur comportement vis-à-vis d'une solution de bactéries sera modifié.

Les molécules bactéricides

Les molécules bactéricides que nous avons sélectionnées sont des ammoniums quaternaires (figure 4), composés largement utilisés en tant que désinfectants [12]. L'avantage d'un tel choix est que leur faible toxicité sur l'homme est bien établie et que leur spectre d'activité en solution est très large. Leur action sur de nombreuses variétés de germes Gram (+) et Gram (-), ainsi que sur des levures a été largement établie depuis leur première utilisation en tant que germicide par G. Domagk dans les années 1935. Bien entendu, il est possible de greffer d'autres types de molécules biocides en utilisant le même principe. Il est également envisageable d'augmenter le spectre d'activité de la surface traitée en greffant différentes molécules bactéricides sur une même surface (répartition statistique).

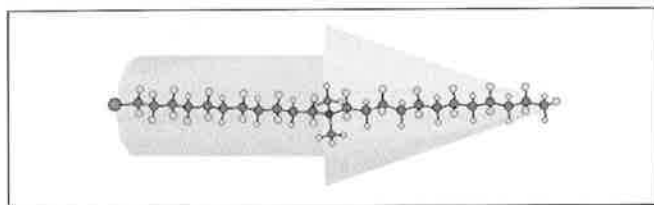


Figure 4 - Exemple de molécule (ammonium quaternaire) qui a été greffée chimiquement à la surface du matériau pour le rendre biocide.

La quantité de molécules qu'il est nécessaire de déposer pour former une couche compacte est très faible du fait de l'épaisseur monomoléculaire. Il suffit de 0,5 mg pour couvrir 1 m². La concentration superficielle est estimée à 0,1 nanomole par cm².

Performances des matériaux hyperbactéricides

Comportement biocide vis-à-vis d'une solution bactérienne

Un matériau dont la surface a été modifiée par greffage d'une couche monomoléculaire d'ammonium quaternaire devient

fortement biocide vis-à-vis des solutions de bactéries avec lesquelles il est mis en contact. Des tests qualitatifs particulièrement frappants ont été effectués sur des tubes souples en PVC de 2,5 mm de diamètre interne. Ces tubes ont été remplis avec une solution nutritive contenant 10⁵ bactéries par mL, et mis à incuber pendant 24 heures dans de bonnes conditions de croissance. Les bactéries choisies, des *Staphylococcus epidermidis*, se divisent toutes les 20 minutes, et la population bactérienne va donc croître rapidement. On constate à la fin du test que la solution retirée du tube témoin est trouble à cause de la lumière diffusée par cette surconcentration bactérienne (figure 5-a). Une numération sur boîte de Pétri montre que le nombre de bactéries vivantes est supérieur à 10⁸ par mL. La situation est totalement différente pour un tube dont la paroi intérieure a été traitée (figure 5-b). La solution retirée du tube est toujours claire et la numération montre une absence totale de bactéries encore vivantes. **La solution initiale a été entièrement décontaminée.**

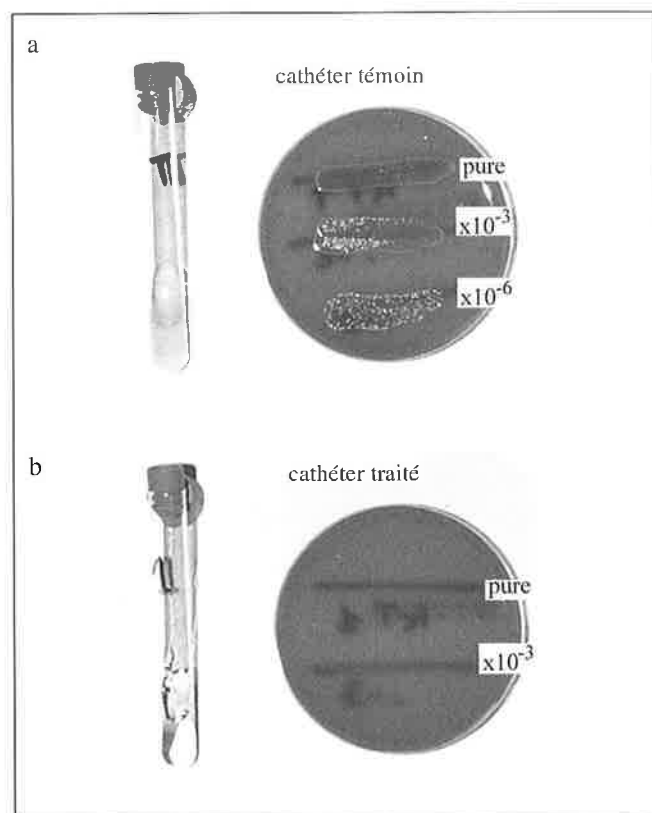


Figure 5 - Résultat des tests bactériologiques sur des tubes en PVC. La limite de sensibilité de la méthode de dénombrement est d'environ 20 bactéries par mL.

Pour tester la vitesse de décontamination, nous avons plongé des morceaux de tube PVC dans un milieu non nutritif contenant 10⁵ bactéries Gram (+) par mL. Dans le bain témoin, le nombre de bactéries est donc invariable au cours du temps. La figure 6 montre les mesures faites après 1 h et 24 h dans le bain contenant les tubes dont les surfaces ont été rendues hyperbactéricides. La population bactérienne chute d'un facteur 10 au bout de la première heure et d'un facteur 1 000 au bout de 24 heures pour atteindre la limite de dénombrement indiquée par le trait horizontal en pointillés. Une décroissance similaire est observée pour une levure. Le facteur limitant ici est, bien entendu, le temps nécessaire pour que toutes les bac-

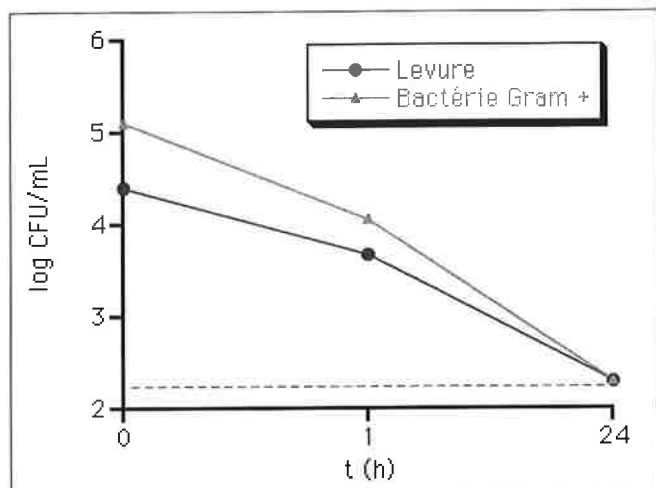


Figure 6 - Évolution de la population de bactéries (rond noir) et de levures (triangle) en fonction du temps dans une solution aqueuse en contact avec des morceaux de PVC hyperbactéricides. La limite de sensibilité est indiquée par un trait en pointillé.

téries viennent au contact de la paroi traitée. Ce temps est fonction de la mobilité des bactéries et du rapport surface traitée sur volume à décontaminer. Dans ce cas précis, le rapport est de $14 \text{ cm}^2/\text{mL}$ et le coefficient de diffusion des bactéries est de l'ordre de $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Le spectre d'activité de ces surfaces hyperbactéricides est très large : nous avons observé un effet bactéricide quasi total sur toutes les bactéries Gram (+) et sur 4 des 5 levures testées à ce jour. Nous avons également observé un effet, quoique plus faible, sur des bactéries Gram (-) qui sont connues pour être plus résistantes aux ammoniums quaternaires.

Le greffage est irréversible et il n'y a pas de réaction chimique entre les fonctions biocides et les bactéries, donc le traitement hyperbactéricide doit être permanent. Cette hypothèse a été testée en réutilisant 3 fois de suite un objet traité pour décontaminer des solutions de *Staphylococcus epidermidis* (10^5 B/mL). Nous avons constaté effectivement que **le comportement bactéricide reste inchangé au cours des différents essais**. De plus, un examen visuel montre que de larges taches blanches apparaissent sur la paroi interne des tubes non traités, alors que les tubes traités restent parfaitement transparents. Une coloration au violet de gentiane prouve que ces taches correspondent effectivement à des colonies bactériennes. **Le traitement hyperbactéricide inhibe la formation des biofilms en détruisant les bactéries au fur et à mesure de leur adhésion sur la paroi traitée.**

Comparaison entre le comportement de molécules biocides en solution libre et greffées en une couche hyperbactéricide

Nous en arrivons maintenant au chiffre clef qui va permettre de justifier l'appellation de surfaces hyperbactéricides que nous associons à ce type de matériau. Pour cela, nous avons comparé la concentration résiduelle en bactéries au bout d'une heure dans un inoculum mis en contact, soit avec des ammoniums quaternaires en solution (bactéricides libres), soit avec les mêmes molécules mais greffées de façon covalente sur un substrat solide. Connaissant la surface de l'objet hyperbactéricide, la densité du greffage et le volume de la

solution à décontaminer, on peut facilement calculer que, dans ce dernier cas, la concentration moyenne de molécules biocides est équivalente à 0,6 ppm. C'est donc une concentration extrêmement faible. Elle est totalement inhabituelle en bactériologie classique pour laquelle les doses courantes vont de 10 à 100 ppm suivant les biocides. Sur la figure 7, on constate néanmoins que cette concentration ultrafaible a la même efficacité qu'une solution de bactéricides libres comprise entre 10 et 50 ppm. **Le fait de greffer les molécules sur une surface augmente leur efficacité globale de 20 à 100 fois par rapport à une solution libre.**

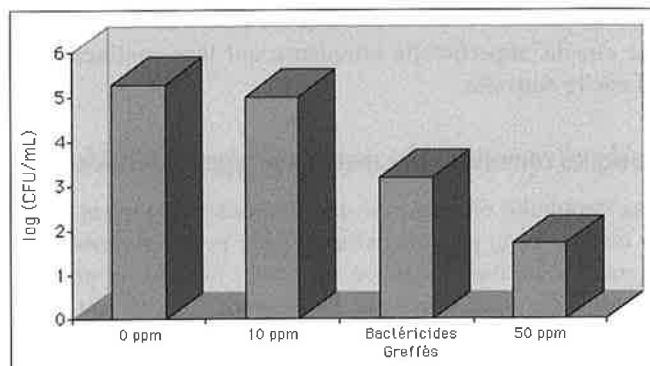


Figure 7 - Concentration en bactéries dans un inoculum mis en contact pendant 1 heure avec des molécules biocides qui sont soit dispersées aléatoirement en solution (10 et 50 ppm), soit regroupées dans une couche hyperbactéricide (bactéricides greffés). La concentration équivalente pour les bactéricides greffés est d'environ 0,6 ppm.

Une nouvelle bactériologie

Concentrations locales en molécules biocides très inhabituelles

Dans le cas des matériaux hyperbactéricides, les concentrations locales sont considérables du fait de l'empilement compact des molécules au sein de la couche monomoléculaire. En admettant une densité de 1 ammonium quaternaire tous les nm^2 et une épaisseur de couche de 2 nm, on arrive à une concentration superficielle de 1 mole par litre. A titre de comparaison, les concentrations auxquelles sont utilisés les ammoniums quaternaires en solution pour obtenir un effet bactéricide sont tout au plus de 100 micromoles par litre, soit dix mille fois plus faibles. On peut calculer qu'une bactérie de $1 \mu\text{m}$ de dimension moyenne venant en contact avec la surface traitée sera soumise à l'action simultanée de 10^6 molécules biocides. En solution, ce nombre restera mille fois plus faible si on ne veut pas atteindre des doses nocives ou dangereuses pour l'homme ou l'animal.

On pourrait craindre que ces fortes concentrations ne créent de graves problèmes de toxicité générale si les molécules greffées sur la surface venaient à être relâchées dans l'environnement. Outre que ce risque est extrêmement faible vu que les molécules biocides sont liées de façon irréversible au matériau solide, il se produirait immédiatement un effet de dilution qui réduirait le danger à néant. On peut calculer que si toutes les molécules greffées sur un tube de 1,5 mm de diamètre interne étaient relâchées en solution, la concentration résultante dans

le volume libre serait de 1,4 ppm. Les ammoniums quaternaires sont hémolytiques à partir de 15 ppm.

Généralement, les efforts des grandes sociétés pharmaceutiques sont centrés sur la découverte de principes actifs nouveaux et qui puissent avoir une action sur les bactéries récalcitrantes. Ceci suppose d'énormes investissements en temps et le recours à des actions de criblage systématique ou de chimie combinatoire longues et coûteuses. Ceci pose également le problème de la certification et des autorisations légales [13]. Le concept des surfaces hyperbactéricides permet une approche radicalement différente puisque basée sur l'utilisation de molécules existantes et dont les effets ont déjà été prouvés. C'est la localisation de ces molécules dans une couche superficielle ultradense qui leur confèrent une efficacité nouvelle.

Quelques contraintes des matériaux hyperbactéricides

Une contrainte évidente est que les bactéries doivent venir au contact de la paroi hyperbactéricide pour être sensible à la surconcentration locale en molécules biocides et pouvoir être détruites. La cinétique de décontamination est donc imposée par la mobilité des bactéries. Si l'on ne peut compter que sur l'agitation thermique et le mouvement brownien, il est bien connu que la dynamique sera lente et va croître comme le carré de la distance à parcourir. En 24 heures, on ne pourra raisonnablement espérer décontaminer un inoculum que sur des distances inférieures à quelques millimètres. Bien entendu, la situation change radicalement si la bactérie est munie de cils ou flagelles et est donc mobile ou si la solution est agitée artificiellement ou par convection thermique. Dans ce cas, les temps de décontamination deviennent beaucoup plus courts.

Une autre contrainte à prendre en compte est que la surface ne doit pas être recouverte par d'autres types de molécules éventuellement présentes dans la solution à décontaminer. Si ces molécules venaient à se fixer sur la paroi, elles écranteraient les molécules biocides de l'inoculum contenant les bactéries.

De multiples domaines d'applications

Les matériaux hyperbactéricides sont susceptibles d'apporter des solutions intéressantes dans tous les grands domaines d'activité industrielle où les risques de contamination bactérienne sont incontournables.

C'est sûrement vrai dans les industries agro-alimentaires. Les problèmes récents dus à la listériose et qui ont affecté l'industrie fromagère de Normandie sont encore dans toutes les mémoires. Les yaourts, le lait, les jus de fruits sont des cibles privilégiées de contamination. Dans les hôpitaux, les infections nosocomiales causées par des germes pathogènes sont également très nombreuses et coûteuses en vies humaines. On considère que plus de 30 % des cathéters vasculaires implantés sur des durées supérieures à 3 jours sont contaminés. La levure *Candida albicans* et les staphylocoques en sont les responsables principaux. On pourrait donc recouvrir les parois des cathéters hospitaliers avec un revêtement hyperbactéricide qui leur soit spécifiquement ciblé. On peut d'ailleurs songer à traiter de la même manière

tout autre objet hospitalier « à risque » car utilisé sur des individus dont les défenses naturelles sont affaiblies. On peut citer les sondes urinaires, les cartouches de dialyse rénale, les poches à sang et les endoscopes. De même, dentistes et prothésistes pourront souhaiter des amalgames et des ciments autoprotégés.

De façon plus futuriste, on pourra un jour avoir besoin de gaines de câble électrique résistantes aux agressions bactériennes, de tuyaux métalliques moins sensibles à la corrosion provoquée par leur métabolisme, ou encore de circuits électroniques bactériologiquement propres pour assurer l'évolution de la micro- vers la nano-électronique.

Conclusions

Le traitement de type chimie douce en phase liquide, qui est décrit dans cet article, permet de conférer des propriétés antibactériennes à un grand nombre de matériaux et de les transformer en matériaux bactériologiquement propres. La méthode consiste en un greffage chimique irréversible, sur la surface à traiter, de molécules organiques sélectionnées pour leur propriétés biocides (bactéricides, fongicides, etc.). Les conditions de dépôt sont soigneusement contrôlées de façon à obtenir une couche monomoléculaire de très faible épaisseur (quelques nanomètres) et de très forte densité (le taux de couverture est proche de la saturation).

Le traitement est efficace, irréversible, durable et peu coûteux car il ne nécessite que des quantités de matière active très faible. Il résiste bien également aux agressions extérieures. Enfin, il n'y a pas de difficulté de principe à traiter des objets finis, de forme et dimension quelconques. Tout ceci explique les nombreuses utilisations potentielles, et dont certaines sont en cours de validation industrielle.

Remerciements

Nous avons bénéficié de nombreuses discussions avec O. Bouloussa et P. Nassoy, et de l'aide technique de Q. Wijngaards.

Références

- [1] Jeanblanc A., *Le Point*, **1997**, 1272, p. 64.
- [2] Raad II., *Middle East Journal of Anesthesiology*, **1994**, 12(4), p. 381.
- [3] *L'Expansion*, **1996**, 525, p. 122.
- [4] Davies J., *Nature*, **1996**, 383, p. 219.
- [5] Lessing M.P.A., Raftery M.J., *The Lancet*, **1998**, 351, p. 601.
- [6] Gupta A., Silver S., *Nature Biotechnology*, **1998**, 16, p. 888.
- [7] Rondelez F., Bezou P., Bouloussa O., *Surfaces Hyperbactéricides*, brevet n° 27 51 882 du 6 février **1998**.
- [8] Brzoska J.B., Shahidzadeh N., Rondelez F., *Nature*, **1992**, 360, p. 719.
- [9] Parikh A.N., Allara D.L., Ben Azouz I., Rondelez F., *Journal of Physical Chemistry*, **1994**, 98, p. 7577.
- [10] Brzoska J.B., Ben Azouz I., Rondelez F., *Langmuir*, **1994**, 10, p. 4367.
- [11] Allara D.L., Parikh A.N., Rondelez F., *Langmuir*, **1995**, 11, p. 2357.
- [12] Dauphin A., Darbord J.C., *Hygiène Hospitalière Pratique*, EMI Techniques et Documentation Lavoisier, **1985**.
- [13] McCoy M., *Chemical and Engineering News*, **1998** (novembre 9), p. 21.