

Présentation des travaux réalisés dans le cadre du projet MATINNO

Réunion d'avancement 02/02/2016

Héloïse FABRE, en thèse depuis le 01/10/2014

Encadrants de thèse : - Jean-François Bardeau (IMMM)
- Nicolas Delorme (IMMM)
- Jean-Philippe Bouchara (GEIHP – Angers)



Plan de la présentation

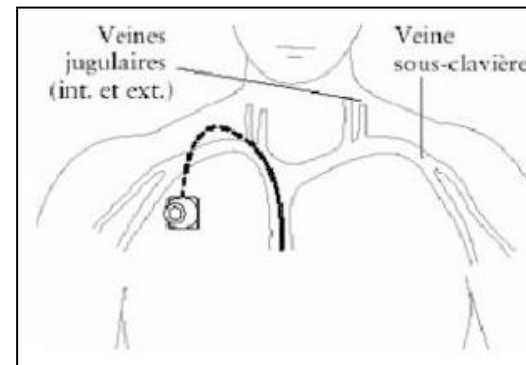
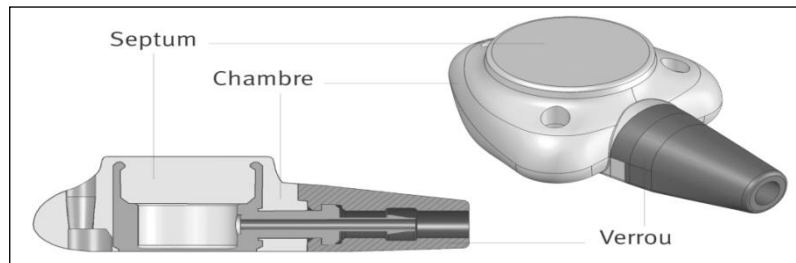
- I. Présentation du sujet
- II. Préparation des échantillons
- III. Analyses des surfaces
- IV. Analyses microbiologiques
- V. Conclusion et perspectives

Plan de la présentation

- I. Présentation du sujet**
- II. Préparation des échantillons
- III. Analyses des surfaces
- IV. Analyses microbiologiques
- V. Conclusion et perspectives

Chambre implantable

- Utilisée dans les **traitements de chimiothérapie** à long terme pour l'administration de médicaments et éventuellement pour une alimentation parentérale
- Composée **d'un réservoir** de quelques dixièmes de ml fermé par un septum en silicone et **reliée à un cathéter** dont l'extrémité est placée dans la **veine cave**



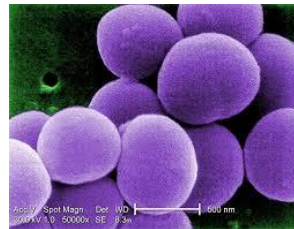
Chambres implantables et infections nosocomiales

- **Utilisation des chambres implantables** de plus en plus importante (env. 400000/an en France) **MAIS risques d'infections nosocomiales**
- Nombre d'infections CI (pour 1000 jours/ cathéter)

Utilisation classique	0,11 – 0,37
Avec nutrition parentérale	0,33 – 3,20

- Principaux microorganismes responsables de la contamination :
 - Staphylocoques à coagulase négative
 - *Staphylococcus aureus*
 - Entérobactéries (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *enterobacter...*)
 - *Candida*

Staphylococcus aureus



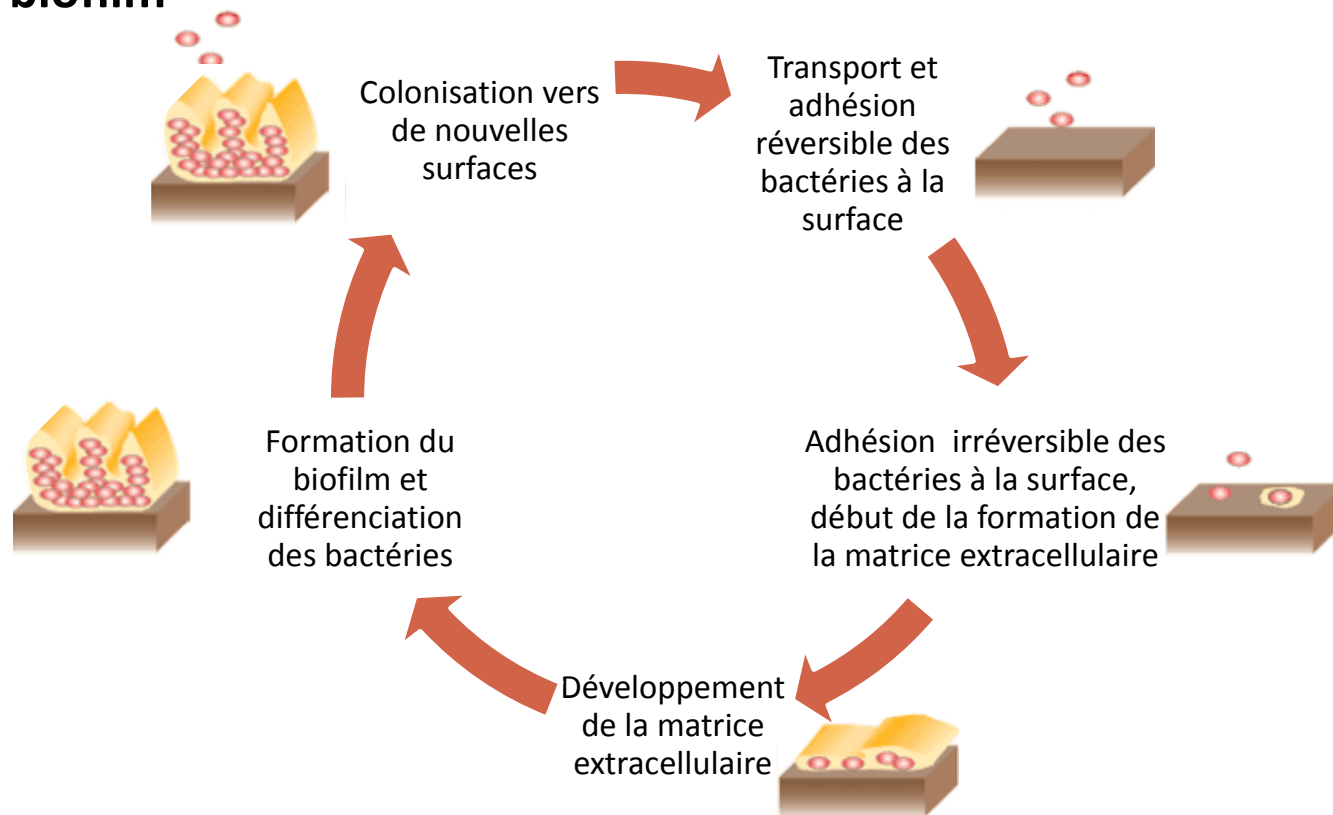
Candida albicans



Etat de l'art

Critères d'adhérence et formation du biofilm

- Sur une surface libre, **organisation des bactéries et levures en biofilm**



Etat de l'art

Différents types de surfaces antimicrobiennes

- Modifications de surface possible :
 - Physique : hydrophobicité, charge de surface, topographie, rugosité
 - Chimique : composition chimique, charge de surface
- Différentes études menées :

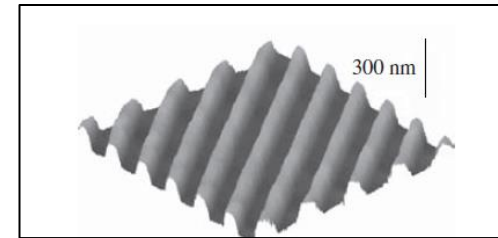
Etat de l'art

Différents types de surfaces antimicrobiennes

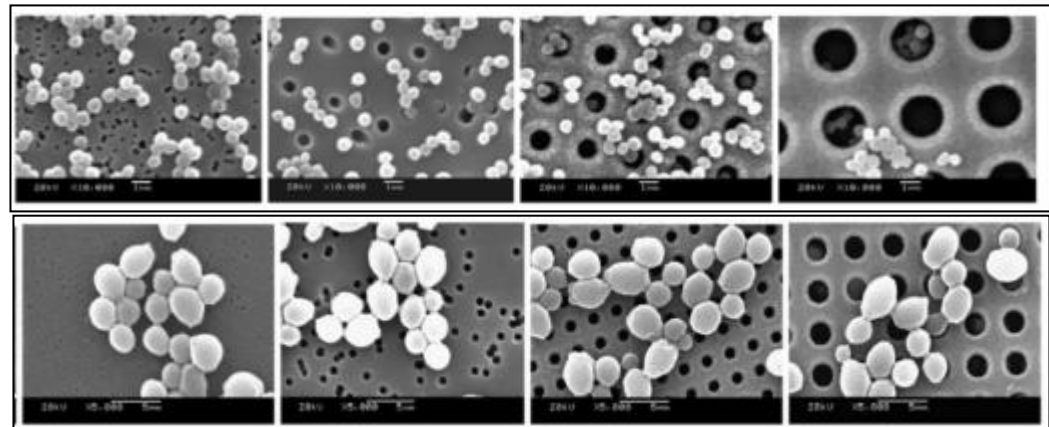
- Modifications de surface possible :
 - Physique : hydrophobicité, charge de surface, topographie, rugosité
 - Chimique : composition chimique, charge de surface

- Différentes études menées :

Surfaces structurées



Meilleure adhésion des bactéries si beaucoup de points de contact avec la surface



Etat de l'art

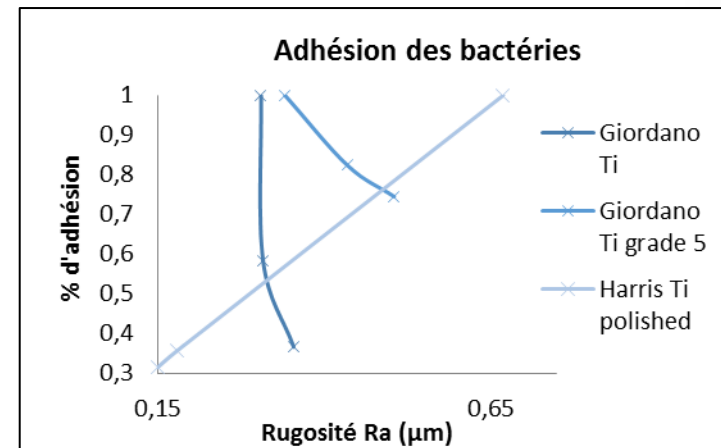
Différents types de surfaces antimicrobiennes

- Modifications de surface possible :
 - Physique : hydrophobicité, charge de surface, topographie, rugosité
 - Chimique : composition chimique, charge de surface
- Différentes études menées :

Surfaces structurées

Rugosité

Résultats
différents
selon les
études



Etat de l'art

Différents types de surfaces antimicrobiennes

- Modifications de surface possible :
 - Physique : hydrophobicité, charge de surface, topographie, rugosité
 - Chimique : composition chimique, charge de surface
- Différentes études menées :

Surfaces structurées

Rugosité

Fonctionnalisation de la surface

Forte diminution de l'adhésion de *S. Aureus* avec une surface superhydrophobe

Etat de l'art

Différents types de surfaces antimicrobiennes

- Modifications de surface possible :
 - Physique : hydrophobicité, charge de surface, topographie, rugosité
 - Chimique : composition chimique, charge de surface
- Différentes études menées :

Surfaces structurées

Rugosité

Fonctionnalisation de la surface

Revêtement polymère bactéricide

Bonne alternative mais
risque de résistance des
souches

Plan de la présentation

I. Présentation du sujet

II. Préparation des échantillons

III. Analyses des surfaces

IV. Analyses microbiologiques

V. Conclusion et perspectives

Description des échantillons

- Préparation d'échantillons modèles à base de TiO_2
- Objectifs :

→ Créer des échantillons à rugosité et topographie contrôlées

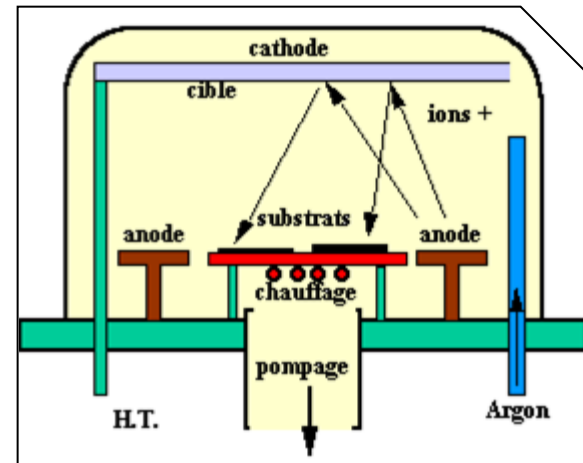
- Mise au point des protocoles
 - Elaboration de surfaces ultra-lisses
 - Elaboration de surfaces micro-structurées

→ Modifier la tension de surface des échantillons

- Greffage de molécules rendant les surfaces hydrophobes

Echantillons ultra-lisses

- Dépôt de Ti par **pulvérisation cathodique** sur des wafers de silicium
- **Optimisation des conditions de dépôt** pour obtenir une couche mince de TiO_2
 - Puissance
 - Pression de travail
 - Composition des gaz
 - Température
 - Temps de dépôt



Principe de fonctionnement de la pulvérisation cathodique

→ Obtention d'une couche mince (épaisseur nanométrique) de rugosité inférieure au nm

Echantillons à rugosité contrôlée

- Attaque chimique de substrat de silicium orientés <100> par KOH



Protocole

- Elimination couche SiO_2 native avec HF
- Attaque basique du Si : Utilisation d'une solution de KOH
- Différents paramètres à contrôler
 - Température
 - Concentration en KOH
 - Temps d'attaque

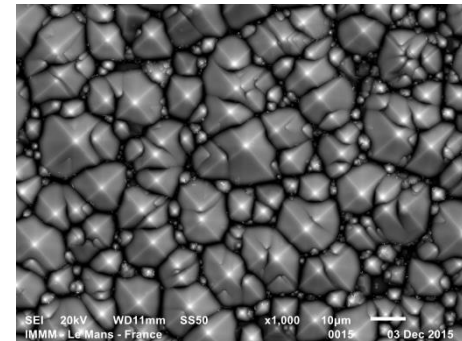
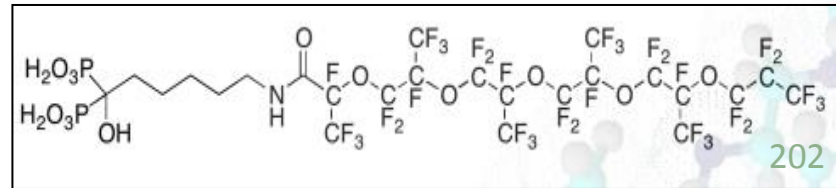
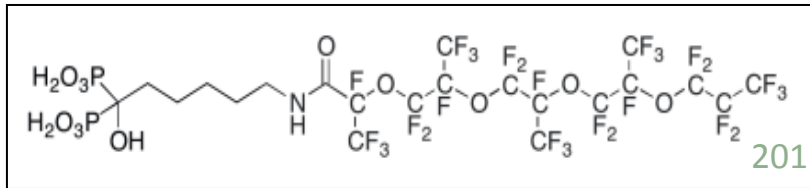


Image obtenue par MEB

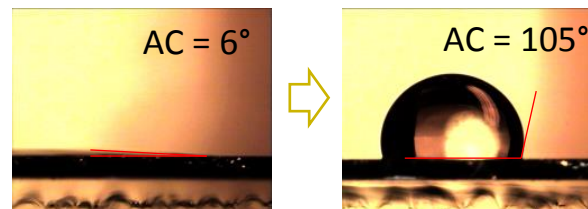
- Puis dépôt de TiO_2 par pulvérisation cathodique sur ces surfaces structurées

Surfaces hydrophobes

- Utilisation de deux molécules synthétisées par Surfactis



- Greffage des molécules sur le TiO_2
 - Activation de la surface par UV- O_3
 - Greffage par immersion de l'échantillon dans la solution
- Augmentation très significative de l'angle de contact



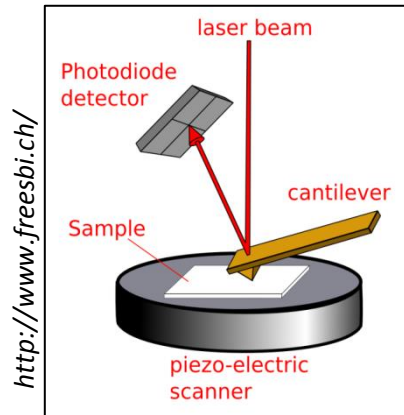
Angles de contact avant et après fonctionnalisation

Plan de la présentation

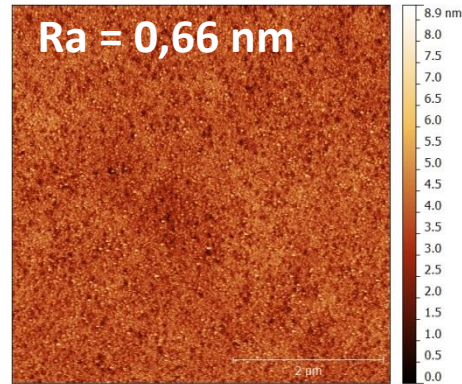
- I. Présentation du sujet
- II. Préparation des échantillons
- III. Analyses des surfaces**
- IV. Analyses microbiologiques
- V. Conclusion et perspectives

Analyse de la rugosité

- Etude de la rugosité des **surfaces lisses** par AFM

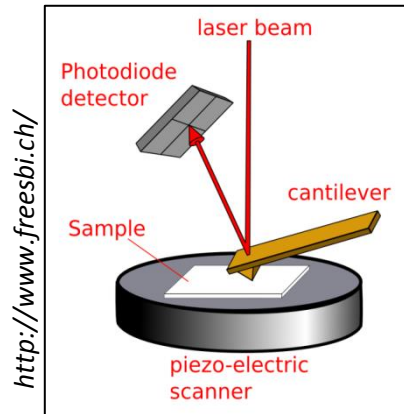


*Principe de fonctionnement
de l'AFM*

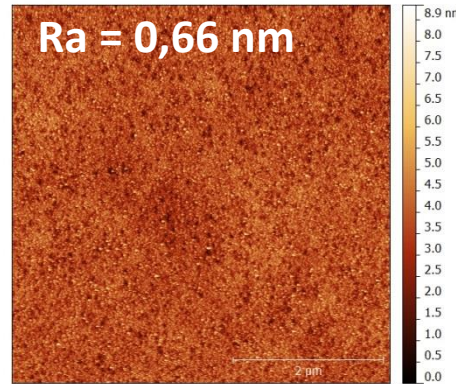


Analyse de la rugosité

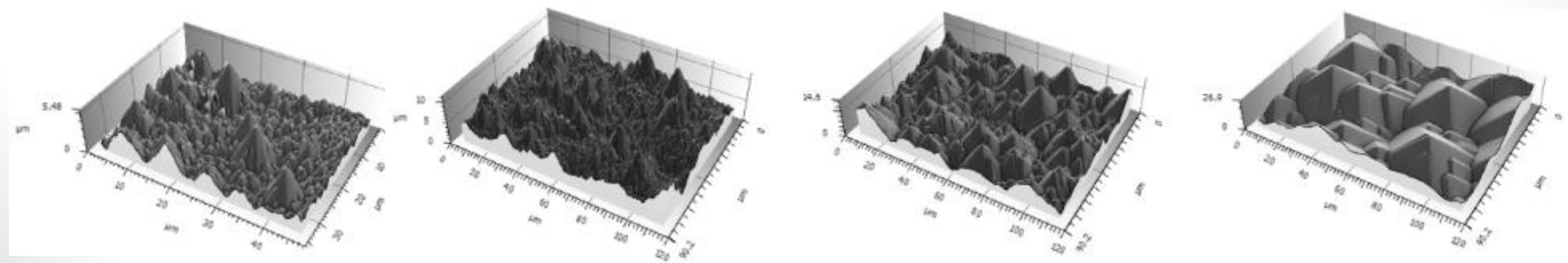
- Etude de la rugosité des **surfaces lisses** par AFM



Principe de fonctionnement de l'AFM



- Etude de la topographie / rugosité **des surfaces micro-structurées** par reconstruction 3D à partir de 2 images MEB



Cond 1 – Ra = 0,6 μm

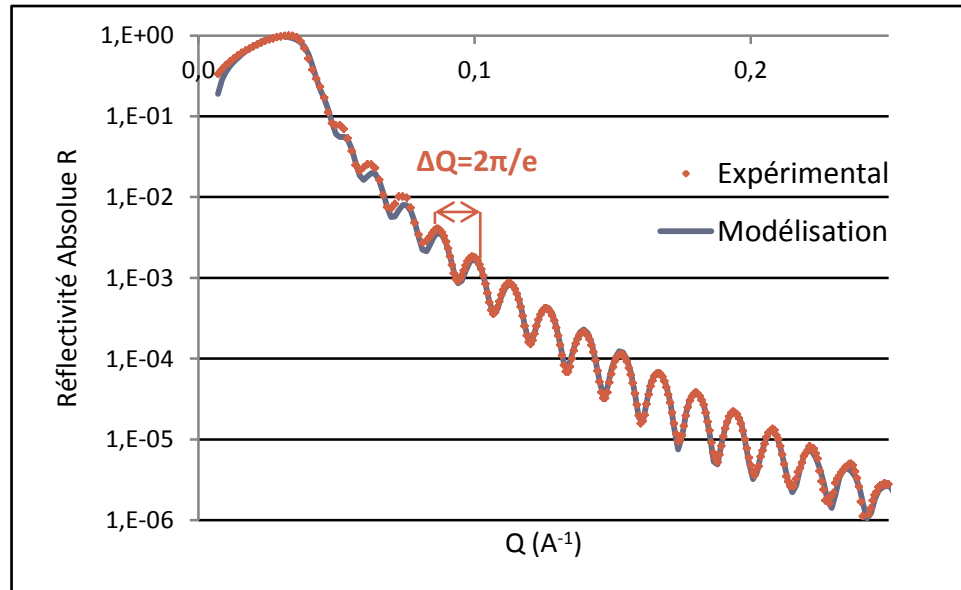
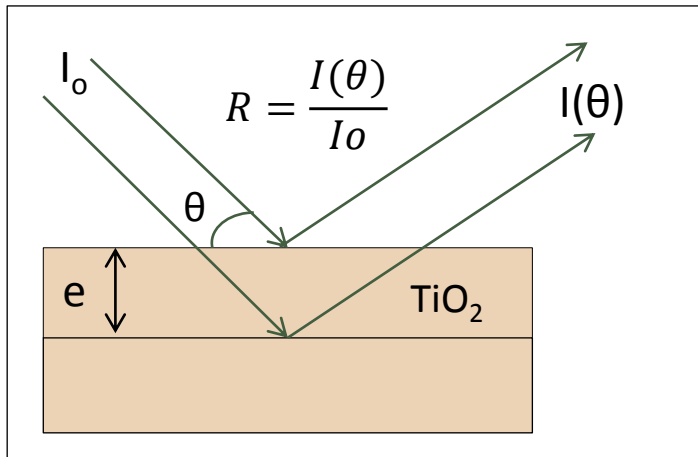
Cond 2 – Ra = 1,1 μm

Cond 3 – Ra = 1,8 μm

Cond 4 – Ra = 4,3 μm

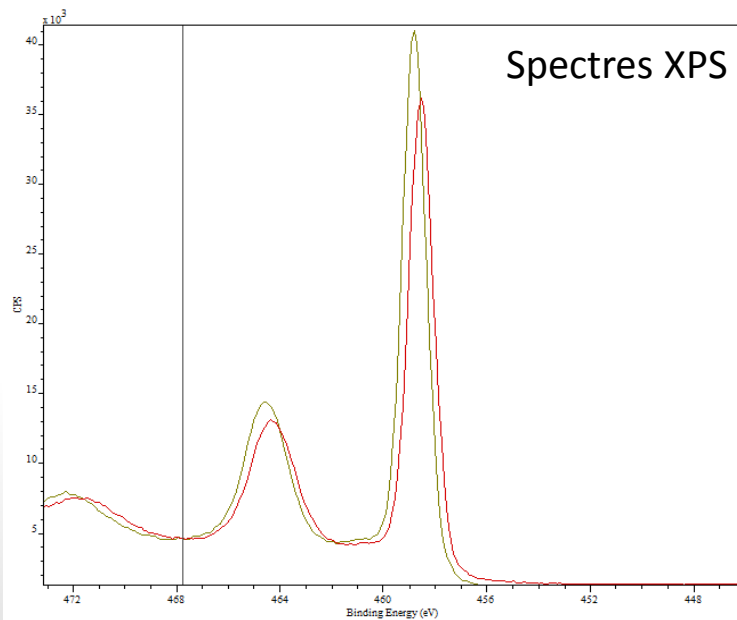
Analyse de l'épaisseur de la couche de titane

- Détermination des épaisseurs des couches déposées
- Utilisation de la **réflectivité des rayons X**



Analyses chimiques de la couche de titane

- **Analyse XPS** pour vérifier le degré d'oxydation du titane
 - **Obtention des pics caractéristiques du TiO₂**

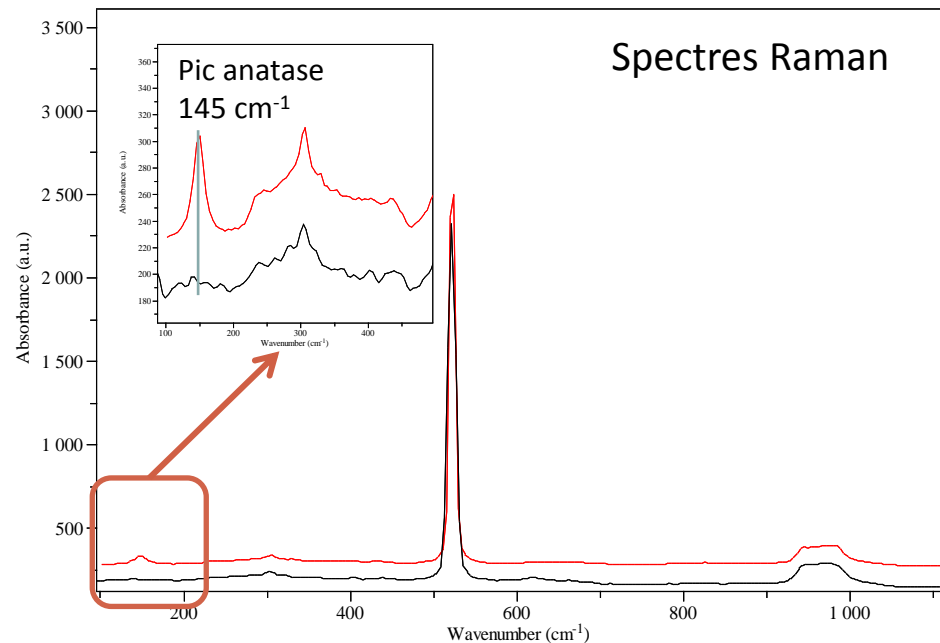
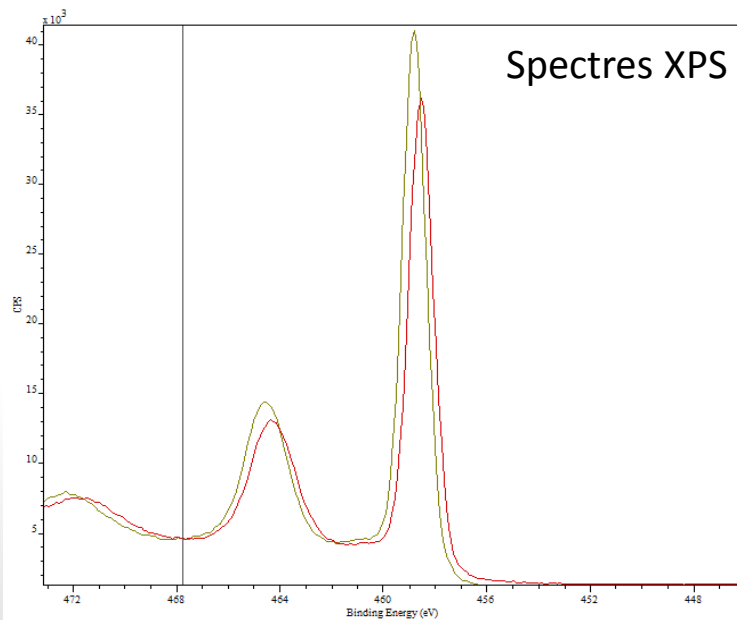


Kumar et al. *Thin Solid Films*, 2000. **358**, p. 122-130.

McCafferty et al, *Surface and Interface Analysis*, 1998. **26(8)**: p. 549-564.

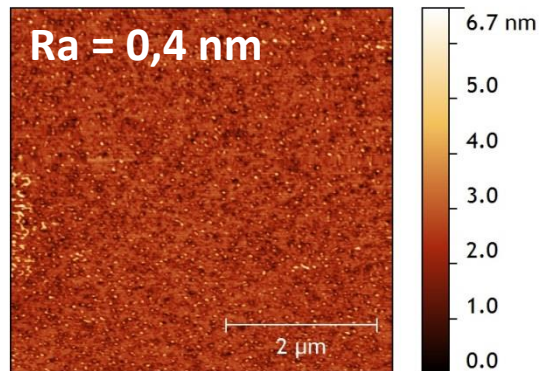
Analyses chimiques de la couche de titane

- **Analyse XPS** pour vérifier le degré d'oxydation du titane
 - **Obtention des pics caractéristiques du TiO₂**
- Lors du dépôt de TiO₂ par pulvérisation cathodique, possibilité de déposer du **TiO₂ amorphe ou cristallisé** (phase anatase)
 - Vérification par **spectroscopie Raman**



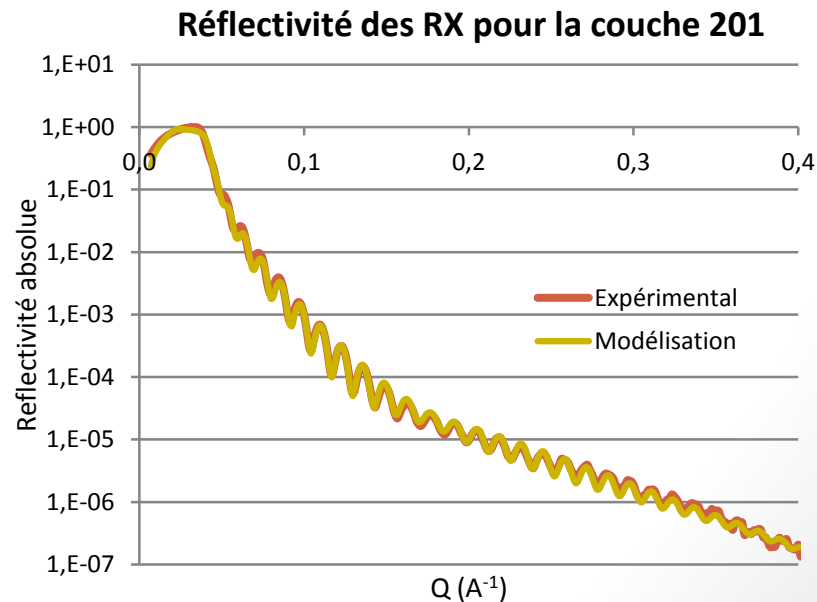
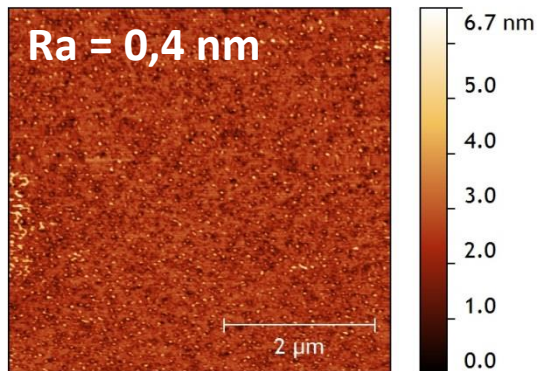
Analyses physiques de la monocouche moléculaire

- Etude de la **rugosité de surface par AFM**
 - **Rugosité inférieure au nm** pour un greffage sur les surfaces ultra-lisses



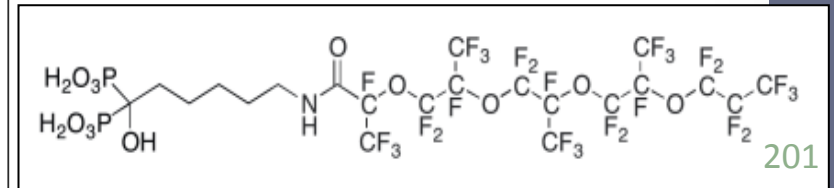
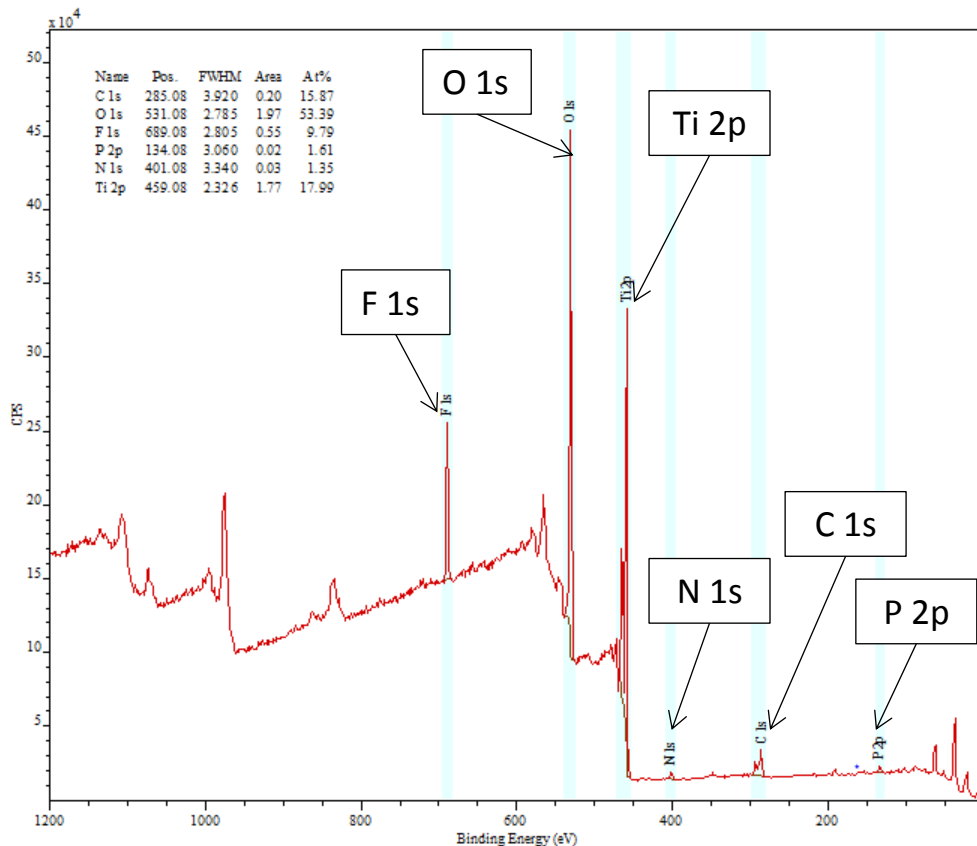
Analyses physiques de la monocouche moléculaire

- Etude de la **rugosité de surface par AFM**
 - **Rugosité inférieure au nm** pour un greffage sur les surfaces ultra-lisses
- Mesure de **l'épaisseur de la couche par réflectivité de rayons X**
 - Obtention d'une épaisseur de **1,9 nm** pour les deux molécules

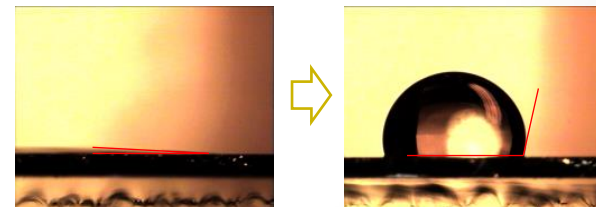


Analyses chimiques de la couche moléculaire

- Vérification de la **composition chimique de la couche par XPS**
 - Présence des différents éléments sur le spectre
 - Pas de différences entre les deux molécules



Angles de contact avant et après fonctionnalisation



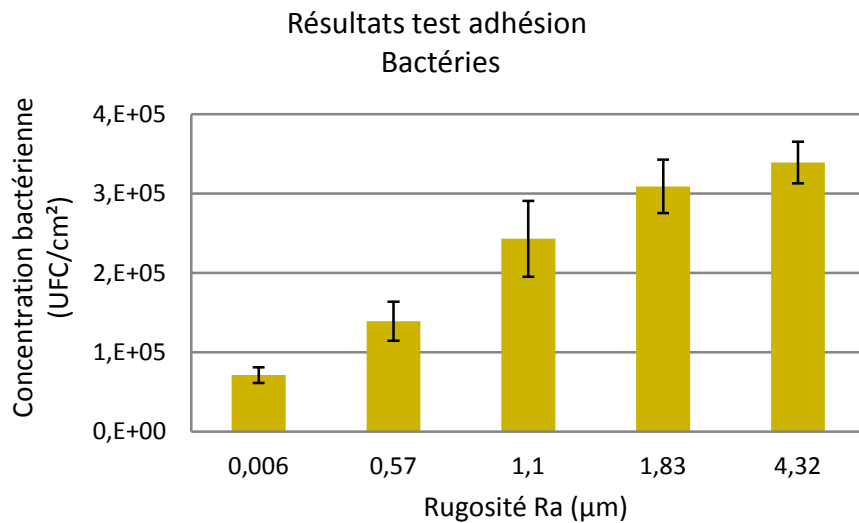
Plan de la présentation

- I. Présentation du sujet
- II. Préparation des échantillons
- III. Analyses des surfaces
- IV. Analyses microbiologiques**
- V. Conclusion et perspectives

Résultats de l'adhérence des microorganismes sur les surfaces structurées

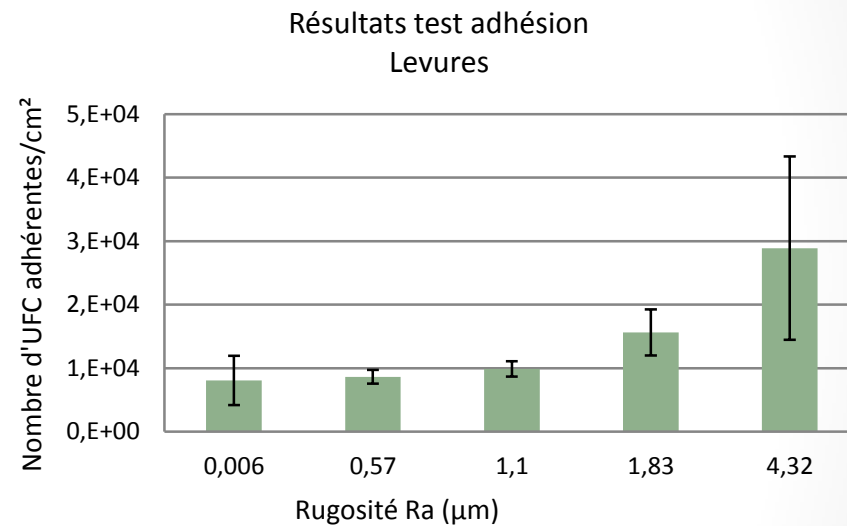
Bactéries

Staphylococcus aureus



Levures

Candida albicans

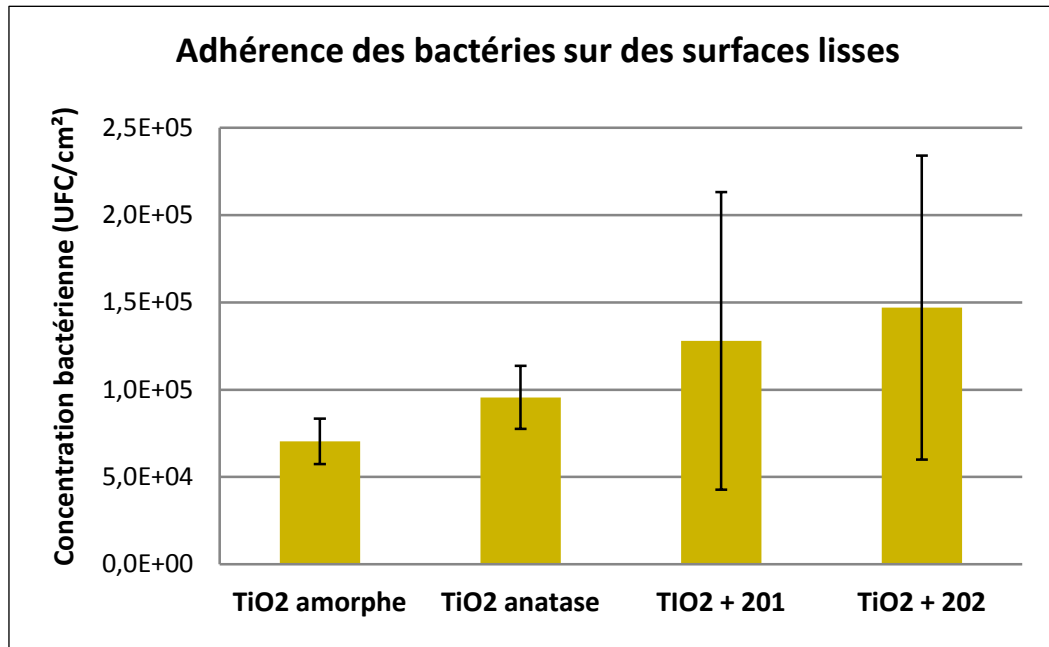


- L'adhérence des bactéries augmente avec la taille des pyramides
- Quand la taille caractéristique ($1 \mu\text{m}$) des bactéries est proche de la rugosité, augmentation importante de l'adhérence

- L'adhérence des levures sur ces surfaces reste faible jusqu'à ce que la rugosité devienne proche de la taille caractéristique des levures ($2-3 \mu\text{m}$)

Etude de l'influence de la fonctionnalisation sur l'adhérence de microorganismes

- Etude de l'adhérence des bactéries (*Staphylococcus aureus*) sur les surfaces lisses (plusieurs types de surfaces)



- Pas de différences significatives entre les différents types de surfaces

Etude préliminaire avec des produits de chimiothérapie

- Etude des traces laissées par 4 produits utilisés en chimiothérapie, laissés en contact pour une durée correspondant à 1 dose ou 6 mois de cure

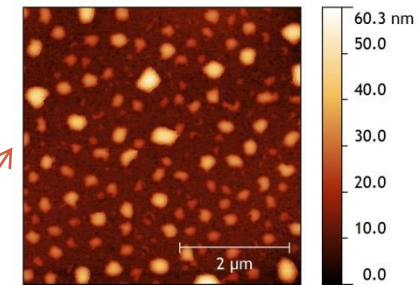
	« Temps de contact pour 1 dose »	« Temps de contact pour 6 mois de cure »
Farmorubicine	10 min	6 x 10 min
Endoxan	30 min	6 x 30 min
Taxol	1h	12 x 1h
Eloxatine	2h	6 x 2h



Etude préliminaire avec des produits de chimiothérapie

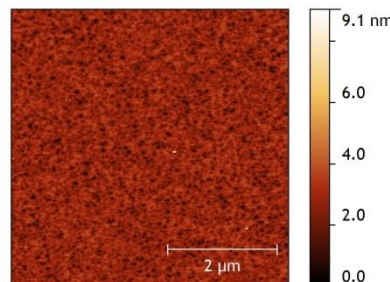
- Etude des traces laissées par 4 produits utilisés en chimiothérapie, laissés en contact pour une durée correspondant à 1 dose ou 6 mois de cure

	« Temps de contact pour 1 dose »	« Temps de contact pour 6 mois de cure »	Traces ?
Farmorubicine	10 min	6 x 10 min	Oui pour 6 mois de cure
Endoxan	30 min	6 x 30 min	
Taxol	1h	12 x 1h	
Eloxatine	2h	6 x 2h	



Après 6 mois de traitement avec Farmorubicine

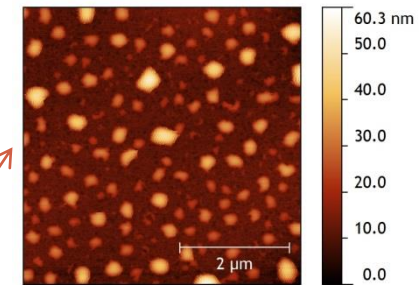
Sans traitement



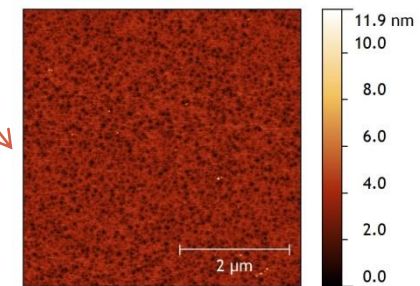
Etude préliminaire avec des produits de chimiothérapie

- Etude des traces laissées par 4 produits utilisés en chimiothérapie, laissés en contact pour une durée correspondant à 1 dose ou 6 mois de cure

	« Temps de contact pour 1 dose »	« Temps de contact pour 6 mois de cure »	Traces ?
Farmorubicine	10 min	6 x 10 min	Oui pour 6 mois de cure
Endoxan	30 min	6 x 30 min	Non
Taxol	1h	12 x 1h	Non
Eloxatine	2h	6 x 2h	Non

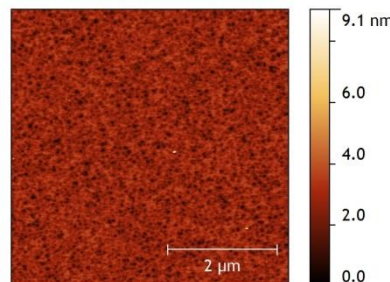


Après 6 mois de traitement avec Farmorubicine



Après 6 mois de traitement avec Taxol

Sans traitement



Plan de la présentation

- I. Présentation du sujet
- II. Préparation des échantillons
- III. Analyses des surfaces
- IV. Analyses microbiologiques
- V. Conclusion et perspectives**

Conclusion

- Elaboration de différents types de surface de TiO_2 dites modèles
 - Surfaces lisses de TiO_2 amorphe ou anatase
 - Surfaces de TiO_2 ayant une rugosité contrôlée
 - Surfaces fonctionnalisées par des molécules rendant les surfaces hydrophobes
- Etude de l'adhérence de microorganismes (*Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*) sur ces différents types de surfaces
 - Adhérence plus faible des microorganismes sur les surfaces lisses

Perspectives

- **Greffage d'un autre type de molécules** permettant d'étudier l'influence de la tension de surface sur l'adhérence des microorganismes
- **Etudier l'influence de traces laissées** par les produits de chimiothérapie et de la nutrition parentérale **sur l'adhérence de microorganismes**



Perspectives

- Etudier **l'interaction entre des protéines et les surfaces** fonctionnalisées ou non (XPS et micro-balance à quartz) et comparer les résultats à ceux obtenus avec les bactéries
 - Début d'une collaboration avec Chimie Paris
- **Elaboration de nouveaux types de surfaces en alliage de titane** (grade 2 et 5), lisses et rugueux, présentant de nouvelles topographies de surface

