



L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire

Emilie Bulard

► To cite this version:

Emilie Bulard. L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112249 . tel-00752485

HAL Id: tel-00752485

<https://theses.hal.science/tel-00752485>

Submitted on 15 Nov 2012

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : *ED288 Ondes et Matière*
Laboratoire de *l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay ISMO*

DISCIPLINE Physique

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 19/10/2012

par

Emilie BULARD

L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire

Directeur de thèse :	Henri DUBOST	Professeur émérite (ISMO, Université Paris Sud) 2009-2012
	Bernard BOURGUIGNON	Chercheur (ISMO, Université Paris Sud) - 2012

Composition du jury :

Rapporteurs :	Fabienne PONCIN-EPAILLARD	Directeur de Recherche (PCI, Université du Maine)
	Eric FREYSZ	Directeur de Recherche (LOMA, Université Bordeaux 1)
Examineurs :	Philippe ROGER	Professeur (ICMMO, Université Paris Sud)
	Bertrand BUSSON	Chercheur (LCP, Université Paris Sud)
	Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE	Professeur (UBBHM, AgroParistech Massy)
	Bernard BOURGUIGNON	Chercheur (ISMO, Université Paris Sud)

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein de l'équipe Surfaces, Interfaces : Réactivité et Nanostructuration (SIREN) en collaboration avec l'équipe Biophysique et Biophotonique de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO, Université Paris Sud) et l'équipe Bioadhésion, Biofilms et Hygiène des Matériaux de l'Institut MICALIS (UBBHM, UMR 1319 INRA-AgroParisTech-Massy). Je remercie Philippe Brechignac et Romain Briandet de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires dont ils en ont assuré la direction respectivement.

J'exprime toute ma reconnaissance à Fabienne Poncin-Epaillard, Eric Freysz, Philippe Roger, Bertrand Busson, Marie-Noëlle Bellon-Fontaine et Bernard Bourguignon d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. En particulier, merci à Fabienne Poncin-Epaillard et Eric Freysz d'avoir accepté la tâche supplémentaire d'être rapporteurs de mon travail.

Henri Dubost a dirigé mon travail de recherche durant ces trois années de thèse associé à Bernard Bourguignon, Marie-Pierre Fontaine-Aupart et Marie-Noëlle Bellon-Fontaine. J'ai beaucoup apprécié leurs qualités humaines autant que leurs comportements comme « directeurs de thèse ». Je remercie vivement Henri Dubost qui a suivi mon travail tout au long de ma thèse et qui a participé activement à la relecture du manuscrit. Je remercie particulièrement Bernard Bourguignon pour la formation scientifique qu'il m'a dispensée et Marie-Pierre Fontaine-Aupart pour la qualité de son encadrement et son investissement scientifique. Je tiens à remercier Marie-Noëlle Bellon-Fontaine pour son exigence et sa rigueur dans le cadre des expériences microbiologiques. J'ai pu ainsi percevoir toute la pertinence de leurs remarques scientifiques dans leur domaine scientifique respectif.

J'adresse toute ma gratitude à l'équipe de l'UBBHM pour m'avoir initiée aux techniques microbiologiques. Ma reconnaissance s'adresse en premier lieu à Jean-Marie Herry pour ses connaissances et sa technique très pointues en microscopie à force atomique, mesures d'angles de contact et de charge et qu'il a partagé avec moi. Je remercie tout particulièrement Margareth Renault pour son accompagnement lors des expériences de microscopie confocale de fluorescence (en particuliers, celles concernant les bactéries pathogènes) ou de microscopie électronique à balayage et les conseils qu'elle m'a prodiguée. Merci aussi à Stéphane Durieux, Julien Deschamps, Morgan Guilbaud et Gilles Gerlot pour leurs bonnes humeurs et leurs aides techniques. Je remercie aussi Isabelle Grand qui m'a appris entre autre une nouvelle technique de dénombrement de bactéries et Jérôme Bruzard, deux doctorants qui ont comblé quelques lacunes scientifiques au cours de discussions intéressantes. J'exprime mes vifs remerciements à Bruno Carnez, technicien en charge de la préparation des milieux biologiques et à qui j'ai demandé beaucoup de ces préparations.

Ma reconnaissance s'adresse au personnel de l'équipe Biophysique et Biophotonique, notamment à Sandrine Lécart, ingénieur de recherche responsable de la plateforme CPBM (Centre de Photonique BioMédicale à l'université Paris Sud), qui est venue à mon aide

lorsque le matériel me faisait défaut. Merci aussi aux doctorants Samia Daddi Oubekka, Viviane Devauges, Baptiste Chappaz, Alan Chan que j'ai côtoyé à diverses périodes de ma thèse et avec qui j'ai pu échanger des conversations sur les divers problèmes rencontrés en biologie ou tout simplement sur le ressenti d'une thèse. Je remercie aussi Qingli Kou pour ses discussions hors travail.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe femtophysique aux interfaces de l'équipe SIREN. Je remercie tout d'abord Ziang Guo, le doctorant qui m'a initié à la spectroscopie SFG et avec qui j'ai passé de très longues journées à acquérir des spectres. Je remercie aussi Aimeric Ouvrard pour sa disponibilité lors de problèmes rencontrés sur la chaîne laser. Je remercie sincèrement Serge Carrez qui a accepté de partager son bureau avec moi : merci pour les nombreuses discussions partagées, scientifiques ou non, et ta présence tout au long de cette thèse. Je remercie Wanquan Zheng pour la fabrication des échantillons de la SAM d'ODT et pour les calculs *ab initio*. Merci aussi aux autres doctorants de l'équipe : Ahmed Ghalgaoui et Jijin Wang.

Merci aux doctorants de l'ISMO, en particuliers, à Raphaël Thon, Géraldine Féraud, Hatem Labidi, Hela Friha, Tamara Ovramenko, Marie-Aline Martin, Rudy Desmarchelier, Patrick Jacquet, Benoit Rogez, qui ont contribué à mettre une bonne ambiance entre les doctorants de l'institut et qui m'ont permis de m'évader de mon travail de recherche par leurs divers centres d'intérêts.

Pour finir, je remercie chaleureusement Martine Basset, secrétaire de l'école doctorale onde et matière qui a partagé les instants de bonheur et de doutes ces deux dernières années, en particulier pendant les repas du midi. Merci aussi aux secrétaires de l'ISMO qui m'ont aidée à avancer parmi les méandres de l'administration française mais aussi étrangère lors des différents congrès que j'ai pu faire : merci à Raymonde Sévéré, Bernadette Rome, et Marie-Claire Paul. Je remercie également Christophe Lefumeux pour son implication dans la chaîne laser et l'équipe technique pour la fabrication de pièces mécaniques.

Sommaire

INTRODUCTION	9
I – L’ADHESION BACTERIENNE : ETAT DE L’ART	13
I – 1 – Le monde bactérien	14
I – 1 – 1 : Diversité du monde bactérien	14
I – 1 – 2 : Les différents modes de vie des bactéries	16
I – 2 – Aspects mécanistiques de l’adhésion bactérienne, de la formation des biofilms et de l’adsorption protéique	16
I – 2 – 2 : Effet de la présence des protéines sur l’adhésion bactérienne	18
I – 3 – Les différentes stratégies anti-bioadhésion	22
I – 3 – 1 : Différentes approches pour limiter l’adhésion bactérienne	22
I – 3 – 2 : Les surfaces « brosse » : une approche pour limiter l’adhésion bactérienne	23
I – 4 – Les différentes techniques d’étude de l’adhésion bactérienne	25
I – 4 – 1 : Aspects microbiologiques : évaluation du nombre de bactéries adhérentes sur une surface	25
I – 4 – 2 : Aspects physico-chimiques : évaluation de l’interaction bactérie - surface	26
I – 4 – 3 : Des résultats divergents	27
I – 4 – 4 : Techniques récemment appliquées à l’étude des interfaces biologiques	28
II – LA MONOCOUCHE AUTOASSEMBLEE D’OCTADECANETHIOL (SAM D’ODT) : PREPARATION, CARACTERISATION MULTI-ECHELLE, APPORT DE LA SPECTROSCOPIE DE GENERATION DE FREQUENCE SOMME (SFG)	35
II – 1 – Fabrication des surfaces de la SAM d’ODT	36
II – 2 – Techniques de caractérisation de la SAM d’ODT	37
II – 2 – 1 : La microscopie à Force Atomique (AFM)	37
II – 2 – 2 : La mesure d’angle de contact	39
II – 2 – 3 : La spectroscopie de Génération de Fréquence Somme (SFG)	41
II – 2 – 4 : Structure de la SAM d’ODT, spectres SFG et modélisation	56
II – 3 – Caractérisation multi-échelle de la SAM d’ODT exposée à l’air	69
II – 3 – 1 : Caractérisation macroscopique et microscopique	69
II – 3 – 2 : Caractérisation moléculaire : spectroscopie vibrationnelle SFG	73
III – EFFET DE LA BIOCONTAMINATION SUR LA SAM D’ODT	83
III – 1 – Biomolécules : préparation, protocoles d’adhésion/adsorption, observation par différentes microscopies	84
III – 1 – 1 : Préparation des échantillons	84
III – 1 – 2 : Protocoles d’adhésion/adsorption	87
III – 1 – 3 : Observation par différentes microscopies	89

III – 2 – Etude par SFG et microscopie confocale de fluorescence de la compétition entre l'adsorption de protéines et l'adhésion bactérienne.....	95
III – 2 – 1 : Propriétés électrostatiques des bactéries en solution et en présence de protéines	95
III – 2 – 2 : Recouvrement des SAM d'ODT par les bactéries et les protéines.....	98
III – 2 – 3 : Spectroscopie SFG de la SAM d'ODT en présence de biomolécules.....	103
III – 2 – 4 : Caractérisation par microscopie confocale de l'attachement des bactéries <i>L. lactis</i> sur la SAM d'ODT.....	118
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	127
ANNEXES	133
Annexe 1 : Complément au chapitre II	134
Annexe 2 : Complément au chapitre III	142
Annexe 3 : Complément aux Perspectives - expériences préliminaires.....	160
ARTICLES	165
LISTE DES FIGURES	167
LISTE DES TABLEAUX.....	170
LISTE DES ABREVIATIONS.....	171
LISTE DES NOTATIONS.....	173
BIBLIOGRAPHIE	175

Introduction

Les matériaux en contact avec des fluides biologiques sont exposés à de nombreux microorganismes (bactéries, levures...) et à des macromolécules telles que les protéines. Ces différentes entités peuvent s'adsorber et/ou adhérer sur une surface et la coloniser. Lorsque les microorganismes impliqués sont pathogènes, les dangers pour la santé humaine sont nombreux : de l'infection intestinale (causée par exemple par *Salmonella*) à la maladie nosocomiale (causée par exemple par *Staphylococcus aureus*) en passant par la listériose (causée par *Listeria monocytogenes*). Néanmoins, lorsque les bactéries sont non pathogènes, la colonisation de la surface par ces bactéries peut être utile. Il s'agit par exemple de l'utilisation de *Brevibacterium linens* ou de *Staphylococcus xylosus* dans les salles d'affinage des fromageries (ces bactéries rendent la croûte de certains fromages rouge et odorante).

Différents types de traitements de surface sont utilisés pour maîtriser la colonisation et/ou éradiquer les bactéries pathogènes. Parmi les différentes stratégies possibles d'élaboration de surfaces à effet antiadhésif, la fonctionnalisation des surfaces s'est fortement développée. Leur efficacité (i.e. l'impact de la biocontamination) est alors évaluée par :

- le dénombrement des bactéries au moyen des techniques microbiologiques, de la microscopie de fluorescence ou de la microscopie électronique à balayage (MEB).
- La mesure des forces d'interactions entre les bactéries et ces surfaces par des mesures en microscopie à force atomique (AFM).

Néanmoins, les résultats expérimentaux ne sont pas toujours à la hauteur des espérances. Ceci s'explique par la complexité du monde bactérien, la grande diversité des surfaces développées mais également par le manque de caractérisation à l'échelle moléculaire de la surface en interaction avec les bactéries.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la biocontamination par des bactéries *Lactococcus lactis* en présence et en l'absence de protéines, d'une surface organisée composée d'une monocouche autoassemblée (SAM) hydrophobe d'OctaDécaneThiol (ODT), qui est constitué d'une chaîne aliphatique de groupes méthylènes, terminée par un groupe méthyle d'un côté et par une fonction thiol de l'autre, cette dernière lui permettant de se greffer sur une surface d'or. La motivation de cette recherche est la compréhension des processus moléculaires à l'interface substrat – biomolécules qui permettrait d'optimiser la fabrication et la fonctionnalisation de surfaces pour limiter l'adhésion bactérienne et/ou faciliter l'éradication des cellules adhérentes.

Dans ce contexte, la spectroscopie vibrationnelle de Génération de Fréquence Somme (SFG) apparaît comme la technique la mieux adaptée à comprendre fondamentalement l'interaction entre les bactéries et une surface à l'échelle moléculaire. Il s'agit d'une technique basée sur l'optique non linéaire du second ordre permettant de sonder spécifiquement des surfaces et interfaces ordonnées. Le principe consiste à envoyer sur l'échantillon un faisceau visible et un faisceau infrarouge accordé aux longueurs d'onde des vibrations des molécules

de la surface (ici celles des liaisons C–H des groupements méthylènes et méthyles de la SAM d'ODT). Le spectre SFG obtenu permet d'obtenir quantitativement après déconvolution et modélisation, la conformation des molécules en fonction de leur environnement biochimique. Bien qu'il s'agisse d'une technique appliquée depuis une vingtaine d'années à l'étude de surfaces organiques ou inorganiques exposées à l'air ou sous ultravide, l'émergence des recherches pluridisciplinaires cette dernière décennie en fait un outil de plus en plus utilisé pour l'étude de surfaces en contact avec des milieux biologiques (ADN, protéines). En effet, la spectroscopie SFG présente des avantages certains pour la biologie :

- pas de destruction des échantillons biologiques
- obtention de spectres SFG dans des conditions *in situ*.
- pas de nécessité de modifier les biomolécules avec un marqueur photosensible (une nécessité rencontrée avec la plupart des techniques optiques telles que la microscopie de fluorescence).

Le choix de la surface de la SAM d'ODT s'avère être prometteuse comme support pour étudier l'adhésion bactérienne car il s'agit d'une surface structurée en « brosse » (i.e. ayant des propriétés susceptibles de limiter l'adhésion bactérienne par sa structure en bras « espaceurs » entre les bactéries et la surface) et donnant lieu à un fort signal SFG.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes attachés à compléter les connaissances actuelles sur l'adhésion bactérienne grâce à l'originalité de la spectroscopie SFG et à en déduire certains facteurs régissant l'adhésion sur une surface fonctionnalisée, incluant le rôle des protéines. Cette étude utilise principalement la spectroscopie SFG, à notre connaissance réalisée pour la première fois, sur des surfaces en contact avec des bactéries. D'autres techniques complémentaires, telles que la microscopie de fluorescence, la microscopie à force atomique, la microscopie électronique à balayage, la mesure d'angles de contact, la mesure de la charge portée par les bactéries ou le dénombrement des cellules adhérentes viables cultivables ont été également utilisés afin de caractériser au mieux le support, le matériel biologique (bactéries et protéines) et interpréter les données SFG.

Ce travail se situe à l'interface de la chimie, de la physique, de la microbiologie et s'articule autour de deux grands axes (Figure 1) :

- fonctionnalisation et détermination de la conformation de la SAM d'ODT par spectroscopie vibrationnelle SFG et modélisation
- étude de la biocontamination (on entend à la fois la contamination par les protéines, présentes dans les fluides biologiques environnants, et par les bactéries : adhésion bactérienne et adsorption protéique) sur la SAM d'ODT par spectroscopie SFG et microscopie confocale associées aux méthodes physico-chimiques précédemment citées.

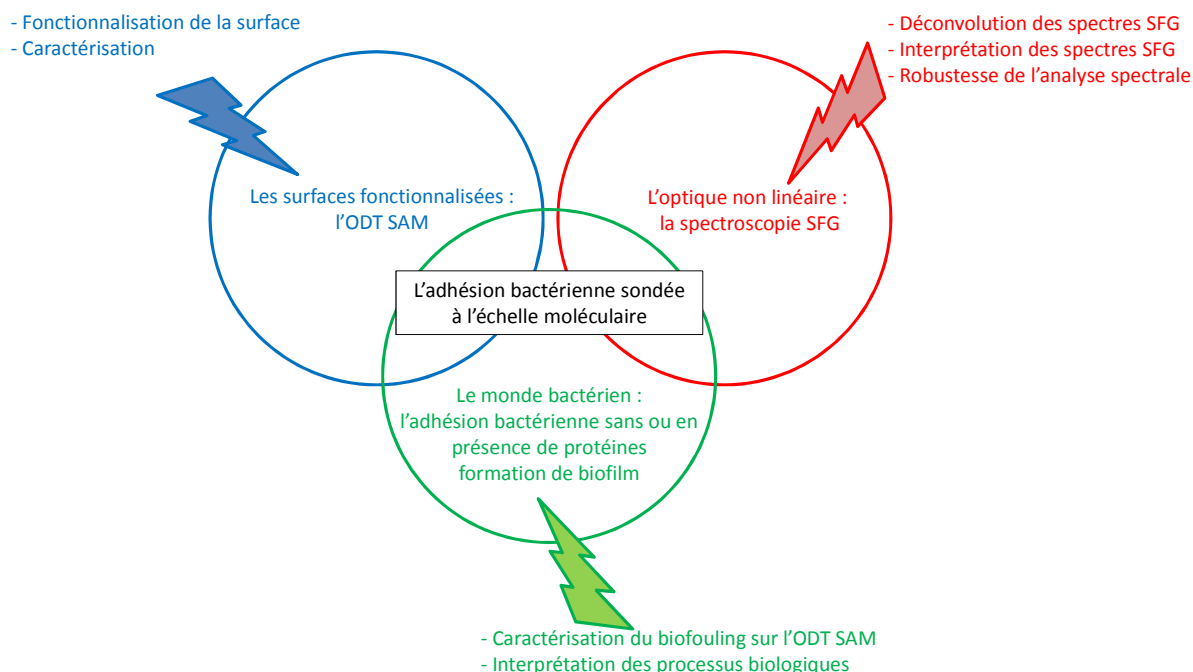


Figure 1 : Pluridisciplinarité de ce travail de thèse.

Pour atteindre l'objectif de la thèse, mon travail de recherche se décompose comme suit :

- dans une première partie, le monde bactérien, l'adhésion bactérienne et l'adsorption protéique sont décrits puis un état de l'art de la recherche menée sur l'adhésion bactérienne sur des surfaces fonctionnalisées est présenté.
- dans une seconde partie, nous décrirons la fabrication de la SAM d'ODT et sa caractérisation multi-échelle. La microscopie à force atomique et les mesures d'angles de contact permettront de caractériser la qualité et l'homogénéité de la SAM d'ODT aux échelles macroscopique et microscopique. La caractérisation moléculaire (i.e. la conformation des molécules d'ODT) sera obtenue par la spectroscopie vibrationnelle SFG. J'insisterai sur la déconvolution des spectres expérimentaux SFG et la modélisation que j'ai fait évoluer afin d'obtenir une analyse rigoureuse et complète des informations pouvant être obtenues à partir de ces spectres.
- dans une troisième partie, on étudiera le biofouling (i.e. l'encrassement biologique) des surfaces SAM par deux souches de *Lactococcus lactis*, puis par les protéines modèles d'Albumine de Sérum Bovin (BSA pour Bovin Serum Albumin) et enfin par les bactéries en présence de protéines.

Dans cette troisième partie, je décrirai également un certain nombre de méthodes microbiologiques permettant de caractériser les biosystèmes :

- détermination des caractéristiques physico-chimiques des bactéries et des protéines par mesures de charge (zétamétrie), détermination du caractère hydrophobe / hydrophile des parois bactériennes par un test de partage (méthode de l'adhésion microbienne aux solvants), etc...
- caractérisation de l'adhésion bactérienne par microscopie électronique à balayage et microscopie de fluorescence
- caractérisation de l'adsorption protéique par mesures d'angle de contact
- ...

Les protocoles d'adhésion bactérienne et d'adsorption protéique sur la SAM d'ODT que j'ai mis au point afin d'obtenir des adhésions / adsorptions homogènes seront décrits ainsi que les précautions à prendre lors des expériences SFG réalisées en milieux aqueux.

L'impact de la biocontamination sur la SAM d'ODT sera discuté suite à l'analyse et la modélisation des spectres SFG que j'ai adapté aux milieux solvatés et à l'étude des forces d'adhésion des bactéries sur la surface par microscopie confocale de fluorescence. Cette étude permettra de proposer des mécanismes d'adhésion bactérienne sans et en présence de protéines BSA : lorsque ces protéines sont déjà présentes sur la SAM (BSA « coating ») ou lorsqu'elles sont présentes au sein de la suspension bactérienne.

L'ensemble de cette thèse a fait l'objet d'une collaboration très étroite entre l'équipe Surfaces, Interfaces : Réactivité et Nanostructuration (SIREN), l'équipe Biophysique et Biophotonique de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay et l'équipe Bioadhésion, Biofilms et Hygiène des Matériaux de l'Institut MICALIS (UMR 1319 INRA-AgroParisTech-Massy).

I – L'adhésion bactérienne : état de l'Art

I – 1 – Le monde bactérien

I – 1 – 1 : Diversité du monde bactérien

Les bactéries sont des cellules procaryotes (i.e. sans noyaux) naturellement présentes dans notre environnement, en suspension dans des fluides plus ou moins complexes (air ou liquide), à l'état planctonique (i.e. les bactéries sont libres) ou « fixées » sur une surface biotique ou abiotique. Les habitats naturels des bactéries sont ainsi très variés : du sol à l'aliment, de l'organisme humain aux sites industriels (Figure 2).

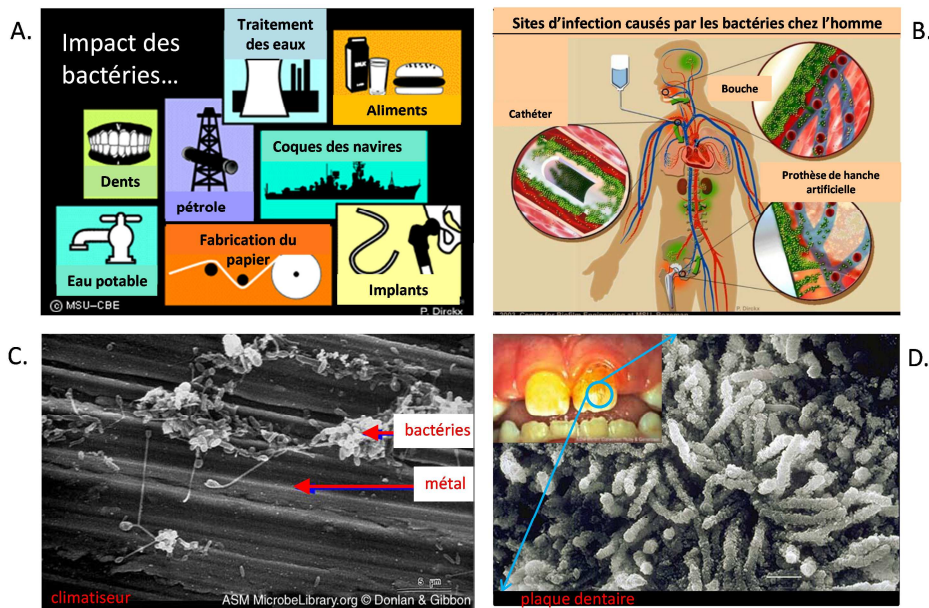


Figure 2 : A. Exemples d'habitats colonisés par des bactéries dans la vie quotidienne (Montana State University Center for Biofilm Engineering). B : Implants médicaux contaminés dans le corps humain (Montana State University Center for Biofilm Engineering). C. Colonisation du métal d'un climatiseur par des bactéries amenées par l'eau au bout de 2 semaines (1). D. Plaque dentaire causée par trois types de bactéries différentes (2).

Le monde bactérien en lui-même présente également une importante diversité. La nature de la bactérie diffère par :

- sa forme : sphérique, ovale, en bâtonnet, en filament, etc... (Figure 3.A), **(3)**
- sa taille allant de quelques microns à la centaine de microns (Figure 3.B), **(4)**
- la composition de son enveloppe : type Gram positif ou Gram négatif (Figure 4.A et Figure 4.B respectivement), présence ou non de capsules, de protéines favorisant l'adhésion des bactéries sur des surfaces (fimbriae, adhésines...) **(2)**
- la présence éventuelle d'appendices : flagelles, pilis, curlis (appendices composés de fibres flexibles), etc... aidant à la motilité des bactéries, c'est-à-dire leur capacité de mouvement sur les surfaces ou dans les liquides (Figure 4.C)

- les nutriments nécessaires au développement des cellules : type aérobie ou anaérobie, c'est-à-dire besoin de dioxygène ou non, besoin de glucose ou non, etc...
- son mode de vie : individuelle ou en communauté.

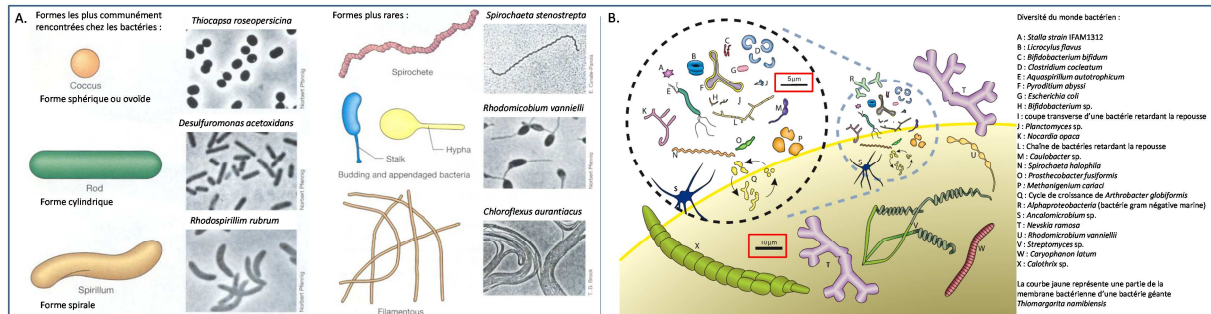


Figure 3 : A. Diversité morphologique des bactéries. B. Diversité de taille (de 0,5 μm à une centaine de microns de diamètre) et de forme chez les bactéries. Figure adaptée de (3) et (4).

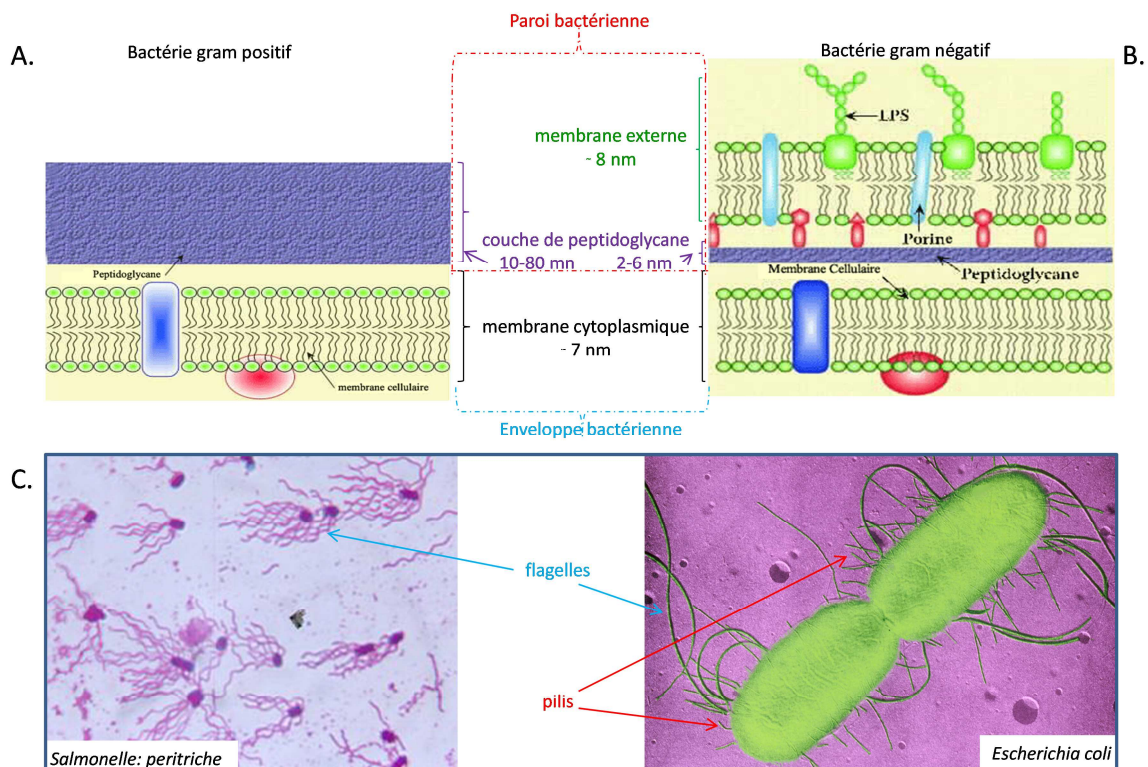


Figure 4 : A, B. Représentation schématique d'une paroi bactérienne A : d'une bactérie à Gram positif, B : d'une bactérie à Gram négatif. Le peptidoglycane est composé de glycanes reliés entre eux par des petites chaînes peptidiques, il forme un filet de mailles plus ou moins serrées. Dans le cas des bactéries à Gram négatif une membrane externe supplémentaire existe, composée de protéines et de lipopolysaccharides (LPS constitués d'une partie lipide et d'une partie polysaccharide). C : Images au microscope électronique de bactéries comportant à gauche des flagelles (appendices rotatoires de 20 nm de diamètre et de 15-20 nm de long) et à droite des flagelles et des pili (appendices de 2-3 nm de diamètre et de 5-7 nm de long). Figure adaptée de la source membres.multimania.fr et des références (2) et (5).

I – 1 – 2 : Les différents modes de vie des bactéries

Selon les conditions environnementales, une bactérie peut être présente dans deux états **(6)** :

- l'état végétatif, durant lequel sont assurées des biosynthèses équilibrées permettant la croissance de la population bactérienne
- l'état de repos, caractérisé par un minimum d'échanges avec le milieu extérieur assurant la survie bactérienne sans multiplication.

Chez les bactéries, la croissance peut se traduire par une augmentation du volume de la cellule bactérienne, mais elle conduit le plus souvent à une augmentation du nombre de cellules. Pour assurer sa croissance ou sa survie, une bactérie doit trouver dans son environnement de quoi satisfaire ses besoins nutritifs : substances énergétiques permettant à la cellule de réaliser la synthèse de ses constituants et substances élémentaires constitutives de la cellule.

Parmi les habitats possibles pour les bactéries, les surfaces (organiques ou inorganiques) sont les plus importantes car les nutriments s'y trouvent souvent en quantité beaucoup plus importante que dans un milieu liquide.

Dans le monde hospitalier ou agroalimentaire, la colonisation des surfaces par les bactéries est un véritable problème de santé publique. Par exemple, les infections nosocomiales (IAS : Infections Associées aux Soins générées, impliquant principalement les bactéries *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) touchent environ 5% des personnes hospitalisées par an en France et causent quelques 4 000 décès par an (données de 2006, **(7)**) et les toxi-infections alimentaires ont touché 9901 personnes en France en 2010 dont une est décédée **(8)**. Les bactéries ont en effet la capacité de s'adapter très facilement à leur environnement et d'en tirer le meilleur parti afin de se développer et de proliférer.

I – 2 – Aspects mécanistiques de l'adhésion bactérienne, de la formation des biofilms et de l'adsorption protéique

Les bactéries présentes dans notre écosystème sont transportées vers la surface réceptrice sur laquelle elles peuvent adhérer par différents processus de transport **(9) (10)** :

- la sédimentation due aux forces de gravité
- les forces hydrodynamiques du fluide environnant
- la diffusion aléatoire par mouvements browniens dus à l'agitation thermique
- le mouvement propre et autonome des bactéries, qui en sont capables grâce à la présence de flagelles ou de pilis.

L'adhésion bactérienne sur une surface peut être décrite comme un processus en deux étapes successives :

- une première étape physique, instantanée et réversible : c'est l'étape d'attachement des bactéries sur la surface. Les microorganismes vont pouvoir adhérer à la surface par des liaisons physicochimiques (interactions électrostatiques, de van der Waals ou hydrophobes lorsque les interactions sont gouvernées par l'entropie) et par des interactions liées au mouvement brownien (i.e. mouvements incessants et aléatoires en solution) **(11)**.
- une seconde étape non instantanée liée à la physiologie des bactéries (nécessitant que les liaisons créées entre les bactéries et la surface durant l'étape d'attachement soient maintenues et consolidées), irréversible du point de vue chimique et cellulaire. Elle consiste en une adaptation de la bactérie à la surface.

En résumé, « l'adhésion bactérienne » est une situation dans laquelle la bactérie adhère à une surface par des interactions physico-chimiques, adapte sa physiologie et sa conformation.

Outre les caractéristiques propres des bactéries, l'adhésion bactérienne est influencée par de nombreux autres facteurs **(9) (10)**. Parmi ceux-ci, figurent la nature de la surface du point de vue acido-basique au sens de Lewis et la présence éventuelle de charges, qui si elles existent jouent un rôle important par rapport aux simples forces de van der Waals qui sont plus faibles **(12)**. Un autre facteur à prendre en compte est la rugosité de la surface : les irrégularités d'une surface, la présence de trous et l'augmentation de la porosité sont trois facteurs augmentant le nombre de bactéries adhérant à la surface **(13)**.

L'environnement au sens large du terme, c'est-à-dire la température, le temps d'exposition, la présence d'antibiotiques, la concentration bactérienne et les conditions de flux sont également des facteurs influençant l'adhésion bactérienne. Le pH et la force ionique, en modifiant l'état de la surface (qui est plus ou moins hydrophobe, et plus ou moins chargée suivant le pH, influent par conséquent sur l'adhésion bactérienne **(14)**.

Enfin, l'environnement de la surface peut au préalable « contaminer » la surface par des macromolécules adsorbées telles que des protéines et l'adhésion bactérienne est alors perturbée (l'aspect mécanistique de l'adhésion bactérienne en présence des protéines est discutée dans le paragraphe suivant). Ces protéines peuvent servir de nutriments pour les bactéries, elles peuvent être des récepteurs aux bactéries ou au contraire limiter l'interaction entre les bactéries et la surface **(15)**. Par exemple, l'adhésion des bactéries *Staphylococcus aureus* sur une surface exposée au préalable au sérum protéique d'albumine bovin **(16)** est limitée alors que si la surface est exposée au sérum protéique de fibrinogène ou de fibronectine (déjà connus pour influencer l'adhésion de cellules eucaryotes sur une surface), ces protéines ont au contraire tendance à favoriser l'adhésion bactérienne sur la surface **(17)**.

I – 2 – 2 : Effet de la présence des protéines sur l'adhésion bactérienne

Les protéines sont naturellement présentes sur les surfaces dès lors que celles-ci entrent en contact avec des fluides biologiques environnants **(18)**. L'adsorption des protéines est donc un facteur important à prendre en compte lors de l'étude de l'adhésion bactérienne. Elle peut modifier les propriétés physico-chimiques de la surface, l'adhésion bactérienne **(10)** **(9)** et la diffusion des bactéries **(19)**, la biodégradabilité, les fonctionnalités (échangeurs thermiques, résistance à l'écoulement de l'eau pour les embarcations en navigation, etc...), l'efficacité du nettoyage ou des processus de désinfection, la biocompatibilité des implants... La prise en compte de la présence des protéines est indispensable à la compréhension des interactions bactéries – surface dans un milieu naturel.

Les protéines

Les protéines sont des édifices biologiques possédant différents niveaux d'organisation (Figure 5). Ces macromolécules sont constituées d'acides aminés. Il existe 20 acides aminés (AA) naturels.

La composition chimique (nombre et pourcentage d'AA) et l'ordre d'enchaînements des AA (formation des liaisons peptidiques) constituent la structure primaire d'une protéine. La structure secondaire résulte de la formation de liaisons hydrogènes, ioniques, ou des ponts disulfures, qui déterminent localement la forme de la protéine. Deux types de structures secondaires prédominent : les hélices alpha (enroulement hélicoïdal) et les feuillets bêta (enroulement en feuillets plissés). Elles sont reliées entre elles par des structures plus désordonnées ou des « turns ».

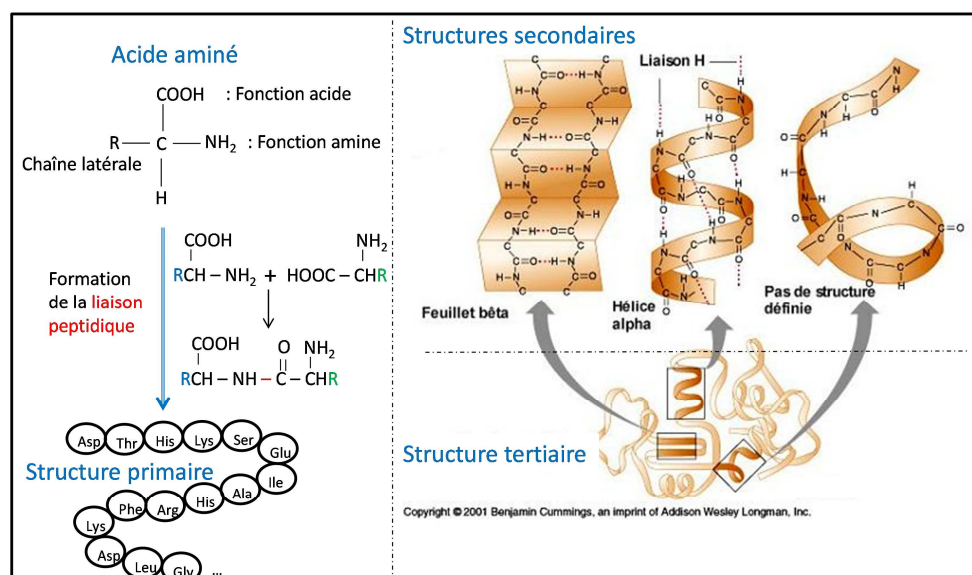


Figure 5: Les différents niveaux d'organisation d'une protéine. La structure primaire correspond à celle de la protéine BSA.

Enfin, l'organisation spatiale des structures secondaires dans l'espace tridimensionnel permet d'obtenir la forme finale de la protéine, dite structure tertiaire, dont la stabilité est assurée également par des liaisons hydrogènes, ioniques ou des ponts disulfures s'établissant entre les chaînes latérales des acides aminés. Les protéines les plus complexes ont un quatrième niveau d'organisation de leur structure appelé structure quaternaire. C'est le cas par exemple de l'hémoglobine.

L'adsorption protéique

Les protéines peuvent adopter différentes structures tertiaires si elles sont en interaction avec d'autres molécules ou adsorbées sur une surface. En effet, la surface d'une protéine présente des groupements hydrophobes et hydrophiles, chargés positivement et/ou négativement, des régions polaires et apolaires. Différentes interactions auront donc lieu entre la protéine et la surface suivant leurs caractéristiques physico-chimiques respectives (cf. ci-dessous). Ceci peut amener à une dénaturation de la protéine (destruction de la structure tertiaire) ou à un changement de sa conformation au contact avec la surface **(20) (21)**.

Lorsqu'une protéine migre vers une surface, différentes interactions entre la protéine et la surface sont mises en jeu (Figure 6) **(22) (23)** :

- des interactions électrostatiques qui peuvent conduire à la co-adsorption d'ions présents en solution afin d'optimiser l'énergie du système en neutralisant les charges portées par la surface et les protéines.
- des interactions dispersives telles que les forces de London, toujours attractives mais dont l'intensité diminue avec la diminution de la taille des protéines et l'augmentation de la distance protéine-surface.
- des interactions hydrophobes : dans le cas d'interactions avec un solvant hydrophile, les protéines en solution adaptent leur conformation afin d'enfouir les groupements apolaires et hydrophobes au cœur de la structure protéique tertiaire pour limiter les interactions défavorables entre ces groupements et les molécules d'eau. Dans le cas où la surface est hydrophobe, les protéines vont au contraire changer leur conformation afin de maximiser les interactions entre elles et la surface. Lorsque le solvant et la surface ont des polarités différentes, les protéines ont plus de chances de changer de conformation quand elles s'adsorbent **(24)**.

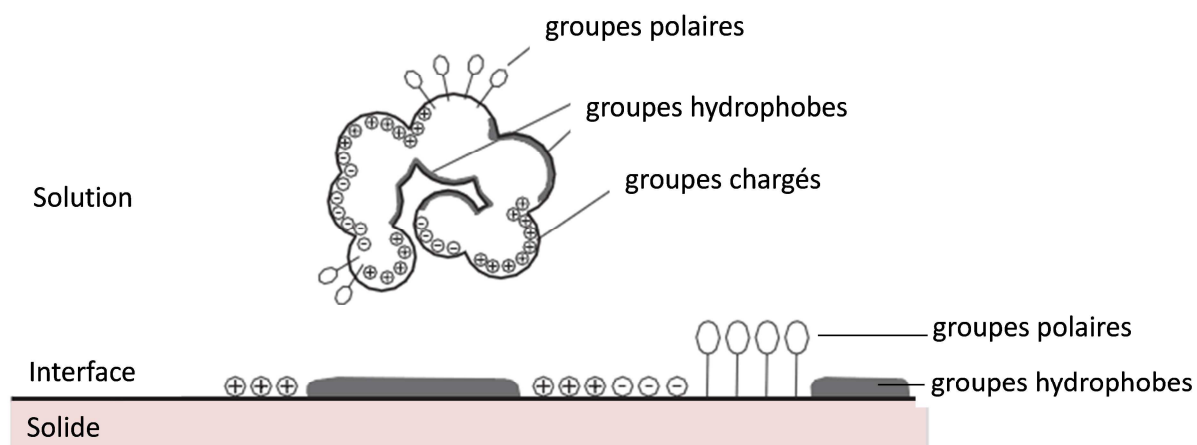


Figure 6 : Vue schématique de l'adsorption d'une protéine. Figure adaptée de la Ref (25).

L'adsorption des protéines sur une surface (i.e. accumulation de protéines) conduit à la formation d'un film qui peut être « conditionnant », sub-, mono- ou multicouche.

L'adhésion bactérienne en présence de protéines

Au sein de notre organisme, le taux de protéines dans le sang (appelé protéinémie) est compris entre 60 et 80 mg.mL⁻¹ composé par les albumines (liées à la régulation de la pression dans les vaisseaux sanguins), les immunoglobulines du système immunitaire et d'autres protéines impliquées dans la coagulation du sang ou la réponse immunitaire. Les infections bactériennes surfaciques chez l'homme (notamment sur les implants) se produisent donc en présence de protéines.

Lorsque les surfaces sont recouvertes d'un film primaire de protéines, les interactions entre les bactéries et les surfaces vont être modifiées par rapport à leur interaction directe avec le support puisque les protéines n'ont aucune raison d'avoir les mêmes caractéristiques physico-chimiques que les surfaces originelles. Les protéines peuvent améliorer « l'ancrage » des bactéries sur la surface grâce aux interactions ligands-récepteurs ou acide/base de Lewis entre elles et les bactéries, ou au contraire limiter l'adhésion bactérienne par des interactions répulsives, le plus souvent électrostatiques (9) (16) (17) (26) (27) (28) (29) (30).

Les protéines de la surface peuvent aussi être un élément nutritif pour les bactéries, ce qui est de nature à modifier l'état de la surface par la métabolisation des protéines, avec une influence sur la poursuite de l'adhésion bactérienne mais aussi sur la prolifération des bactéries sur la surface.

I – 2 – 3 : Le biofilm

Suite à l'adhésion bactérienne, les bactéries peuvent proliférer et changer de mode de vie, formant une « communauté bactérienne », appelé biofilm bactérien (Figure 7), présent sur toutes les surfaces de notre quotidien (31) (32). Dans le biofilm, elles renforcent leur protection vis-à-vis des agents extérieurs et peuvent devenir par exemple beaucoup plus résistantes aux antimicrobiens.

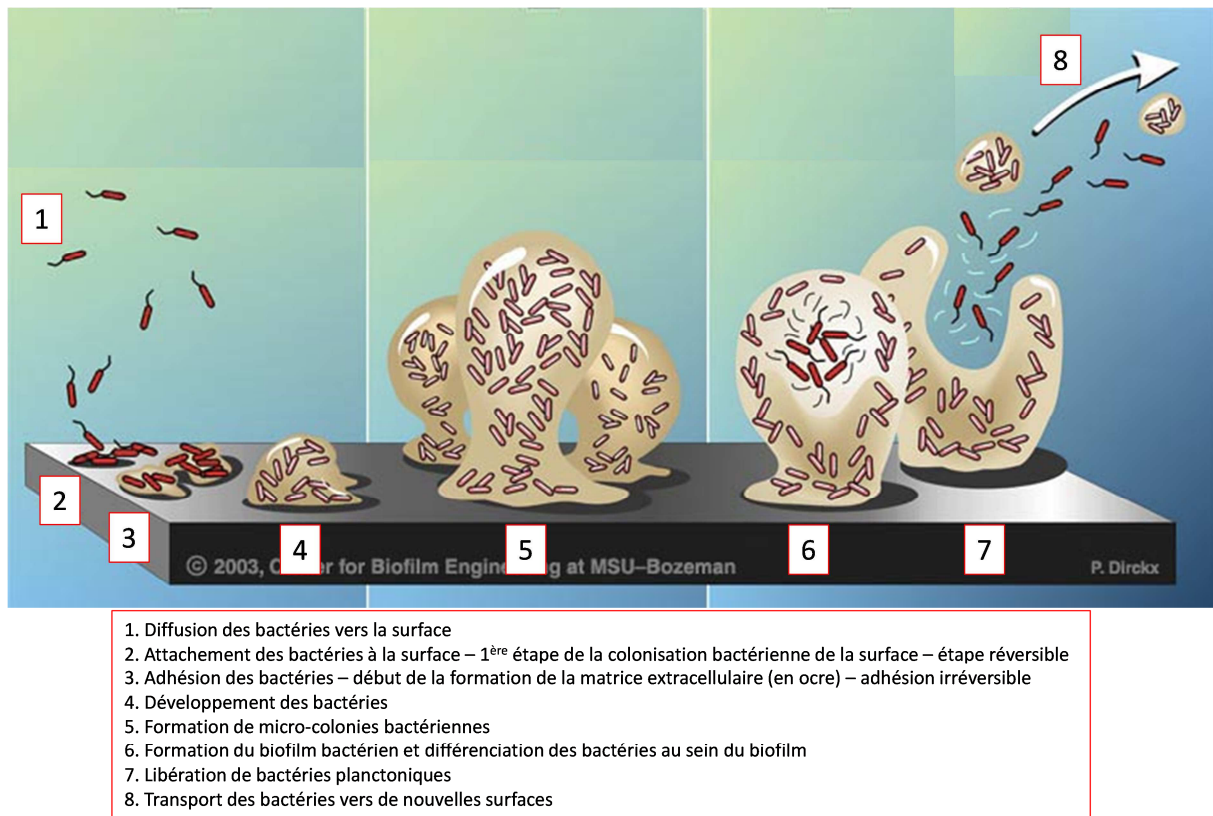


Figure 7 : Développement d'un biofilm bactérien sur une surface. Figure adaptée de (33), Montana State University Center for Biofilm Engineering.

Les bactéries adhérentes à la surface commencent d'abord par se multiplier (*étape 2*). A partir d'une certaine densité bactérienne, les bactéries vont excréter des polysaccharides, des protéines, de l'ADN ou des lipides (*étapes 3 – 4*). Ces différents composants vont former une matrice extracellulaire qui les relie entre elles et leur permet de « communiquer » : des micro-colonies bactériennes se forment. Cette matrice est très bien organisée : des canaux aqueux vont être créés afin d'apporter les différents nutriments ou l'oxygène aux bactéries par des diffusions sous l'effet de gradients de concentration. Ces canaux permettent également de faire circuler des molécules de signalisation (appelées « quorum sensing ») pouvant alerter les bactéries d'une « attaque extérieure » : les bactéries sont alors dans la capacité de réaliser des mutations physiologiques les prémunissant de l'agent attaquant. De plus, du matériel génétique pouvant accroître la résistance des cellules contre des hôtes hostiles peut aussi diffuser dans ces canaux. Enfin, les différentes micro-colonies vont se réunir pour former ce

qu'on appelle le biofilm mature, communément appelé biofilm bactérien (*étape 5 – 6*). En constant changement, l'état métabolique des bactéries dépend de leur localisation au sein du biofilm : les bactéries peuvent reprendre leur état planctonique afin de coloniser d'autres milieux (*étape 7*, Figure 7).

Différents processus physico-chimiques sont impliqués lors des différentes étapes de la maturation du biofilm. Par exemple, lors du développement du biofilm, la capacité des bactéries à excréter les composants nécessaires à la formation de la matrice extracellulaire joue un rôle important pour le caractère irréversible de l'adhésion et pour la cinétique de formation du biofilm.

Dans la nature, les biofilms sont en général hétérogènes, c'est-à-dire formés de plusieurs microorganismes : bactéries, levures, algues unicellulaires, etc... Les biofilms bactériens pathogènes qui se développent sur des surfaces sont à l'origine de problèmes sanitaires graves en milieu hospitalier et industriel (contamination des implants, légionellose dans les canalisations d'eau, etc...) qui justifient la recherche active actuellement développée pour remédier au problème.

I – 3 – Les différentes stratégies anti-bioadhésion

I – 3 – 1 : Différentes approches pour limiter l'adhésion bactérienne

Le concept d'anti-adhésion a pour objectif de limiter la colonisation des surfaces (c'est-à-dire limiter le nombre de bactéries), ou de limiter les forces d'interaction entre les bactéries et les surfaces afin de faciliter le décrochage des bactéries. Pour ce faire, différentes méthodes ont été étudiées :

- utilisation de polymères greffés par un agent qui peut rester un antimicrobien **(34)** ou être inorganique (en général, des groupes amines **(35)**) pour obtenir un effet létal sur les bactéries.
- utilisation d'un revêtement protéique de surface (protein coating) limitant l'adhésion des bactéries **(26) (29)**.
- utilisation de désinfectants qui tuent ou inactivent les bactéries.
- utilisation de détergents qui permet d'éliminer les cellules bactériennes à la surface **(36)**. Les solutions aqueuses de détergents (composés de peroxyde d'hydrogène par exemple **(37) (38) (39)**) ont un rendement de décrochage et/ou de destruction des bactéries plus important sur des surfaces hydrophobes que sur des surfaces hydrophiles. En effet, les surfaces hydrophobes n'absorbent pas l'eau. Un flux d'eau conséquent emporte alors les particules (saleté, bactéries...) dans son sillage et nettoie donc la surface contaminée : c'est l'effet « lotus » (le lotus s'auto-nettoie sous l'effet de la pluie grâce à ses propriétés « super-hydrophobes »).

- utilisation de surfaces super-hydrophobes afin de mimer l'effet « lotus » pour limiter l'adhésion des bactéries **(40) (41) (42)**.
- utilisation de surfaces super-hydrophiles pour limiter l'adhésion des bactéries hydrophobes.

Le principal problème rencontré est que l'efficacité de ces différentes méthodes dépend de la nature des bactéries que l'on souhaite décrocher ou ne pas faire adhérer sur la surface modifiée.

De par la multitude de facteurs influençant l'adhésion bactérienne (cf. chapitre I – 2), il n'existe pas de support idéal limitant la colonisation de toutes les bactéries. De nombreuses études sont réalisées sur l'adhésion de bactéries particulièrement pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ou *epidermidis*) sur des surfaces à fort potentiel limitant l'adhésion telles que les « brosses ».

I – 3 – 2 : Les surfaces « brosse » : une approche pour limiter l'adhésion bactérienne

Parmi les différentes approches décrites ci-dessus, la fonctionnalisation de surfaces par des chaînes ou des brosses, structures rigides de chaînes organiques ou inorganiques, s'est fortement développée **(43) (44)**. Elles font office d'espaces entre les bactéries et la surface et doivent limiter l'adhésion bactérienne et/ou faciliter le décrochage des bactéries (Figure 8).

Parmi les surfaces « brosses », les monocouches autoassemblées (SAM : Self-Assembled Monolayers) sur des surfaces métalliques développées depuis une dizaine d'années sont très prometteuses notamment pour des applications en biologie **(45) (46) (47)**. Les SAM sont un auto-assemblage quasi-solide de chaînes de molécules chimisorbées sur une surface. Selon la terminaison chimique des molécules choisies, on peut créer des SAM ayant des propriétés physicochimiques particulières :

- SAM d'oligosaccharides. Ces surfaces sont employées pour étudier les interactions entre les protéines à la surface des bactéries et les oligosaccharides présents sur la surface des cellules eucaryotes, interactions permettant la communication cellulaire, la différenciation et le développement cellulaire **(48) (49)**
- SAM de molécules hydrophobes telles que les alcanethiols (chaînes carbonées reliée à la surface d'un métal noble par un atome de soufre, étirées dans la conformation quasi tout trans et organisées spontanément en une structure compacte quasi-solide). Ce sont les premiers SAM mis au point par Nuzzo et Allara en 1983 **(50) (51)**
- SAM de molécules hydrophiles
- SAM avec des groupes amines en bout de chaîne tel que l'APTS (acide paratoluènesulfonique)
- SAM de poly(éthylèneglycol) (PEG) capables de limiter à l'adhésion bactérienne et cellulaire

- SAM composées de monocouches ou bicouche lipidiques modélisant la membrane cellulaire (52) afin d'étudier l'adsorption des protéines (53) ou l'adhésion d'autres cellules (54)
- SAM composées de biotines en bout de chaîne utilisées en tant que sonde biologique (47) (55)
- etc...

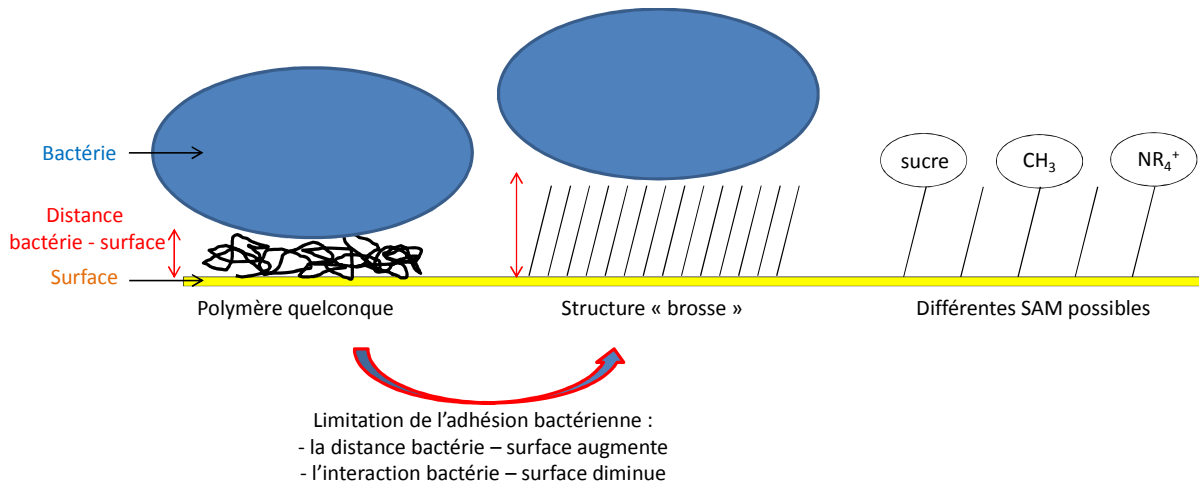


Figure 8 : Schéma de principe d'une surface « brosse ».

Les surfaces permettant la chimisorption des SAM sont nombreuses et peuvent être biocompatibles (56) :

- oxydes de métaux (AgO ou Al₂O₃) pour la chimisorption de chaînes d'acides carboxyliques (C_nH_{2n+1}COOH) par la réaction acide/base entre la chaîne et la surface.
- verre hydroxylé ou une surface d'oxyde d'aluminium pour des organosilanes grâce à la formation de la liaison covalente Si – O – Si.
- les métaux nobles ou les semi-conducteurs (Au, Ag, γ-Fe₂O₃) pour les organosulfures (HS(CH₂)_nX avec X, un groupe fonctionnalisant) grâce à la formation de la liaison covalente S – Métal.

Un autre avantage de ces structures est leur simplicité de fabrication : il suffit d'immerger pendant quelques secondes à quelques heures la surface à fonctionnaliser dans une solution contenant les molécules formant les futurs SAM. Spontanément, les molécules vont se chimisorber sur la surface et s'auto-organiser afin de former une monocouche de chaînes structurées (en pratique toutefois, la préparation de la surface avant exposition aux molécules doit être effectuée très rigoureusement).

L'auto-assemblage est donc un moyen très intéressant pour adapter la surface des matériaux à un environnement biologique et obtenir des propriétés « antiadhésives » et « antisalissures (antifouling) » contre les bactéries. On peut citer en perspective de développement, la recherche menée sur des SAM permettant d'inhiber l'adhésion des

bactéries pathogènes par la colonisation de la surface par des bactéries non pathogènes ciblées.

Cependant la surface SAM « idéale » reste à concevoir. On vient de voir dans le chapitre I – 2 que l’adhésion bactérienne est un processus impliquant à la fois des liaisons non spécifiques (interactions électrostatiques ou de van der Waals) et spécifiques (interactions ligand-récepteur) avec la surface. Une des stratégies à explorer serait de fonctionnaliser une surface à protéger des bactéries pathogènes avec des molécules capables de s’auto-assembler et de former des liaisons spécifiques avec des bactéries non pathogènes ciblées, tout en ne formant pas de liaisons non spécifiques avec les bactéries pathogènes.

I – 4 – Les différentes techniques d’étude de l’adhésion bactérienne

Jusqu’à présent les études concernant l’adhésion bactérienne consistent principalement à mesurer le nombre de bactéries adhérant sur la surface et à mesurer l’énergie d’adhésion.

I – 4 – 1 : Aspects microbiologiques : évaluation du nombre de bactéries adhérentes sur une surface

Dans ce paragraphe, les différentes techniques de dénombrement des bactéries en conditions statiques ou en flux sont décrites (9) (57) (58).

La mesure statique consiste à déposer une suspension bactérienne sur une surface sans flux d’éléments nutritionnels. Les surfaces sont rincées, lavées ou centrifugées pour éliminer toutes les bactéries qui n’ont pas adhéré à la surface. Enfin, les bactéries restant fixées à la surface sont comptées.

Afin de compter les bactéries, le moyen le plus simple est d’observer l’état de la surface au microscope optique (microscope de fluorescence, microscope confocal) mais cela requiert au préalable le marquage des bactéries par un marqueur fluorescent. Un microscope électronique (microscope électronique à balayage, (59)) ou à force atomique peut également être utilisé à cette fin. Cependant la mise en œuvre n’est pas aussi simple et peut être plus destructive pour les bactéries (déshydratation des échantillons pour les mesures en microscopie électronique, accrochage des bactéries sur la pointe AFM).

Une autre méthode consiste à détacher les bactéries de la surface par ultrasons et à les compter par les méthodes de dénombrement décrites en Annexe 2.A. D’autres modes de comptage directs ou indirects sont également utilisés tels que la spectrophotométrie (mesure de la diffusion de la lumière par les bactéries) ou la détection de marqueurs biochimiques en interaction avec les bactéries. Il est également possible d’évaluer le nombre de bactéries au stade du biofilm à partir de l’observation de la structure de ce dernier (épaisseur, densité, morphologie). Dans la plupart des cas, la microscopie optique est privilégiée.

La précision de ces méthodes est cependant limitée. Par exemple, le dénombrement des bactéries à partir des ultrasons présente l'inconvénient qu'il est toujours possible que toutes les bactéries ne se détachent pas de la surface. De plus, des bactéries peuvent être détruites par ultrasonication. Ainsi leur nombre risque d'être sous-évalué par cette méthode, d'une manière variable avec le type de surface et surtout avec le type de bactéries. De même, le dénombrement par microscopie optique peut sur- ou sous-évaluer le nombre de bactéries présent sur la surface lors du traitement statistique de l'image de fluorescence dépendant fortement de l'expérimentateur qui estime le grain de la pixélisation de l'image (i.e. taille et nombre de pixels décrivant une bactérie).

Enfin, le dénombrement en conditions statiques n'est pas toujours adapté. Par exemple, dans une usine, les fluides contenant des bactéries peuvent évoluer constamment dans le temps et l'espace. Des mesures d'adhésion en conditions de flux ont aussi été développées (60). Il s'agit de faire circuler une solution contenant des nutriments, ou simplement de l'eau distillée, à une vitesse fixée dans une chambre (i.e. boîte stérile possédant une entrée et une sortie reliées à une pompe afin de faire circuler la solution dans la boîte) contenant une suspension bactérienne et la surface à étudier, et de dénombrer les bactéries adhérentes au cours du temps par microscopie optique tel que décrit ci-dessus.

I – 4 – 2 : Aspects physico-chimiques : évaluation de l'interaction bactérie - surface

Depuis la fin des années 90, la microscopie à force atomique (AFM) connaît un essor important dans le monde microbiologique. C'est une méthode de microscopie de champ proche (61), basée sur les forces d'interaction entre le substrat et la pointe qui permet d'étudier de nombreuses propriétés de matériaux (62) et en interaction avec des entités biologiques (63). L'AFM permet de sonder simultanément la topologie de la surface, la force d'interaction d'une bactérie unique avec la surface ainsi que la morphologie de la bactérie (64). De plus, cette technique peut être mise en œuvre aussi bien à l'air que dans les milieux liquides. Plus précisément, l'interaction bactérie – surface peut être approchée selon deux protocoles différents :

- généralement, la pointe AFM est balayée sur la surface sur laquelle a adhéré la bactérie pour définir une courbe de force. On peut citer comme exemple l'étude du biofilm bactérien *E. coli* sur du verre avec une pointe de nitrure de silice (65).
- une bactérie peut être aussi déposée sur la pointe AFM et la mesure de la force d'interaction entre la bactérie et la surface est obtenue en approchant la bactérie de la surface nue. La mesure est répétée en différents endroits de la surface pour différencier la force d'adhésion en fonction de la topographie de la surface. Ceci a été réalisé par exemple sur des surfaces à caractère hydrophobe variable et des bactéries *E. coli* (66).

Dans tous les cas, il est possible de déterminer quantitativement les forces répulsives ou attractives entre les bactéries et les surfaces. Les différents matériaux peuvent alors être

classés selon leur caractère « répulsif » à l'adhésion bactérienne. La théorie DLVO élaborée dès 1948 par Derjaguin et Landau, Verwey et Overbeek permet de décrire les interactions entre deux particules sphériques (67) en prenant en compte les contributions de London-van der Waals (force attractive dépendant de la polarisabilité) et de la double couche électrique (force répulsive dépendant de la force ionique de la solution et de la charge portée par les particules) (68). Dans sa version initiale, cette théorie ne permet cependant pas d'expliquer les résultats expérimentaux observés en fonction de la nature hydrophobe / hydrophile de la surface. Une théorie plus complète est aujourd'hui utilisée en prenant en compte les effets stériques et de solvatation qui contribuent de façon importante à courte distance (66) (69). Elle permet d'obtenir un bon accord entre résultats théoriques et expérimentaux (9) (70).

Ainsi, il est désormais possible de classer les interactions entre les bactéries et les surfaces de façon quantitative. Cependant l'AFM est une technique délicate d'utilisation en raison de la pollution facile de la pointe par différentes entités : ions environnants, bactéries mortes... La pointe AFM interagit aussi fortement avec la bactérie que la surface, ce qui peut perturber les mesures de force. Ce type de problème a été rencontré lors de nos mesures et n'a pas permis d'utiliser facilement et rapidement la méthode pour des mesures de force d'interaction.

I – 4 – 3 : Des résultats divergents

Les études réalisées sur différents matériaux (verre, métaux, polymères...), différentes espèces bactériennes, et différentes conditions expérimentales (température, pH, force ionique...) conduisent à des résultats qui ne permettent pas de tirer de conclusions générales en ce qui concerne la limitation de l'adhésion des bactéries (43) (71). Par exemple, plusieurs études ont montré que les bactéries (souches de *Pseudomonas*, *Staphylococcus sanguis* ou *Streptococcus mutans* (10)) adhèrent en plus grand nombre sur des surfaces hydrophobes que sur des surfaces hydrophiles. Mais, un autre travail réalisé sur une souche hydrophobe de *Staphylococcus aureus* a démontré au contraire que les bactéries adhèrent moins (de 60 %) sur du polypropylène pourtant plus hydrophobe que sur le polyéthylène basse densité PEBD (34).

Pour certaines conditions expérimentales (72), des souches de bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, à gram négatif, n'adhèrent pas sur des surfaces de polyméthacrylate chargées positivement, alors que les bactéries à gram positif telles que *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* adhèrent à ces surfaces. Au contraire, d'autres conditions d'expériences (73) rapportent que les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* colonisent le polymère qu'il soit chargé négativement ou positivement, en désaccord avec l'étude précédente.

La description de l'adhésion bactérienne sur une surface prend généralement en compte le caractère hydrophobe / hydrophile ou la présence de charges sur la surface ou sur les parois bactériennes. Cependant, d'autres paramètres peuvent modifier l'adhésion

bactérienne, en particulier la physicochimie des cellules bactériennes et la qualité des surfaces (74), ce qui explique le manque de généralité des conclusions (75). Par exemple, les surfaces des polymères sont généralement hétérogènes, rugueuses et peuvent comporter des impuretés, tous ces défauts influençant énormément l'adhésion bactérienne.

Un meilleur contrôle des surfaces, à l'échelle moléculaire, est nécessaire afin de préciser le rôle des diverses caractéristiques surfaciques (composition chimique, topographie, configuration des groupes fonctionnels, etc...).

I – 4 – 4 : Techniques récemment appliquées à l'étude des interfaces biologiques

Différentes techniques spectroscopiques et microscopiques

Les techniques appliquées pour la caractérisation des surfaces en contact avec des entités biologiques depuis une quinzaine d'années sont nombreuses. On peut citer les suivantes (76) :

- la microscopie électronique à balayage (MEB) qui permet d'obtenir une topographie de la surface avec une résolution nanométrique. Son principe repose sur l'interaction d'un faisceau d'électrons très fin (0,5 – 50 nm) et monocinétique avec la matière. Le principal inconvénient de cette méthode est la nécessité de déshydrater et de métalliser les échantillons biologiques afin d'obtenir une couche conductrice pour les électrons.
- les microscopies à sonde locale (SPM : Scanning Probe Microscopy) qui regroupent le microscope à force atomique AFM (mesure de force entre une pointe et une surface) et le microscope à effet tunnel STM (mesure de courant entre une pointe et une surface). Elles permettent comme décrits précédemment d'obtenir une topographie de la surface avec une résolution très élevée (résolution atomique dans les meilleurs cas, le STM étant supérieur à l'AFM de ce point de vue). Elle a été utilisée pour imager de l'ADN, des lipides ou des protéines (77).
- la spectroscopie de photoélectron par rayons X (XPS : X-Ray Photoelectron Spectroscopy) qui permet une analyse chimique quantitative de la surface (avec une résolution spatiale limitée à 10 μm^2).
- la spectroscopie de structure fine près du seuil d'absorption de rayons X (NEXAFS : Near Edge X-Ray Absorption Fine Structure) qui apporte des informations sur l'environnement local (à l'échelle atomique) des atomes de l'élément considéré.
- la spectrométrie de masse des ions secondaires par temps de vol (TOF SIMS : Time-Of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry) qui permet d'obtenir le spectre de masse des molécules présentes par pulvérisation (totalement destructive) de la surface par bombardement par des ions primaires.

Ces techniques permettent d'obtenir des renseignements très précis et variés sur la composition et la structure des surfaces biologiques. Cependant, toutes ces techniques (sauf AFM et STM) sont mises en œuvre sous ultravide (UHV) car les électrons et les ions qui sont détectés ne se propagent que dans le vide. Elles ne permettent donc pas l'étude des processus biologiques en condition *in situ* (milieu aqueux). Afin d'observer directement une surface biotique ou abiotique dans un tel environnement, de nouvelles techniques spectroscopiques de surface se sont développées. Elles reposent sur l'optique non linéaire (78).

La spectroscopie non linéaire

L'optique non linéaire résulte de l'interaction entre la matière et un ou plusieurs champs électriques lorsque ces derniers sont suffisamment intenses (79) (80) (81). Le rayonnement lumineux perturbe les propriétés optiques locales du matériau en agissant sur les charges se trouvant dans ce milieu (i.e. phénomène de polarisation) (82) : la polarisation acquise par le matériau dépend de façon non linéaire de l'amplitude du champ électrique. Par un développement limité de la polarisation induite par les champs électriques, il est possible de modifier des fréquences, de produire des ondes de nouvelles fréquences à partir de la ou des fréquences incidentes ou de faire interagir deux ondes différentes au sein d'un matériau (appelé communément milieu non linéaire).

La spectroscopie non linéaire du second ordre (développement limité de la polarisation induite à l'ordre 2) consiste à faire interagir deux ondes de même fréquences (spectroscopie de Génération de Seconde Harmonique SHG) ou de fréquences différentes (spectroscopie de Génération de Fréquence Somme SFG, spectroscopie de Génération de Différence de Fréquence DFG) sur un milieu non linéaire et à étudier l'onde émise à une nouvelle fréquence. Par ses règles de sélection, l'optique non linéaire du second ordre apparaît uniquement sur des milieux non centro-symétriques et ordonnés. Il s'agit par ailleurs d'une technique d'étude spécifique aux interfaces et non à l'ensemble du volume du milieu sondé (83).

Une étude vibrationnelle de l'échantillon est possible lorsqu'on envoie sur le milieu non linéaire un faisceau infrarouge en résonance avec des vibrations moléculaires de l'interface à sonder. C'est le cas de la spectroscopie SFG vibrationnelle où un faisceau visible et un faisceau infrarouge sont envoyés de façon colinéaire spatialement et temporellement sur l'interface à étudier (84). L'analyse du faisceau émis à la fréquence somme du faisceau visible et infrarouge permet d'obtenir la conformation, l'orientation et la composition chimique des molécules sondées (85).

La principale limitation de cette spectroscopie est la nature de la surface pouvant être étudiée car elle doit être non centro-symétrique et ordonnée : le désordre moléculaire donne lieu à une centro-symétrie locale du système et à l'absence de signal de SFG.

La spectroscopie SFG, un apport pour l'étude des interfaces biologiques

La spectroscopie SFG émerge en tant qu'outil pour étudier les interfaces biologiques et leurs interactions avec l'environnement.

Malgré la complexité de la mise en œuvre du dispositif expérimental SFG et des échantillons biologiques eux-mêmes, il a été montré qu'il était possible d'obtenir des signaux SFG exploitables des surfaces en contact avec du matériel biologique tel que l'ADN **(86)**, les érythrocytes (globules rouges) dans un milieu liquide **(87) (88)**, les protéines (cf. paragraphe suivant), ou de l'interaction protéines – membrane modèle afin d'appréhender différents processus **(89)** :

- les fonctions cellulaires liées à des peptides ou des protéines associées aux membranes.
- la formation de pores au sein d'une membrane, processus présent lorsqu'un virus pénètre une cellule **(90)**.
- etc...

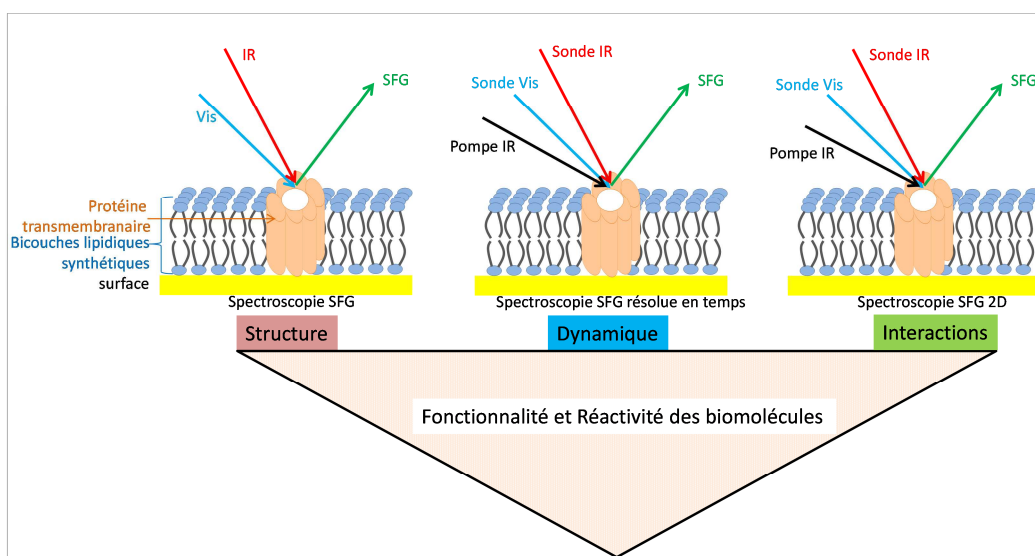


Figure 9 : Les différentes techniques SFG appliquées à l'étude de l'interaction entre une protéine transmembranaire et une membrane artificielle.

Différentes techniques SFG peuvent être appliquées afin d'obtenir la signature électronique, vibrationnelle, dynamique, électrostatique et chirale des biomolécules de l'interface et donc de comprendre dans son ensemble la réactivité des molécules sondées (i.e. leur fonctionnalité), (Figure 9) :

- la SFG « statique » utilisée dans ce travail de recherche qui permet d'obtenir des informations structurales des molécules sondées.

- la SFG pompe-sonde ou résolue en temps qui permet d'obtenir des informations dynamiques sur les processus intervenant à l'interface **(91)** : un faisceau supplémentaire dit « pompe » est envoyé sur l'échantillon afin d'exciter les molécules puis les faisceaux visibles et infrarouges (dits « faisceaux sondes ») viennent sonder l'état de la surface perturbée par la pompe. La pompe peut-être un faisceau infrarouge (on obtient alors des renseignements sur la dynamique de relaxation vibrationnelle) ou visible (dans ce cas, c'est le substrat qui est électroniquement excité, et on observe l'effet de l'interaction des photoélectrons avec les molécules adsorbées).
- la SFG à deux dimensions (2D-SFG) (similaire à la spectroscopie infrarouge à deux dimensions) : une cartographie à deux dimensions de l'émission SFG est obtenue en enregistrant l'intensité SFG en fonction de deux longueurs d'onde d'un des faisceaux incidents (en général, le faisceau infrarouge). Dans le cas d'une cartographie réalisée par deux impulsions infrarouges, les propriétés vibrationnelles des molécules de l'interface sont sondées ce qui permet de mettre en évidence les couplages vibrationnels et d'identifier quels groupes chimiques interagissent ensemble **(92)**.

Un exemple d'étude SFG : l'adsorption protéique

L'adsorption protéique a été étudiée à l'aide de très nombreuses méthodes :

- mesures d'angle de contact afin d'étudier l'effet de l'adsorption des protéines sur le mouillage d'une surface **(93) (94) (95)**
- isothermes d'adsorption pour identifier les premières étapes de l'adsorption protéique **(21)** : des cycles d'adsorption et de désorption des protéines sur une colonne fonctionnalisée sont réalisés en fonction du temps puis la concentration et la structure des protéines désorbées sont mesurées par spectrophotométrie et dichroïsme circulaire respectivement, afin de déterminer la force d'interaction entre les protéines et la colonne.
- diffusion des neutrons pour déterminer l'épaisseur de la couche protéique **(96)**
- résonance plasmon de surface pour mesurer les changements d'indice de réfraction induits par les biomolécules adsorbées sur une surface **(27) (54)**
- microscopie à force atomique afin de quantifier la force d'adhésion des protéines (détermination de l'énergie libre de Gibbs) **(97) (98)**
- modélisation des forces d'interaction entre les protéines et les surfaces **(99)** ou l'eau par dynamique moléculaire **(100)**

Ces différentes techniques ont permis de montrer que l'adsorption des protéines peut être réalisée sur différents supports (mesure d'angle de contact, diffusion de neutron, résonance plasmon) et qu'elle dépend des caractères physico-chimiques de ces supports (microscopie AFM, dynamique moléculaire) et des conditions opératoires telles que le pH ou la concentration protéique en solution (isotherme d'adsorption). Cependant, ces études ne

permettent pas de déterminer totalement la structure et la fonctionnalité des protéines adsorbées sur des surfaces. Ceci est majoritairement dû à la caractérisation non spécifique aux interfaces des techniques et au manque de résolution spatiale ou temporelle (par exemple pour des études cinétiques de l'adsorption protéique car les protéines sont des édifices dynamiques et non figés). Ainsi, les interactions protéines-surface sont encore mal comprises et les changements de conformation des protéines en interaction avec une surface sont rarement appréhendés.

Les études spectroscopiques SFG réalisées ces dernières années sur l'adsorption protéique ont permis de faire fortement progresser la compréhension des interactions entre les protéines et les surfaces. On a ainsi sondé des protéines adsorbées (fibrinogène et albumine de sérum bovin BSA) sur des polymères tels que le polystyrène **(101) (102)** en fonction du pH de la solution, en présence ou non d'ions et à différentes concentrations **(103) (104)**. Les changements spectraux observés en fonction des conditions expérimentales ont permis de mettre en évidence des changements de conformation protéique.

Il a été par ailleurs démontré que la concentration des protéines en solution était un facteur important pour l'organisation des protéines sur la surface **(87) (104) (105) (106)**. Pour des concentrations faibles de protéines, elles ont tendance à s'étaler sur toute la surface et à maximiser les interactions avec le support (en général hydrophobe). Elles adoptent une conformation dépliée dans un film protéique primaire ordonné. Au contraire, lorsque les protéines sont en concentration importante sur la surface, beaucoup d'entre elles s'adsorbent en même temps sur la surface. Celle-ci devient alors très vite encombrée, ne permettant pas aux protéines de s'étaler ni de s'organiser (contrairement à une monocouche de molécules molles comme les alcanethiols pour lesquelles l'encombrement de la surface est au contraire le facteur qui les conduit à s'auto-assembler en adoptant une conformation bien définie). Ainsi, le film protéique surfacique devient hétérogène et désordonné après équilibre entre la phase liquide et la phase adsorbée.

La concentration limite entre un film homogène ou hétérogène dépend donc de la surface et de la protéine (structure, taille).

L'adhésion bactérienne en SFG

Dans ce travail de recherche fondamentale, pour la première fois, nous exploitons la très bonne connaissance spectroscopique que nous avons des SAM d'alcanethiols, qui par leur haut degré d'organisation sur la surface d'un métal permettent d'obtenir un fort signal de SFG, pour déterminer si l'adhésion bactérienne sur la SAM a un effet mesurable sur l'orientation des molécules autoassemblées, et si on peut dégager des informations rationnelles de ce type d'interaction **(107)**.

L'adsorption protéique sur la SAM d'ODT est également étudiée en SFG ainsi que son influence sur l'adhésion bactérienne. Les différents travaux réalisés et présentés ci-dessus sur l'impact de la présence de protéines sur l'adhésion bactérienne ont étudié l'effet d'un

« encrassement » des supports par les protéines sur l'adhésion bactérienne (effet du « protein coating ») mais n'ont jamais, à notre connaissance, étudié l'effet de l'adhésion bactérienne sur une surface en présence de protéines dans la suspension bactérienne, ce qui est réalisé dans cette thèse.

II – La Monocouche AutoAssemblée d’OctaDécaneThiol (SAM d’ODT) : préparation, caractérisation multi-échelle, apport de la spectroscopie de Génération de Fréquence Somme (SFG)

Notre recherche porte sur l’étude de l’adhésion bactérienne sur une surface d’or fonctionnalisée par une SAM constituée de molécules d’OctaDécaneThiol (ODT). Ces supports possèdent un haut degré d’organisation leur conférant un fort signal de SFG.

Dans ce chapitre, nous décrirons la fabrication de ces systèmes autoassemblés et leurs propriétés physico-chimiques. Celles-ci seront étudiées à l’échelle macroscopique et microscopique par microscopie AFM, mesures d’angles de contact et spectroscopie SFG.

La spectroscopie vibrationnelle SFG permettra de sonder les niveaux vibrationnels des modes C-H de la SAM d’ODT pour en retirer des informations concernant l’orientation des groupes méthyles terminaux des molécules. Les spectres SFG devront être déconvolués pour en extraire les intensités relatives des différents modes. Il s’avèrera que cette déconvolution devra être faite rigoureusement pour être reproductible et permettre d’obtenir des informations qualitatives fiables de la conformation des molécules d’ODT. Une comparaison des spectres SFG expérimentaux avec des spectres théoriques obtenus par modélisation de la SAM d’ODT permettront d’obtenir des informations quantitatives sur la conformation moléculaire du support.

II – 1 – Fabrication des surfaces de la SAM d'ODT

Des substrats d'or polycristallin commerciaux (Arrandee) dont les cristallites sont orientées dans la direction (111) sont utilisés. Ils doivent être préalablement nettoyés. Pour ce faire, ils sont chauffés à la flamme (combustion de gaz de butane) jusqu'à l'observation d'une couleur rouge qui correspond à une température suffisamment élevée pour brûler les impuretés éventuelles et pour reconstruire la surface polycristalline. Un flux d'argon permet de limiter l'oxydation de la surface par l'oxygène de l'air lors du refroidissement. Les échantillons sont rapidement déposés dans de l'alcool pur. L'effet de ce traitement de surface a été contrôlé par microscopie AFM en comparant l'état du substrat avant et après chauffage (cf. chapitre II – 3 – 1).

Ensuite ces supports sont immergés dans un bécher contenant une solution d'OctaDécaneThiols (ODT) dans l'éthanol absolu à 1 mmol.L^{-1} , durant deux à trois heures. Les molécules d'ODT sont des organo-sulfures qui vont se chimisorber sur la surface d'or par l'intermédiaire de leur atome de soufre (Figure 10) puis s'auto-organiser lentement (en une dizaine d'heures environ) et spontanément en adoptant une géométrie bien définie : toutes les molécules d'ODT sont étirées en conformation quasi tout trans et parallèles, avec les plans C-C orientés les uns par rapport aux autres (cf. chapitre II – 3) **(108) (109) (110)**.

Les supports ainsi fonctionnalisés sont rincés à l'éthanol absolu puis séchés sous un flux d'azote.

Figure 10 : Schéma de fonctionnalisation du substrat d'or par les molécules d'ODT.

Ce nouveau support est stable grâce à la forte liaison covalente polaire et spécifique soufre-or (aucune autre molécule ne se chimisorbe sur l'or) et aux nombreuses interactions de type van der Waals cumulées tout le long des chaînes. En effet, ces forces peuvent représenter beaucoup d'énergie dès lors qu'une chaîne est suffisamment longue ce qui est le cas ici : environ 1 eV/molécule d'ODT (111). L'inertie chimique de l'or vis-à-vis de la plupart des réactifs et la stabilité de l'auto-assemblage qui est « quasi-solide » permet de conserver les supports quasi-indéfiniment (des mois).

La monocouche d'ODT a une hauteur d'environ 2 nm (Figure 11.A). Les sites d'adsorption de l'ODT sur l'or(111) étant le site ponté et le site ternaire (Figure 11.B)

Page | 36

respectivement, la distance moyenne séparant deux atomes de soufre est d'environ 0,22 nm d'après des mesures de diffraction (112). La distance moyenne séparant deux chaînes est beaucoup plus grande (0,5 nm), ce qui implique que les chaînes, très proches les unes des autres au voisinage de la surface, s'en écartent et ont donc nécessairement une forme en « L » avec des défauts par rapports à la conformation tout trans, comme il apparaît clairement dans la conformation déduite d'une étude par SFG (Figure 11).

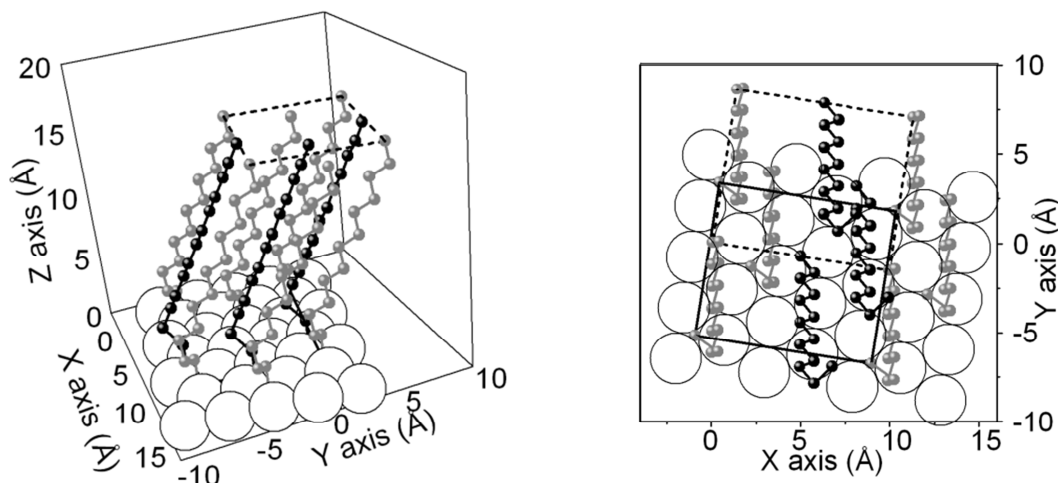


Figure 11: Vue de l'interface ODT/Au(111). Seuls les atomes de carbone et de soufre sont représentés. Il apparaît clairement que les chaînes sont tout trans, à l'exception du pied des chaînes. Les chaînes doivent trouver la distance appropriée aux interactions de van der Waals tandis qu'en bas de la chaîne elles doivent s'adapter aux sites d'adsorption de l'or (111). Les deux contraintes définissent les sites d'adsorption effectivement occupés ainsi que trois angles : inclinaison commune à toutes les molécules (« tilt »), rotation du plan d'inclinaison des chaînes par rapport aux rangées d'atomes d'or, et rotation des plans d'atomes de carbone autour de l'axe moyen des chaînes (« twist »). Il apparaît clairement qu'il existe deux sortes de chaînes (en noir et en gris sur la figure), dont les plans sont perpendiculaires. Cette dernière caractéristique se retrouve dans les solides d'alcane. La structure proposée résulte d'une analyse de spectres SFG incluant également la structure des groupements méthyle et l'existence de deux types de chaînes adsorbées en sites ponté et ternaire (85).

II – 2 – Techniques de caractérisation de la SAM d'ODT

II – 2 – 1 : La microscopie à Force Atomique (AFM)

La microscopie AFM a été utilisée pour caractériser la topographie des supports d'or nus et après adsorption des monocouches autoassemblées (SAM d'ODT) et pour mesurer les courbes de forces de la surface (i.e. homogénéité de la fonctionnalisation de la couche d'or par les molécules d'ODT).

Le microscope à force atomique utilisé (microscope PicoSPM, Molecular imaging, ScienTec, Palaiseau, France) utilise une pointe en silicium nitruré, dont le diamètre peut varier de 10 à 50 nm. Cette pointe est accrochée à un levier constitué d'un ressort de faible constante de raideur $k \approx 25 \text{ N.m}^{-1}$ (Figure 12). Les mesures ont été obtenues à une température de 22°C.

Il existe différents modes de mesures possibles avec le microscope AFM reposant tous sur le principe suivant : le levier est approché à environ 1 nanomètre de la surface à étudier. Lors de l'approche, il est soumis d'abord à des forces attractives, puis répulsives selon la courbe du potentiel de Lennard-Jones décrivant l'interaction de la pointe avec la surface (Figure 12). Les mouvements de la pointe en fonction de la distance à la surface Z sont décrits dans la Figure 13.

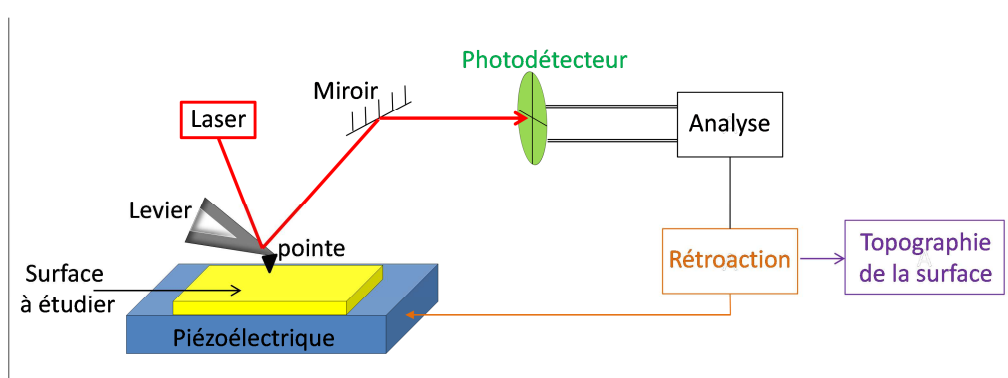


Figure 12 : Schéma de principe d'un microscope AFM.

Pour obtenir la topographie de nos surfaces, nous avons utilisé le microscope AFM en mode oscillant (mode contact intermittent ou « tapping ») à 315 kHz : le levier est mis en oscillation par une cale piézoélectrique à une fréquence fixe proche de celle de sa résonance. La constante de force effective, la réponse et l'amplitude d'oscillation dépendent de l'interaction mécanique entre la pointe et la surface. Les mouvements de la pointe sont enregistrés grâce à un miroir localisé sur le levier. Si on maintient constante l'amplitude des oscillations tout au long du balayage de la surface suivant X, Y au moyen de la tension qui ajuste la distance de la surface Z ($\approx 2,9 \text{ V}$), on obtient la topographie de la surface ($Z = f(X,Y)$). Dans ce mode d'utilisation de l'AFM, la force d'interaction avec la surface est faible : $F_{\text{tapping}} = 10^{-10} \text{ N}$ ce qui limite au maximum le risque de détérioration de la surface. Dans le mode « contact » couramment utilisé, la force d'interaction est beaucoup plus forte et peut conduire plus facilement à l'endommagement de la surface ($F_{\text{contact}} = 10^{-6} \text{ N}$).

Le mode « tapping » permet de mesurer, en plus de la topographie de la surface, le déphasage entre le signal excitateur et la réponse en oscillation du levier. L'image de phase peut différer de l'image topographique dans le cas d'une surface chimiquement hétérogène. Dans notre étude, la topographie et le signal de phase ont été collectés à une vitesse de

balayage de 1 ligne/seconde et de 512 lignes/image. Des mesures de force d'adhésion (i.e. courbes de force) entre la pointe et la surface ont également été réalisées (Figure 13).

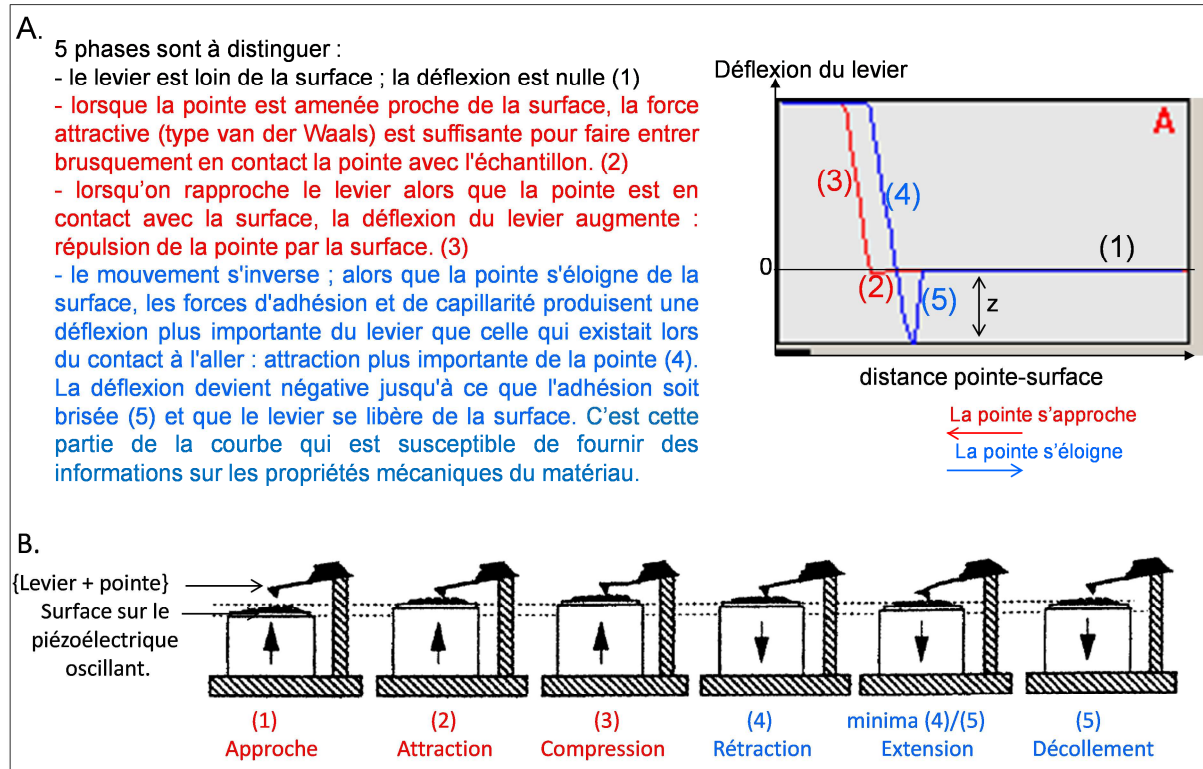


Figure 13 : A. Principe de la mesure de force d'adhésion et B. Positions successives de la surface correspondant à la courbe de déflexion (figure adaptée de la Ref (113)).

II – 2 – 2 : La mesure d'angle de contact

La mesure d'angle de contact est une technique permettant d'évaluer la mouillabilité d'une surface (la capacité d'une goutte à s'étaler sur la surface) (95) (114) (115). Elle consiste à y déposer une goutte d'un liquide de propriétés connues et à mesurer l'angle formé par la tangente du profil de celle-ci avec la surface réceptrice au point triple (Figure 14).

La mesure de l'angle de contact θ permet d'avoir accès au caractère hydrophobe / hydrophile du support lorsque le liquide de référence est de l'eau. Pour ce faire on dépose une goutte d'eau sur la surface :

- $\theta > 90^\circ$: la goutte ne s'étale pas, le support est hydrophobe
- $\theta < 30^\circ$: la goutte d'eau s'étale sur le support, le support est hydrophile
- $30 < \theta < 90^\circ$: le support est moyennement hydrophobe / hydrophile.

Le suivi cinétique de l'étalement ou de l'évaporation de la goutte déposée sur le support permet également d'obtenir des informations sur l'homogénéité chimique ou physique et la rugosité de la surface **(116) (117)**.

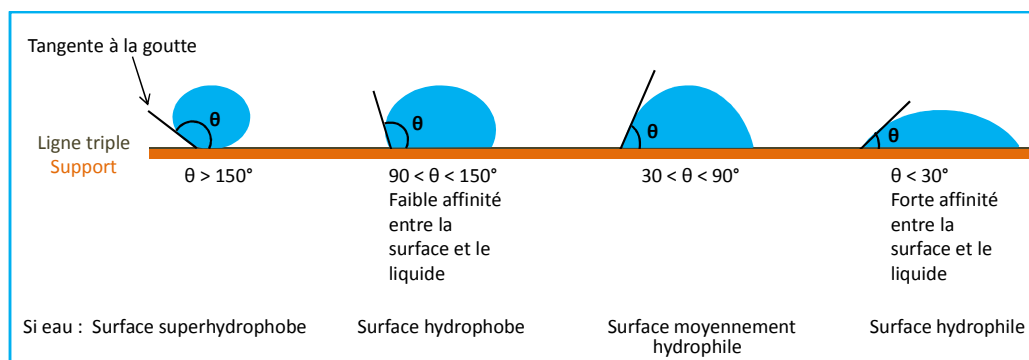


Figure 14 : Angle de contact d'une goutte déposée sur une surface en fonction de leurs affinités.

Pour la mesure d'angles de contact, on utilise un goniomètre dans des conditions de température contrôlée (22°C). Dans le cadre de notre étude, deux appareils distincts ont été mis à disposition. Le premier, le goniomètre « macroscopique », permet de déposer manuellement à l'aide d'une seringue une goutte de liquide de 5 microlitres environ sur la surface à analyser (Figure 15.A). La goutte est éclairée par une source de lumière blanche et son image est obtenue grâce à une caméra CCD associée à un objectif permettant d'obtenir des images avec un rapport d'agrandissement x4 (Goniomètre G10, Krüss, Palaiseau, France).

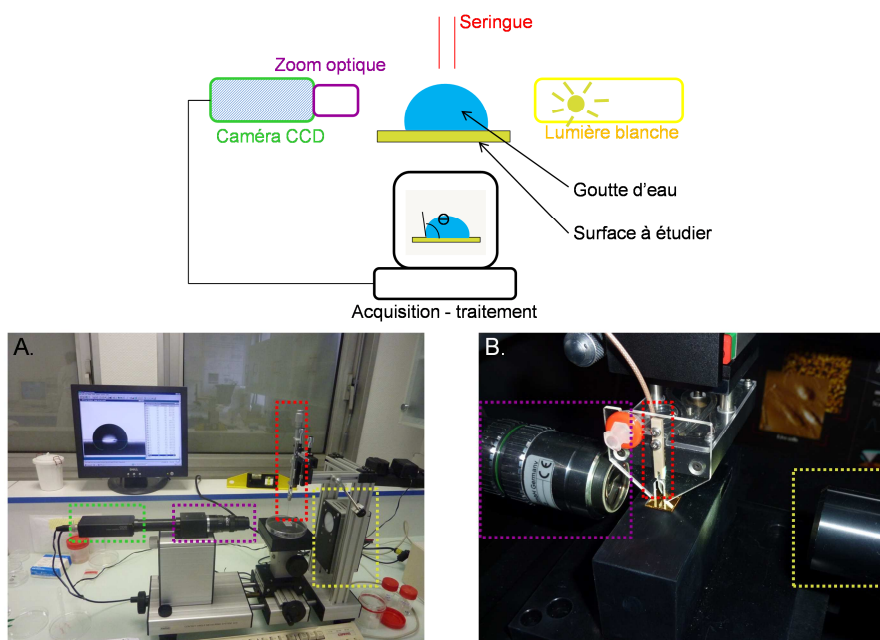


Figure 15 : Schéma de principe d'un goniomètre et photographies des deux goniomètres utilisés au cours de ce travail : A. le goniomètre « macroscopique » et B. le goniomètre « picoLitre ». Les différents cadres colorés représentent les composants du dispositif : la seringue en rouge, la source lumineuse en jaune, le zoom optique en violet et la caméra CCD en vert.

Le second, le goniomètre « picoLitre », permet de réaliser un balayage d'une portion de $5 \times 5 \text{ mm}^2$ de la surface de manière automatique en « projetant » des gouttes d'eau distillée de 300 picolitres ($\varnothing = 100 \text{ }\mu\text{m}$) espacées de $250 \text{ }\mu\text{m}$ les unes des autres grâce à une unité de dosage piézoélectrique (Goniomètre DSA100M, Krüss, Palaiseau, France, Figure 15.B). L'image de la goutte est obtenue dans les mêmes conditions que précédemment mais il est nécessaire d'avoir un rapport d'agrandissement $\times 20$. Une procédure automatique d'acquisition d'images enregistre l'évolution de la goutte à partir d'un temps antérieur au contact avec la surface, pendant 2 secondes (temps suffisamment long pour que la goutte s'évapore). On peut en extraire la cinétique de l'angle de contact de la goutte qui peut révéler selon les cas l'évaporation simple ou des processus simultanés d'évaporation et d'adsorption du liquide dans la surface.

II – 2 – 3 : La spectroscopie de Génération de Fréquence Somme (SFG)

Les SAM d'ODT ont été caractérisés à l'échelle moléculaire par spectroscopie vibrationnelle SFG. La SFG comme nous l'avons mentionné dans le chapitre I, est une méthode d'optique non linéaire dont nous rappellerons ici les principes de base. Il s'ensuit une présentation de la spectroscopie SFG vibrationnelle femtoseconde telle qu'elle a été utilisée dans cette étude et du dispositif expérimental.

L'optique non linéaire

En présence d'une onde électromagnétique, tous les matériaux présentent une réponse linéaire face à l'excitation du milieu par le champ électrique. Cette réponse est due à l'oscillation des charges mises en mouvement par le champ électrique de l'onde, qui fait apparaître un dipôle oscillant de volume qui rayonne à la fréquence de l'onde incidente et se traduit par l'émission de faisceaux réfléchis et transmis. Des effets non linéaires en fonction de l'intensité du champ peuvent être observés si le champ électrique est suffisamment intense et uniquement sur certains matériaux (appelés communément milieux non linéaires). L'intensité nécessaire ne peut pas être atteinte avec les sources de lumière incohérentes. C'est la raison pour laquelle l'optique non linéaire ne s'est développée qu'à partir des années 1960 avec la découverte du laser. Expérimentalement, si une onde de pulsation ω est envoyée sur un milieu et que ce dernier réémet d'autres ondes à des pulsations 2ω , 3ω , 4ω , etc... alors on est en présence d'effets non linéaires **(79) (80) (81)**.

La description des effets non linéaires repose sur les équations de Maxwell. On peut décomposer le champ électrique $\mathbf{E}$ en série de Fourier sur toutes les fréquences éclairant le matériau $\mathbf{E}(\omega_m)$ de vecteur d'onde $\mathbf{k}_m$ à la pulsation ω_m :

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \sum_{m>0} \mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega_m) e^{-i\omega_m t}$$

avec $\mathbf{r}$, le vecteur position d'un point de l'espace (xyz)

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega_m) = \sum_{i=x,y,z} A(\omega_m) e^{i\mathbf{k}_m \mathbf{r}} \mathbf{e}_i$$

$\mathbf{e}_i$: le vecteur unitaire pointant dans la direction d'espace i

$A(\omega_m)$, l'amplitude du champ $\mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega_m)$

$k_m = n \frac{\omega_m}{c}$ où n est l'indice de réfraction du milieu et c, la célérité de la lumière.

Lorsqu'une onde lumineuse traverse un matériau, ce dernier induit une polarisation $\mathbf{P}$ s'écrivant sous la forme :

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}, t) = \sum_m \mathbf{P}(\mathbf{r}, \omega_m) e^{-i\omega_m t} = \sum_m P(\omega_m) e^{-i\omega_m t + i\mathbf{k}_m \mathbf{r}} \mathbf{e}_i$$

avec $P(\omega_m) = P^{(1)}(\omega_m) + P^{(2)}(\omega_m) + P^{(3)}(\omega_m) + \dots$

La polarisation se décompose en une somme de termes : du premier ordre $P^{(1)}$ variant comme le champ exciteur (polarisation linéaire), du second ordre $P^{(2)}$ variant comme le carré du champ exciteur, du troisième ordre $P^{(3)}$ variant comme le cube, etc... (polarisations non linéaires).

Celle-ci peut également s'écrire comme une somme de composantes de Fourier spatiales et temporelles :

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}, t) = \sum_m \sum_p \sum_{i=x,y,z} P_i^{(p)}(\omega_m) e^{-i\omega_m t + i\mathbf{K}_m \mathbf{r}} \mathbf{e}_i$$

avec $P_i^{(p)}(\omega_m)$: la densité de polarisation à l'ordre p dans la direction de l'espace i

$$\mathbf{P}^{(p)}(\omega_m) = \sum_{i=x,y,z} P_i^{(p)}(\omega_m) \mathbf{e}_i$$

$$\mathbf{K}_m = \sum_{j=1}^p \mathbf{k}_{m_j}$$

En optique linéaire, le matériau est caractérisé par sa susceptibilité linéaire $\chi^{(1)}$ qui décrit entièrement la façon dont la polarisation d'un milieu dépend des champs électriques $\mathbf{E}(\omega_m)$ auxquels il est soumis. A l'ordre 1 (optique linéaire), la relation entre $\mathbf{P}^{(1)}$ et $\mathbf{E}$ s'écrit :

$$\mathbf{P}^{(1)}(\mathbf{r}, t) = \epsilon_0 \chi^{(1)} \cdot \mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$$

avec ϵ_0 : la permittivité du vide

$\chi^{(1)}$ est donc un tenseur de rang 2, représenté par une matrice 3x3 symétrique d'élément $\chi_{ij}^{(1)}$ dans un repère cartésien (x, y, z) donné, sans dimension.

En faisant intervenir les composantes cartésiennes, la polarisation linéaire s'écrit :

$$P_i^{(1)}(\omega_m) = \sum_j \epsilon_0 \chi_{ij}^{(1)} E_j(\omega_m) = N \mu$$

avec μ : le moment dipolaire des entités constituant le milieu, par exemple des molécules

N : leur densité volumique

Les indices i, j correspondent aux composantes cartésiennes (x, y, z) des grandeurs vectorielles.

De même, en optique non linéaire à l'ordre 2, la polarisation d'ordre 2 s'écrit :

$$\mathbf{P}^{(2)}(\mathbf{r}, t) = \varepsilon_0 \chi^{(2)} \mathbf{E}^2(\mathbf{r}, t)$$

où $\chi^{(2)}$ est la susceptibilité non linéaire à l'ordre 2, un tenseur de rang 3 possédant $3^3 = 27$ éléments, ayant pour dimension l'inverse d'un champ électrique (m.V^{-1}).

Ainsi, le matériau présentera différentes composantes non linéaires $\chi_{ijk}^{(2)}$ définies par l'équation suivante :

$$\mathbf{P}_i^{(2)}(\omega_m + \omega_n) = \varepsilon_0 \sum_{j,k} \chi_{ijk}^{(2)}(\omega_m + \omega_n, \omega_m, \omega_n) \mathbf{E}_j(\omega_m) \mathbf{E}_k(\omega_n)$$

Finalement, l'intensité $I(\omega)$ émise par le matériau est égale au module carré du champ rayonné par la polarisation : $I(\omega) = |\mathbf{E}(\omega)|^2 \propto |\mathbf{P}(\omega)|^2 = |\mathbf{P}_L(\omega) + \mathbf{P}_{NL}(\omega)|^2$ où $\mathbf{P}_L(\omega)$ et $\mathbf{P}_{NL}(\omega)$ sont les polarisation linéaires et non linéaires respectivement.

En pratique, on utilise une ou deux fréquences. Dans ce dernier cas, le champ électrique $\mathbf{E}$ est composé de deux ondes monochromatiques de pulsation ω_1 et ω_2 ($\mathbf{E} = \mathbf{E}_1 + \mathbf{E}_2$). On peut alors obtenir différentes spectroscopies (Figure 16) :

- Si $\omega_1 \neq \omega_2$ et si $\omega_1 + \omega_2 = \omega_3$: on réalise de la Génération de Fréquence Somme (SFG) (118).

$$\mathbf{P}^{(2)}(\omega_1 + \omega_2 = \omega_3) = \varepsilon_0 \chi^{(2)}(\omega_1 + \omega_2) \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2$$

$$\text{et } I_{SFG} \propto |\mathbf{P}^{(2)}(\omega_3)|^2 \propto |\chi^{(2)}(\omega_3)|^2 I_1 I_2$$

Il est à noter que l'émission SFG correspond à une transition Raman : le niveau énergétique supérieur dans la Figure 16 peut être réel ou virtuel.

- Si $\omega_1 = \omega_2$ et si $\omega_1 + \omega_2 = 2\omega$: on obtient la Génération de Seconde Harmonique (SHG).

$$\mathbf{P}^{(2)}(2\omega) = \varepsilon_0 \chi^{(2)}(2\omega) \mathbf{E}_1^2$$

$$\text{et } I_{SHG} \propto |\mathbf{P}^{(2)}(2\omega)|^2 \propto |\chi^{(2)}(2\omega)|^2 I_1^2$$

- Si $\omega_1 \neq \omega_2$ et si $\omega_1 - \omega_2 = \omega_3$: on réalise de la Génération de Différence de Fréquences (DFG).

$$\mathbf{P}^{(2)}(\omega_1 - \omega_2) = \varepsilon_0 \chi^{(2)}(\omega_1 - \omega_2) \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2$$

$$\text{et } I_{DFG} \propto |\mathbf{P}^{(2)}(\omega_1 - \omega_2)|^2 \propto |\chi^{(2)}(\omega_1 - \omega_2)|^2 I_1 I_2$$

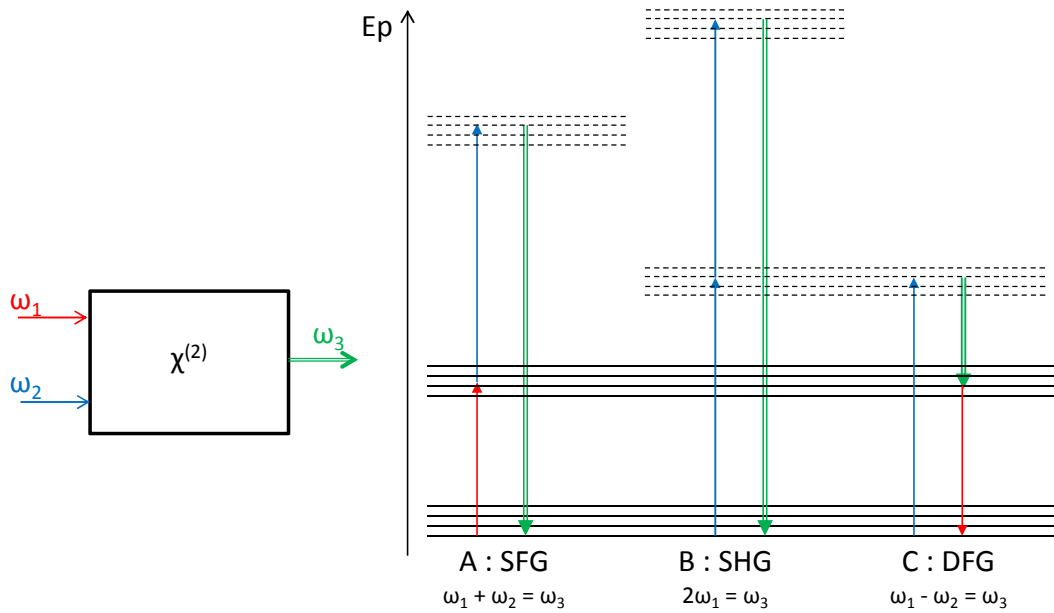


Figure 16 : Les différentes techniques spectroscopiques non linéaires d'ordre 2 : description en termes de niveaux d'énergie de : A. La spectroscopie SFG, B. la spectroscopie SHG, et C. la spectroscopie DFG. Les niveaux d'énergie en traits pointillés peuvent être réels ou virtuels.

La raison pour laquelle les processus de second ordre sont exploités comme sonde des interfaces est que dans les milieux centro-symétriques (les plus répandus), la réponse SFG est rigoureusement nulle. En effet, dans le cas d'un solide possédant un centre d'inversion (milieu centro-symétrique), si l'application d'un champ $\mathbf{E}$ produit une polarisation $\mathbf{P}$, alors l'application d'un champ $-\mathbf{E}$ produit une polarisation $-\mathbf{P}$:

$$\begin{aligned} -\mathbf{P}_i^{(2)}(\omega_1 + \omega_2) &= \varepsilon_0 \sum_{j,k} \chi_{ijk}^{(2)}(\omega_1 + \omega_2) (-E_j(\omega_1)) (-E_k(\omega_2)) \\ -\mathbf{P}_i^{(2)}(\omega_1 + \omega_2) &= \varepsilon_0 \sum_{j,k} \chi_{ijk}^{(2)}(\omega_1 + \omega_2) E_j(\omega_1) E_k(\omega_2) \\ -\mathbf{P}_i^{(2)}(\omega_1 + \omega_2) &= \mathbf{P}_i^{(2)}(\omega_1 + \omega_2) \end{aligned}$$

Ceci est valable pour tout i, j, k donc $\mathbf{P} = -\mathbf{P}$ or $\mathbf{P} \neq \mathbf{0}$ ce qui implique nécessairement que $\chi_{ijk}^{(2)} = 0$: les milieux possédant un centre d'inversion ne génèrent donc pas d'effets non linéaire d'ordre 2.

Dans ces milieux, la spectroscopie SFG permet donc de sonder spécifiquement l'interface (où la symétrie est brisée) sans aucun signal parasite provenant du volume du solide. C'est un avantage considérable par rapport à la spectroscopie linéaire d'absorption IR par transformée de Fourier avec laquelle les signaux d'absorption par les molécules de la surface sont de 10^{-3} à 10^{-4} fois moins intenses que la réponse du volume, ce qui la rend très difficile à mettre en œuvre.

La spectroscopie SFG vibrationnelle femtoseconde

Méthode expérimentale

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé la spectroscopie de Génération de Fréquence Somme (SFG) afin d'étudier la SAM d'ODT.

Les molécules d'ODT contiennent une fonction thiol S-H (l'atome d'hydrogène se dissociant lors de l'adsorption sur l'or), 17 groupes méthylène CH_2 et un groupe méthyle CH_3 en bout de chaîne. En utilisant un faisceau infrarouge accordé sur les modes de vibration d'élongation C-H des groupes méthylènes et méthyle (cf. chapitre II – 1 – 2), il est alors possible de sonder la SAM d'ODT.

Expérimentalement deux faisceaux dont on contrôle les recouvrements temporel et spatial sont envoyés colinéairement sur l'échantillon. Le premier faisceau est centré à la fréquence infrarouge $\omega_1 = \omega_{\text{IR}} = 2900 \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda_{\text{IR}} \approx 3,4 \text{ }\mu\text{m}$). En tenant compte de la largeur spectrale du laser, ce faisceau recouvre les transitions vibrationnelles $v'' = 0 \rightarrow v' = 1$ d'élongation C-H des groupes CH_2 et CH_3 de l'ODT. Le second faisceau est centré à la fréquence visible $\omega_2 = \omega_{\text{vis}} = 12\,407 \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda_{\text{vis}} = 806 \text{ nm}$, la longueur d'onde visible a été choisie en tenant compte des propriétés des filtres dichroïques utilisés pour séparer la SFG du faisceau visible avant le détecteur, cf. ci-après). Par effet non linéaire d'ordre 2, le faisceau émis sera à la fréquence $\omega_{\text{IR}} + \omega_{\text{vis}} = \omega_{\text{SFG}}$ dans le domaine des fréquences du visible (vers 650 nm). La SFG permet de sonder des niveaux vibrationnels tout en réalisant l'acquisition des spectres dans le domaine du visible. On gagne alors en sensibilité puisque l'on peut utiliser des détecteurs dans le visible qui sont plus sensibles que ceux infrarouges et surtout du fait que le rayonnement thermique est beaucoup plus faible dans le domaine visible que dans l'infrarouge.

Le laser utilisé pour réaliser la spectroscopie SFG est un laser impulsionnel femtoseconde dont la durée est de l'ordre de 100 fs (cf. ci-après). L'avantage majeur d'effectuer la spectroscopie SFG avec des impulsions laser très courtes temporellement est d'obtenir des spectres très larges dans le domaine des fréquences (environ 150 cm^{-1} à mi-hauteur). Ainsi, toutes les vibrations d'élongation C-H du support sont sondées sans avoir besoin de réaliser un balayage de la fréquence du laser. On évite toute dérive lente qui contribuerait au bruit spectral. Un autre avantage de la spectroscopie SFG impulsionnelle femtoseconde est qu'avec une puissance moyenne comparable à celle d'un laser continu de faible puissance (1mW) on obtient une puissance crête infiniment supérieure (10MW pour des impulsions de 100 fs, d'énergie 1 μJ et de cadence 1kHz) ce qui permet d'obtenir une plus grande efficacité des processus non linéaires et donc plus de signal SFG en produisant un échauffement négligeable de la surface sondée.

De plus, en SFG, on mesure l'émission Raman : la résolution correspond donc à la largeur spectrale des niveaux supérieurs de la Figure 16, qui est égale à celle de l'impulsion

du laser visible. Dans le cadre de nos expériences, la largeur spectrale du laser visible est de quelques cm^{-1} (cf. paragraphe ci-après).

La spectroscopie SFG combine donc deux avantages pour étudier spectroscopiquement des interfaces (solides centro-symétriques) / (molécules adsorbées à leur surface) : sélectivité de l'interface et sensibilité grâce à la détection dans le visible. Elle est également non destructive ce qui représente un avantage majeur lorsqu'on souhaite étudier des échantillons biologiques. Comme il sera démontré dans le chapitre II – 2 – 4, la spectroscopie SFG permet d'obtenir différents types d'informations sur le système et donc une description relativement complète du système étudié :

- une information chimique : les groupes fonctionnels sondés sont-ils présents ?
- une information structurale : quelle est la conformation / orientation des différentes espèces chimiques ?
- une information environnementale (à travers les fréquences et largeurs des transitions vibrationnelles sondées) : quel est l'environnement chimique des groupes sondés par SFG ?

Les différents milieux non linéaires utilisés dans notre étude

Suivant le type de réponse observée en SFG, les différents milieux sondés peuvent être classés en trois catégories (Figure 17) dont deux ont été étudiés dans le cadre de ce travail :

- lorsque le milieu étudié ne présente pas de niveaux vibrationnels mais possède un continuum d'états électroniques en résonance avec le laser infrarouge (Figure 17.A), toutes les composantes spectrales de l'infrarouge vont induire la même réponse SFG dite non résonnante qui sera modulée par le profil spectral du laser. Lorsque seule une réponse non résonnante est obtenue, le spectre SFG permet de mesurer directement le spectre du laser infrarouge, qui en pratique est une Gaussienne dès lors que le laser a été bien réglé.

Ceci est le cas pour le cristal non centro-symétrique d'arséniure de gallium GaAs (111) qui a l'avantage d'avoir une forte réponse non résonnante SFG sur toute la gamme de fréquences utilisée dans ce travail : entre 1600 et 3500 cm^{-1} . En effet, ce cristal possède un gap d'énergie de 1,43 eV entre sa bande de conduction et sa bande de valence : si $\omega_{\text{SFG}} > 11\,521\text{ cm}^{-1}$, il peut y avoir résonance et donc émission efficace de SFG (ce qui est le cas pour la fréquence visible utilisée dans notre dispositif expérimental). On l'utilise en pratique pour réaliser des spectres de référence (cf. chapitre II – 3 – 2).

- lorsque la pulsation infrarouge est en résonance avec des transitions vibrationnelles (par exemple, celles des molécules d'une interface) et qu'il y a une réponse non résonnante du système, un terme d'interférence apparaît entre le signal résonnant (d'origine vibrationnelle) et le signal non résonnant (d'origine électronique : il n'est pas rare que le fond « non résonnant » soit lui-même résonnant avec des états modifiés par la chimisorption des molécules). L'allure du spectre SFG présentera la forme d'une Gaussienne modulée par des

creux ou des pics correspondant à la réponse résonnante du matériau suivant la différence de phase entre les contributions résonnantes et non résonnante (par exemple, l'interférence se traduit par des creux sur la Figure 17.B). L'intensité SFG peut alors être envisagée comme une combinaison linéaire d'une réponse résonnante et d'une réponse non résonnante (119). On obtient donc :

$$I_{SFG} \propto \left| \chi_R^{(2)} + \chi_{NR}^{(2)} \right|^2 = \left| \chi_R^{(2)} \right|^2 + \left| \chi_{NR}^{(2)} \right|^2 + 2 \cdot \left| \chi_R^{(2)} \right| \left| \chi_{NR}^{(2)} \right| \cos(\varphi_R - \varphi_{NR})$$

avec $\chi_R^{(2)}$, la susceptibilité résonnante d'ordre 2

$\chi_{NR}^{(2)}$, la susceptibilité non résonnante d'ordre 2

$\varphi_R - \varphi_{NR}$, la différence de phase entre la susceptibilité résonnante et non résonnante

C'est précisément le cas du support de la SAM d'ODT adsorbée sur une couche d'or. Il est intéressant de remarquer que dans le cas où $\chi_{NR}^{(2)} \gg \chi_R^{(2)}$, la réponse résonnante est amplifiée par la réponse non résonnante mais en contrepartie, l'interférence déforme le spectre via le terme de différence de phase.

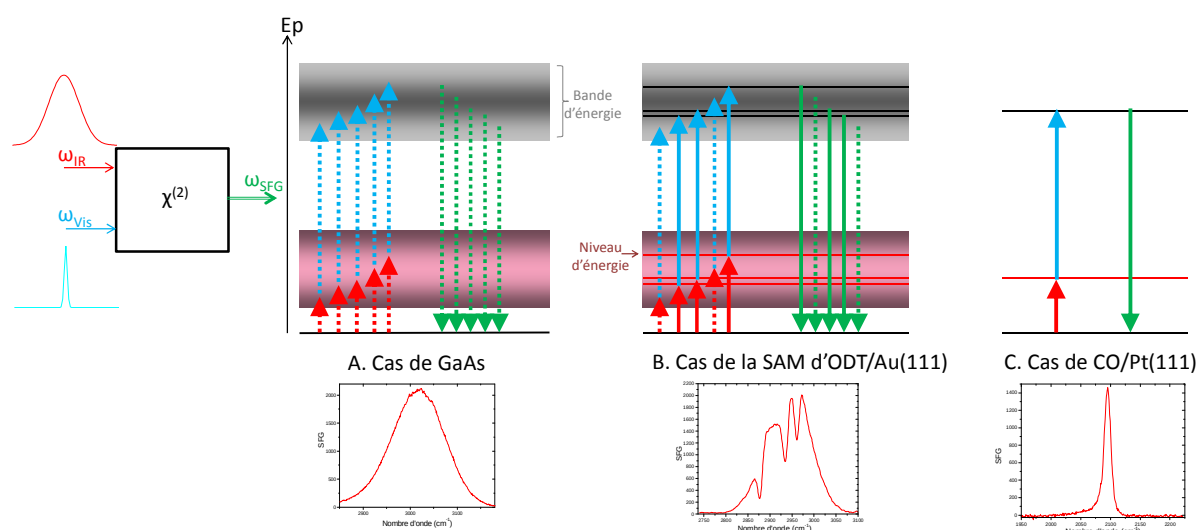


Figure 17 : Schémas de principe de la SFG : A. cas non résonnant, B. cas où une réponse résonnante apparaît en plus du signal non-résonnant, C. cas où seul un signal résonnant existe. Les flèches pleines représentent le cas où il y a une transition résonnante avec le support et les flèches en pointillé lorsque la transition est non résonnante.

- le dernier cas rencontré en SFG est celui où le système n'a pas de réponse non résonnante ((Figure 17.C) et où seules les fréquences de l'infrarouge en résonance avec les transitions vibrationnelles donneront lieu à un signal SFG.

C'est le cas par exemple du monoxyde de carbone adsorbé sur du platine (seule la vibration interne du CO contribue à la réponse résonnante).

Le dispositif expérimental SFG

Afin de réaliser la spectroscopie SFG femtoseconde vibrationnelle, deux faisceaux lumineux impulsionnels sont nécessaires. Au laboratoire, nous disposons d'une chaîne laser femtoseconde à 800 nm et d'un amplificateur paramétrique optique (OPA) permettant d'obtenir des impulsions dans le domaine infrarouge. Ces deux dispositifs sont décrits ci-dessous. Il est à noter que le dispositif expérimental est disposé dans une salle grise (en surpression comportant un sas d'entrée, où le port de sur-chaussures est obligatoire) contrôlée en température ($T \approx 23^\circ\text{C}$, avec une stabilité en température meilleure que 1°C).

La chaîne laser

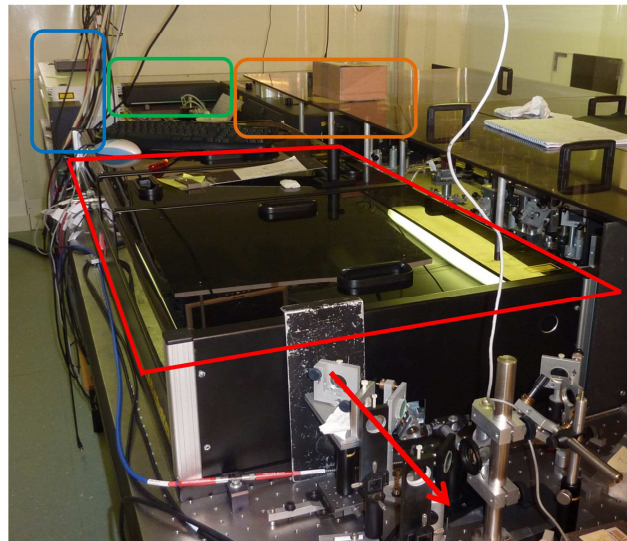
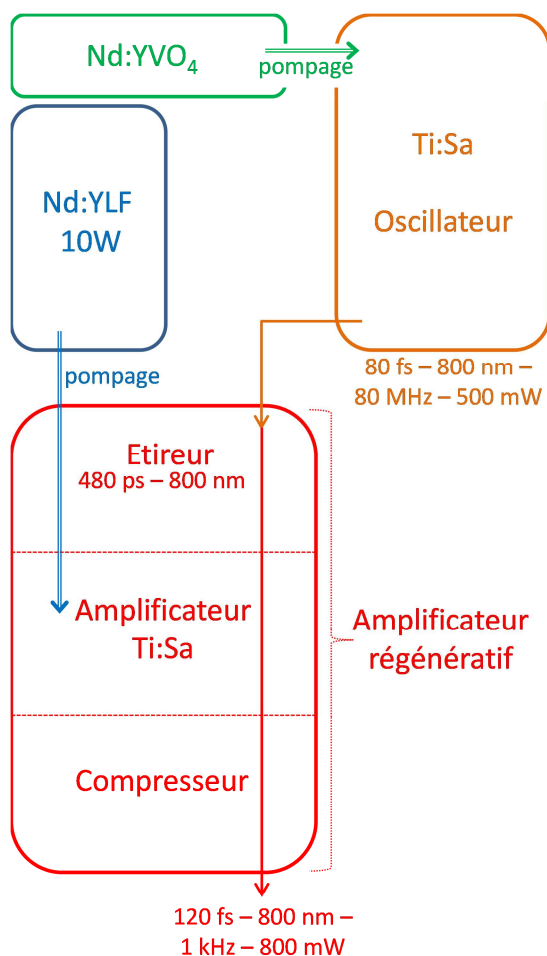


Figure 18 : Vue schématique (à gauche) et photo de la chaîne laser (à droite).

Le dispositif laser, représenté sur la Figure 18, est un ensemble comprenant différents « étages » :

- un laser continu Nd : YVO₄ (orthovanadate d'yttrium, Coherent Verdi) pompe un oscillateur (Coherent Mira) fonctionnant en blocage de modes et possédant un cristal

Titane : Saphir (Ti : Sa) comme milieu à gain. L'oscillateur permet d'obtenir des impulsions de 80 femtosecondes autour de 800 nm, à une cadence de 80 MHz, de puissance moyenne de 600 mW. L'énergie obtenue par impulsion est d'environ 6 nJ ce qui est trop faible pour pomper l'amplificateur paramétrique optique (OPA) qui produit les impulsions infrarouge (cf. ci-dessous).

Il faut donc amplifier les impulsions de l'oscillateur Ti : Sa pour pouvoir pomper l'OPA. Le système utilisé est un amplificateur régénératif (RGA, Thalès Laser ALPHA 1000) constitué d'un étireur, d'un amplificateur et d'un compresseur (Figure 19).

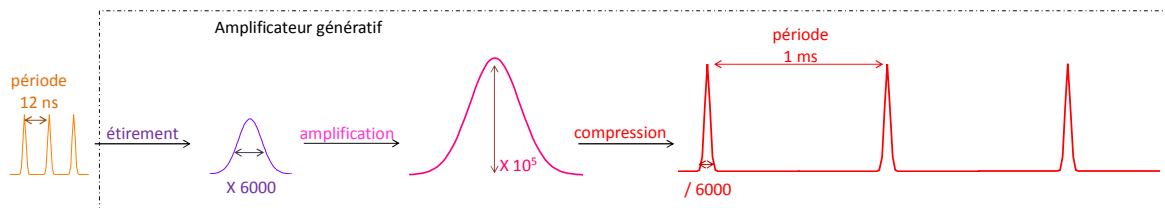


Figure 19 : Vue schématique de l'effet de l'amplificateur régénératif sur les impulsions du laser Mira.

- les impulsions obtenues par le laser Mira sont tout d'abord étirées par multi-passages sur un réseau de diffraction au sein de l'étireur avec une géométrie appropriée. On obtient alors des impulsions environ 6000 fois plus longues (480 ps) que les impulsions initiales et de puissance crête suffisamment faible pour entrer dans l'amplificateur sans risque d'endommager le cristal (sans l'étirement, les impulsions après amplification dépasseraient le seuil de dommage qui est de l'ordre de 5 GW.cm^{-2}).
- les impulsions sont ensuite amplifiées à une cadence réduite de 80 MHz à 1 kHz dans une cavité amplificatrice comprenant un autre cristal Ti : Sa pompé par un laser Nd : YLF (Thalès Laser) pulsé, d'énergie 10 mJ par impulsion. Il est malheureusement impossible de créer des impulsions à cette intensité à la cadence de 80 MHz.
- enfin, ces impulsions sont raccourcies dans le domaine temporel grâce au compresseur (i.e. 4 passages sur un réseau de diffraction identique à celui de l'étireur, avec une géométrie différente). Des impulsions de 120 fs à 800 nm sont obtenues en sortie de l'amplificateur régénératif. L'énergie par impulsion est de 800 μJ . Ce dispositif permet donc d'obtenir des impulsions de durée comparable à celles de l'oscillateur Mira mais avec une énergie par impulsion environ 100 000 fois plus importante. En contrepartie, le taux de répétition des impulsions s'en trouve diminué à la valeur de 1 kHz. L'énergie obtenue est maintenant suffisante pour générer des impulsions IR à l'aide de l'OPA.

Le principe de fonctionnement de l'OPA

L'amplificateur paramétrique optique (OPA) est un dispositif qui permet de convertir des fréquences. Il repose sur des phénomènes d'optique non linéaire se produisant au sein des cristaux non linéaires **(80) (120)**. Au sein de notre OPA, deux cristaux non linéaires sont utilisés :

- un cristal de Bêta Borate de Baryum (β -BaB₂O₄ ou BBO) qui permet de générer deux longueurs d'onde ω_2 et ω_3 (appelées « signal » et « idler » respectivement – par convention $\omega_2 > \omega_3$) à partir d'un faisceau incident à la fréquence ω_1 (appelé « pompe »), les trois fréquences étant reliées par la relation $\omega_1 = \omega_2 + \omega_3$. Ce processus de conversion est appelé effet paramétrique (expliqué ci-dessous). Il ne repose pas sur le pompage optique : le cristal n'absorbe aucune des trois ondes. Il n'intervient que par ses propriétés anisotropes en permettant un accord de phase favorable entre les trois ondes dans une certaine orientation. Il s'agit de conversion d'énergie d'un faisceau vers les deux autres par création d'une paire de photons « signal » et « idler » à partir d'un photon « pompe ». D'autres effets non linéaires, parasites pour l'OPA, peuvent aussi se produire dans le BBO (génération d'harmoniques). Le BBO est transparent entre 0,19 et 2,6 μm , ce qui détermine son domaine spectral utile **(121)**.
- un cristal de thiogallate d'argent (AgGaS₂) qui permet de générer des fréquences IR ($\omega_1 - \omega_2$) plus lointaines que ω_1 et ω_2 par différence de fréquence. Ce cristal non linéaire est transparent dans un large domaine (entre 0,47 et 13 μm) **(120) (122)**.

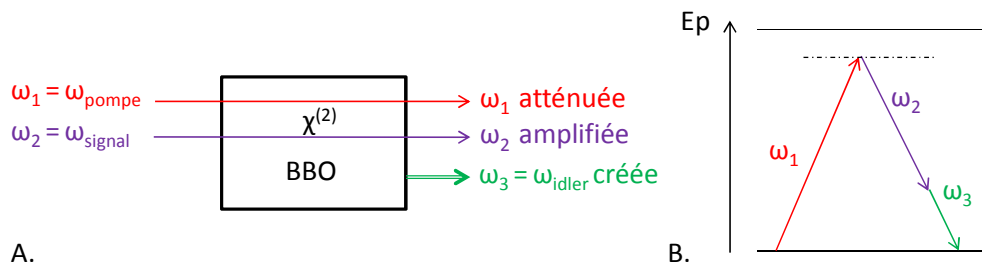


Figure 20 : A. Principe de l'effet paramétrique dans un cristal non linéaire et B. Interprétation quantique du processus de mélange paramétrique, conservation de l'énergie.

Suivant les intensités relatives incidentes des trois ondes ω_1 , ω_2 , ω_3 (où on suppose $\omega_1 > \omega_2$ et $\omega_1 = \omega_2 + \omega_3$), on peut obtenir différents effets, car l'efficacité du processus paramétrique dépend du nombre de photons dans chaque onde et peut être inversé (à la manière d'un équilibre chimique qui peut être déplacé par excès de l'un des réactifs). En général, pour que le processus soit efficace lors d'une traversée du cristal, il faut que l'onde qui doit être convertie soit la plus intense, et qu'une autre onde ait une intensité non nulle : par exemple ω_1 intense, ω_3 peu intense, ω_2 nulle permet d'obtenir l'effet paramétrique tel que désiré dans notre cas (création de faisceaux IR de fréquences plus faibles) : $\omega_1 \rightarrow \omega_2 + \omega_3$. L'effet paramétrique « inverse » est obtenu lorsque deux faisceaux ω_2 et ω_3 sont incidents : la pulsation ω_1 est alors créée (Figure 20).

Pour que le processus ait lieu, la relation de conservation de la quantité de mouvement des photons $\mathbf{p}$ ($\mathbf{p} = \hbar\mathbf{k}$) doit être vérifiée :

$$\Delta\mathbf{k} = \mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_2 - \mathbf{k}_3 = 0 \quad (\text{accord de phase})$$

Bien entendu, le processus d'amplification n'est efficace que lorsque :

- l'accord de phase est réalisé (ce qui impose que les impulsions aient les bonnes polarisations, que le cristal soit bien orienté, et que l'angle d'incidence soit réglé pour le couple de longueurs d'onde désiré). Il existe deux combinaisons distinctes de polarisations permettant l'effet paramétrique, dites de types I et II. Notre OPA fonctionne en type II : les faisceaux « pompe » et « idler » ont la même polarisation.
- les faisceaux incidents sont superposés spatialement
- les impulsions incidentes sont synchronisées temporellement.

L'accordabilité en fréquence des faisceaux de pulsation ω_2 et ω_3 est obtenue en tournant le cristal non linéaire générant l'effet paramétrique. Notre faisceau « pompe » ayant pour longueur d'onde ≈ 800 nm, l'effet paramétrique génère un faisceau « signal » accordable entre 1,1 et 1,6 μm , et un faisceau « idler » accordable entre 1,6 et 2,9 μm , les limites de longueur d'onde étant imposées par l'absorption du BBO.

Les chemins optiques au sein de l'OPA

Le faisceau obtenu à la sortie de l'amplificateur régénératif à 800 nm, polarisé verticalement suite à un passage dans un ascenseur entre dans l'OPA et est divisé en deux faisceaux grâce à une séparatrice (Figure 21) :

- le premier faisceau (très peu intense) passe à travers une lame $\lambda/2$ et un polariseur qui permettent de régler son intensité. Il est ensuite focalisé sur un cristal de saphir qui va générer un continuum de lumière blanche par effets non linéaires d'ordres supérieurs. Ce continuum est suffisamment large spectralement pour contenir la fréquence « signal » que l'on souhaite par la suite amplifier.
- le second faisceau est appelé faisceau « pompe ». Il est de nouveau divisé en deux parties pour donner lieu à ce qu'on appelle le faisceau de première et de deuxième pompe, d'énergies relatives environ 20 et 80 % respectivement.

Dans un premier temps, les faisceaux « première pompe » et « continuum » sont envoyés colinéairement dans le cristal BBO permettant ainsi de réaliser un premier effet paramétrique relativement peu efficace : l'intensité de l'onde à fréquence « signal » contenue dans le faisceau « continuum » est amplifiée et un faisceau complémentaire (« idler ») est produit. Une ligne à retard permet de superposer temporellement les deux ondes incidentes dans le cristal de BBO.

Dans un deuxième temps, le faisceau « deuxième pompe » est envoyé dans le cristal de BBO, superposé spatialement et temporellement (grâce à la seconde ligne à retard) au

faisceau « idler » créés par la « première pompe », ce qui permet d'amplifier les ondes « signal » et « idler ».

Le faisceau « deuxième pompe » à 800 nm est ensuite séparé des faisceaux « signal » et « idler » grâce à une séparatrice. Il s'agit du faisceau appelé par la suite faisceau visible à la pulsation ω_{visible} qui sera utilisé pour les expériences SFG après mise en forme spectro-temporelle.

Finalement, les faisceaux « signal » et « idler » sont envoyés sur un second cristal non linéaire d'AgGaS₂ où une différence de fréquence se produit permettant l'obtention d'un faisceau infrarouge polarisé horizontalement à la fréquence $\omega_{\text{IR}} = \omega_{\text{signal}} - \omega_{\text{idler}}$. L'énergie de ce faisceau IR en sortie de l'OPA est de l'ordre de 3 à 5 μJ . Le rendement de conversion n'étant pas total, des résidus de faisceaux « signal » et « idler » existent à la sortie du cristal : ils sont éliminés et séparés du faisceau infrarouge grâce à un filtre.

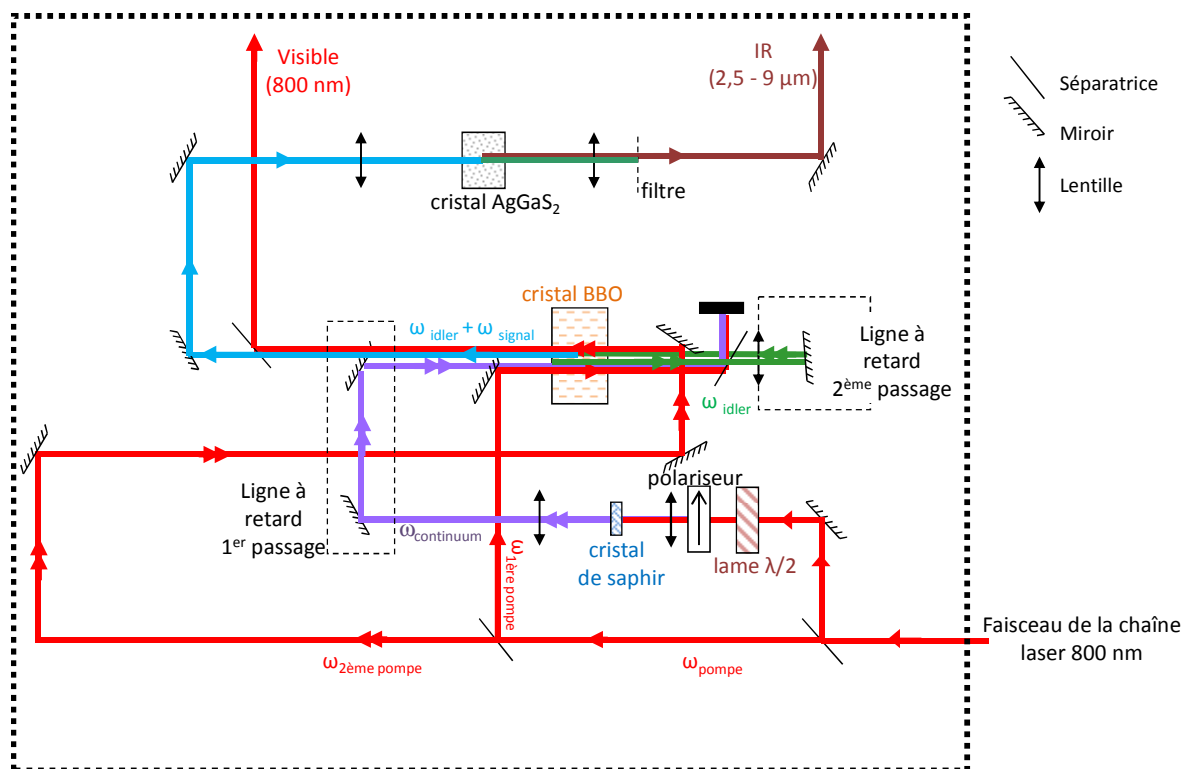


Figure 21 : Vue schématique de l'OPA et des différents trajets optique des faisceaux lumineux. Le faisceau en rouge représente le faisceau « pompe » à 800 nm (ω_{pompe} , venant de la chaîne laser femtoseconde), en violet : le faisceau « continuum », en vert : le faisceau « idler » créé par le premier passage dans le cristal BBO, en bleu : le faisceau « idler + signal » amplifié après le second passage par le cristal BBO, et en bordeaux : le faisceau infrarouge obtenu après passage par le cristal AgGaS₂ ($\omega_{\text{crééAgGaS}_2} = \omega_{\text{signal}} - \omega_{\text{idler}} = \omega_{\text{IR}}$).

En fonction des angles des cristaux non linéaires par rapport aux faisceaux incidents, différentes fréquences infrarouges peuvent être obtenues (Tableau 1). Expérimentalement, notre dispositif OPA couvre un large domaine spectral et permet d'obtenir des fréquences infrarouges comprises entre 2,5 et 9 μm soit entre 1100 et 4000 cm^{-1} .

Angle du cristal de BBO (°)	Angle de l'AgGaS ₂ (°)	Gamme spectrale du faisceau infrarouge (cm ⁻¹)
38	163	2750 - 3100
39	130	2000 – 2300
39	126	1800 – 2000
37,5	118	1600 - 1800

Tableau 1: Combinaison du positionnement des cristaux de BBO et d'AgGaS₂ et gamme spectrale infrarouge obtenue. Données expérimentales.

En résumé, le dispositif OPA peut se traduire par les conversions suivantes :

- au sein du cristal BBO, on a : $\omega_{\text{pompe}} \rightarrow \omega_{\text{signal}} + \omega_{\text{idler}}$ (effet paramétrique)

On a amplification de l'onde à la pulsation ω_{signal} contenue dans le continuum et création de l'onde à la pulsation ω_{idler} .

- au sein du cristal AgGaS₂, on a : $\omega_{\text{signal}} - \omega_{\text{idler}} \rightarrow \omega_{\text{IR}}$ (DFG).

Le montage optique de spectroscopie SFG

Les faisceaux dits « visible » (≈ 800 nm) et « infrarouge » (2,5-9 μm) sont tous les deux polarisés horizontalement et de durée ≈ 120 fs pour le « visible » (mesuré par autocorrélation et ≈ 140 fs pour l'IR (mesuré par cross-corrélation par un processus de somme de trois fréquences « vis+IR+IR », **(123)**).

Afin d'obtenir la résolution spectrale de SFG nécessaire à l'étude des spectres de la SAM d'ODT sur une couche d'or (de l'ordre de quelques cm^{-1}), le faisceau visible est raccourci spectralement par passage dans un façonneur d'impulsions (« pulse-shaper », Figure 22). Il s'agit d'un dispositif dit « 4f » constitué de deux réseaux et de deux lentilles de même focale f . Les composants sont disposés à des distances égales à la distance focale de la lentille. Globalement le dispositif n'introduit aucune dérive de fréquence (chirp) s'il est bien réglé. Au centre du dispositif, le spectre de l'impulsion incidente est focalisé (plan de Fourier) : on peut donc y insérer un dispositif modifiant le spectre de l'impulsion. Le plus simple est une fente de largeur réglable (appelé également masque), qui permet de sélectionner la longueur d'onde souhaitée (ici autour de 800 nm) et sa largeur spectrale. Bien entendu cette opération réalisée dans le domaine spectral a une répercussion dans le domaine temporel : la durée du paquet d'ondes incident dépend du verrouillage de phase sur toute la largeur spectrale incidente. Les fréquences manquantes après réduction de la largeur modifient les interférences entre les composantes spectrales transmises et ne permettent pas de conserver la durée de l'impulsion qui va s'allonger jusqu'à quelques picosecondes pour la gamme de largeurs spectrales dont nous avons besoin.

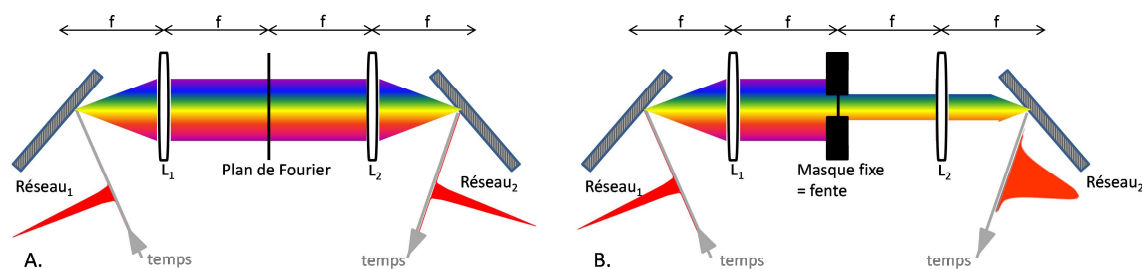


Figure 22 : Principe du « pulse-shaper » – montage « 4f » A. Ligne à dispersion nulle : l'onde n'est pas modifiée (à l'exception d'une perte d'intensité au passage sur les réseaux). B. Ligne à dispersion nulle avec un masque dans le plan de Fourier : l'onde est façonnée, elle est rétrécie spectralement et donc allongée temporellement.

Dans le cadre de nos expériences, le pulse-shaper ainsi que le trajet optique sont repliés sur eux-mêmes par l'ajout d'un miroir plan derrière le masque ce qui permet de diviser par deux le nombre d'éléments optiques et un gain de place sur la table optique (Figure 23). A travers ce dispositif, l'impulsion visible femtoseconde devient donc picoseconde. Le faisceau infrarouge n'est pas modifié (femtoseconde) et reste donc plus large spectralement (environ 150 cm^{-1} à mi-hauteur) que le faisceau visible.

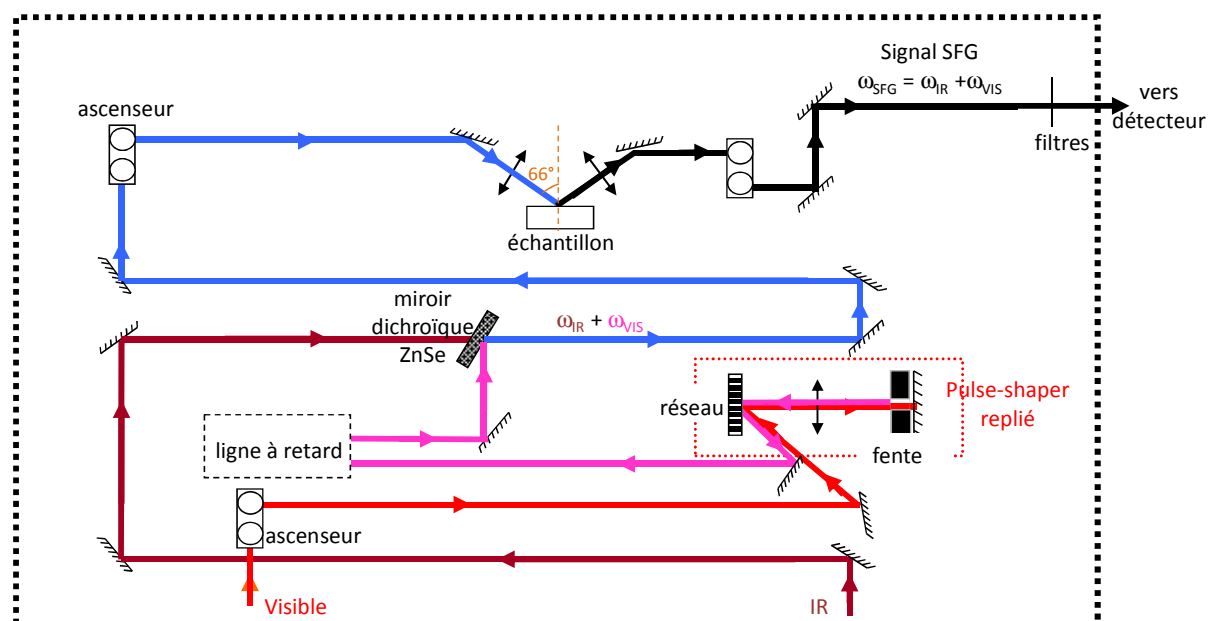


Figure 23 : Trajets optiques des faisceaux visible (en rouge puis en rose après façonnage par le pulse-shaper) et infrarouge (en bordeaux) jusqu'à l'échantillon. Le faisceau en bleu représente la combinaison de ces deux faisceaux. L'émission SFG obtenue après passage sur un échantillon est représentée par un faisceau noir.

Les faisceaux infrarouge et visible sont ensuite recombinaison colinéairement sur la face réfléchissante d'un miroir dichroïque en ZnSe (transparent entre 1 et $21 \mu\text{m}$) puis envoyés vers l'échantillon avec un angle d'incidence d'environ 66° par rapport à la normale à cet

échantillon. Une lentille en CaF_2 de distance focale $f = 10$ cm juste avant l'échantillon permet de focaliser les faisceaux au voisinage de celui-ci afin d'optimiser le signal SFG. En raison de la dispersion de CaF_2 , les points focaux des faisceaux visible et IR ne sont pas identiques. Le faisceau visible est focalisé devant l'échantillon et le faisceau IR plutôt derrière. Le faisceau IR ne peut pas endommager l'échantillon même si son point focal est sur l'échantillon. Il n'en est pas de même du faisceau visible, dont le point focal doit être gardé suffisamment loin de l'échantillon. Le diamètre du spot sondé par SFG a été estimé à une centaine de microns (123). Le passage par divers ascenseurs permet d'obtenir des faisceaux visible et infrarouge polarisés p sur l'échantillon (Figure 24), ce qui est nécessaire pour les échantillons métalliques sur lesquels les champs polarisés s sont extrêmement faibles. Une ligne à retard est également présente afin de superposer temporellement les deux faisceaux. Avant l'acquisition des spectres SFG, les faisceaux infrarouge et visible résiduels sont éliminés par passage par des filtres dichroïques qui ne laissent passer que le faisceau SFG. Le taux de réjection de quatre filtres est de 10^{-16} .

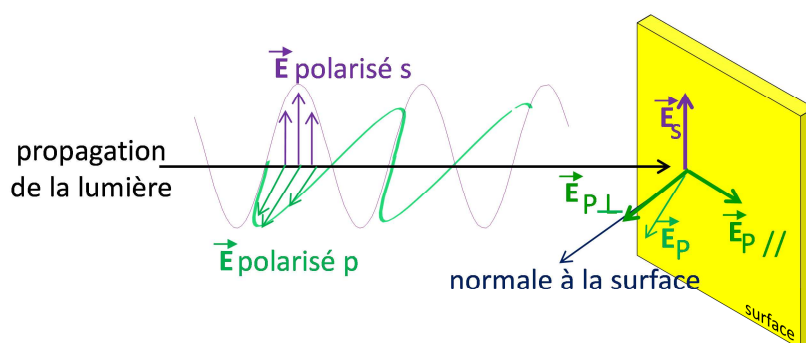


Figure 24 : Polarisation s (contenue dans le plan perpendiculaire au plan d'incidence du champ E en violet) et polarisation p (contenue dans le plan parallèle au plan d'incidence du champ E en vert) d'une onde électromagnétique (E , B), (en rouge).

Finalement, l'émission SFG peut être détectée au choix par deux caméras CCD (Charge Coupled Device) qui sont placées derrière un monochromateur :

- une caméra CCD (Roper Pixis) refroidie à -70°C par effet Peltier à trois étages. Le bruit de fond ne provient alors que de la lumière diffuse résiduelle présente dans la pièce (écrans d'ordinateurs, voyants des appareils, jauges à vide,...), du processus de lecture (quelques coups par lecture) et du bruit statistique. Il faut préférer une exposition longue du détecteur à la sommation de spectres qui multiplie le bruit de lecture par le nombre de spectres sommés et peut le rendre dominant. La lumière diffuse peut être mesurée, lissée et soustraite efficacement. Le rapport signal sur bruit est finalement limité par le bruit statistique. Il est proportionnel à la racine carrée du nombre de photons détectés. Typiquement une amplitude de quelques milliers de coups permet d'obtenir d'excellents spectres vibrationnels. Le temps d'exposition nécessaire varie avec les échantillons.

- une caméra intensifiée (Roper Scientific) ; dans le cas de signaux faibles, le signal SFG peut être difficile à obtenir. Dans ce cas l'usage d'une caméra intensifiée permet d'augmenter la sensibilité de détection, mais au détriment du bruit spectral. L'intensification se fait par émission d'électrons par impact des photons SFG sur une photocathode. Les électrons sont accélérés par une impulsion de haute tension de courte durée (quelques ns) sur une galette à microcanaux puis envoyés sur écran luminescent qui réémet des photons sur une CCD. La présence de la tension d'accélération pulsée a le grand avantage d'éliminer toute contribution de la lumière ambiante. On peut même travailler lumière allumée.

La caméra intensifiée est ainsi plus sensible que la caméra refroidie et sera donc utilisée afin d'optimiser de faibles signaux avant l'acquisition. Néanmoins, du bruit spectral est créé durant la phase d'amplification c'est pourquoi la caméra refroidie est privilégiée pour réaliser l'acquisition finale des spectres avec le logiciel WinSpec32. L'acquisition des spectres est effectuée en quelques dizaines de secondes pour la SAM d'ODT exposée à l'air et en quelques centaines de secondes lorsque la surface est exposée à une solution aqueuse, sur la caméra CCD (Roper Pixis) refroidie. Elle se fait dans le noir le plus poussé possible pour limiter la lumière ambiante. A chaque mesure de SFG sur un échantillon, un « background » est effectué en coupant le faisceau de l'IR pour mesurer le bruit de fond dû aux lumières parasites restantes de la pièce, incluant la lumière diffusée du faisceau visible. Un contrôle a également été réalisé en coupant le faisceau visible : aucun signal n'a été détecté.

En conclusion, ces différents dispositifs permettent de réaliser de la spectroscopie vibrationnelle de Génération de Fréquence Somme femtoseconde à large bande (broadband, « BBSFG ») avec une résolution spectrale de l'ordre du cm^{-1} en configuration dite ppp = faisceaux SFG, visible et infrarouge polarisés p. Un « basculeur » de polarisation des deux faisceaux, des polariseurs et lames $\lambda/2$ à 800 nm pour le faisceau visible, ainsi qu'un polariseur large bande dans le visible pour la SFG émise, sont disponibles pour des études à d'autres polarisations.

Au cours de ce travail, le dispositif expérimental SFG est également utilisé pour sonder des échantillons exposés à des solutions aqueuses. L'eau liquide absorbe dans le domaine infrarouge. La bande d'absorption empiète légèrement sur le spectre de notre laser IR. Par ailleurs, l'eau provoque la diffusion de la lumière, ce qui est très gênant pour notre dispositif de détection. C'est pourquoi une lame de CaF_2 est placée au-dessus du substrat. Elle permet de limiter l'épaisseur de la couche aqueuse. Nous verrons au chapitre III – 2 que cette épaisseur est de l'ordre de 5 μm .

II – 2 – 4 : Structure de la SAM d'ODT, spectres SFG et modélisation

La molécule d'ODT est composée d'un groupement thiol SH (l'atome H se dissociant lors de l'adsorption sur la surface d'or), de 17 groupes méthylène CH_2 et d'un groupe méthyle CH_3 . Le spectre vibrationnel contient donc un mode S-C (trop loin dans l'IR pour qu'il soit détectable par SFG), des modes C-C et des modes C-H d'élongation et de pliage. Les modes

C-H d'élongation se trouvent dans une fenêtre atmosphérique où H_2O et CO_2 n'absorbent pas et où l'OPA fonctionne très bien : ce sont donc ces modes que nous avons choisi de sonder. Les vibrations C-H gardent un caractère local marqué : les modes des groupes CH_2 et de CH_3 apparaissent à leurs fréquences caractéristiques habituelles. Seule la fréquence du mode de vibration antisymétrique du groupe CH_2 est déplacée à plus faible fréquence (2918 cm^{-1} au lieu de 2924 cm^{-1}) par l'autoassemblage.

Au total 7 fréquences peuvent contribuer au signal SFG dans la région spectrale accessible (Figure 25, Tableau 2) :

- les vibrations d'élongation symétrique (un mode) et antisymétrique (deux modes dégénérés) du groupe méthyle CH_3
- la résonance de Fermi provenant du couplage entre le mode de vibration d'élongation symétrique de CH_3 et deux quantas du mode de vibration de pliage (bending) de même symétrie : lorsque deux niveaux d'énergie sont très voisins, il suffit d'un couplage très faible pour que leurs fonctions d'onde se mélangent. Le niveau perturbateur apparaît alors dans le spectre, même si la transition correspondante est normalement interdite : c'est ainsi qu'une vibration de pliage apparaît dans les bandes d'élongation.
- les vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique des groupes méthylènes CH_2 .
- les vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique du groupe méthylène voisin du soufre qui ne possède ni le même environnement géométrique comme on le verra plus loin, ni le même environnement chimique que les autres groupes CH_2 . L'atome de soufre ne possédant pas la même électronégativité qu'un atome de carbone : 2,58 et 2,55, respectivement, l'atome de carbone voisin se retrouve appauvri en charges négatives alors que dans une liaison C-C au milieu de la chaîne d'ODT, les électrons sont répartis de façon homogène entre atomes de carbone (centro-symétrie locale). Il n'y a pas de consensus dans la littérature concernant les modes associés à S- CH_2 . Toutefois, lorsqu'il n'est pas pris en compte (ajustement à 5 fréquences, cf. chapitre II – 3 – 2) nous observons une différence systématique entre spectres expérimentaux et spectres déconvolués autour de 2905 cm^{-1} : nous proposons donc que la fréquence de S- CH_2 soit $2905 \pm 1\text{ cm}^{-1}$. Cette attribution est confortée par le fait que l'écart de 54 cm^{-1} entre CH_2 et S- CH_2 est proche de celui calculé *ab initio* dans notre groupe (cf. chapitre II – 3 – 2). L'écart entre les bandes de vibration symétrique et antisymétrique de S- CH_2 devrait être semblable à celui de CH_2 . La fréquence antisymétrique de S- CH_2 devrait alors se trouver autour de 2972 cm^{-1} : nous n'observons pas de bande à cet endroit. Toutefois, nos calculs de spectres SFG prévoient que l'intensité du mode antisymétrique est nettement plus faible que celle du mode symétrique en raison de l'orientation particulière de S- CH_2 dans la SAM. L'attribution de la fréquence de 2905 cm^{-1} au mode d'élongation symétrique de S- CH_2 semble donc raisonnable. L'existence d'une bande à la fréquence de 2905 cm^{-1} a déjà été rapportée par différents groupes (51) (124) (125) mais jamais attribuée. Une

autre étude suggère qu'une résonance de Fermi du groupe méthylène, ou d'autres modes de vibration d'élongation CH_2 , existent entre 2900 et 2920 cm^{-1} **(126)**. En ce qui concerne la fréquence du mode antisymétrique possible à 2972 cm^{-1} , aucune autre étude ne fait mention de son existence. Nous présenterons plus loin une série de résultats expérimentaux appuyant notre attribution, ainsi que les résultats des calculs *ab initio*.

Certains auteurs ont suggéré que les vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique du groupe méthylène voisin du groupe méthyle pourraient apparaître à une fréquence différente des autres CH_2 du fait de son environnement chimique un peu différent des autres groupes CH_2 : toutefois il n'y a pas d'attribution convaincante de ce mode à une fréquence particulière dans la littérature, et nous considérons donc qu'il apparaît à la même fréquence que les autres.

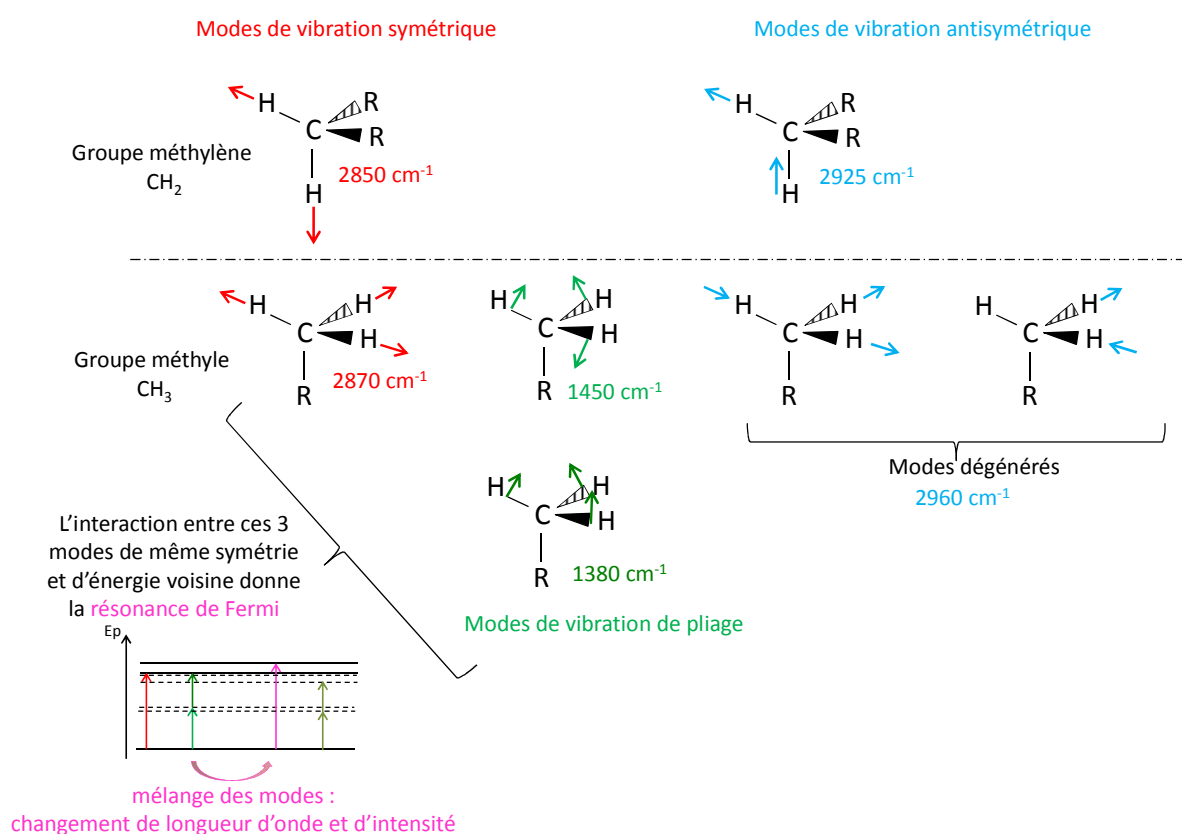


Figure 25: Les différents modes de vibrations des groupes CH_2 et CH_3 . Les fréquences sont données à titre indicatif et sont valables dans le cas où les groupes sont isolés (ce qui n'est pas le cas de la SAM d'ODT). Données adaptées de **(127)**.

Comme nous l'avons vu plus haut, dans la monocouche auto-assemblée, les molécules, qui sont très flexibles en phases gazeuse et liquide, parviennent à adopter spontanément une conformation quasi tout trans qui leur permet de s'ordonner et de constituer une couche quasiment solide. Le haut degré d'ordre permet de stabiliser énergétiquement la

monocouche grâce aux interactions de van der Waals qui sont alors attractives tout le long des chaînes. Plus la chaîne est longue, plus l'énergie de van der Waals mise en jeu le long de la chaîne est grande. Pour l'ODT, elle est à peu près équivalente à l'énergie de liaison de la fonction sulfure sur l'or.

Tableau 2 : Fréquences de vibration des modes d'élongation de C-H de l'ODT auto-assemblé observées par SFG.

Fréquence (cm ⁻¹)	Intensité	Attribution
2851	Faible	CH ₂ mode d'élongation symétrique
2877	Forte	CH ₃ mode d'élongation symétrique
2905*	Faible	S-CH ₂ mode d'élongation symétrique
2918	Faible	CH ₂ mode d'élongation asymétrique
2936	Forte	CH ₃ résonance de Fermi
2962	Forte	CH ₃ modes d'élongation asymétriques
≈ 2972*	Faible (pas observée)	S-CH ₂ mode d'élongation asymétrique

* attributions proposées dans ce travail

La structure des monocouches d'alcanethiols a fait l'objet d'un nombre considérable d'études expérimentales et théoriques. Nous en ferons un court résumé (85) :

- l'ellipsométrie indique que l'épaisseur de la couche auto-assemblée est de 2 nm, ce qui indique que les molécules sont inclinées sur la surface de 30° en supposant que les chaînes sont en conformation « tout trans ». Cette inclinaison permet au système de concilier les contraintes géométriques imposées par l'adsorption sur l'or (les molécules ne pouvant pas s'adsorber n'importe où) et celle imposée par la portée des interactions de van der Waals (les chaînes doivent être à une distance optimale).

- la SFG montre qu'après auto-assemblage l'intensité des groupements CH₂ devient quasiment nulle, ce qui confirme que les chaînes sont « tout trans ». En effet, dans la conformation trans, la molécule d'ODT possède des centres de symétrie locaux situés au milieu des liaisons C-C des groupes méthylènes (Figure 11). Dans ce cas, les groupes CH₂ de part et d'autre du centre d'inversion donnent des polarisations SFG égales en norme mais opposées : elles s'annulent deux à deux. Notons que ce raisonnement suppose implicitement que les modes sont locaux. La comparaison des spectres d'absorption IR et des spectres SFG est spectaculaire : les bandes de CH₂ dominent largement le spectre d'absorption, tandis qu'elles sont quasiment absentes du spectre SFG.

- la STM montre que les groupes méthyles forment des hexagones correspondant à la maille $\sqrt{3} \times \sqrt{3} R30^\circ$ de l'or (111) sous-jacent, mais ils ne sont pas tous équivalents (deux hauteurs différentes) : il y a donc deux types de molécules d'ODT, caractérisées par des conformations différentes.

- une étude SFG sur monocristal d'or, en fonction de l'azimut, montre qu'il y a deux types de sites d'adsorption sur l'or, ce qui va également dans le sens de deux types de conformations.

- une étude de diffraction X montre que les atomes de soufre de deux molécules voisines ne sont séparés que par 2.2 Å (une distance plus faible que la distance de 2.9 Å qui

sépare deux atomes d'or), alors que les chaînes carbonées sont séparées par 5.0 Å. Ceci explique l'origine des deux types de conformations : les molécules sont liées par paires sur le substrat par un pont disulfure. Les chaînes, très proches l'une de l'autre au voisinage du substrat, doivent s'écarter les unes des autres pour se trouver à une distance favorable aux interactions de van der Waals. Elles adoptent donc une forme en L, et s'écartent obligatoirement de la conformation trans en pied de chaîne (Figure 26).

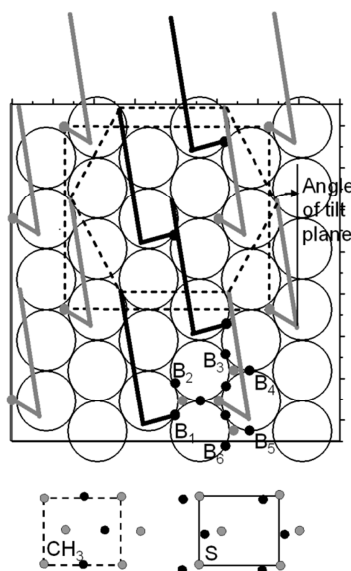


Figure 26: Esquisse vue du dessus de la structure de la surface de la SAM d'ODT résumant les résultats obtenus par STM, SFG et diffraction des rayons X. Deux types de conformations coexistent (en noir et gris). Chacun d'entre eux présente un défaut de gauche près de la surface, ce qui entraîne une forme en L des molécules d'ODT pour tenir compte de l'appariement des atomes de S à une distance de 2,2 Å alors que les chaînes carbonées doivent rester à une distance beaucoup plus grande pour optimiser les interactions attractives de van der Waals. La maille $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ R30° de l'or (111) est rappelée en pointillés, avec les hexagones formés par les groupes méthyle. Pour plus de clarté les motifs de groupes CH_3 et les atomes S dans la maille élémentaire sont présentés comme encarts. Il est à noter que le plan d'inclinaison forme un angle par rapport aux atomes d'or nus. Sur le site d'adsorption de la molécule située en bas à droite sont ajoutés les plus proches sites d'adsorption possibles : sites ternaires (en gris) et les sites pontés (en noir), et les six sites pontés possibles de B1 à B6 (noir) localisés à 2,2 Å de la molécule d'ODT. (85).

Une étude SFG, prenant en compte l'ensemble de ces contraintes, a permis de préciser tous les détails de la conformation des molécules par simulation des intensités SFG relatives des différents modes C-H (85). Dès lors que la molécule est tout trans jusqu'au défaut de bas de chaîne avec une géométrie tétraédrique autour de chaque atome de carbone, la géométrie de l'ensemble de la molécule est en fait déterminée par trois angles en bas de chaîne (Figure 27, Figure 28) :

- l'angle d'inclinaison Θ de la chaîne alkyle par rapport à la normale à la surface (tilt)
- l'angle de rotation Φ de la chaîne carbonée autour de l'axe moyen de la chaîne (twist)

- l'angle ψ_1 caractérisant le défaut gauche du bas de la chaîne : ψ_1 est l'angle de rotation autour de la liaison $C_0 - C_1$ entre les deux premiers groupes méthylènes voisins de l'atome de soufre.

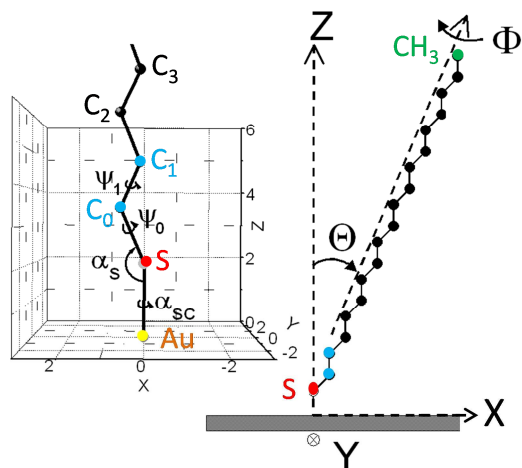


Figure 27 : Description géométrique de la molécule d'ODT dans le repère XYZ avec : Θ , l'angle d'inclinaison de la chaîne, Φ , l'angle de rotation autour de l'axe moyen de la chaîne, ψ_0 , l'angle de rotation autour de la liaison $S - C_0$, ψ_1 , l'angle de rotation autour de la liaison $C_0 - C_1$, α_{SC} , l'angle de rotation autour de la liaison $Au - S$ et α_s , l'angle formé par les atomes $\widehat{C_0SAu}$. NB : le schéma de droite est irréaliste en ce qui concerne la conformation de la molécule en pied de chaîne.

Les autres angles décrivant la chaîne sont (Figure 27) :

- ψ_0 , l'angle de rotation autour de la liaison $S - C_0$
- α_s , l'angle formé par les atomes $\widehat{C_0SAu}$.
- l'angle d'azimut α_{SC} , angle de rotation autour de la liaison $Au - S$
- l'angle d'inclinaison (tilt du méthyle) du groupe CH_3 par rapport à la normale de la surface.

Les trois angles α_{SC} , α_s et Ψ_0 sont calculables à partir des angles Θ , Φ et Ψ_1 . L'orientation du groupe méthyle est déterminée par Θ et Φ seuls. La valeur de $\Theta = 30^\circ$ donnée par la littérature semblant bien établie, la comparaison des spectres SFG calculés et expérimentaux a donc pour but de déterminer Φ et ψ_1 pour les deux conformations de molécules, que nous nommons A et B. Ceci a été réalisé dans la réf. (85) dans l'hypothèse de modes locaux. Le tenseur de susceptibilité non linéaire d'ordre 2 a été calculé comme la somme des hyperpolarisabilités du mode CH_3 et de tous les modes CH_2 des molécules A et B, qui ne diffèrent les uns des autres que par leur orientation. Les hyperpolarisabilités de CH_3 et de CH_2 ont été calculées *ab initio* dans l'environnement d'un alcane linéaire. La géométrie obtenue dans la réf. (85) pour la SAM d'ODT à l'air est représentée dans la Figure 28.

Sachant que la chaîne est quasi tout trans, on s'attend à ce que l'intensité des modes CH_2 ne soit pas rigoureusement nulle : c'est bien ce qui est observé en fait. Le plan des CH_2 qui se trouvent sur le défaut non trans de la chaîne alkyle (c'est-à-dire en bas de chaîne près de

l'atome de soufre) s'écarte trop peu du plan de la surface pour donner lieu à des bandes intenses : les moments de transition IR de leurs deux modes sont dans le plan de la molécule, et interagissent donc essentiellement avec les composantes des champs laser du plan de la surface, qui sont très faibles sur les métaux. Contrairement à ce qui est affirmé dans la littérature, la très faible intensité des modes méthylène dans les SAM d'alkanethiol n'implique pas que les chaînes soient strictement tout trans.

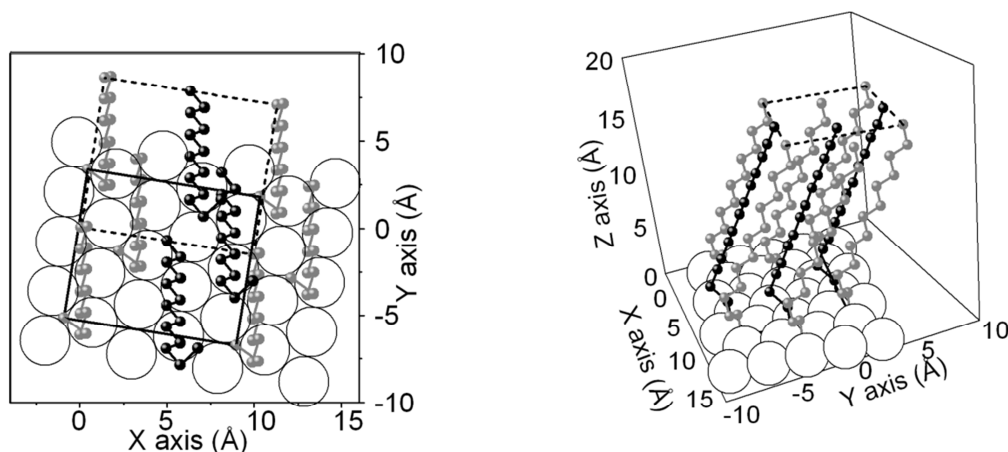


Figure 28: Vues du dessus (à gauche) et en perspective (à droite) de la SAM d'ODT, correspondant à une description réaliste, respectant toutes les données de la littérature (SFG, diffraction X, STM). Les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés. Les deux types de molécules A et B sont en noir et en gris, respectivement. On remarque que les plans des atomes de carbone de A et B sont perpendiculaires entre eux, que les sites d'adsorption sont pontés pour A et ternaires pour B, et que la forme en bas de chaîne n'est pas la même. Il en résulte que la hauteur des groupes méthyle de A et B est différente.

Dans ce travail, la SAM d'ODT se trouve également dans un autre environnement que l'air : en présence d'eau pure, de protéines et de bactéries. Le simple fait de se trouver en présence d'eau pure modifie les spectres, car la relation de définition de l'intensité SFG fait intervenir les champs locaux (dans le plan des molécules). Ces champs dépendent des facteurs de Fresnel et n'ont donc pas les mêmes amplitudes ni directions en présence d'eau. Par ailleurs l'interaction des molécules d'ODT avec les molécules d'eau, les bactéries, ou les protéines, peut modifier la conformation des molécules et peut donc également contribuer à modifier les spectres : le but de cette étude est de découvrir si c'est bien le cas.

Toutefois, les modifications attendues de la SAM d'ODT sont faibles, parce que l'ODT est peu réactif. Si les molécules restent autoassemblées mais ajustent leur conformation suite aux interactions supplémentaires qu'elles subissent, alors le degré de liberté qui coûte le moins d'énergie est la modification de l'angle twist Φ : il ne change pas l'interaction de van der Waals ; par contre il implique un ajustement en bas de chaîne (ψ_1) qui paraît possible, car les molécules se trouvent déjà hors de la configuration trans qui est optimale. Un changement du tilt Θ se traduirait par contre par un fort coût en énergie parce que les molécules se trouveraient à une distance inappropriée pour les interactions de van der Waals. Le changement de tilt s'accompagnerait donc très probablement d'écarts à la

conformation tout trans, qui devraient se traduire par une forte augmentation de l'intensité des modes CH_2 . Enfin si les bactéries, voire les protéines, déplaçaient les molécules d'ODT, elles détruiraient la structure de la SAM, ce qui se traduirait par des bandes larges et nettement moins intenses.

Si on observe un spectre semblable à celui de l'air, caractérisé essentiellement par une modification des intensités relatives des modes de CH_3 , c'est que l'angle de tilt du méthyle a changé. Il peut avoir changé par rotation « locale » du groupe méthyle au niveau de la liaison $\text{C}_{16} - \text{C}_{17}$ (écart à la conformation tout trans) ou par une rotation « globale » de la chaîne (angle de twist Φ de l'ODT). Dans la suite, nous allons utiliser le programme de calcul de spectre SFG de la référence (85), pour extraire de nos spectres l'angle de tilt du méthyle et l'angle de twist Φ correspondant au cas où le tilt du méthyle serait couplé à la rotation de la chaîne. Pour faire la différence entre les deux hypothèses, il faudrait utiliser l'intensité des modes CH_2 pour déterminer ψ_1 , mais celle-ci s'avère trop peu sensible aux variations de ψ_1 , alors que l'intensité des modes CH_3 est forte et extrêmement sensible à de petites variations du tilt du méthyle et/ou de Φ : nous n'avons donc pas pu éclaircir si le méthyle seul tourne, ou s'il tourne avec toute la chaîne alkyle.

Déroulement du calcul

Le calcul du spectre SFG correspondant à une conformation des chaînes A et B d'ODT n'est pas réalisé sur une chaîne carbonée comportant 18 atomes de carbone mais seulement 12 carbones. En effet, il a été observé que le spectre SFG ne dépendait plus du nombre d'atomes de carbone au-delà de 11 groupes méthylène puisque les hyperpolarisabilités de deux groupes CH_2 en conformation trans s'annulent strictement dans une approche de modes locaux. La diminution du nombre de groupes CH_2 permet de réduire le temps de calcul. Il est à noter qu'on aurait pu se contenter de seulement 3 groupes méthylène. Mais pour obtenir une représentation satisfaisante des conformations dans l'espace réel, un plus grand nombre de groupes méthylènes est nécessaire.

Nous détaillons dans ce qui suit le contenu du programme de calcul. Dans un premier temps, la conformation de la molécule d'ODT « droite sur la surface » est calculée, c'est-à-dire que Θ et Φ sont nuls mais que ψ_1 a une valeur déterminée : à l'air, pour la molécule A : $\psi_1 = 90^\circ$ et pour B : $\psi_1 = 100^\circ$. Tous les atomes de carbone sont considérés comme « tétraédriques » avec une conformation tout trans, à l'exception de ψ_1 , y compris autour de l'atome de soufre auquel on a attaché formellement un atome d'or (Figure 29.A). La longueur des liaisons entre atomes est prise dans la littérature :

- longueur de la liaison C-C = 1.51 Å
- longueur de la liaison S-C = 1.82 Å
- longueur de la liaison Au-S = 2 Å

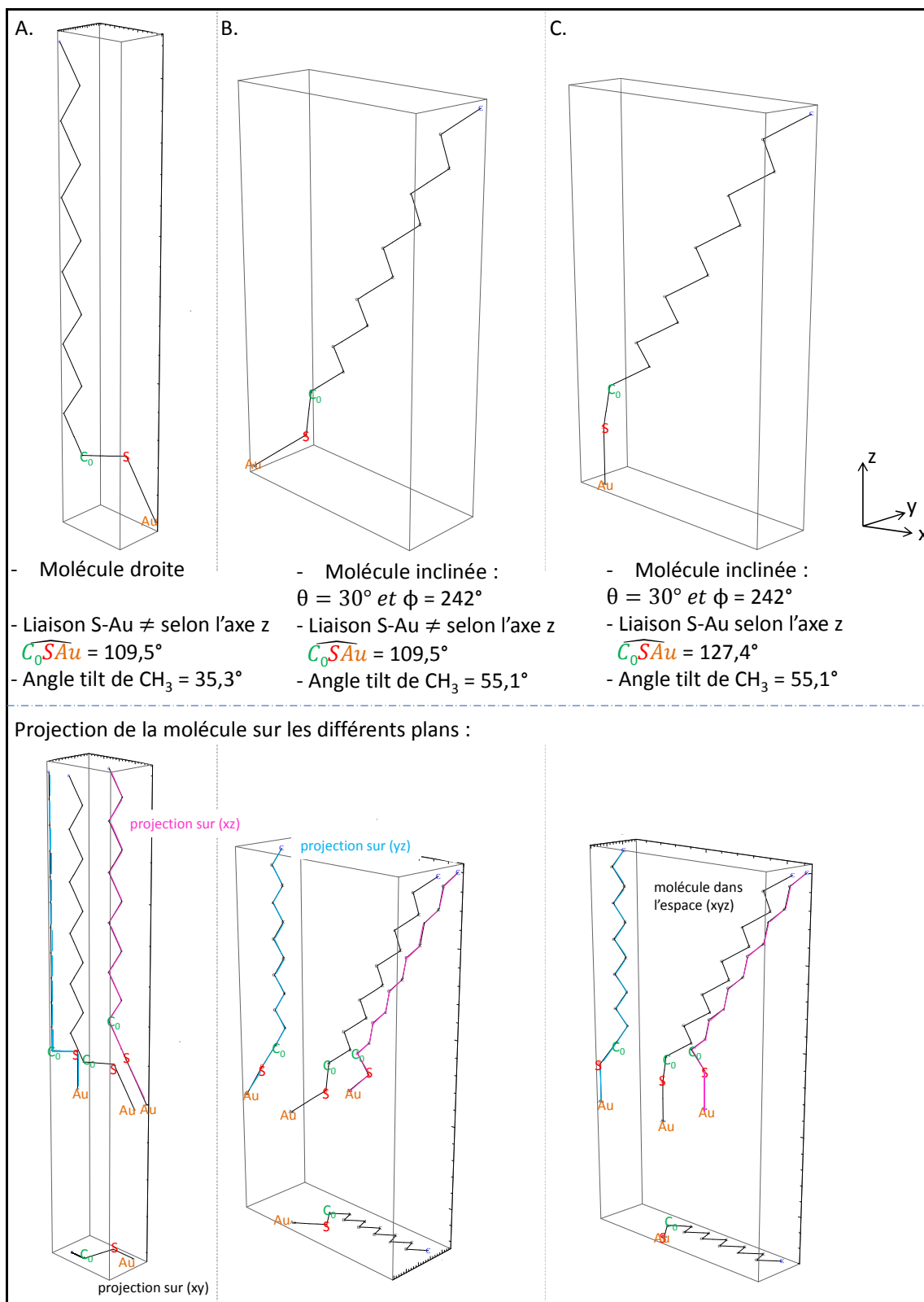


Figure 29 : Conformation de la molécule d'ODT pour $\psi_1 = 90^\circ$ (molécule A) exposée à l'air et ses projections sur les différents plans lors du déroulement du calcul pour déterminer totalement la conformation : A. 1^{ère} étape : la molécule est droite B. 2^{ème} étape : on considère les angles $\theta = 30^\circ$ et $\Phi = 242^\circ$ et C. 3^{ème} étape : la liaison Au-S est perpendiculaire à la surface du solide. La surface du solide est dans le plan (xy).

Puis l'inclinaison de la molécule est choisie (angles Θ et Φ , Figure 29.B). Alors, les paramètres α_S , α_{SC} et ψ_0 sont calculés avec la contrainte que la liaison Au-S réaliste (soit perpendiculaire à la surface).

La géométrie correspondant aux conformations choisies des molécules d'ODT A et B au sein de la SAM est alors complètement déterminée, y compris l'angle de tilt du groupe méthyle (Figure 29.C). Le programme peut alors calculer les spectres SFG de A, de B, et des deux molécules A et B ensemble.

Calcul du spectre SFG théorique de la SAM d'ODT

Calcul du spectre SFG théorique

Tout d'abord, le spectre SFG théorique de la molécule A seule puis de la molécule B seule sont calculés. Pour chacun de ces calculs, différents paramètres d'entrée sont à poser :

- les paramètres ψ_1 , Θ et Φ obtenus lors de l'étape de détermination de la géométrie de la molécule d'ODT
- les caractéristiques spectrales des différents modes de vibration de la SAM, supposés Lorentziens, soient les fréquences ω_v , les demi-largeurs à mi-hauteur Γ_v et la phase ϕ_v déterminés par la déconvolution des spectres expérimentaux. L'existence des deux modes dégénérés de vibration antisymétrique du groupe CH_3 est prise en compte car ils ne contribuent pas de la même façon au spectre SFG du fait que leurs moments de transition n'ont pas la même direction.
- le rapport expérimental R_{exp} entre la bande due à la résonance de Fermi et la bande d'élongation symétrique du méthyle est également utilisé afin de déterminer le poids de la fonction d'onde du mode d'élongation dans les deux niveaux, qui détermine quelle est l'intensité du mode du méthyle – sans résonance de Fermi.
- les indices optiques des différents milieux traversés par les faisceaux lumineux sont également considérés (les intensités en dépendent très fortement) (Figure 30).
- les angles d'incidence, de réflexion et de transmission sont calculés en fonction des indices optiques de chaque longueur d'onde en tenant compte de l'angle d'incidence mesuré expérimentalement (66° à l'air) et de l'arrangement colinéaire des faisceaux infrarouge et visible (Figure 30).

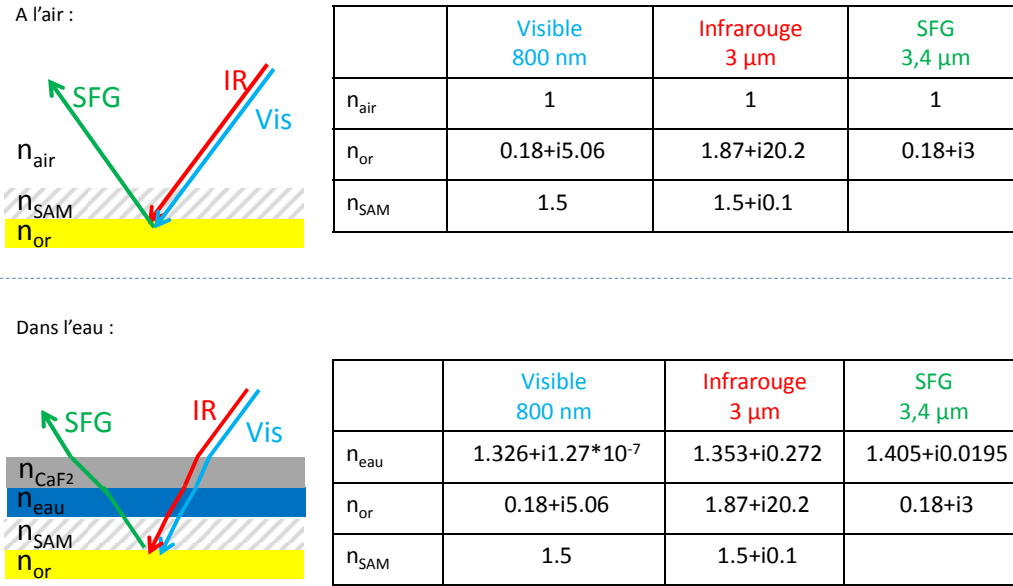


Figure 30 : Schéma expérimental d'une expérience SFG réalisée à l'air (en haut) et dans l'eau (en bas) et leurs tableaux associés de valeurs des indices des milieux à considérer à l'interface SAM d'ODT selon la longueur d'onde. Lorsque la SAM d'ODT est en contact avec un milieu aqueux, une lame de CaF₂ est ajoutée afin de limiter l'épaisseur de la couche d'eau (cf. chapitre III). Il est à noter que l'indice de la lame CaF₂ n'intervient pas dans le calcul théorique du spectre SFG puisque la SAM d'ODT n'est pas en contact direct avec celle-ci.

A partir de ces paramètres, le spectre SFG théorique est calculé pour chaque molécule A et B de l'ODT en 3 grandes étapes :

- les tenseurs de susceptibilité du second ordre χ_v de chaque mode de vibration sont calculés à partir des tenseurs d'hyperpolarisabilité moléculaires β_v qui sont le produit de deux termes (les moments de transition dipolaires vibrationnel et Raman) et qui doivent être projetés dans le référentiel de la surface pour tenir compte de l'orientation des différents groupes CH₂ et CH₃ qui contribuent au spectre :

$$\chi_{XYZ} = \sum_{\text{molécules}} \sum_v \beta_{ijk} = N_A \sum_v \sum_{ijk} U_{A,XYZijk} \beta_{ijk} + N_B \sum_v \sum_{ijk} U_{B,XYZijk} \beta_{ijk}$$

$$\beta_{ijk} \propto \sum_v \frac{\langle 0 | \alpha_{ij} | v \rangle \cdot \langle v | \mu_k | 0 \rangle}{\omega_{IR} - \omega_v + i\Gamma_v}$$

avec χ_{XYZ} , l'hyperpolarisabilité moléculaire dans le repère de la surface (XYZ)

N_A et N_B , le nombre de molécules par unité de volume de conformation A et B respectivement

β_{ijk} , le tenseur d'hyperpolarisabilité dans l'espace adapté (ijk)

$U_{A,XYZijk}$ et $U_{B,XYZijk}$, une collection de rotations pour les molécules A et B respectivement permettant le passage de l'espace (ijk) à l'espace (XYZ)

μ_k , la composante du moment de transition dipolaire infrarouge du mode de vibration

α_{ij} , la composante du tenseur de polarisabilité Raman

ω_v , la fréquence du mode de vibration v .

ω_{IR} , la fréquence infrarouge.

Γ_v , la demi-largeur à mi-hauteur de la courbe Lorentzienne relative au mode de vibration v .

Il est à noter dans notre approximation de description par modes locaux, les tenseurs d'hyperpolarisabilité des différents groupes méthylène sont identiques. En revanche leur contribution au tenseur d'hyperpolarisabilité fait intervenir leur orientation.

Puis les composantes des champs électriques infrarouge et visible résultant sont calculés en tenant compte des coefficients de Fresnel, des angles d'incidence, et de la polarisation des lasers.

- la polarisation de chaque mode de vibration est calculée dans le repère de la surface (XYZ)
- enfin, le champ électrique SFG résultant de la polarisation calculée à la fréquence SFG est évalué en tenant compte des coefficients de Fresnel pour chaque mode de vibration v (y compris la résonance de Fermi dont le coefficient de Fresnel est supposé égal à celui de la vibration symétrique du groupe CH_3) et pour chaque polarisation projetée sur chaque axe du repère de la surface ($J = X, Y$ ou Z). On obtient alors le champ électrique du faisceaux SFG polarisé s et p :

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_{SFG_s} &= \sum_v L_s Y_v \times \mathbf{P}_v \\ \mathbf{E}_{SFG_p} &= \sum_v L_p Z_v \times \mathbf{P}_v + \sum_v L_p X_v \times \mathbf{P}_v \end{aligned}$$

avec $\mathbf{E}_{SFG_s}$, le champ électrique SFG polarisé s

$\mathbf{E}_{SFG_p}$, le champ électrique SFG polarisé p

$\mathbf{P}_v$, la polarisation du mode de vibration v

$L_i J_v$, les coefficients de Fresnel

$i = s$ ou p

La polarisation s est sur l'axe Y alors que la polarisation p du faisceau se projette sur les axes X et Z .

Les intensités SFG de chaque mode de vibration de la molécule A et B de la SAM d'ODT sont alors obtenues grâce aux relations suivantes :

$$\begin{aligned} I_{SFG_v} &= \sum_{i,J} |L_i J_v \times \mathbf{P}_v|^2 \\ I_{SFG} &= |\mathbf{E}_{SFG_s}|^2 + |\mathbf{E}_{SFG_p}|^2 \end{aligned}$$

avec I_{SFG} , l'intensité totale du spectre SFG

et I_{SFG_v} , l'intensité du mode de vibration v de la molécule

Calcul du spectre SFG théorique total de la SAM d'ODT

Pour déterminer le spectre SFG théorique total de la SAM d'ODT, il suffit de sommer les susceptibilités non linéaires du second ordre de la molécule A ($\chi_{v_{molécule\ A}}^{(2)}$) et de la molécule B ($\chi_{v_{molécule\ B}}^{(2)}$) pour chaque mode de vibration v :

$$\chi_v^{(2)} = \chi_{v_{molécule\ A}}^{(2)} + \chi_{v_{molécule\ B}}^{(2)}$$

Ensuite, il ne reste plus qu'à déterminer les polarisations et les champs électriques équivalents. On obtient alors l'intensité SFG de chaque mode de vibration de la SAM d'ODT.

Détermination de la conformation expérimentale de la SAM d'ODT

La dernière étape pour déterminer la conformation réelle de la SAM d'ODT est de comparer les spectres SFG théorique et expérimental :

- si les intensités des modes de vibration du groupe CH_3 calculées sont les mêmes que celles trouvées suite à la déconvolution du spectre SFG expérimental, alors les conformations réelles de l'ODT des molécules A et B sont celles entrées dans le programme de calcul SFG ;
- si ce n'est pas le cas, alors la conformation donnée n'est pas la bonne : de nouveaux paramètres ψ_1 , Θ et Φ sont choisis pour les molécules A et B. On recalcule le spectre SFG théorique de chaque type de molécules puis le spectre global et on confronte de nouveau ce résultat à l'expérience. On réitère ce procédé jusqu'à obtenir les mêmes intensités SFG pour le calcul et l'expérience.

Comme nous l'avons déjà mentionné, les intensités expérimentales des modes de vibration des groupes CH_2 sont très faibles. L'incertitude résultante sur l'orientation des CH_2 ne permet pas de juger si l'interaction de l'ODT avec l'eau ou avec des molécules biologiques donne lieu ou non à une rotation globale des chaînes alkyle plutôt qu'à un simple tilt du méthyle seul. Nous calculons donc le tilt du méthyle avec une bonne précision, nous estimons Φ avec l'hypothèse que toute la chaîne tourne, mais nous n'avons pas cherché à estimer ψ_1 . En revanche, nous vérifions que l'intensité calculée pour les modes de CH_2 reste bien compatible avec la faible intensité observée expérimentalement.

II – 3 – Caractérisation multi-échelle de la SAM d'ODT exposée à l'air

II – 3 – 1 : Caractérisation macroscopique et microscopique

Caractérisation par AFM

Dans cette étude, la surface balayée par la pointe AFM est comprise entre $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ (taille typique de la surface sondée par le faisceau laser utilisé en spectroscopie SFG) et $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ afin d'observer plus finement la taille des terrasses d'or sur lesquelles les molécules d'ODT vont se chimisorber par la suite (la SAM d'ODT se construit sur des surfaces lisses et atomiquement plates et non dans les parties rugueuses des échantillons). Les images ont été réalisées en différents points de la surface, montrant que les échantillons sont homogènes et ont en tout point les mêmes caractéristiques topographiques.

Nous avons initialement caractérisé les surfaces d'or nues avant et après chauffage par AFM. Deux types de supports d'or ont été testés et caractérisés par AFM. L'utilisation d'un monocristal d'or (111) aurait été la solution idéale du point de vue de la qualité cristalline, mais elle est beaucoup trop onéreuse car nos substrats sont à usage unique du fait de leur biocontamination. La plupart des études d'auto-assemblage sont faites avec des couches minces d'or déposées sur du verre ou du mica.

Dans un premier cas, l'or a été déposé sur une couche de mica (Phasis) **(128)**. Le mica est connu pour avoir une surface polycristalline présentant de larges terrasses plates à l'échelle atomique, et constitue donc un meilleur support que le verre pour déposer des couches métalliques. La caractérisation AFM de ces surfaces (Figure 31.A et Figure 31.D) met en évidence des terrasses d'or uniformes très peu rugueuses de grande taille (environ $1 \mu\text{m}$) ainsi que la présence de trous séparés de quelques microns, de diamètre d'environ 20 nm (qui subsistent après la fonctionnalisation de la couche d'or par les molécules d'ODT). Bien que la rugosité de ces supports soit meilleure que celle obtenue sur support de verre (Figure 31.B et Figure 31.E), ils se sont avérés inadaptés pour nos études, car pour une raison que nous n'avons pas élucidée, les spectres SFG en présence d'eau sont très peu intenses (cf. Annexe 1.A).

Nous avons donc utilisé les supports de verre borosilicaté ($0,7 \text{ mm}$) recouvert d'une couche d'or (111) de 250 nm fournis par Arrandee (Figure 31.B). La caractérisation AFM de ces surfaces met en évidence une rugosité de surface d'environ $2,5 \text{ nm}$. On n'observe pas de terrasses avant le chauffage du substrat, mais des grains d'or (Figure 31.B). Après chauffage, de larges terrasses ($1 \text{ à } 2 \mu\text{m}^2$), beaucoup moins rugueuses (rugosité à l'intérieur des terrasses : $1 \text{ à } 2 \text{ nm}$), délimitées par des crevasses de profondeur $5\text{-}10 \text{ nm}$ sont observées (Figure 31.C). Ces supports sont de qualité suffisante pour un greffage ultérieur par les molécules d'ODT.

La fonctionnalisation de la couche d'or par les molécules d'ODT n'entraîne aucune désorganisation de la surface comme le montre les images AFM (Figure 31.E et Figure 31.F).

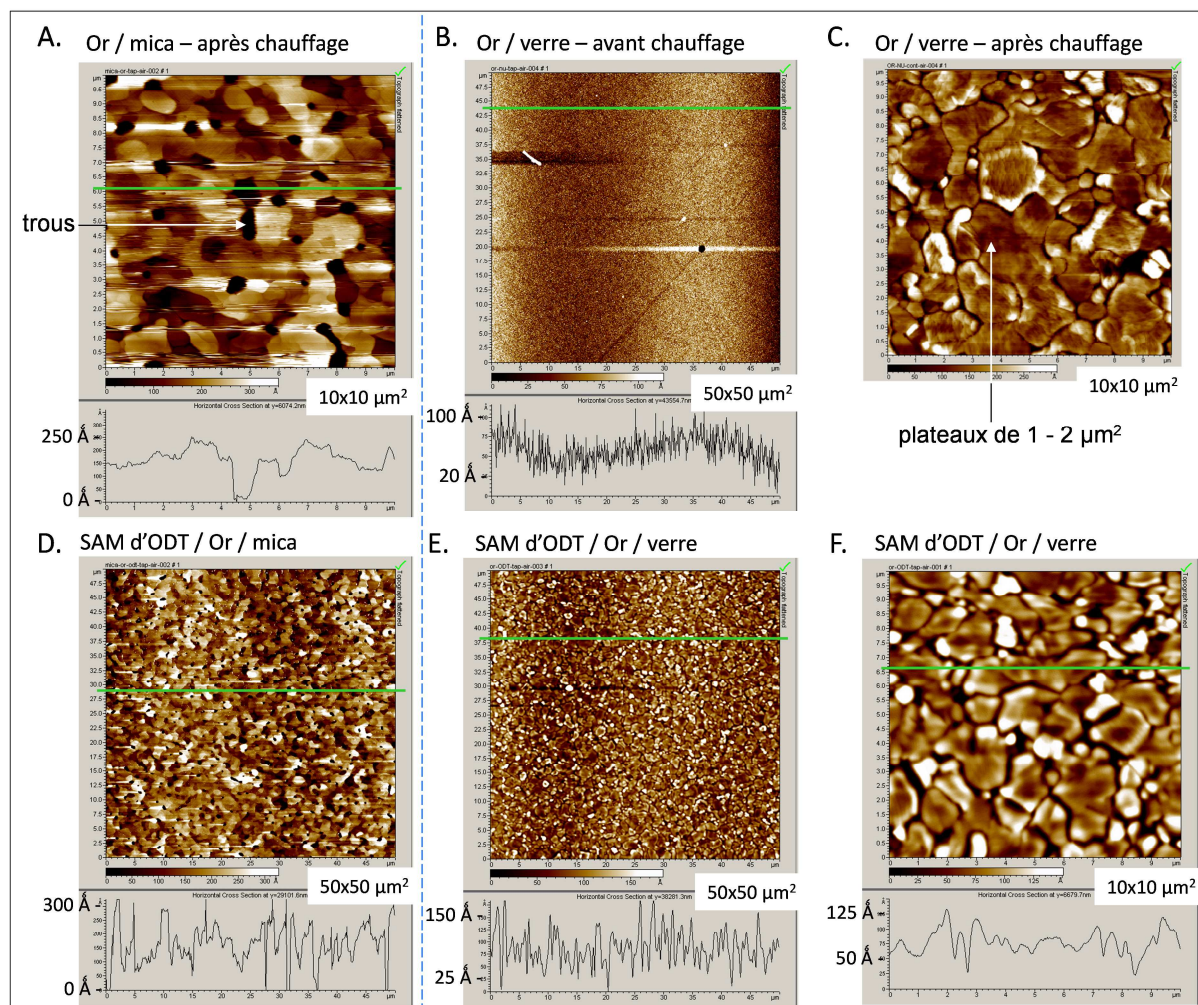


Figure 31 : Images topographiques d'AFM en mode oscillant A. de la surface d'or sur mica après chauffage du substrat, B. de la surface d'or sur verre avant et C. après chauffage du substrat. D, E, F.: après fonctionnalisation par les molécules de la SAM d'ODT : D. d'or déposé sur le mica E, F : d'or déposé sur le verre borosilicaté à deux échelles différentes. La hauteur de la surface le long des droites vertes est représentée en-dessous des images topographiques.

Pour un meilleur contrôle de l'uniformité de la SAM d'ODT, une cartographie point par point des courbes de force de la SAM d'ODT (sur une surface de 1 μm^2 , taille typique d'un plateau d'or) a été réalisée (Figure 32). Ces courbes sont identiques sur toute la surface ce qui indique que la fonctionnalisation du support d'or est homogène.

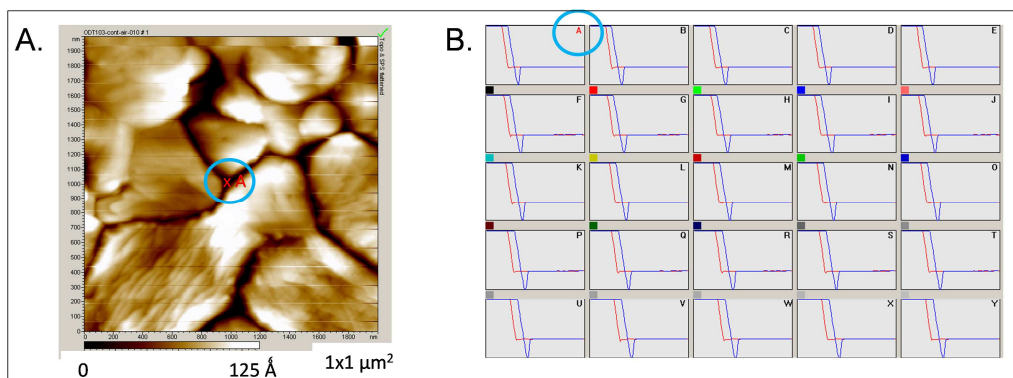


Figure 32 : A. Image topographique ($1 \mu\text{m}^2$) de la SAM d'ODT en mode contact force-volume, B. Cartographie des courbes de forces réalisée sur l'image topographique. Les autres points B à Y forment un damier régulier de pas $0,1 \mu\text{m}$ sur l'image topographique.

Caractérisation par la mesure d'angle de contact

Le caractère hydrophobe / hydrophile a été caractérisé par la mesure d'angles de contact comme décrit précédemment à l'aide du goniomètre « macroscopique ». Au temps initial, la valeur d'angle de contact des gouttes d'eau déposées sur la SAM d'ODT est de $109 \pm 2^\circ$ sur toute la surface (moyenne des mesures pour 5 gouttes d'eau déposées aléatoirement sur la surface, Figure 33.A). Ce résultat comparable aux données de la littérature **(54) (124)**, est en accord avec le caractère hydrophobe de la molécule d'ODT. Le manque d'affinité de l'ODT pour l'eau se vérifie à travers la cinétique de l'angle de contact de la Figure 33.A qui montre que l'angle de contact diminue peu au cours du temps ($\theta = 104 \pm 2^\circ$ à $t = 300 \text{ s}$) : la goutte d'eau ne s'étale pas sur le support ni ne s'adsorbe. La faible variation de la valeur de θ au cours du temps s'explique par l'évaporation de la goutte d'eau.

La mesure d'angle de contact, méthode simple et rapide, permet aussi d'évaluer l'homogénéité du support. Pour certains échantillons (que nous avons rejetés), nous avons mesuré des valeurs d'angle de contact $\theta_{(t=0)}$ variant de 96 à 109° selon le point de mesure sur la surface (Figure 33.B). Dans d'autres cas d'échantillons insuffisamment bons, l'angle de contact est constant sur la surface mais révèle une moins grande hydrophobicité ($\theta_{(t=0)} = 97^\circ$). Ce résultat peut correspondre à un manque de molécules d'ODT sur le substrat d'or.

Les mesures d'angle de contact effectuées avec le goniomètre « picoLitre » confirment le caractère hydrophobe de la surface SAM d'ODT ($\theta_{(t=0)} = 110,5 \pm 2^\circ$) ainsi que son homogénéité à l'échelle du micron (Figure 34). La valeur de l'angle de contact initial est en accord avec les données du goniomètre « macroscopique ».

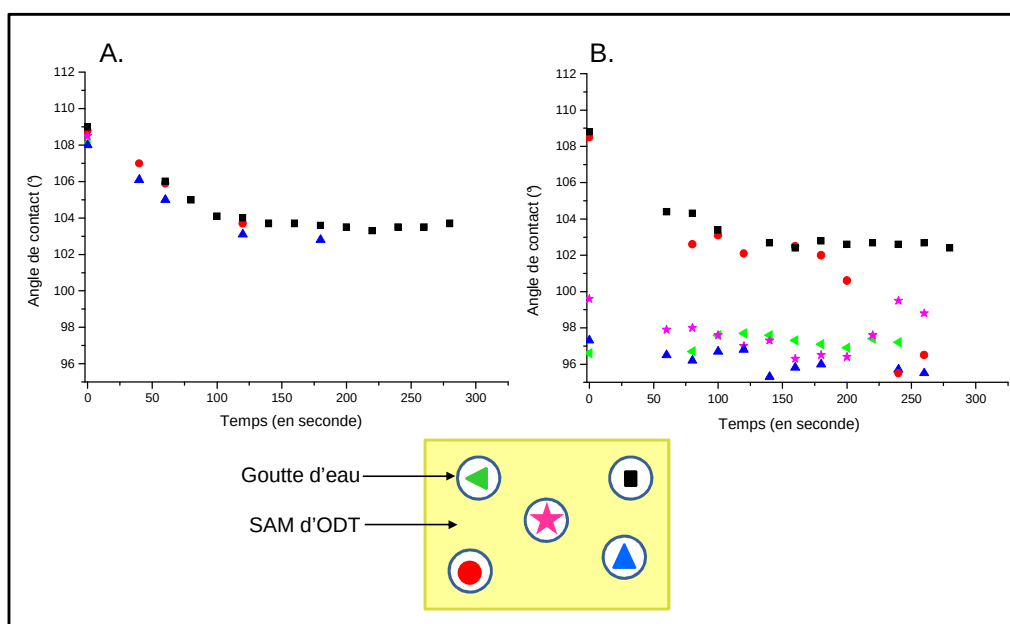


Figure 33 : Cinétique (entre $t = 0$ et $t = 300$ s) de l'angle de contact de gouttes d'eau déposées sur la SAM d'ODT observées au goniomètre « macroscopique » A. dans le cas où le support est bien fonctionnalisé et B. dans le cas où le support est hétérogène. En-dessous, localisation des mesures sur l'échantillon.

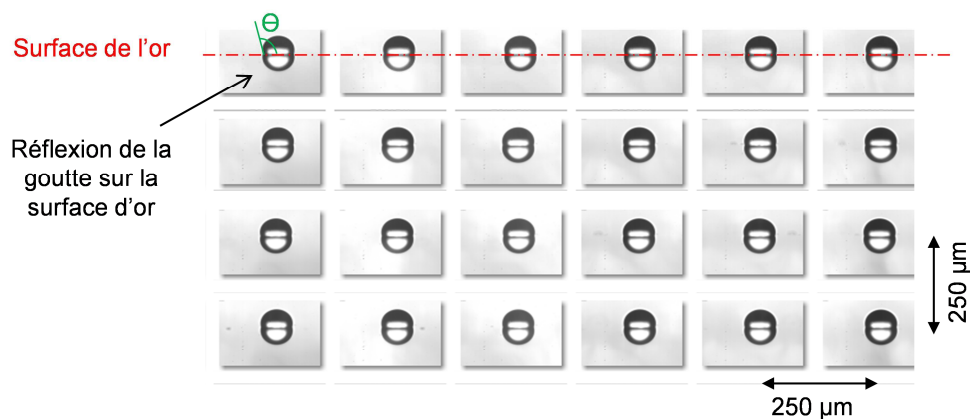


Figure 34: Gouttes d'eau (observées de côté) déposées sur la SAM d'ODT à intervalles de 250 μm observées à l'aide du goniomètre « picoLitre ». On observe également le reflet des gouttes sur la surface.

En conclusion, les SAM d'ODT utilisées pour les expériences SFG respectent deux critères :

- un angle de contact initial de $\sim 110^\circ$
- une variation de cette valeur au cours du temps $\theta(t = 300 \text{ s, gonio. macro.})$ inférieure à 10° .

Le spectre SFG expérimental

Le spectre SFG de la SAM d'ODT exposée à l'air (interface solide/air) fait apparaître une réponse non résonnante provenant des états électroniques de la surface d'or éventuellement perturbés (ou « hybridés ») par les molécules d'ODT, ayant la forme spectrale du faisceau infrarouge (spectre de référence, Figure 35), qui interfère avec la réponse résonnante provenant des modes de vibration d'élongation C-H des groupes méthylènes et du groupe méthyle qui constituent la molécule d'ODT (spectre expérimental, Figure 35). Le déphasage entre réponses non-résonnante et résonnante est tel que les modes de vibration d'élongation C-H apparaissent en creux sur le fond résonant. Par ailleurs, seuls les modes du groupe méthyle sont intenses, conformément aux observations de la littérature décrites plus haut (126) :

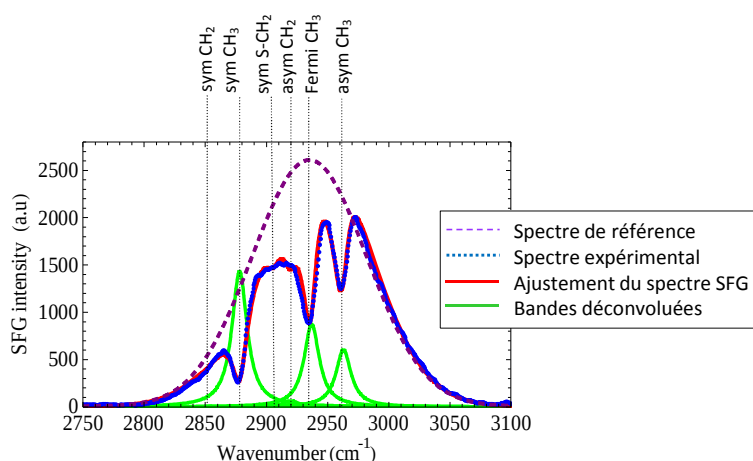


Figure 35 : Spectre expérimental de la SAM d'ODT exposée à l'air (en traits bleus pointillés) et du cristal GaAs exposé à l'air (courbe pointillée violette). L'ajustement réalisé suite à la déconvolution du spectre expérimental est indiqué par la courbe rouge et les bandes déconvoluées du profil spectral du laser et des effets d'interférence sont montrées en courbes vertes.

Afin d'obtenir les informations chimiques, spectrales et structurales qu'apporte la spectroscopie SFG, une déconvolution rigoureuse des spectres est réalisée avec le logiciel Mathematica en utilisant la formule suivante (129) (130) (131):

$$I_{SFG}(\omega_{IR}) \propto \underbrace{g(\omega_{IR})}_{\text{intensité du spectre SFG}} \underbrace{\left[\chi_{NR} e^{i\varphi_{NR}} + \sum_v \frac{A_v e^{i\varphi_v}}{\omega_{IR} - \omega_v + i\Gamma_v} \right]}_{\substack{\text{profil spectral du laser IR} \\ \text{terme constant provenant de l'interface} \\ \text{Bandes de vibration modélisées par des fonctions Lorentziennes}}}^2 \quad (1)$$

avec $g(\omega_{IR})$, le profil spectral du faisceau infrarouge (enregistré sur le spectre de référence de GaAs)

$\chi_{NR}e^{i\varphi_{NR}}$, la réponse non résonnante constante d'origine électronique provenant de la surface d'or : χ_{NR} est la susceptibilité non résonnante et φ_{NR} , la phase non résonnante.

A_v , l'amplitude de la fonction Lorentzienne relative au mode de vibration v .

ω_v , la fréquence du mode de vibration v .

ω_{IR} , la fréquence infrarouge.

Γ_v , la demi-largeur à mi-hauteur de la fonction Lorentzienne relative au mode de vibration v , 2Γ = FWHM (Full Width at Half Maximum).

φ_v , la phase du mode de vibration v

On obtient alors la différence de phase entre la réponse non résonnante et la réponse résonnante du mode de vibration v : $\Delta\varphi_v = \varphi_{NR} - \varphi_v$.

Le nombre de paramètres décrivant le spectre SFG est important. Mathématiquement, il n'est pas possible de déterminer tous les paramètres de façon stricte car l'équation (1) n'admet pas de solution unique **(132)**. Pour obtenir une analyse reproductible des spectres d'un échantillon à l'autre, certains paramètres ont été fixés :

- les demi-largeurs à mi-hauteur Γ de tous les modes de vibrations des groupes CH_2 et CH_3 sont supposées égales. Physiquement, un profil Lorentzien correspond à une distribution homogène des molécules qui sont toutes identiques : la largeur correspond alors à la durée de vie du mode de vibration qui est inversement proportionnelle au couplage de la vibration avec l'environnement (la surface d'or) (pour une distribution inhomogène de sites d'adsorption, la variation de fréquence associée aux variations d'environnement des molécules est le facteur déterminant du profil spectral, qui devient gaussien). On s'attend à ce que les largeurs à mi-hauteur des modes de vibration des groupes méthylènes et méthyles soient proches. Cette hypothèse est raisonnable car les groupes CH_2 et CH_3 sont très semblables chimiquement. Lors de la déconvolution des spectres la précision obtenue pour la demi-largeur Γ est de $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.
- la différence de phase $\Delta\varphi_v$ est également supposée identique ($\Delta\varphi$) pour tous les modes de vibration. La phase dépend des interactions électroniques intramoléculaires et entre surface, adsorbats, et milieu environnant la surface. Lorsqu'il n'y a pas d'interaction vibronique les fonctions d'onde vibrationnelles sont réelles et il n'apparaît pas de phase φ_v . Quand la surface est exposée à l'air, la différence de phase $\Delta\varphi$ a été mesurée expérimentalement en optimisant simultanément la déconvolution d'une vingtaine de spectres de la SAM d'ODT, réalisés à différentes dates dans des conditions variables. On a obtenu $\Delta\varphi = \varphi_{NR} - \varphi_v = \varphi_{NR} = 290^\circ$ en prenant arbitrairement l'origine des phases $\varphi_v = 0$.
- les fréquences ω_v des modes de vibration de la SAM d'ODT étant bien connues, elles ont été fixées aux valeurs rappelées dans le Tableau 2.

Avec ces choix, la déconvolution des spectres d'ODT donne des intensités relatives entre modes du méthyle parfaitement reproductibles. Il est arrivé parfois que la déconvolution ne donne pas le résultat normal : dans ce cas, il s'est avéré que l'angle de contact n'était pas normal non plus.

Dans la littérature, les modes de vibration d'élongation symétrique et antisymétrique des groupes méthylènes à 2850 et 2918 cm^{-1} respectivement sont le plus souvent négligées, considérant que les chaînes sont en conformation tout trans. Cependant, comme nous l'avons vu plus haut, l'intensité des groupes méthylène n'est pas nulle, et leur faible intensité est due à une combinaison de deux effets : la centro-symétrie locale, qui annule la contribution des 16 groupes CH_2 par paires à partir du haut de la chaîne, et l'orientation du CH_2 du pied de chaîne, dont les moments de transition IR s'écartent trop peu du plan de la surface pour contribuer efficacement au spectre. Toutefois la prise en compte des modes CH_2 , même peu intenses, modifie les intensités relatives des bandes de CH_3 . Lors de la déconvolution du spectre SFG de la SAM d'ODT, nous ne négligeons donc pas les modes de vibration des groupes CH_2 .

Optimisation de la déconvolution du spectre SFG

Dans ce paragraphe, l'importance d'une déconvolution rigoureuse des spectres SFG exposée ci-dessus sera illustrée, ainsi que la nécessité de prendre en compte la bande d'élongation symétrique de S-CH_2 .

La Figure 36 représente différentes déconvolutions du même spectre expérimental SFG de la SAM d'ODT exposée à l'air :

- la Figure 36.A montre qu'en n'utilisant que cinq fréquences (celles des vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique du groupe CH_3 et du groupe CH_2 ainsi que la résonance de Fermi du groupe méthyle) et en laissant tous les différents paramètres varier (i.e. les amplitudes, les phases et les largeurs à mi-hauteur), une très bonne déconvolution du spectre expérimental est obtenue. Le résultat de l'ajustement donne une différence de phase $\Delta\phi$ variant de 255 à 326° et des demi-largeurs à mi-hauteurs variant de 7,1 à 8,56 cm^{-1} .

Comme il a été mentionné plus haut, la grande qualité de l'ajustement est obtenue grâce à un nombre de paramètres trop grand. Du coup il pèse en réalité sur chaque paramètre une grande incertitude. La déconvolution n'est pas unique : un autre jeu de paramètres peut également permettre d'obtenir une déconvolution correcte du même spectre expérimental (un autre ajustement permet d'obtenir une différence de phase $\Delta\phi$ variant de 279 à 351° et Γ_v variant de 7,74 à 10,46). Cette constatation a également été prouvée mathématiquement (132). De ce fait, les résultats obtenus ne sont pas reproductibles d'un support à un autre, même si les autres méthodes de caractérisation de ces supports indiquent qu'ils sont de bonne qualité. Nous sommes donc conduits à réduire le nombre de paramètres d'ajustement, ainsi que nous l'avons exposé ci-dessus.

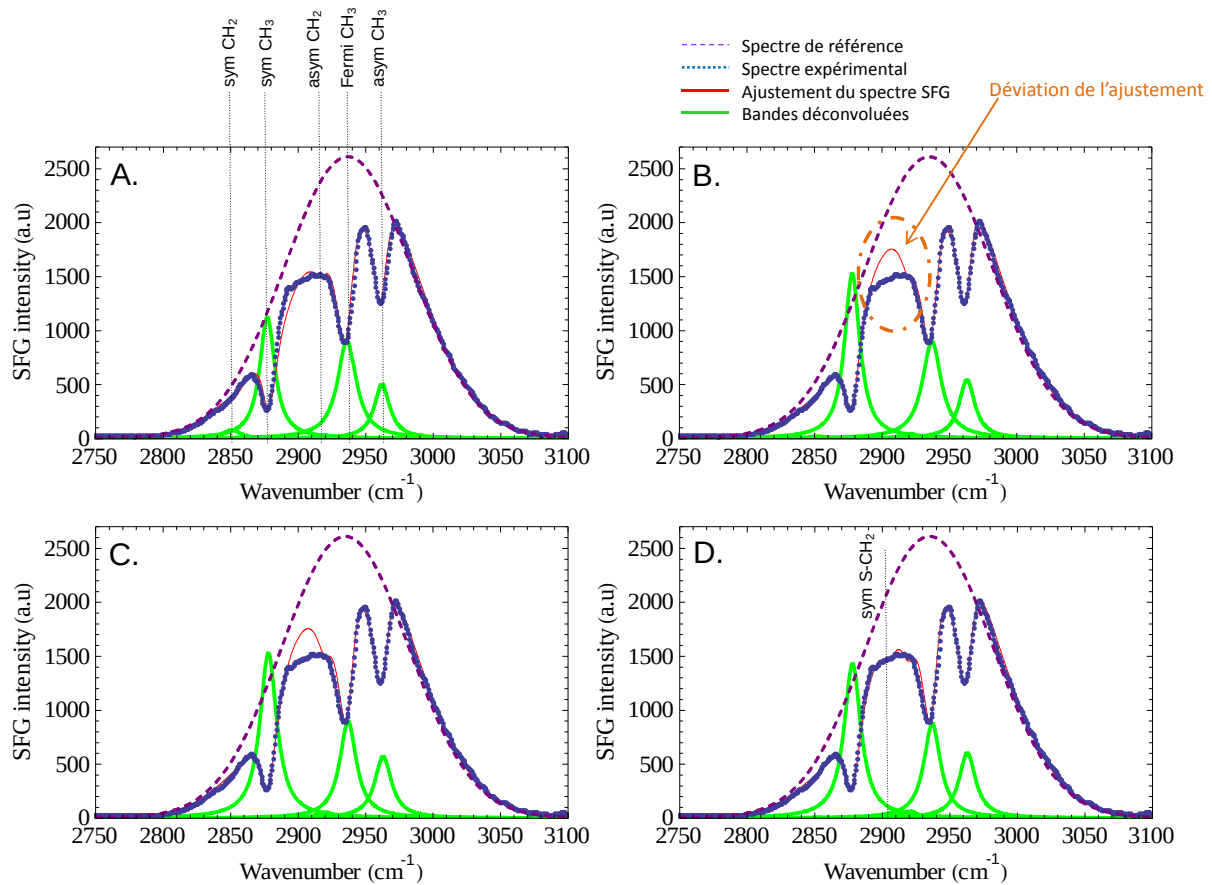


Figure 36 : Spectre SFG expérimental de la SAM d'ODT (courbe bleue) et sa déconvolution (courbe rouge) ayant pour paramètres : A. 5 bandes vibrationnelles, $255 < \Delta\varphi_v < 326^\circ$, $7,1 < \Gamma_v < 8,56$, B. 5 bandes vibrationnelles, $\Delta\varphi = 290^\circ$, $7,1 < \Gamma < 8,56$, C. 5 bandes vibrationnelles, $\Delta\varphi = 290^\circ$, $\Gamma = 7,6$ et D. 6 bandes vibrationnelles, $\Delta\varphi = 290^\circ$, $\Gamma = 7,6$. Le spectre de référence (courbe violette) ainsi que les bandes de chaque mode de vibration ont été ajoutés (courbes vertes).

- la déconvolution de la Figure 36.B est obtenue en fixant la différence de phase de tous les modes vibrationnels à la valeur de 290° (valeur moyenne obtenue sur l'ajustement d'une vingtaine de spectres). Le résultat de l'ajustement conduit à des demi-largeurs à mi-hauteur Γ_v variant de 7,1 à 8,56.
- la déconvolution de la Figure 36.C est également obtenue en fixant la différence de phase $\Delta\varphi$ à la valeur 290° mais aussi la demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma_v = \Gamma = 7,6$.

Ces deux dernières déconvolutions permettent d'obtenir un bon ajustement du spectre expérimental, avec toutefois une difficulté dans la région spectrale $2890 - 2920 \text{ cm}^{-1}$. Cette déviation a été systématiquement observée pour tous les spectres la SAM d'ODT exposée à l'air.

- la déconvolution de la Figure 36.D résulte pour tous les modes de vibration d'une phase de la réponse résonnante fixe ($\Delta\varphi = 290^\circ$), d'une demi-largeur de bande à mi-hauteur fixe ($\Gamma_v = \Gamma = 7,6$) et de l'ajout d'une bande à 2905 cm^{-1} ayant les

mêmes valeurs de phase et de largeur que les autres modes. Ainsi, le spectre expérimental est bien déconvolué, malgré la forte réduction du nombre de paramètres ajustés, et elle est reproductible, condition indispensable pour pouvoir apprécier si le changement d'environnement de la SAM produit ou non un changement de conformation de la SAM.

L'intensité de ce nouveau mode de vibration est comparable à celle des groupes méthylènes (très faible), et le mode est attribué à la vibration d'élongation symétrique du groupe CH₂ proche de l'atome de soufre, ainsi que nous l'avons déjà précisé dans le paragraphe II – 2 – 4.

Calculs *ab initio*

Afin de vérifier la pertinence de l'attribution d'une 6^{ème} bande dans le spectre de la SAM d'ODT, des calculs *ab initio* basés sur la théorie Hartree-Fock ont été réalisés sous Gaussian avec la base HF/6-31G(D) par W. Zheng au sein de notre groupe sur deux systèmes différents :

- la molécule isolée de décanethiol –SH-(CH₂)₉-CH₃, 93 modes de vibration (nombre modes de vibration = 3x nombre d'atomes – 6 (rotation, translation) = 3x 33 – 6).
- la molécule isolée de butanethiol –SH-(CH₂)₃-CH₃, 39 modes de vibration.

Le choix de ces alcanethiols isolés et plus courts que la molécule d'octadécane thiols répond au besoin de limiter le temps de calcul. A noter que la résonance de Fermi ne peut pas être calculée par cette méthode.

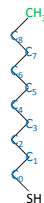
Butanethiol	Mode de vibration	Fréquence (cm ⁻¹)	Intensité IR
	Symétrique CH ₂ : délocalisé sur toute la chaîne	2851	30
	localisé sur HS – C ₁ H ₂	2897	41
	Symétrique CH ₃ : localisé sur CH ₃	2862	40
	Fort couplage / mélange des vibrations symétriques (et antisymétriques respectivement) entre les groupes CH ₃ et CH ₂ .		
Décanethiol	Mode de vibration	Fréquence (cm ⁻¹)	Intensité IR
	Symétrique CH ₂ : délocalisé sur toute la chaîne	2835	0,17
		2836	0,92
		2840	1,33
		2842	0,82
		2845	0,40
		2848	4,17
	délocalisé sur C ₅ H ₂ – C ₆ H ₂ – C ₇ H ₂	2851	226,56
	localisé sur HS – C ₁ H ₂	2896	45,18
	Antisymétrique CH ₂ : localisé sur HS – C ₁ H ₂	2942	39,84
	Symétrique CH ₃ : localisé sur CH ₃	2876	35,80
	Antisymétrique CH ₃ : localisé sur CH ₃	2930	135,78

Figure 37 : Données obtenues sur les modes de vibration des molécules butanethiol et décanethiol isolées par le calcul *ab initio* basé sur la théorie Hartree-Fock.

Trois résultats importants en ressortent (Figure 37) concernant la molécule de décanethiol :

- il existe 7 modes de vibration symétrique des groupes méthylènes sur la chaîne carbonée mais ils n'ont pas tous la même intensité. Le mode à la fréquence de 2851 cm^{-1} présente une intensité infrarouge intense par rapport aux autres modes de vibration (environ 100 fois plus intense) et se trouve localisé en milieu de chaîne sur trois atomes de carbone ($n^{\circ}5, 6, \text{ et } 7$). Dans les autres modes de vibration, les déplacements des atomes de part et d'autre du milieu de la chaîne se trouvent être quasiment en opposition de phase en conformation trans, conduisant à un dipôle variant très peu avec la vibration, et donc à une réponse infrarouge très faible. On constate donc que l'hypothèse de modes locaux pour les CH_2 , que nous utilisons pour le calcul des spectres SFG en fonction de la conformation, ne correspond pas exactement à la réalité : en fait, l'intensité IR est portée par un mode propre beaucoup plus intense que les autres, qui est légèrement délocalisé. Cependant, il n'y a pas d'autre choix que les modes locaux pour calculer les spectres en fonction de la conformation, puisque le calcul par modes propres demanderait, *pour chaque conformation*, le calcul des modes, celui de l'hyperpolarisabilité de chaque mode, et enfin le calcul du spectre SFG. D'autre part, même si une base n'est pas la mieux adaptée pour décrire une molécule, elle ne donne pas pour autant des résultats complètement faux, tant que la base choisie est complète et que des couplages forts entre les états propres de la base ne sont pas ignorés. Le fait que les modes propres sont loin d'être délocalisés sur toute la longueur de la chaîne est une indication rassurante.
- un mode de vibration symétrique du groupe méthylène est localisé sur l'atome de carbone proche de l'atome de soufre (carbone $n^{\circ}0$) à une fréquence plus grande que les sept autres modes présentés ci-dessus : 2896 cm^{-1} . Son intensité infrarouge est du même ordre de grandeur que les intensités des modes de vibration symétrique et antisymétrique du groupe méthyle.
- le mode de vibration antisymétrique de ce groupe CH_2 a une fréquence de 2942 cm^{-1} (soit 46 cm^{-1} de plus que la fréquence du mode symétrique de ce même groupe).

Les calculs *ab initio* concernant le butanethiol isolé montrent une forte délocalisation des modes de vibration symétriques (ou antisymétriques) sur les groupes méthyle et méthylènes. Il est intéressant de noter que cette forte délocalisation a disparu dans le cas de la chaîne à 10 atomes de carbone, comme nous venons de le voir. Cependant, une des vibrations symétriques du groupe méthylène est très localisée sur le carbone proche du soufre, avec pour fréquence 2897 cm^{-1} .

Sur la base de ces deux calculs, on peut supposer que la molécule d'ODT au sein de la SAM présente elle aussi un mode de vibration symétrique CH_2 localisé sur le carbone proche du soufre et caractérisé par une fréquence proche de 2900 cm^{-1} . Expérimentalement, la déconvolution des spectres SFG nous conduit donc à attribuer la fréquence de $2905 \pm 1\text{ cm}^{-1}$ à ce mode, comme indiqué plus haut dans le Tableau 2.

Introduction d'un paramètre phénoménologique pour rendre compte de l'orientation du groupe méthyle

Les modes de vibration d'élongation dominant dans le spectre SFG de la SAM d'ODT sont ceux du groupe méthyle qui est en bout de la chaîne d'ODT. Leurs intensités relatives permettent d'extraire l'orientation du groupement méthyle, qui à son tour, en tenant compte des contraintes sur la conformation des chaînes (conformation tout trans sauf en pied de chaîne, géométrie tétraédrique autour de tous les atomes de carbone) nous permet de remonter aux angles Θ , Φ et ψ_1 décrits plus haut. Il est pratique de définir un paramètre facile à extraire des spectres (indépendamment de notre programme de calcul de spectre SFG qui nous permet de calculer précisément l'orientation du groupe méthyle) qui nous permet de caractériser l'orientation du groupement méthyle.

Nous définissons le rapport phénoménologique R entre l'intensité de la vibration symétrique du groupe CH_3 (tenant compte de la résonance de Fermi qui emprunte une partie de son intensité au mode de vibration d'élongation symétrique de CH_3) et l'intensité de la vibration antisymétrique du groupe CH_3 :

$$R = \frac{I_{\text{sym CH}_3} + I_{\text{Fermi}}}{I_{\text{asym CH}_3}}$$

avec I_v , l'intensité maximale du mode de vibration v donnée par la déconvolution des spectres SFG expérimentaux : $I_v = \left(\frac{A_v}{\Gamma_v}\right)^2$

A_v , l'amplitude de la courbe Lorentzienne relative au mode de vibration v

Γ_v , la demi-largeur à mi-hauteur de la courbe Lorentzienne relative au mode de vibration v .

On peut prévoir comment varie R lorsque le groupe méthyle est plus ou moins incliné sur la surface. L'intensité SFG est proportionnelle au produit scalaire du moment dipolaire de transition vibrationnel $\boldsymbol{\mu}$ (entre $v''=0$ et $v'=1$) et du champ électrique infrarouge $\mathbf{E}_{\text{IR}}$ dans le cadre de l'approximation dipolaire électrique (118) :

$$I_{\text{SFG}} \propto \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E}_{\text{IR}}$$

Ainsi, l'intensité de chaque mode de vibration I_v sera d'autant plus importante que le produit scalaire $(\boldsymbol{\mu}_v \cdot \mathbf{E}_{\text{IR}})$ sera important. Sur un métal, le champ électrique $\mathbf{E}_{\text{IR}}$ local est quasiment perpendiculaire à la surface du substrat (Figure 38.A). La direction des moments de transition $\boldsymbol{\mu}_v$ de chaque mode de vibration du groupe CH_3 dépend de son orientation. Par conséquent, l'intensité SFG de chaque mode de vibration v dépend de l'orientation du groupe méthyle (Figure 38) :

- si le groupe méthyle est perpendiculaire à la surface, le moment dipolaire symétrique du groupe CH_3 ($\boldsymbol{\mu}_{\text{sym}}$) est parallèle au champ $\mathbf{E}$, alors que les moments dipolaires antisymétriques du groupe CH_3 ($\boldsymbol{\mu}_{\text{asym}}$) sont tous les deux perpendiculaires au champ $\mathbf{E}$: le produit scalaire $\boldsymbol{\mu}_{\text{sym}} \cdot \mathbf{E} \propto I_{\text{sym}}$ est maximal et $\boldsymbol{\mu}_{\text{asym}} \cdot \mathbf{E} \propto I_{\text{asym}}$ est minimal ce qui implique un rapport R important ($R \rightarrow \infty$).

- si le groupe méthyle est parallèle à la surface, μ_{sym} est perpendiculaire au champ E , alors que l'un des μ_{asym} est parallèle au champ E : le produit scalaire $\mu_{\text{sym}} \cdot E \propto I_{\text{sym}}$ est minimal et $\mu_{\text{asym}} \cdot E \propto I_{\text{asym}}$ est maximal, ce qui implique un rapport R très faible ($R \rightarrow 0$).

Lorsque la SAM d'ODT est exposée à l'air (Figure 38.B) le rapport R vaut $3,7 \pm 0,5$. L'incertitude sur ce paramètre tient compte des incertitudes relatives à la déconvolution des spectres (Annexe 1.B) et de la dispersion observée des valeurs de R obtenues sur les échantillons de la SAM d'ODT.

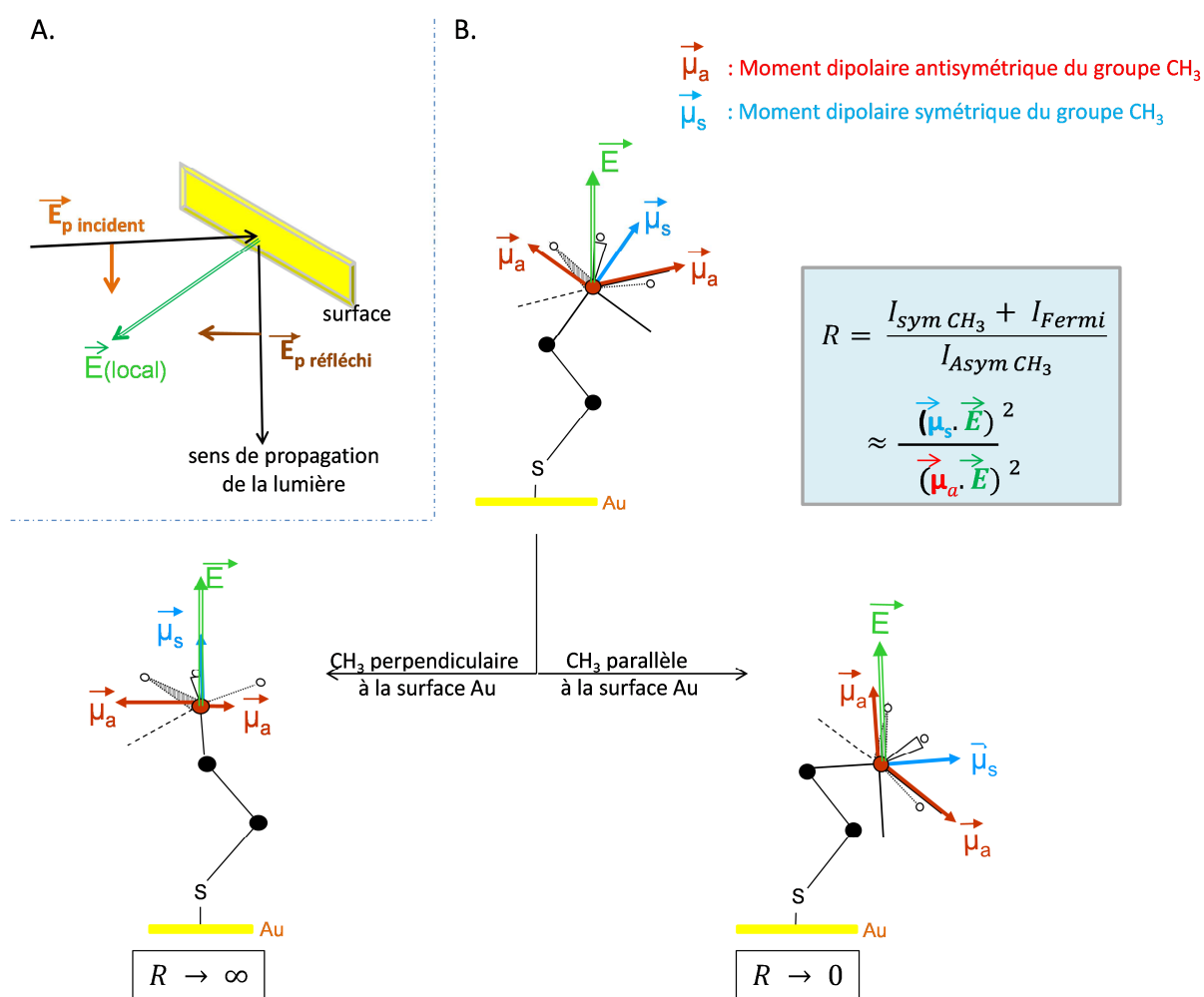


Figure 38 : A. Représentation schématique du champ électrique polarisé p à la surface de l'échantillon à analyser et B. Schéma d'une molécule d'ODT « tronquée » avec ses moments dipolaires symétrique (en bleu) et antisymétriques (mode de vibration doublement dégénéré, en rouge) du groupement méthyle. Le champ électrique E (en vert) est également représenté. La variation du rapport R en fonction de l'orientation du groupe CH_3 est également indiquée.

Conformation de la SAM d'ODT à l'air

Le calcul théorique du spectre SFG total de la SAM d'ODT exposée à l'air réalisé par la modélisation décrite au chapitre II – 2 – 4, montre que le spectre expérimental résulte de la superposition de deux spectres très différents correspondant aux deux types de molécules A et B (Figure 39). La conformation de l'ODT au sein de la SAM a les caractéristiques suivantes :

- les angles twist valent $\Phi_A = 242 \pm 3^\circ$ et $\Phi_B = 332 \pm 3^\circ$
- les angles de tilt du groupe méthyle a pour valeur $55.1 / 15.8 \pm 1.5^\circ$ (pour les molécules A et B respectivement).

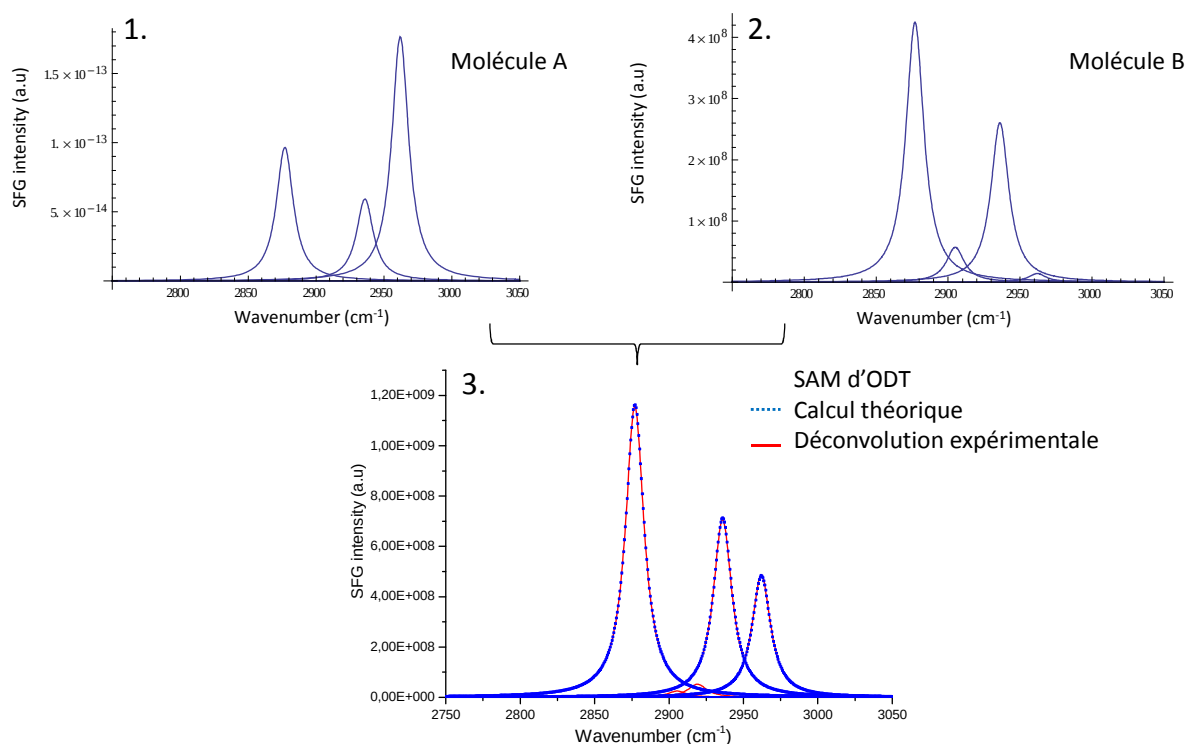


Figure 39 : Bandes de vibration de l'ODT dans la SAM. 1 : molécules ayant la conformation « A ». 2 : molécules ayant la conformation « B ». 3 : molécules de conformations « A » et « B » ensemble.

III – Effet de la biocontamination sur la SAM d'ODT

Dans ce chapitre, nous allons détailler à l'échelle moléculaire l'impact de l'adhésion bactérienne et de l'adsorption protéique, ou « biofouling » sur la conformation de monocouches autoassemblées d'ODT. La problématique est la suivante : comment la conformation de la SAM d'ODT est-elle influencée par les propriétés physico-chimiques des parois bactériennes et par la présence de protéines ? La SAM d'ODT limite-t-elle ou pas le biofouling ?

Dans cette perspective, nous étudierons l'adhésion de deux souches de bactéries *Lactococcus lactis* ayant des propriétés physicochimiques différentes, ainsi que le rôle de la présence d'albumine de sérum bovin (BSA : Bovin Serum Albumin), dans le but de se rapprocher des conditions *in vivo* de l'adhésion bactérienne. Les méthodes utilisées seront la SFG pour déterminer l'effet de la biocontamination sur la conformation de la SAM, et la microscopie confocale de fluorescence pour mesurer la densité de bactéries adhérentes au substrat.

III – 1 – Biomolécules : préparation, protocoles d'adhésion/adsorption, observation par différentes microscopies

III – 1 – 1 : Préparation des échantillons

Les bactéries

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à des bactéries lactiques de l'espèce *Lactococcus lactis*, des bactéries coccoïdes à gram positif (Figure 3, Figure 4, chapitre I). Ces bactéries sont utilisées pour la fermentation des produits laitiers. Elles rendent le milieu acide, permettant la formation d'acide lactique **(133)**. Deux souches ont été utilisées, l'une hydrophile (*L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363) et l'autre hydrophobe (*L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 PrtP+) (collection CNRZ de l'INRA, Jouy-en-Josas, France, cf. Annexe 2.B). Ce caractère hydrophobe a été obtenu en rendant actives les protéases PrtP (PrtP+) ancrées dans les parois cellulaires des bactéries sauvages. Ces protéases sont également capables d'hydrolyser des molécules hydrophobes **(134) (135) (136) (137)**. Ces bactéries *L. lactis* présentent une innocuité qui permet de les utiliser dans un laboratoire de physique ordinaire. Elles constituent un modèle des bactéries pathogènes du genre *Streptococcus*, qui sont beaucoup plus « dangereuses », et dont on veut améliorer la compréhension pour prévenir leur colonisation sur des surfaces. En particulier, les bactéries *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* ou *Streptococcus mutans* colonisent les appareillages orthodontiques qui peuvent causer des infections plus ou moins sévères telles que l'endocardite, la méningite ou d'autres infections qui s'étendent à partir de la plaque dentaire **(138)**.

Les souches bactériennes sont conservées à - 20°C dans un milieu de culture M17 (Difco) auquel est ajouté 0,5% (masse/volume) de glucose (Aldrich) et 50% (volume/volume) de glycérol, milieu nutritif et spécifique aux bactéries *L. lactis*.

Après décongélation à température ambiante, les souches sont mises en culture dans le milieu {M17 + 0,5% (masse/volume) glucose} durant 15 heures à l'étuve à 30°C (conditions optimales pour la croissance de ces bactéries, Figure 40.A). Cette mise en culture constitue le 1^{er} repiquage appelé R₁.

Un test de pureté de la solution bactérienne est réalisé afin de s'assurer de sa non contamination par d'autres bactéries. Il consiste à déposer une goutte de la suspension bactérienne et à l'étaler sur une gélose composée de milieu nutritif. Après quinze heures de croissance des bactéries sur la gélose à 30°C, une vérification visuelle est réalisée : les colonies bactériennes d'une même espèce ont la même forme et sont de la même couleur.

Suite au R₁, deux autres repiquages sont réalisés pour obtenir la suspension bactérienne de travail dans laquelle la population bactérienne est homogène en termes de caractéristiques physico-chimiques et en phase de croissance stationnaire (dans laquelle les

bactéries se multiplient et meurent avec la même vitesse) (cf. Annexe 2.C). Le second repiquage R_2 est obtenu par prélèvement d'1 mL de R_1 , re-dilué dans 9 mL de milieu de culture frais puis placé à l'étuve à 30°C pendant 8 heures. Le R_3 est obtenu par prélèvement de 16 μ L de R_2 , re-dilué dans 100 mL de milieu de culture frais puis placé à l'étuve à 30°C pendant 15 heures.

La suspension bactérienne de travail est ensuite centrifugée 10 minutes, à 7000 g et à 4°C (afin de stopper le développement bactérien). Le culot bactérien est alors repris dans de l'eau physiologique (solution de NaCl à 9 g.L⁻¹ dans l'eau distillée). Cette étape de lavage est reproduite deux fois afin d'éliminer totalement le milieu de culture (Figure 40.B).

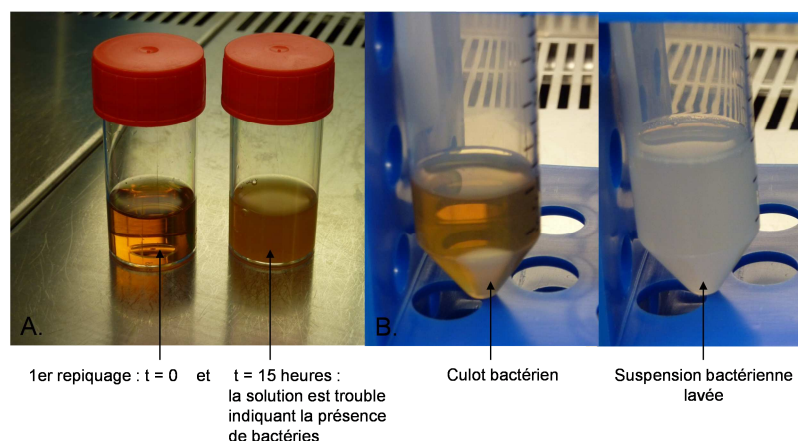


Figure 40 : A. Culture bactérienne du 1^{er} repiquage (1 mL de suspension bactérienne dans 9mL de milieu de culture) au temps $t=0$ et après 1 nuit à l'étuve à 30 °C et B. Bactéries après centrifugation avant et après être re-suspendues dans l'eau physiologique.

Ultimement, les bactéries sont remises en suspension dans de l'eau distillée pour le besoin des expériences de spectroscopies. Il faut encore s'assurer que chacune des deux souches bactériennes survit en milieu aqueux à l'échelle du temps de nos expériences, soit une dizaine d'heures.

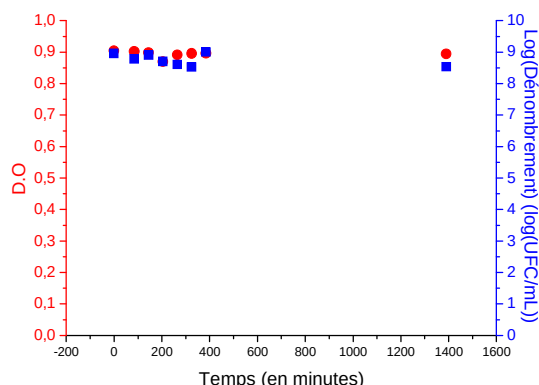


Figure 41 : Courbes de survie au cours du temps d'une suspension de *L. lactis* modifiées PrtP+ dans l'eau distillée réalisées par la mesure de la densité optique à 620 nm (points rouges) et par la mesure du dénombrement (points bleus).

L'étude de la survie des bactéries dans l'eau distillée a été réalisée par dénombrement par micro-spots et par des mesures de densité optique à 620 nm en fonction du temps (Figure 41, Annexe 2.C). Les résultats de la Figure 41 montrent une stabilité de la concentration bactérienne au cours du temps et ce pour chacune des deux souches démontrant que les bactéries *L. lactis* restent vivantes dans l'eau distillée durant les temps d'expérience.

La protéine

La protéine étudiée dans ce travail de thèse est l'Albumine de Sérum Bovin (BSA) une protéine modèle de masse molaire 66,43 kDa ($66\,430\text{ g.mol}^{-1}$) dont les propriétés structurales et physico-chimiques ont déjà fait l'objet d'un grand nombre de publications (20) (23) (139) (140). Son homologue humain, l'Albumine de Sérum Humain (HSA), est la protéine globulaire la plus abondante dans le plasma sanguin ($\sim 60\%$ des protéines du plasma à une concentration de $0,05\text{ g.mL}^{-1}$) permettant de maintenir la pression osmotique au sein des vaisseaux sanguins.

La structure cristallographique par diffraction de rayons X de la protéine BSA n'est pas connue. On suppose qu'elle est proche de celle de la protéine HSA, car les structures primaires des deux protéines présentent $\sim 76\%$ d'homologie (141).

La structure primaire de la BSA est composée de 607 AA (Figure 42.B). Les AA les plus abondants sont chargés (acide glutamique, lysine) ou non polaires (alanine, leucine). Il existe également un nombre important de cystéines qui comportent un atome de soufre et qui peuvent conduire à la formation de ponts disulfures lors de la formation de la structure secondaire de la protéine. La structure tertiaire de la protéine change selon le pH de la solution (142). Dans l'eau pour un pH compris entre 4,5 et 8, la protéine a une structure dite « normal » qui ressemble à un cœur ($30 \times 80\text{ \AA}^2$) comprenant 55% d'hélices alpha. A sa surface, on retrouve des groupements acides, basiques et hydrophobes (Figure 42.A) mais la protéine est globalement chargée négativement dans cette gamme de pH (142).

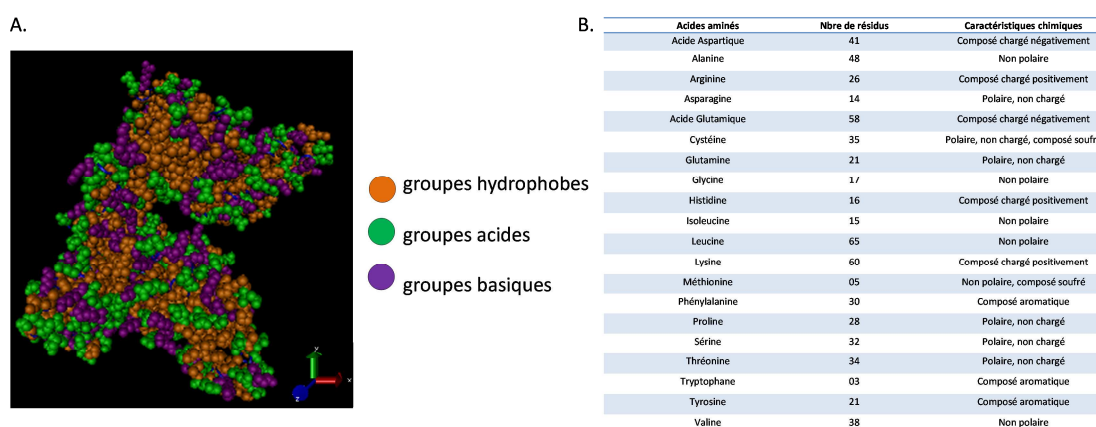


Figure 42: A. Structure 3D de la protéine HSA, proche de la BSA, réalisée grâce au logiciel VMD (programme de visualisation moléculaire 3D d'édifices biologiques). La séquence d'acides aminés de l'albumine provient de la « protein data bank » et B. Composition en acides aminés de la protéine BSA selon la Ref (140).

Dans ce travail, la protéine BSA (Acros), sans purification supplémentaire, a été diluée dans l'eau distillée (pH $\approx$ 5,5) afin d'obtenir des concentrations protéiques de 0,01-0,05-0,1-0,5 et 1 mg.mL⁻¹.

III – 1 – 2 : Protocoles d'adhésion/adsorption

Adhésion bactérienne sur la SAM d'ODT

L'adhésion des bactéries *Lactococcus lactis* a été réalisée en déposant 200 μ L de suspension à une concentration de 4.10^9 UFC/mL (Unité Formant Colonie/mL, cf. Annexe 2.A) de bactéries dans l'eau distillée sur les supports SAM d'ODT. Après 90 minutes, le surnageant est remplacé par de l'eau distillée (Figure 43) pour éviter qu'un biofilm ne se développe pendant les mesures SFG et de microscopie.

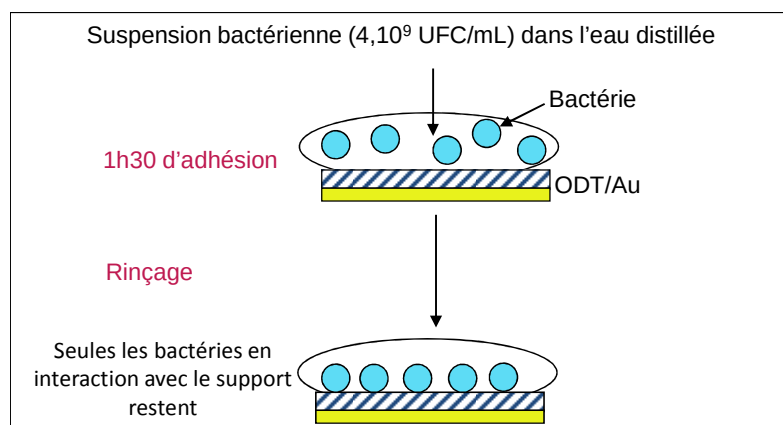


Figure 43 : Schéma de principe de l'adhésion bactérienne sur la SAM d'ODT.

Dans certaines expériences, afin de contrôler l'effet des ions sur l'adhésion bactérienne, l'eau distillée a été remplacée par une solution de nitrate de potassium KNO₃ à 10⁻¹ mol.L⁻¹.

Adsorption des protéines BSA sur la SAM d'ODT

La SAM d'ODT est immergée dans les différentes solutions de BSA pendant 90 minutes puis rincée trois fois avec de l'eau distillée afin d'éliminer toutes les protéines qui ne sont pas adsorbées sur la surface (Figure 44). On obtient alors ce qu'on appelle un film protéique primaire sur la SAM. Afin de limiter la contamination de la surface par d'autres molécules ou organismes, l'adsorption des protéines est réalisée en milieu stérile sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM).

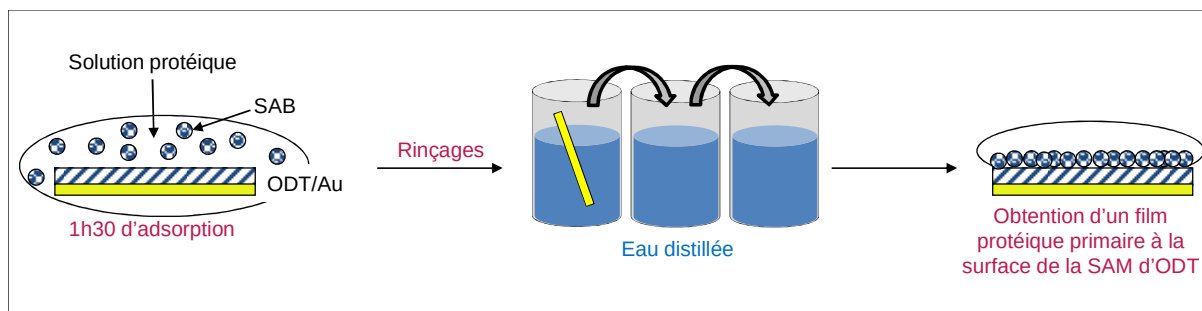


Figure 44 : Schéma du protocole expérimental de préparation d'un film de protéines à la surface de la SAM d'ODT.

Adhésion des bactéries en présence de protéines BSA

Différents protocoles ont été utilisés dans le cadre de ce travail afin de comprendre l'impact de l'adhésion bactérienne sur la surface SAM en présence de protéines. Pour ces études, la concentration protéique est fixée à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ et celles des suspensions bactériennes des deux souches hydrophobes et hydrophiles à 4.10^9 UFC/mL .

Protocole 1 : On dépose sur la SAM d'ODT recouverte d'un film primaire protéique comme décrit ci-dessus, une suspension bactérienne de *Lactococcus lactis* dans l'eau distillée pendant 90 minutes. Le surnageant est ensuite retiré et remplacé par de l'eau distillée.

Protocole 2 : Une suspension de bactéries et de protéines dans l'eau distillée est déposée sur la SAM d'ODT pendant 90 minutes. Comme précédemment, le surnageant est remplacé par de l'eau distillée.

Protocole 3 : La suspension contenant les bactéries et les protéines est centrifugée pendant 10 minutes, à 7000 g afin d'éliminer toutes les protéines qui ne sont pas en interaction « forte » avec les bactéries. Le culot obtenu est remis en suspension dans l'eau distillée puis déposé sur la SAM d'ODT. Après 90 minutes d'incubation, le surnageant est éliminé et remplacé par l'eau distillée.

Formation des biofilms bactériens sur la SAM d'ODT

Dans les protocoles d'adhésion bactérienne décrits ci-dessus, les supports sont totalement recouverts par les bactéries afin que les spectres SFG soient enregistrés sur une surface aussi homogène que possible. Les bactéries peuvent toutefois être en interaction plus ou moins forte avec le support. Les mesures d'épifluorescence permettant de quantifier la densité de bactéries en interaction « forte » avec la SAM d'ODT nécessitent que la surface soit retournée provoquant ainsi le décrochage des bactéries les moins liées.

La surface inversée est ensuite à nouveau immergée :

- soit dans l'eau distillée pour le comptage des bactéries adhérentes
- soit dans le milieu de culture des bactéries *L. lactis* (milieu {M17 + 0,5% (masse/volume) glucose}) afin de permettre aux bactéries encore adhérentes à la SAM d'ODT de se développer et de former un biofilm. Le biofilm bactérien est obtenu en déposant la boîte dans une étuve à 30°C pendant 24 heures en condition statique.

III – 1 – 3 : Observation par différentes microscopies

Zétaphérométrie sous microscope optique

La charge globale de surface d'une bactérie est déterminée par une mesure de mobilité électrophorétique M.E. (143) (144) définie par :

$$M.E. = \frac{v}{E}$$

avec v , la vitesse de déplacement d'une bactérie en solution

E , le champ électrique auquel est soumise la bactérie en solution

La M.E. est caractéristique de la bactérie dans l'environnement particulier où est faite la mesure (solvant, viscosité, pH, etc...).

Dans une solution neutre circulante, la bactérie est soumise à deux types de forces :

- la force de frottement : $f = 6\pi\eta r.v$

avec η : la viscosité du milieu et r , le rayon de la bactérie supposée sphérique

- la force électrostatique : $f' = q.E$

avec q : la charge globale portée par la bactérie

Lorsque la bactérie circule à vitesse constante (équilibre), la somme des forces est nulle ($f = f'$). La mobilité électrophorétique peut alors s'écrire en fonction de la charge de la bactérie :

$$M.E. = \frac{q}{6\pi\eta r} \text{ (en m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}.$$

Le rapport $\frac{q}{r}$ est appelé densité de charge de la bactérie.

On mesure cette mobilité électrophorétique à l'aide d'un appareil commercial appelé zétaphéromètre (Zetapheromet II, CAD Instrument, Les Essarts le Roi, France, Figure 45). La suspension bactérienne est placée dans une cuve rectangulaire de trajet optique 2 mm reliée à deux électrodes sphériques soumises à un champ électrique d'environ 5 V.cm⁻¹. Deux électrodes supplémentaires séparées par une distance connue précisément permettent de mesurer la valeur exacte du champ électrique au sein de la suspension bactérienne.

Sous l'effet de ce champ électrique, les bactéries chargées migrent. Leur vitesse est mesurée optiquement : la cuve est placée sous un microscope (Olympus) et illuminée en son centre par un laser. La suspension bactérienne est suffisamment diluée (~10⁷ UFC/mL dans

l'eau physiologique) pour que l'on puisse observer la mobilité des bactéries individuelles. Le déplacement des bactéries est imagé à l'aide d'une caméra permettant d'acquérir une image par seconde.

Une mesure statistique de la vitesse est obtenue par l'application d'un champ électrique oscillant qui permet toutes les 10 secondes, d'entraîner un changement de sens de migration des bactéries.

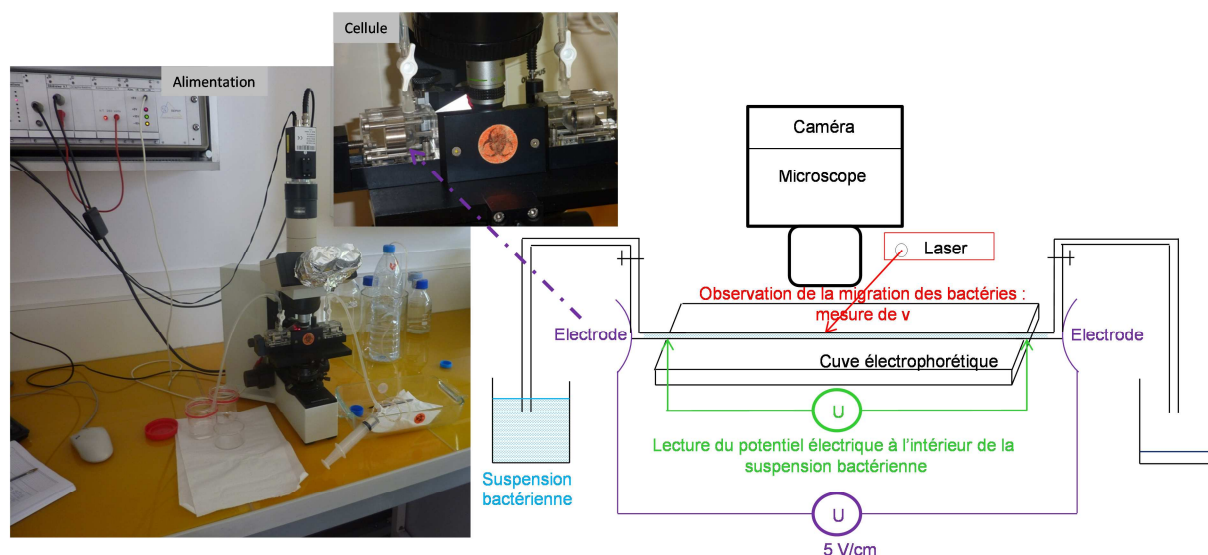


Figure 45 : Photo du montage expérimental (à gauche) et schéma de principe (à droite) d'une mesure de mobilité électrophorétique (M.E.).

Les mesures de mobilité électrophorétique ont été réalisées entre $\text{pH} \approx 5,5$ et $\text{pH} = 2$ par ajout d'acide nitrique. Lorsque la mobilité électrophorétique est nulle, cela signifie que les bactéries ne migrent pas et sont globalement neutres : le pH pour lequel cette situation est observée est appelé point isoélectrique de la bactérie.

Il est à noter qu'avec notre appareil, il est possible de mesurer la mobilité électrophorétique des bactéries mais pas des protéines beaucoup trop petites.

La microscopie électronique à balayage (MEB)

Pour contrôler le recouvrement bactérien sur la surface de la SAM d'ODT qui sera sondée par la spectroscopie SFG ($\sim 100 \mu\text{m}^2$), nous avons utilisé dans un premier temps la microscopie électronique à balayage (MEB) **(145) (146)**. Cette technique permet d'accéder à une résolution nanométrique et de caractériser l'état (i.e. bactéries mortes, vivantes, dégradées) et la forme des cellules suite à leur adhésion sur le support. Les expériences ont été menées pour les SAM recouvertes de chacune des souches hydrophobes et hydrophiles de *L. lactis* en l'absence de protéines. Cette analyse par MEB prenant beaucoup de temps, elle n'a été reproduite que sur deux échantillons. La caractérisation du recouvrement de la SAM

d'ODT par les bactéries est réalisée de manière plus routinière par microscopie d'épifluorescence (voir ci-après).

Le principe de la microscopie électronique repose sur l'interaction d'un faisceau monocinétique d'électrons focalisé sur l'échantillon sur un diamètre très faible (~ 10 nm dans le cas du MEB utilisé dans ce travail, de l'ordre de 0,1 nm sur les MEB les plus sophistiqués). L'interaction du faisceau d'électrons avec l'échantillon se traduit par des collisions multiples avec les atomes de la cible qui génèrent différents processus : émission de rayons X, d'électrons Auger, d'électrons secondaires. On peut obtenir les informations de différentes manières, à partir des électrons transmis ou diffusés, en mode d'imagerie « simple » (enregistrement de l'intensité des électrons transmis ou diffusés en fonction de la localisation du faisceau d'électrons), ou par spectroscopies mesurées localement : perte d'énergie des électrons, Auger. Dans le cadre de ce travail, on s'intéressera uniquement à l'émission d'électrons secondaires : un électron incident (ou rétrodiffusé) éjecte par collision un électron d'un atome de la cible (Figure 46.A). Ces électrons secondaires de faible énergie cinétique (quelques dizaine d'eV) sont donc émis près de la surface de l'échantillon (à une profondeur comprise entre 5 et 10 nm) et sont sensibles à sa topographie (Figure 46.C).

Nous avons utilisé le microscope MEB S-4500 sous vide (Hitachi, Japon de la plateforme MIMA2, logiciel d'acquisition des images Quartz PCI 5). Le canon d'électrons est soumis à une tension d'accélération $V_{acc} = 8$ kV avec une intensité $I = 7$ μ A. Les électrons secondaires émis sont convertis en photons par un scintillateur puis amplifiés par un photomultiplicateur (Figure 46.B). Dans l'enceinte, les échantillons sont inclinés de 30 à 45° pour permettre leur visualisation 3D et obtenir un meilleur contraste. Selon la topographie de la surface (défauts convexes ou concaves), l'intensité des électrons secondaires émis est différente donnant lieu à une image contrastée (Figure 46.C).

La microscopie électronique a diverses contraintes. Elle nécessite un vide poussé car les électrons interagissent très efficacement avec la matière et ne peuvent donc pas s'y propager. Les échantillons doivent être conducteurs pour que la surface ne se charge pas sous le faisceau d'électrons. Les bactéries étant non conductrices, on les recouvre d'une fine couche d'or (200-300 Å). Pour ce faire, on les fixe chimiquement (blocage du métabolisme des cellules) sur la SAM afin que la métallisation n'altère pas l'adhésion bactérienne. Environ 500 μ L de glutaraldéhyde à 3 % (volume/volume) (agent stérilisé fixateur de cellules, Sigma) dans un tampon de cacodylate de sodium (10^{-1} mol.L⁻¹) est ajouté sur la surface couverte de bactéries pendant une nuit entière. Trois rinçages de 15 minutes au tampon cacodylate ($0,2$ mol.L⁻¹ à pH = 7,4) sont réalisés pour retirer l'excédent de glutaraldéhyde.

Les échantillons sont alors déshydratés en effectuant 20 cycles (d'environ 30 minutes) dans lesquels le milieu aqueux est remplacé peu à peu par de l'éthanol absolu de titres croissants (de 50 % à 100 %) afin d'éviter la modification structurale des cellules bactériennes et pour préserver l'adhésion. Suit alors l'étape de métallisation réalisée par évaporation cathodique d'un mélange d'or/plomb sous vide pendant 210 secondes (ion JFC-1100E pulvérisation, Jeol, Japon). Les bactéries meurent au cours de cette préparation, mais le

protocole suivi permet de les « figer » et d'apprécier l'état qu'elles avaient juste avant la métallisation. Les échantillons se conservent des années.

Une expérience de contrôle est réalisée avec des bactéries en suspension dans l'eau distillée puis déposées sur une surface d'aluminium, afin de s'assurer que les conditions de fixation chimique / déshydratation / métallisation des bactéries n'altèrent pas leur structure.

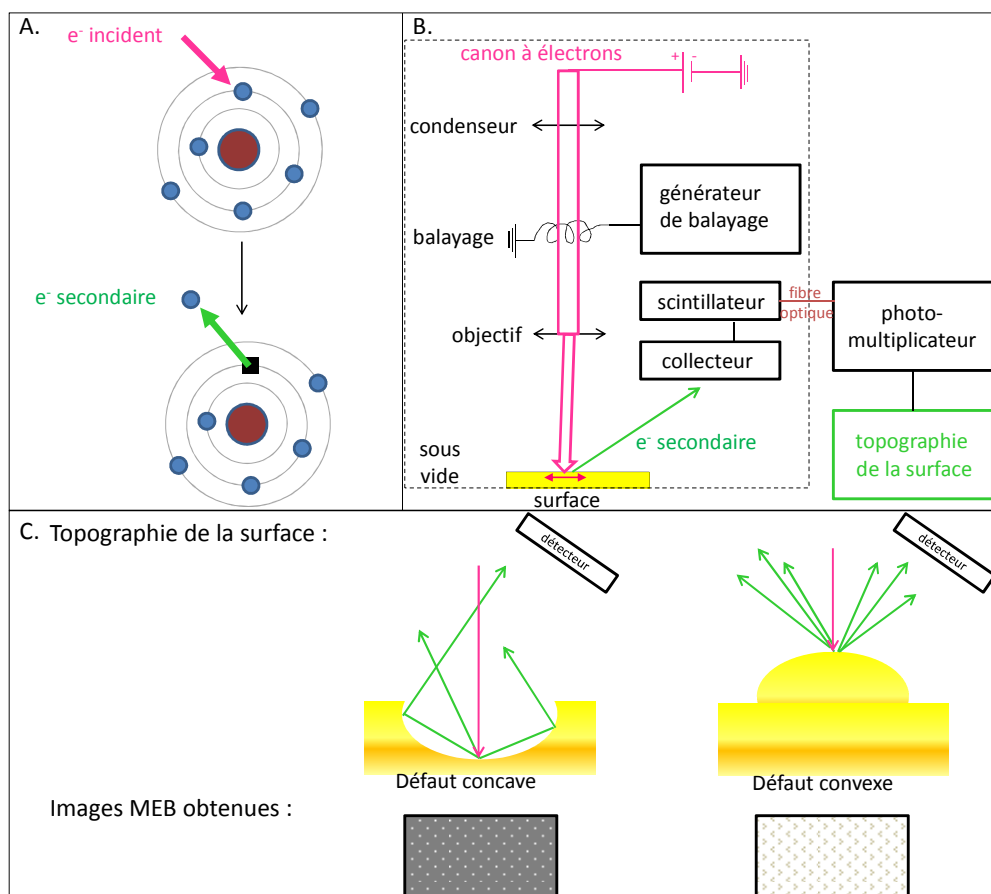


Figure 46 : A. Schémas d'émission d'électrons secondaires, B. Principe de fonctionnement d'un MEB et D. Images MEB obtenues pour différentes topographies de surface.

La microscopie de fluorescence

Le contrôle du bon recouvrement des SAM par les bactéries a été systématiquement sondé par microscopie d'épifluorescence classique (le principe de la fluorescence est rappelé dans l'Annexe 2.D). Pour ce faire, nous avons utilisé un microscope optique d'épifluorescence droit (Olympus BX51, Figure 47) : dans cette configuration, l'échantillon est éclairé par le dessus (lampe à vapeur de mercure X-cite 120Q, EXFO), la fluorescence est collectée du même côté que la lumière excitatrice, par le même objectif. Les faisceaux excitateurs et de fluorescence sont séparés au moyen d'un miroir dichroïque (Figure 47). Les images d'intensité de fluorescence sont numérisées à l'aide d'une caméra CCD refroidie

(Monochrome fluorescence CCD XM10 camera, Olympus). On utilise alternativement deux objectifs x10 (taille de la zone observée : 1,25 x 0,935 mm²) et x40 (0,31 x 0,233 mm²).

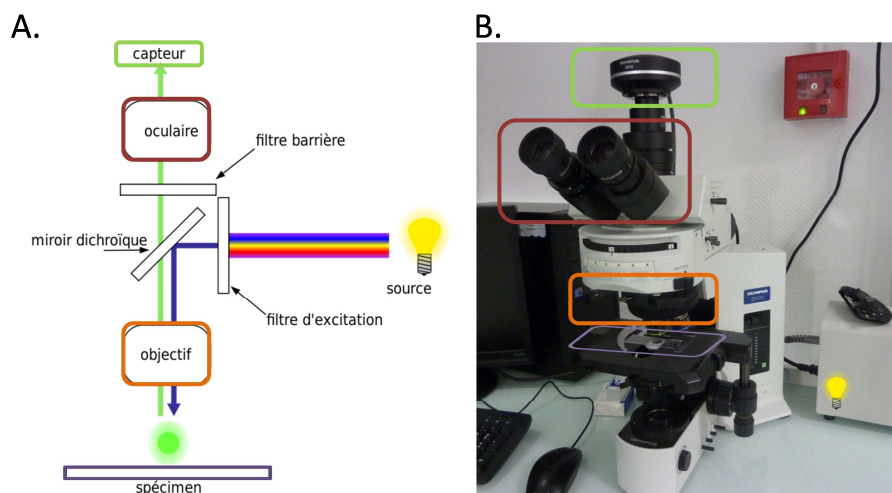


Figure 47 : A. Schéma de principe d'un microscope optique droit fonctionnant en épifluorescence. B. Photo du microscope utilisé.

Pour ces mesures, les bactéries ont été rendues fluorescentes par action de l'acridine orange (rendement quantique de fluorescence $\Phi_{F(\text{acridine orange})} = 0,46$). Ce chromophore pénètre les parois de toutes les cellules bactériennes (mortes ou vivantes) pour se fixer à leur ADN ou à leur ARN par intercalation. Les spectres d'excitation et d'émission de l'acridine orange dans l'eau distillée et intercalée dans l'ADN sont présentés sur les Figure 48.A et Figure 48.B respectivement. On observe un décalage du maximum d'absorption vers les grandes longueurs d'onde lorsque le chromophore se lie à l'ADN (de 435 nm à 500 nm). En excitant dans la bande spectrale 460 – 490 nm, seule l'acridine orange liée à l'ADN est excitée (dans ce domaine spectral, l'absorption de l'acridine orange en solution est quasi nulle).

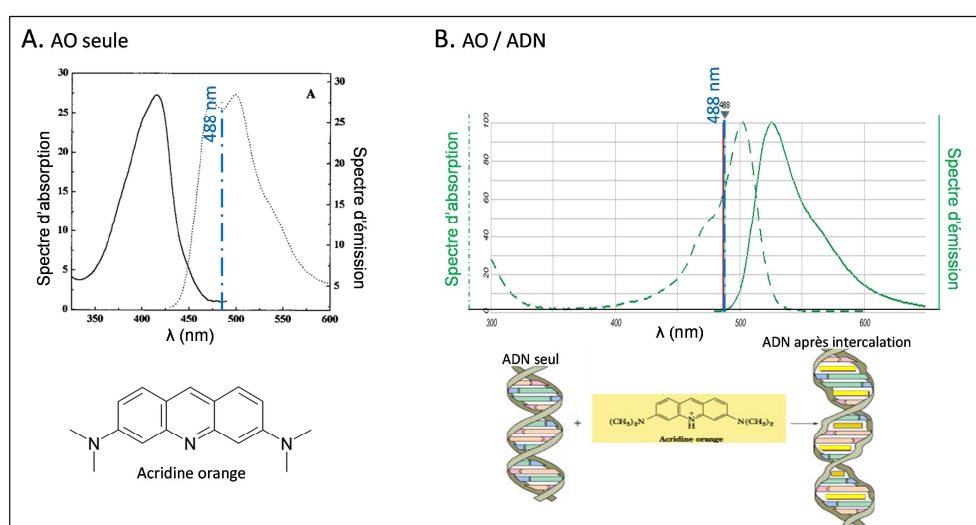


Figure 48 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de l'acridine orange A. dans l'eau distillée (Reprinted (adapted) with permission from (147), Copyright (2012) American Chemical Society) et B. liée à l'ADN (Invitrogen).

Expérimentalement, on dépose sur la SAM d'ODT sur laquelle des bactéries ont adhéré une solution d'acridine orange à 5% dans l'eau distillée pendant 15 minutes dans l'obscurité (pour éviter tout effet de photosensibilisation). Un rinçage à l'eau est ensuite effectué pour éliminer le colorant non fixé.

L'adhésion des bactéries sur la SAM d'ODT et le développement successif des biofilms ont été observé par microscopie confocale de fluorescence (Microscope Confocal à Balayage Laser (MCBL), microscope Leica SP2, Leica Microsystems, France, plateforme MIMA2 à l'INRA de Massy, Figure 49.A). Pour nos études, nous avons utilisé comme source excitatrice la raie à 488 nm d'un laser continu à argon. La meilleure résolution axiale des images est obtenue grâce à la présence d'un trou de filtrage (pinhole) adapté qui permet d'éliminer la fluorescence émise par les plans sous et sur-jacents au plan de focalisation.

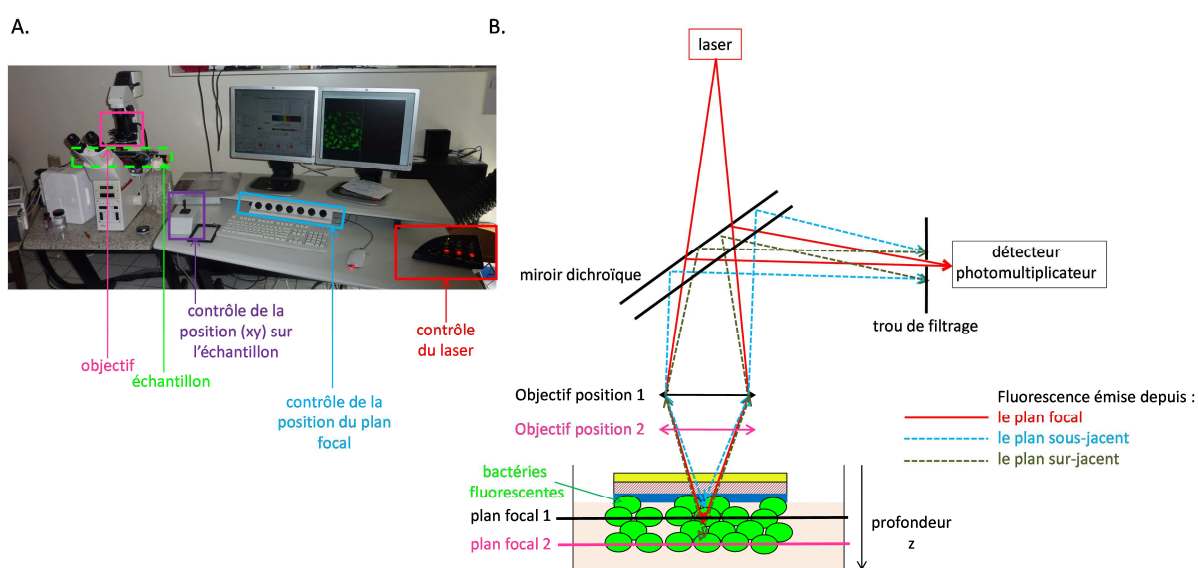


Figure 49 : A. Photo du microscope confocal de la plateforme MIMA2 et B. Principe de l'obtention de l'image 3D de l'échantillon : selon la position de l'objectif, le plan focal change de profondeur (image d'une autre section de l'échantillon).

Pour réaliser les images de fluorescence ($92.6 \times 91.5 \mu\text{m}^2$), le faisceau laser est déplacé sur l'échantillon au moyen d'un système de miroirs galvanométriques dans la direction horizontale (image 2D) et au moyen d'un moteur dans la direction verticale permettant ainsi d'obtenir des images 3D des échantillons (changement de la profondeur du point focal au sein de l'échantillon) (Figure 49.B).

Pour l'imagerie de fluorescence confocale, les bactéries ont été marquées au SYTO9 (rendement quantique de fluorescence $\Phi_{\text{F(SYTO9)}} = 0,58$, Invitrogen) qui se fixe, comme l'acridine orange, par intercalation à l'ADN et à l'ARN des cellules (Figure 50).

Expérimentalement, une solution de SYTO9 dans l'eau distillée ($4,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$) est injectée sous la SAM d'ODT recouverte de biomolécules. Après 15 minutes dans l'obscurité, l'échantillon est placé sous le microscope et analysé au moyen d'objectifs à l'air de

grossissement x10 ou x40 ($92.6 \times 91.5 \mu\text{m}^2$). L'émission de fluorescence est collectée entre 500 et 600 nm. Le dénombrement des bactéries adhérentes à la surface est obtenu en traitant chaque image xy avec le logiciel ImageTool (UTHSCISA, San Antonio, USA) qui permet de définir un seuil de comptage, de binariser et d'analyser le contour des cellules bactériennes.

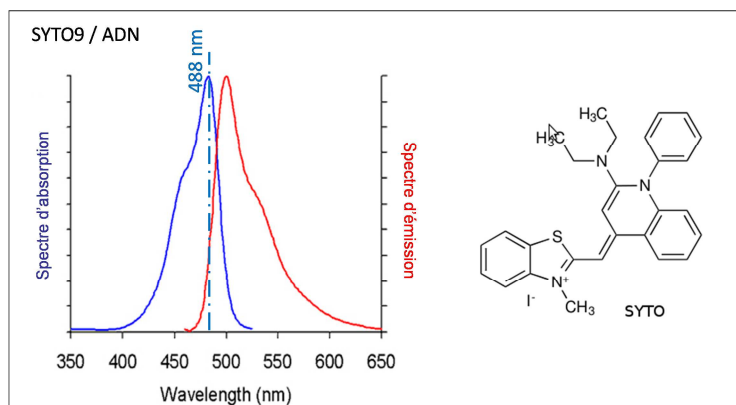


Figure 50 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence du SYTO9 lié à l'ADN excité à $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ (Invitrogen).

Dans le cas de l'observation d'un biofilm bactérien dans son épaisseur, on déplace axialement l'objectif par pas de $0,1 \mu\text{m}$ (objectif x40) ou de $0,3 \mu\text{m}$ (objectif x10). La reconstruction des images 3D des biofilms est réalisée grâce au logiciel IMARYS.

III – 2 – Etude par SFG et microscopie confocale de fluorescence de la compétition entre l'adsorption de protéines et l'adhésion bactérienne

III – 2 – 1 : Propriétés électrostatiques des bactéries en solution et en présence de protéines

Les résultats de mobilité électrophorétique des bactéries en absence de protéines sont illustrés sur la Figure 51. Chacune des deux souches bactériennes est globalement chargée négativement au pH expérimental (pH = 5,5). Néanmoins, les bactéries *L. lactis* sauvages hydrophiles sont chargées plus négativement (point isoélectrique obtenu pour pH < 2 ; densité de charge des bactéries hydrophiles à pH = 5,5 égale à $-6,5 \cdot 10^{-7} \text{ C} \cdot \text{m}^{-1}$) que les bactéries *L. lactis* PrtP+ hydrophobes (point isoélectrique à pH = 2,9 ; densité de charge des bactéries hydrophobes à pH = 5,5 égale à $-3,6 \cdot 10^{-7} \text{ C} \cdot \text{m}^{-1}$).

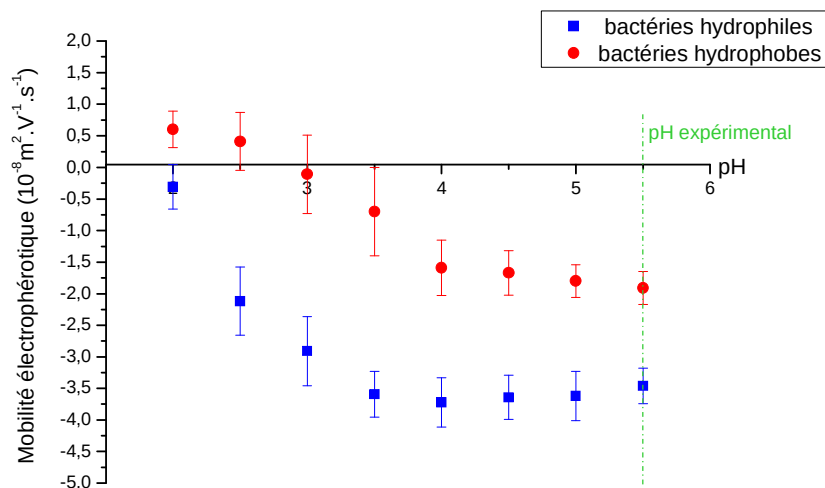


Figure 51: Mobilité électrophorétique en fonction du pH d'une suspension bactérienne *L. lactis* hydrophile (en bleu) et *L. lactis* PRTP+ hydrophobe (en rouge).

Cette différence de charge globale portée par les bactéries (d'un facteur 2 au pH expérimental) pourra alors entraîner des changements physico-chimiques dans le processus d'adhésion sur une surface **(148)**.

Ces mesures ont également été conduites pour des suspensions bactériennes en contact avec les protéines BSA. Nous avons d'abord vérifié que les bactéries ne se multiplient pas en présence de BSA. Pour ce faire, les bactéries ont été mises en suspension avec la protéine BSA ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) dans l'eau distillée et un dénombrement des cellules bactériennes a été réalisé toutes les heures durant sept heures (Figure 52). Aucune multiplication des bactéries hydrophiles ou hydrophobes n'a été observée en présence de protéines démontrant que la BSA n'est pas un élément nutritif pour les deux bactéries testées.

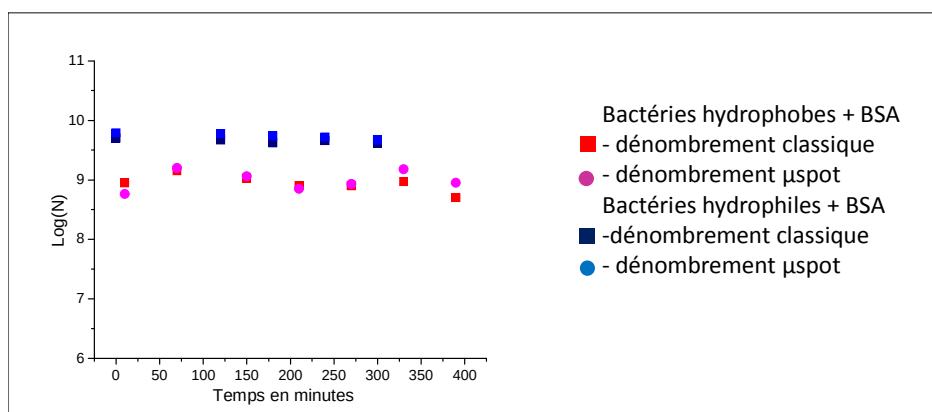


Figure 52 : Dénombrements des bactéries *L.lactis* hydrophiles (points bleus) et hydrophobes (points rouges) en présence de protéines BSA : $\log N(\text{dénombrements}) = f(\text{temps})$. Les dénombrements « classiques » et « μspots » décrits en annexe 2.A ont été effectués. Ils donnent des résultats identiques.

Les mesures de mobilités électrophorétiques (M.E.) des bactéries en présence de protéines sont illustrées Figure 53. Pour chaque souche bactérienne, le point isoélectrique (pI) est obtenu à des pH plus élevés qu'en absence de protéines :

- pI = 3,25 pour les bactéries hydrophiles en contact avec la BSA à comparer à pI < 2 pour les bactéries hydrophiles seules.

- pI = 3,75 pour les bactéries hydrophobes en contact avec la BSA à comparer à pI = 2,9 pour les bactéries hydrophobes seules.

Ce résultat indique que la protéine BSA interagit avec la paroi bactérienne pour les deux souches étudiées, mais que les protéines ne couvrent qu'une partie de la bactérie. Considérant que le point isoélectrique $pI_{(BSA, \text{eau}, 25^{\circ}\text{C})} = 4,5$ (139) et en utilisant l'expression ci-dessous :

$$pI_{(bactéries)} \cdot (1 - \text{taux de recouvrement}) + pI_{(BSA)} \cdot \text{taux de recouvrement} = pI_{(bactéries+BSA)}$$

Les protéines BSA ne recouvrent qu'approximativement 50 % de la surface des bactéries.

Afin de vérifier que ce taux de recouvrement de la paroi bactérienne par les protéines n'était pas dû à une concentration protéique insuffisante, une expérience complémentaire a été réalisée pour une concentration de BSA de 1 mg.mL^{-1} . Le point isoélectrique est toujours égal à 3,25 et 3,75 pour les bactéries hydrophiles et hydrophobes respectivement, indiquant qu'une bactérie n'est toujours recouverte ~50% par les protéines quel que soit la concentration protéique utilisée.

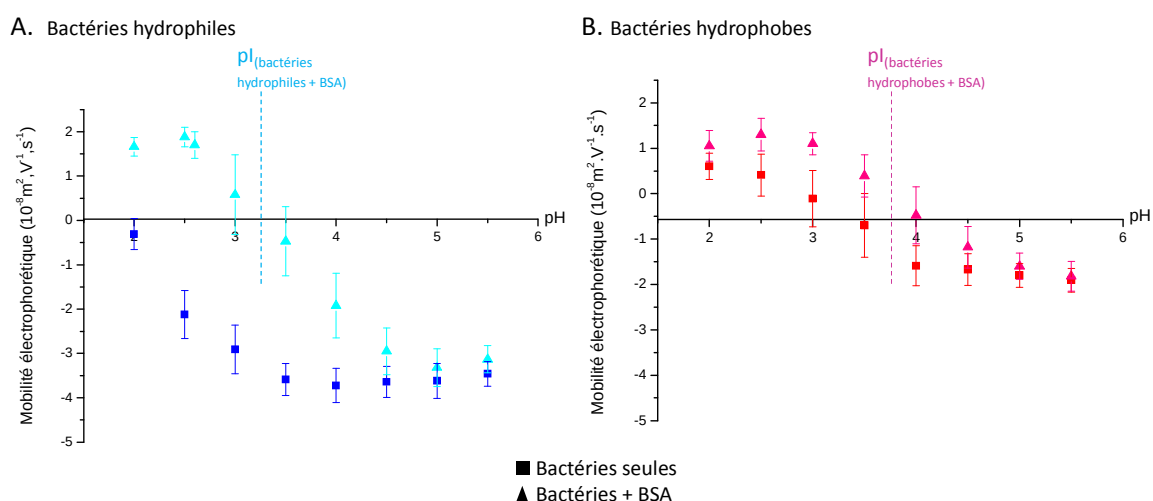


Figure 53: Mobilité électrophorétique en fonction du pH : A. suspension bactérienne *L.lactis* hydrophile en présence ou non de BSA. B. suspension bactérienne *L.lactis* PrtP+ hydrophobe en présence ou non de BSA.

Les mesures de mobilité électrophorétique ont aussi été réalisées sur la suspension bactérienne où l'excédent de protéines libres a été éliminé (cf. chapitre III – 1 – 2). Dans ce cas, les points isoélectriques $pI_{(bactéries \text{ recouvertes de BSA})}$ sont les mêmes que ceux obtenus pour les bactéries seules (Figure 54).

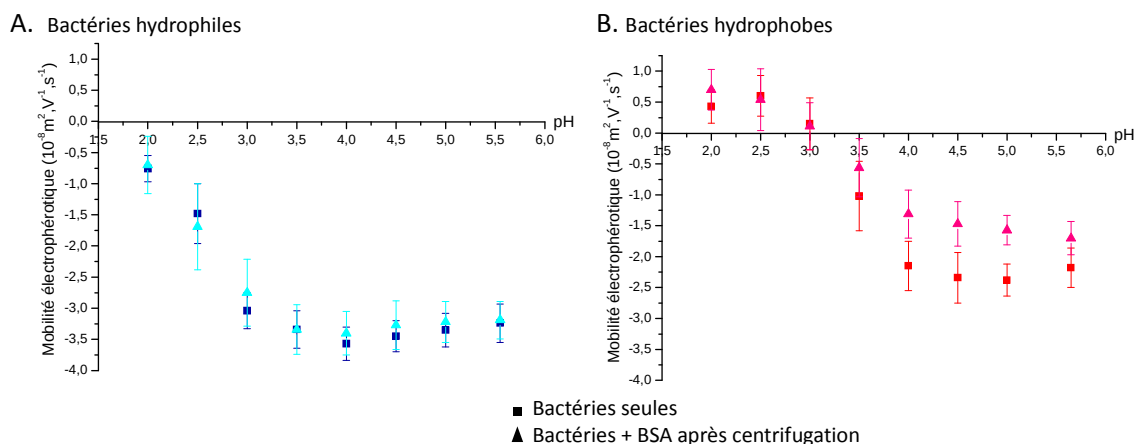


Figure 54: Mesures de mobilité électrophorétique en fonction du pH A. d'une suspension bactérienne *L.lactis* hydrophile recouvertes ou non de BSA et B. d'une suspension bactérienne *L.lactis* PrtP+ hydrophobe recouvertes ou non de BSA.

Il semble donc que la centrifugation qui permet de supprimer l'excédent de protéines a également pour effet de dissocier les protéines des bactéries. Cependant, les données SFG permettront d'écarter cette hypothèse (cf. chapitre III – 2 – 3). Plus probablement, la centrifugation modifie l'interaction BSA – bactérie de telle sorte que l'état de charge global de la bactérie n'est pas affecté par la présence des protéines.

III – 2 – 2 : Recouvrement des SAM d'ODT par les bactéries et les protéines

Caractérisation du recouvrement bactérien par microscopie de fluorescence : importance de la qualité du rinçage

Deux types de distribution spatiale des bactéries sur la SAM d'ODT ont été observés selon la qualité du rinçage pour éliminer les bactéries en suspension (Figure 55).

La Figure 55.A correspond à un échantillon rincé en plongeant le support dans un bécher d'eau distillée (rinçage « brutal ») puis égoutté à l'air avant d'être placé sous le microscope. Cette procédure a pour effet de déplacer des bactéries et de les regrouper sous l'action de forces capillaires et de former des « réseaux » de bactéries.

Pour éviter ce problème (qui rend l'échantillon spatialement inhomogène), le protocole de rinçage a été modifié. L'eau distillée est ajoutée « précautionneusement » à la suspension bactérienne et l'excès de solution s'écoule doucement sur les bords sans que les bactéries ne soient jamais exposées à l'air. On observe qu'alors l'adhésion bactérienne sur la SAM d'ODT reste homogène (Figure 55.B) et on peut estimer le taux de recouvrement de la SAM d'ODT par les bactéries à $60 \pm 10 \%$ (analyse numérique de l'image, cf. chapitre III – 1 – 3).

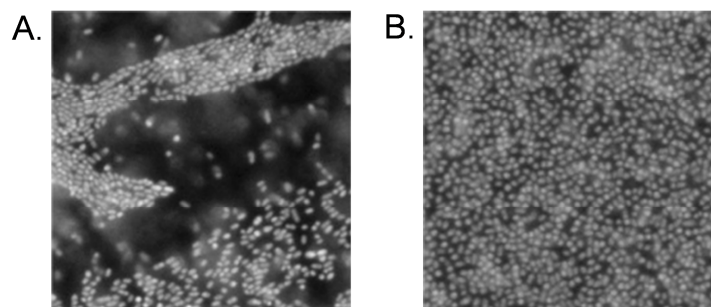


Figure 55 : Images en épifluorescence ($50 \times 50 \mu\text{m}^2$) de l'adhésion bactérienne sur la SAM d'ODT après un rinçage A. « brutal » (avec mise à l'air transitoire du support) et B. « avec précaution ».

On peut aussi dénombrer les bactéries en les décrochant du support par ultrasons puis en utilisant la méthode des micro-spots (cf. Annexe 2.A). Il faut noter que sous ultrasons, toutes les bactéries peuvent ne pas se décrocher, et qu'en outre la technique peut générer la mort de certaines cellules. Ainsi la population bactérienne peut être sous-estimée par cette méthode.

Les résultats de nos dénombrements montrent une population moyenne de 10^6 cellules/mL correspondant à une densité bactérienne sur la SAM d'ODT de $\sim (5 \pm 2) \cdot 10^5$ cellules/ mm^2 (la surface de la goutte de suspension bactérienne sur le support est de $\sim 50 \text{ mm}^2$). Considérant la surface d'une bactérie d'environ $S_{\text{bactérie}} = 8 \cdot 10^{-7} \text{ mm}^2$ (le diamètre d'une bactérie est d' $\sim 1 \mu\text{m}$), le recouvrement bactérien de la surface SAM d'ODT ($S_{\text{bactérie}} \times \text{Densité bactérienne}$) est estimé à $(50 \pm 20) \%$, en accord avec la valeur obtenue par imagerie de fluorescence.

Observation des bactéries après adhésion par microscopie MEB

En microscopie de fluorescence les bactéries apparaissent comme des points. Une image à haute résolution des bactéries, qui nous renseigne sur leur intégrité structurale sur la SAM d'ODT, est accessible par microscopie MEB (Figure 56).

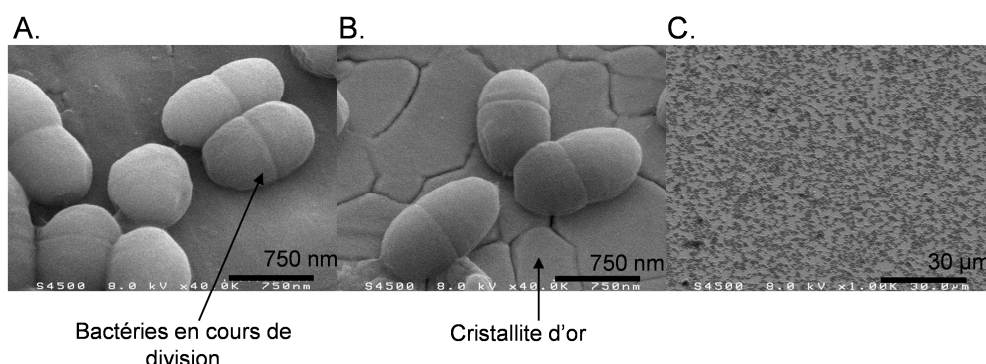


Figure 56 : Images au microscope électronique à balayage de bactéries *Lactococcus lactis* A. échantillon contrôle (bactéries en suspension) B. après 90 min d'adhésion sur la SAM d'ODT à une échelle comparable à la taille d'une bactérie (taille de la zone imagée : $2,85 \times 2,1 \mu\text{m}^2$) et C. à l'échelle de la zone du support sondée par spectroscopie SFG (taille de la zone imagée : $114 \times 84 \mu\text{m}^2$).

Comme on peut l'observer, les bactéries isolées ont conservé leur forme ovococcoïde et leur taille d'un micromètre de diamètre environ. On peut même observer des cellules en cours de mitose (division de la bactérie mère en deux bactéries filles), signe que les bactéries restent « en bonne santé » sur la SAM d'ODT, même sans nutriments. On remarque par ailleurs qu'il ne s'est pas formé de matrice extracellulaire et qu'une seule couche de bactéries recouvre la surface.

A partir d'une image MEB telle que celle représentée Figure 56.C il a été aussi possible d'estimer le recouvrement bactérien à environ 50 %.

La confrontation des données d'imagerie de fluorescence, de dénombrement et d'imagerie MEB permet d'estimer que le taux de recouvrement bactérien sur la surface de la SAM d'ODT est de l'ordre de (60 ± 10) % pour chacune des deux souches bactériennes.

Caractérisation du recouvrement protéique

Les protéines ne peuvent pas être observées directement par les microscopies MEB et d'épifluorescence en raison de leur taille ($30 \times 80 \text{ \AA}^2$ pour la BSA) qui est 100 fois plus petite que celle d'une bactérie *L. lactis*. Afin de contrôler l'état de surface de la SAM d'ODT suite à l'adsorption de la protéine BSA, des mesures topographiques par microscopie AFM et des mesures d'angles de contact avec de l'eau distillée ont été réalisées suivant les procédures décrites au chapitre II – 2.

Mesures d'AFM

Les topographies par microscopie AFM de surfaces SAM d'ODT après adsorption d'une solution de protéines BSA ($0,1$ et $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$) dans l'eau sont illustrées par la Figure 57.

Pour les deux concentrations protéiques, on remarque la présence de stries ou de traits blancs sur les cristallites d'or de la SAM (zones marron), qui correspondent probablement aux protéines adsorbées. On notera Figure 57.C que le passage répété de la pointe AFM sur la surface déplace les protéines et entraîne la formation de dépôts. Ces mesures de microscopie AFM nous permettent d'affirmer la présence de la BSA sur la SAM d'ODT mais ne permettent pas de conclure sur l'homogénéité du recouvrement de la surface par les protéines.

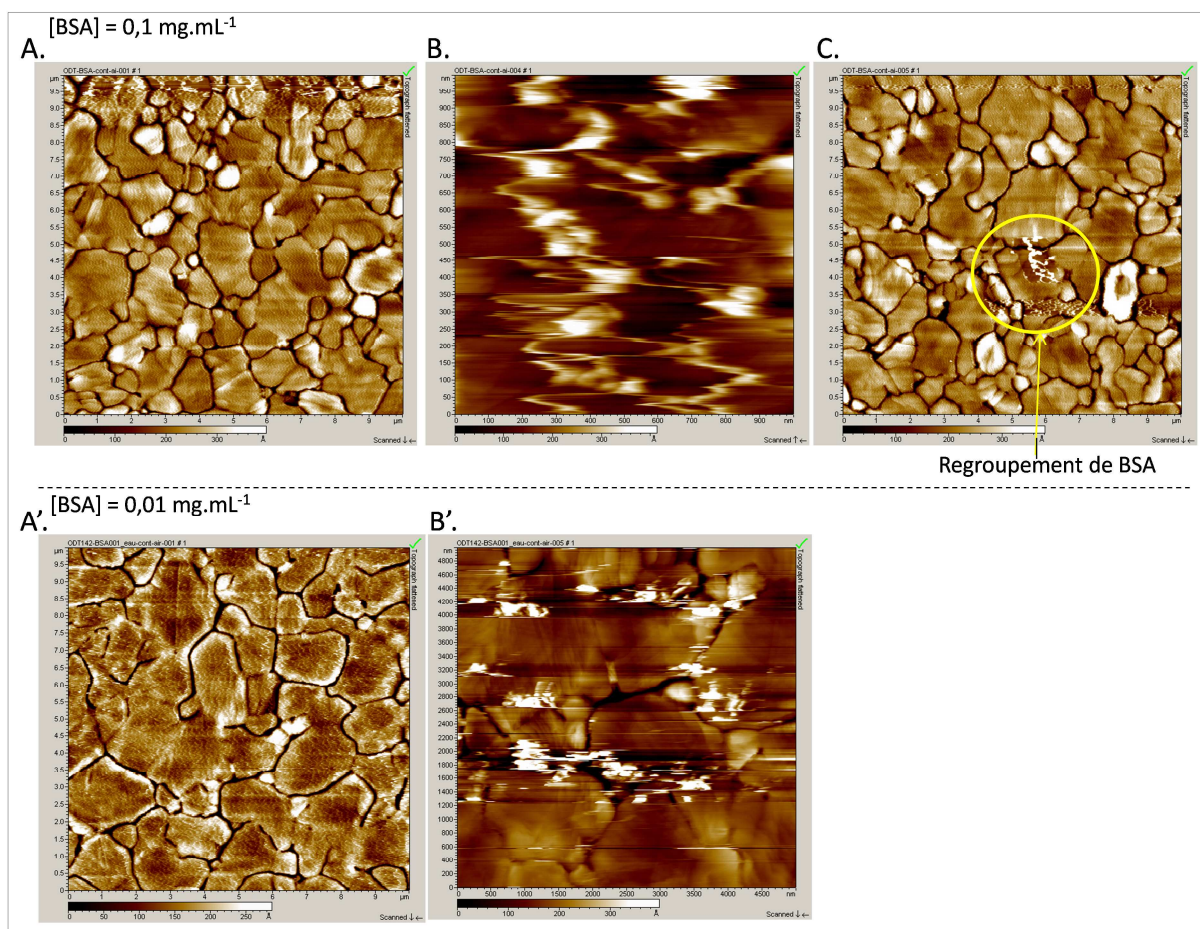


Figure 57 : Images AFM topographiques de la surface de la SAM d'ODT suite à l'adsorption de protéines BSA réalisées en mode contact : A, A'. Images 10x10 μm². B, B'. Zoom au centre de l'image précédente (1x1 μm²). C. Images 10x10 μm² de la même zone imagée en A après avoir obtenu l'image B : la pointe AFM déplace et regroupe les protéines BSA. A-C : [BSA] = 0,1 mg.mL⁻¹. A'-B' : [BSA] = 0,01 mg.mL⁻¹.

Mesures d'angle de contact

Le caractère hydrophobe / hydrophile de la surface de la SAM d'ODT consécutif à l'adsorption des protéines a été contrôlé par des mesures d'angles de contact.

Un support « contrôle » de la SAM d'ODT immergé dans l'eau distillée sans protéines a été analysé au goniomètre « macroscopique ». L'angle de contact initial ($\theta_{i(ODT+H_2O)} = 109 \pm 2^\circ$) est le même que celui mesuré pour l'ODT seul (Annexe 2.E) révélant que l'eau ne pénètre pas au sein du substrat, ne modifie par la structure des chaînes d'ODT et que la surface reste hydrophobe.

Les angles de contact sont ensuite mesurés à l'aide des goniomètres « macroscopique » et « picoLitre » sur des SAM d'ODT après adsorption de protéines à différentes concentrations comme décrit au chapitre III – 1.

L'ensemble des résultats est reporté dans le Tableau 3. En prenant en considération les incertitudes de mesure, les deux méthodes donnent des angles de contact très voisins, quelle que soit la concentration protéique utilisée, significativement inférieure à la valeur d'angle de contact mesurée pour la SAM d'ODT nue. Ces résultats démontrent que la couche de protéines adsorbées sur la SAM d'ODT rend la surface plus hydrophile, en accord avec les données de la littérature (149).

	Goniomètre «macroscopique»	Goniomètre « picoLitre »
ODT seul	$109 \pm 2^\circ$	$110,4 \pm 2^\circ$
ODT + BSA $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$	$74 \pm 3^\circ$	$63,3 \pm 5^\circ$
ODT + BSA $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$	$74 \pm 2^\circ$	$65,7 \pm 4^\circ$
ODT + BSA $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$	$72,3 \pm 2^\circ$	$62,5 \pm 4,3^\circ$
ODT + BSA $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$	$68 \pm 2^\circ$	$66,2 \pm 3,1^\circ$

Tableau 3 : Angle de contact initial de la SAM d'ODT après adsorption de protéines BSA à partir de différentes solutions protéiques, observé à l'aide des goniomètres « macroscopique » et « picoLitre » (cf. Annexe 2.E).

L'homogénéité de la couche de BSA a été contrôlée par mesures d'angle de contact réalisées avec le goniomètre « picoLitre » en différents points de la surface (Figure 58) : aucune variation n'a été mesurée sur toute la surface, révélant un recouvrement protéique homogène quelle que soit la concentration de la solution protéique déposée. Ceci suggère qu'au moins une monocouche de protéines est obtenue à toutes les concentrations. Il se peut que pour une concentration supérieure à $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$, la SAM d'ODT soit recouverte d'une multicouche de protéines.

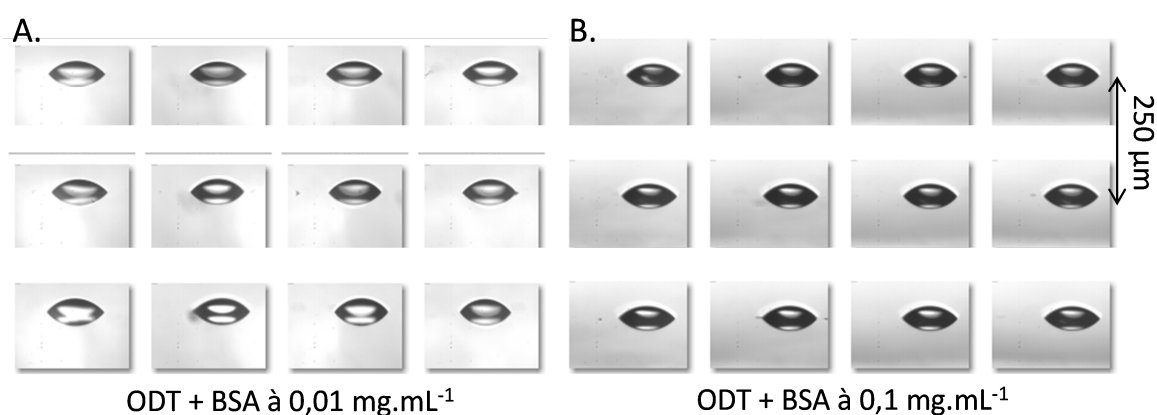


Figure 58 : Cartographie des angles de contact initiaux de l'eau sur la SAM d'ODT suite à l'adsorption protéique. A. [BSA] = $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ et B. [BSA] = $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$. Les gouttes obtenues sur toute la surface présentent la même forme. L'angle de contact est donc constant.

Spectres SFG de la SAM d'ODT exposée aux solvants

Nous avons vu que la simple exposition à un solvant, en modifiant les facteurs de Fresnel, change les intensités relatives des champs laser dans la couche d'ODT, et modifie donc les intensités relatives des bandes de vibration, même si la présence du solvant ne modifie pas la conformation des molécules d'ODT. Il est donc nécessaire dans un premier temps de mesurer le spectre SFG du substrat en milieu aqueux.

Les spectres SFG de l'ODT recouvert d'eau ou d'une solution de nitrate de potassium $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ sont similaires (Figure 59.C et Figure 59.D) et significativement différents de celui de l'ODT exposé à l'air (Figure 59.B).

La déconvolution des spectres expérimentaux obtenus en solution aqueuse a nécessité dans un premier temps de corriger le profil spectral du laser infrarouge $g(\omega_{\text{IR}})$ (cf. chapitre II – 3), qui est modifié par absorption de son aile rouge (i.e. aux grandes valeurs du nombre d'onde), par l'eau liquide. Rappelons que ce profil est obtenu par la mesure du spectre SFG du cristal de référence en GaAs. La Figure 60 montre le spectre laser obtenu à partir d'un échantillon de GaAs placé dans l'air et dans l'eau. Le spectre de l'absorption de l'eau liquide est également indiqué. Si l'on corrige le spectre SFG de GaAs mesuré à l'air par l'absorption de l'eau, on obtient le spectre en vert sur la Figure 60 qui se superpose parfaitement au spectre expérimental quand l'épaisseur de la couche aqueuse est de $5 \mu\text{m}$. Par la suite, tous les spectres SFG acquis en solution aqueuse sont corrigés de l'absorption de l'eau.

La déconvolution des spectres de la Figure 59 a été réalisée dans les mêmes conditions que celle décrite pour la SAM d'ODT exposée à l'air (cf. chapitre II – 3 – 2). Quel que soit le solvant, le meilleur ajustement d'une collection de spectres a été obtenu pour une différence de phase $\Delta\phi = 260^\circ$, différente de la valeur $\Delta\phi = 290^\circ$ déterminée pour l'air. En solution aqueuse, nous avons fixé les contraintes sur les paramètres de déconvolution des spectres de la façon suivante :

- nous avons pris en compte six modes de vibrations des groupes CH_2 et CH_3 aux mêmes fréquences que celles définies pour la SAM d'ODT exposée à l'air (cf. chapitre II – 3 – 2)
- la différence de phase a été fixée à la valeur de 260°
- les demi-largeurs à mi-hauteur Γ_v sont égales pour tous les modes de vibration v .

La déconvolution des spectres SFG obtenus en phase liquide montre que le rapport phénoménologique R décrit précédemment (cf. chapitre II – 3 – 2) augmente lorsque la SAM d'ODT est en milieu aqueux : $R_{(\text{SAM d'ODT} / \text{eau})} = 5,8 \pm 0,5$ et $R_{(\text{SAM d'ODT} / \text{KNO}_3)} = 5,4 \pm 0,5$, par rapport à la valeur déterminée dans l'air ($R_{(\text{SAM d'ODT} / \text{air})} = 3,8 \pm 0,5$).

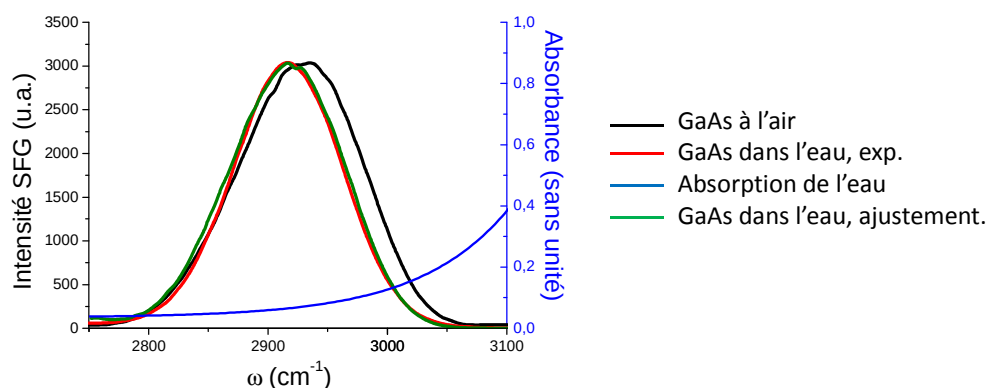
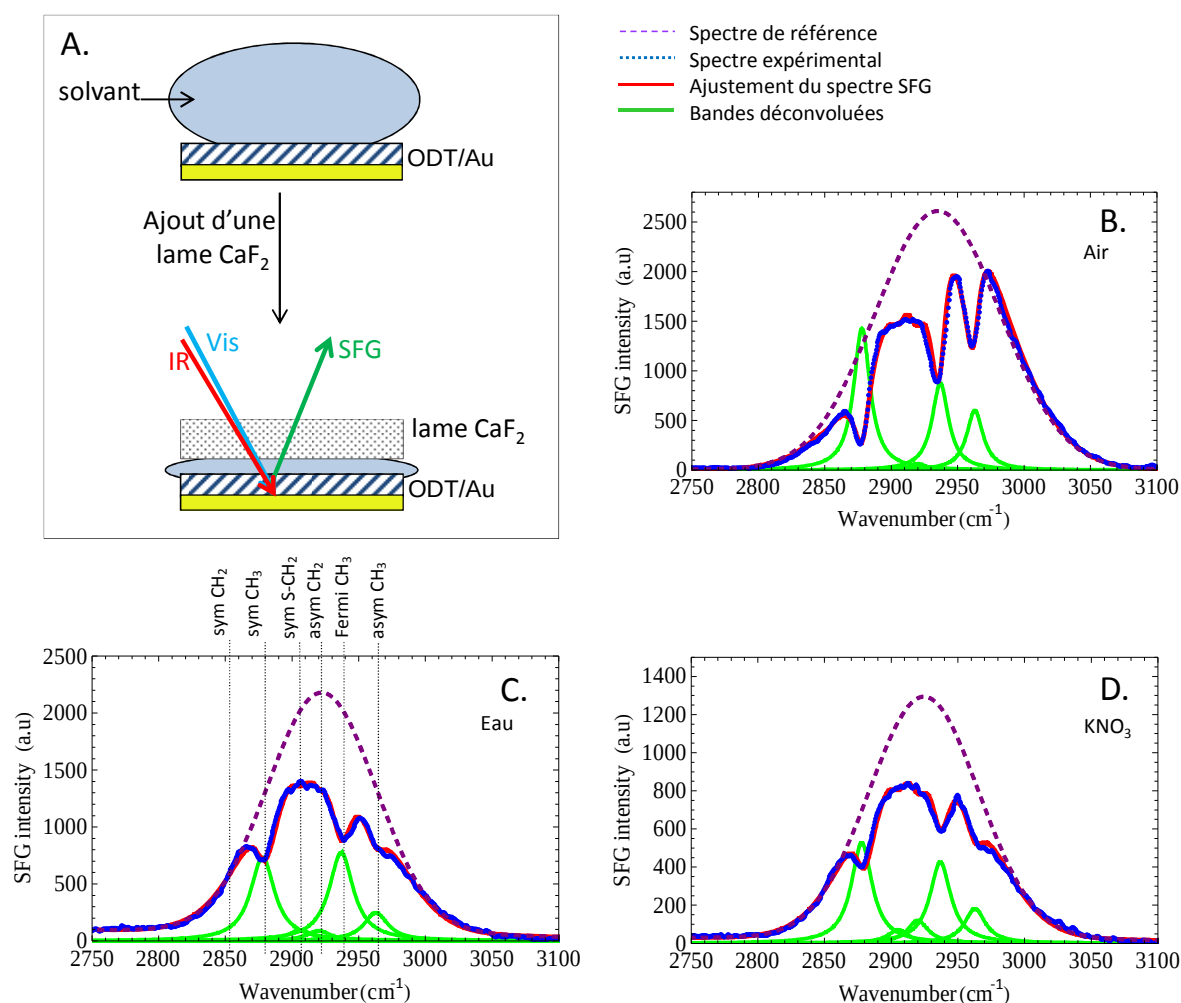


Figure 60 : Courbe de l'absorption de l'eau liquide en fonction du nombre d'onde en bleu. Les spectres SFG de GaAs exposés à l'air (courbe noire) ou dans l'eau (courbe rouge) sont également présents. La courbe verte représente le spectre SFG de GaAs exposé à l'air et corrigé par la courbe de l'absorption de l'eau.

Cette augmentation du rapport R doit correspondre à un redressement du groupe méthyle de l'ODT en phase aqueuse (cf. chapitre II – 2 – 3). Le calcul exact de l'angle d'inclinaison du méthyle est effectué avec notre logiciel de calcul de spectres.

La modélisation des spectres SFG de la SAM d'ODT en milieu aqueux intégrant les paramètres conformationnels de l'ODT exposé à l'air et les paramètres optiques correspondant à l'eau ne permet pas le bon recouvrement avec les spectres expérimentaux (Figure 61.A) : ceci montre qu'il se produit un changement de conformation des molécules d'ODT par simple exposition à l'eau.

La modélisation des spectres SFG de la SAM d'ODT exposée aux solvants aqueux permet de montrer que les chaînes d'ODT changent de conformation par rapport à celle adoptée dans l'air correspondant à une augmentation de l'angle twist et à une diminution de l'angle tilt du méthyle pour les deux solvants étudiés (eau et solution de nitrate de potassium) (Tableau 4) : le groupe méthyle terminal se redresse de 2,6 et 3,9° (pour les molécules A et B respectivement) quand on passe de l'air à l'eau.

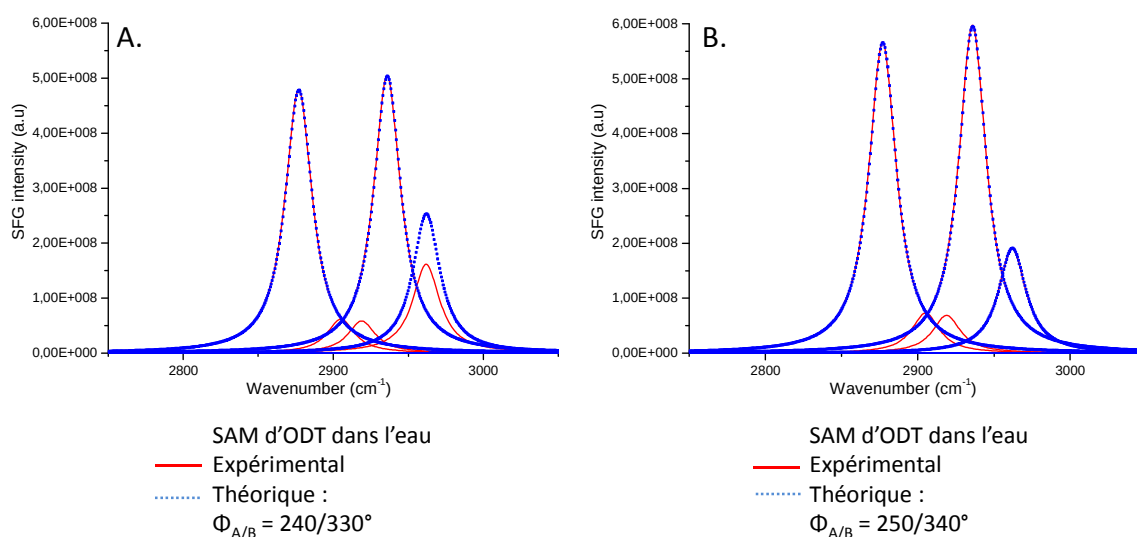


Figure 61 : Comparaison des spectres déconvolués expérimentaux (courbes rouges) de la SAM d'ODT exposée à l'eau distillée avec les spectres théoriques (traits pointillés bleus) A. en supposant que les molécules d'ODT possèdent la même conformation que lorsqu'elles sont exposées à l'air et B. dans l'hypothèse où leur conformation est modifiée et décrite par les paramètres suivants : $\Theta = 30^\circ$, et $\Phi_{A/B} = 250 / 340$ pour les molécules A et B respectivement. Le spectre expérimental est le même dans les deux cas.

Spectres SFG de la SAM d'ODT exposée aux bactéries *Lactococcus lactis* en absence de protéines

Les spectres SFG de la SAM d'ODT exposée aux bactéries hydrophiles et hydrophobes dans l'eau distillée sont représentés Figure 62.A et Figure 62.B respectivement. Les spectres SFG obtenus dans le nitrate de potassium à $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ ne présentent pas de différence avec ceux obtenus dans l'eau distillée.

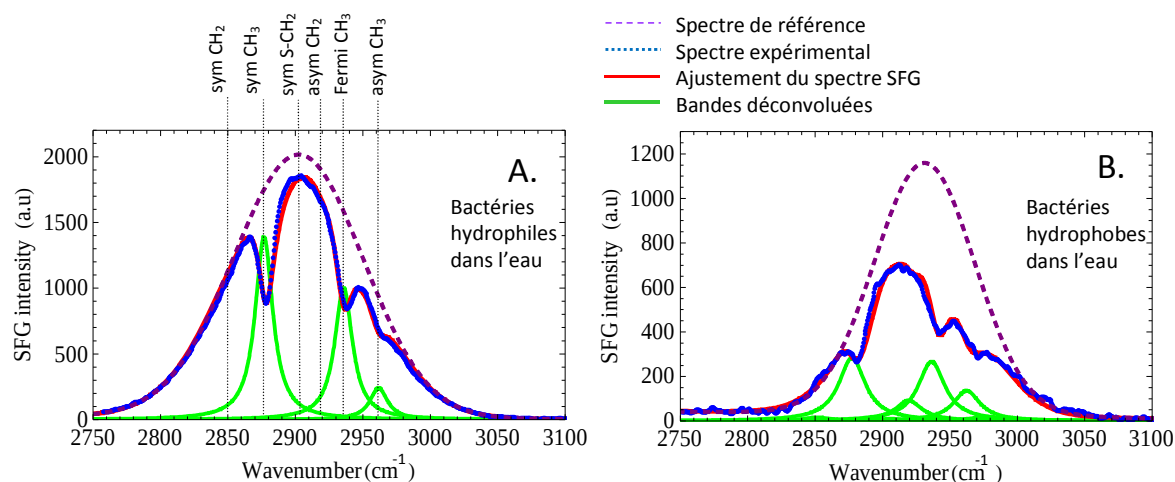


Figure 62 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT (courbe bleue) et ajustement obtenu (courbe rouge) après 90 minutes d'adhésion dans l'eau distillée contenant : A. des bactéries *Lactococcus lactis* hydrophiles. B. des bactéries *Lactococcus lactis* PrtP+ hydrophobes,. La courbe en pointillés violets représente le profil spectral du faisceau IR en milieu aqueux, et les bandes vertes sont les bandes déconvoluées.

Ces spectres ont des allures différentes pour les bactéries hydrophobes et hydrophiles et se différencient également de ceux obtenus pour la SAM d'ODT exposée à l'air ou à une solution aqueuse. Toutefois, sur ces spectres les modes de vibration symétriques (dont la résonance de Fermi) et antisymétriques du groupe méthyle restent prédominants.

Nous avons par ailleurs contrôlé que les bactéries en interaction avec la surface ne contribuaient pas aux intensités des modes de vibrations CH₂ et CH₃ des spectres SFG. En effet, la paroi bactérienne est constituée de peptidoglycanes mais aussi de nombreuses protéines dont les groupements méthyles et méthylènes des acides aminés pourraient contribuer aux spectres SFG. Une adhésion bactérienne sur un substrat d'or non fonctionnalisé a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que l'adhésion bactérienne sur la SAM d'ODT.

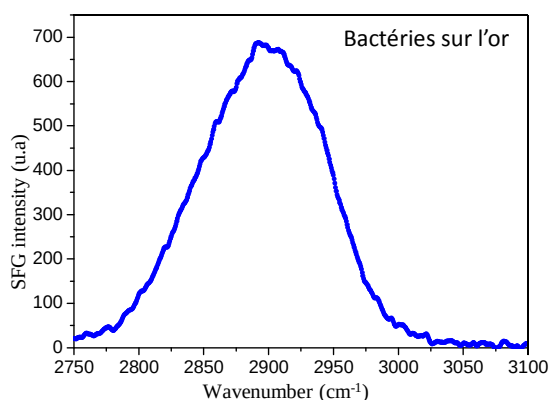


Figure 63 : Spectre SFG expérimental du support d'or exposé aux bactéries *Lactococcus lactis* PrtP+ hydrophobes, après 90 minutes d'adhésion dans l'eau distillée et rinçage.

Le spectre SFG obtenu ne montre qu'un signal non résonnant (Figure 63) démontrant que les bactéries ne contribuent pas au signal SFG et que leurs groupements méthyles et méthylènes ne sont pas ordonnés de façon non centro-symétrique.

La déconvolution des spectres SFG de la SAM d'ODT en présence de bactéries a été réalisée en utilisant les mêmes paramètres de déconvolution que celles précédemment décrites pour le support seul exposé à l'eau :

- une différence de phase fixe pour tous les modes de vibration. La phase, déterminée de la même manière en présence des bactéries qu'en présence de l'air et de l'eau, est de 260° lorsque la SAM d'ODT est en contact avec les bactéries hydrophiles (même valeur que pour l'eau) et 236° lorsque le support est en contact avec les bactéries hydrophobes
- une même largeur spectrale pour les six modes de vibration.

Par ailleurs, la déconvolution des spectres s'est avérée de meilleure qualité quand on a pris en considération le fait que les bactéries ne recouvraient pas toute la surface. Quand on admet un recouvrement de 100 % de la SAM, nous obtenons une dispersion plus grande des valeurs du paramètre phénoménologique R (Figure 64A, Figure 64.B). La formule d'ajustement des spectres (2) est indiquée plus loin. Cette procédure ajoute un paramètre d'ajustement (le poids du spectre des bactéries par rapport à celui de l'eau). La meilleure reproductibilité de la déconvolution des spectres en présence des bactéries (Figure 64) a été obtenue avec un recouvrement de 60 ± 10 % pour les deux souches de bactéries. Cette estimation du recouvrement de la SAM par les bactéries est en bon accord avec celles obtenues par les microscopies de fluorescence et MEB.

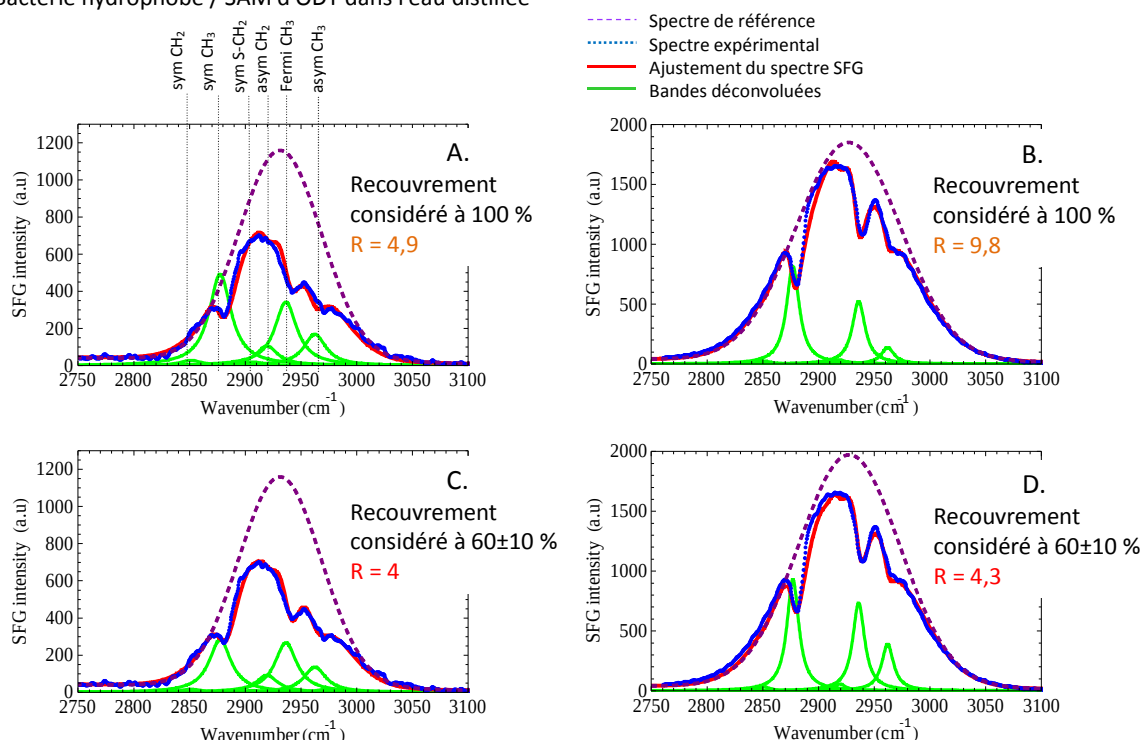
On suppose donc que les spectres SFG résultent de la superposition cohérente de deux contributions, l'une provenant des molécules d'ODT recouvertes de bactéries et l'autre des molécules d'ODT exposées directement à la solution aqueuse.

La formule de déconvolution intègre ainsi le recouvrement bactérien de la surface a ($a = 1$: pas de bactérie, $a = 0$: recouvrement total des bactéries sur la SAM d'ODT) :

$$I_{SFG}(\omega_{IR}) \propto g(\omega_{IR}) \left| \chi_{NR} e^{i\varphi_{NR}} + a \left(\sum_v \frac{A_v e^{i\varphi_v}}{\omega_{IR} - \omega_v + i\Gamma_v} \right)_{solvant} + (1 - a) \left(\sum_v \frac{A_v e^{i\varphi_v}}{\omega_{IR} - \omega_v + i\Gamma_v} \right)_{bactéries} \right|^2 \quad (2)$$

Expérimentalement, le signal de la SAM d'ODT exposée au solvant est toujours acquis le même jour et dans les mêmes conditions que celui de la SAM d'ODT exposée aux bactéries afin de s'affranchir des fluctuations possibles du laser et du trajet optique. Les paramètres de déconvolution de ce signal sont ceux utilisés pour la déconvolution des spectres de la SAM d'ODT exposée aux bactéries.

Bactérie hydrophobe / SAM d'ODT dans l'eau distillée



Bactérie hydrophile / SAM d'ODT dans les deux solvants

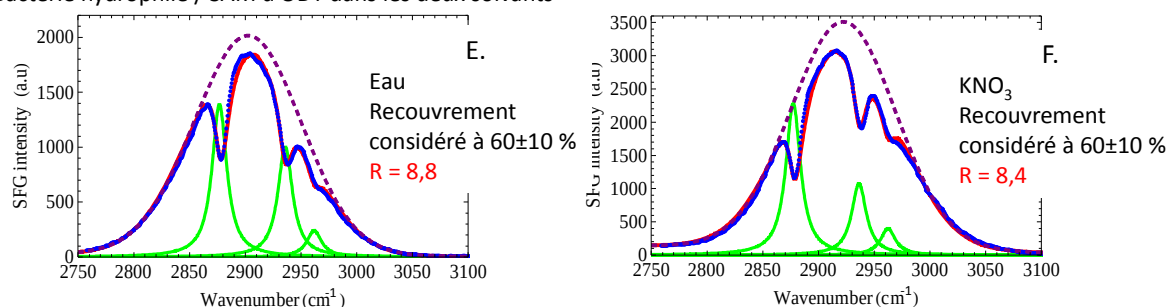


Figure 64 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT (courbe bleue) exposée aux bactéries *Lactococcus lactis* PrtP⁺ hydrophobes, après 90 minutes d'adhésion dans l'eau distillée, réalisés à deux différentes dates : A, B. l'ajustement est obtenu (courbe rouge) avec un recouvrement de la surface par les bactéries considéré comme total (100 %) ; C, D. l'ajustement est obtenu (courbe rouge) avec un recouvrement de la surface par les bactéries de 60 ± 10 % pour les deux dates et E.F. exposé aux bactéries *Lactococcus lactis* hydrophiles, après 90 minutes d'adhésion, réalisés le même jour dans l'eau distillée et une solution de nitrate de potassium (10^{-1} mol.L⁻¹) respectivement avec un recouvrement de la surface par les bactéries de 60 ± 10 %. La courbe en pointillés violets représente le profil spectral du faisceau IR en milieu aqueux et les bandes vertes, les bandes déconvoluées.

Les valeurs du rapport R obtenues dans les différents cas sont répertoriées dans le Tableau 4. Le rapport R est significativement différent selon que les bactéries sont hydrophobes ou hydrophiles. R augmente en présence des bactéries hydrophiles par rapport à l'eau, ce qui correspond à un redressement des groupes méthyles de la SAM d'ODT. Au contraire, en présence de bactéries hydrophobes, le rapport R diminue par rapport au cas de l'eau, indiquant que ces bactéries ont pour effet de « coucher » les groupes méthyle des

chaînes d'ODT. On remarque aussi que la présence d'ions dans le milieu ne modifie pas l'interaction des bactéries avec la SAM.

SAM d'ODT à	Paramètre R (± 0.5)	Angle $\Phi_{A/B}$ ($\pm 3^\circ$)	Angle tilt _{A/B} CH ₃ ($\pm 1^\circ$)
l'air	3,7	243 / 332	55,1 / 15,8
l'eau distillée	5,8	250 / 340	52,5 / 11,9
KNO ₃ (10^{-1} mol.L ⁻¹)	5,4	249 / 339	52,5 / 11,9
bactéries hydrophiles, eau	8,8	260 / 350	48,9 / 7,5
bactéries hydrophiles, KNO ₃	8,2	260 / 350	48,9 / 7,5
bactéries hydrophobes, eau	3,8	238 / 328	55,8 / 16,8
bactéries hydrophobes, KNO ₃	3,5	237 / 327	56,6 / 18,3

Tableau 4 : Résultats de la déconvolution des spectres SFG (paramètre $R = \frac{I_{sym CH_3} + I_{Fermi}}{I_{Asym CH_3}}$) et de leur modélisation : inclinaison (« tilt ») du groupe méthyle et angle de « twist » de la chaîne Φ associé, dans l'hypothèse où les chaînes tournent rigidelement autour d'elles-mêmes pour les molécules A et B respectivement (cf. le modèle présenté au chapitre II – 2) de la SAM d'ODT exposée aux solvants et aux bactéries.

La modélisation des spectres SFG est ensuite réalisée. Pour obtenir l'angle d'inclinaison des groupes méthyle, et l'angle correspondant de « twist » de la chaîne alkyle (dans l'hypothèse où les chaînes tournent rigidelement autour d'elles-mêmes), nous avons considéré que l'indice optique des bactéries n'était pas différent de celui de l'eau (le cytoplasme des bactéries étant principalement composé d'un milieu aqueux) en l'absence d'une valeur expérimentale de l'indice optique des bactéries dans la littérature. Les Figure 65.A et Figure 65.B montrent les spectres correspondant à l'eau. L'ajustement des spectres SFG théoriques et expérimentaux (Figure 65.C et Figure 65.D) est obtenu pour les valeurs de $\Phi_{A/B}$ répertoriés dans le Tableau 4.

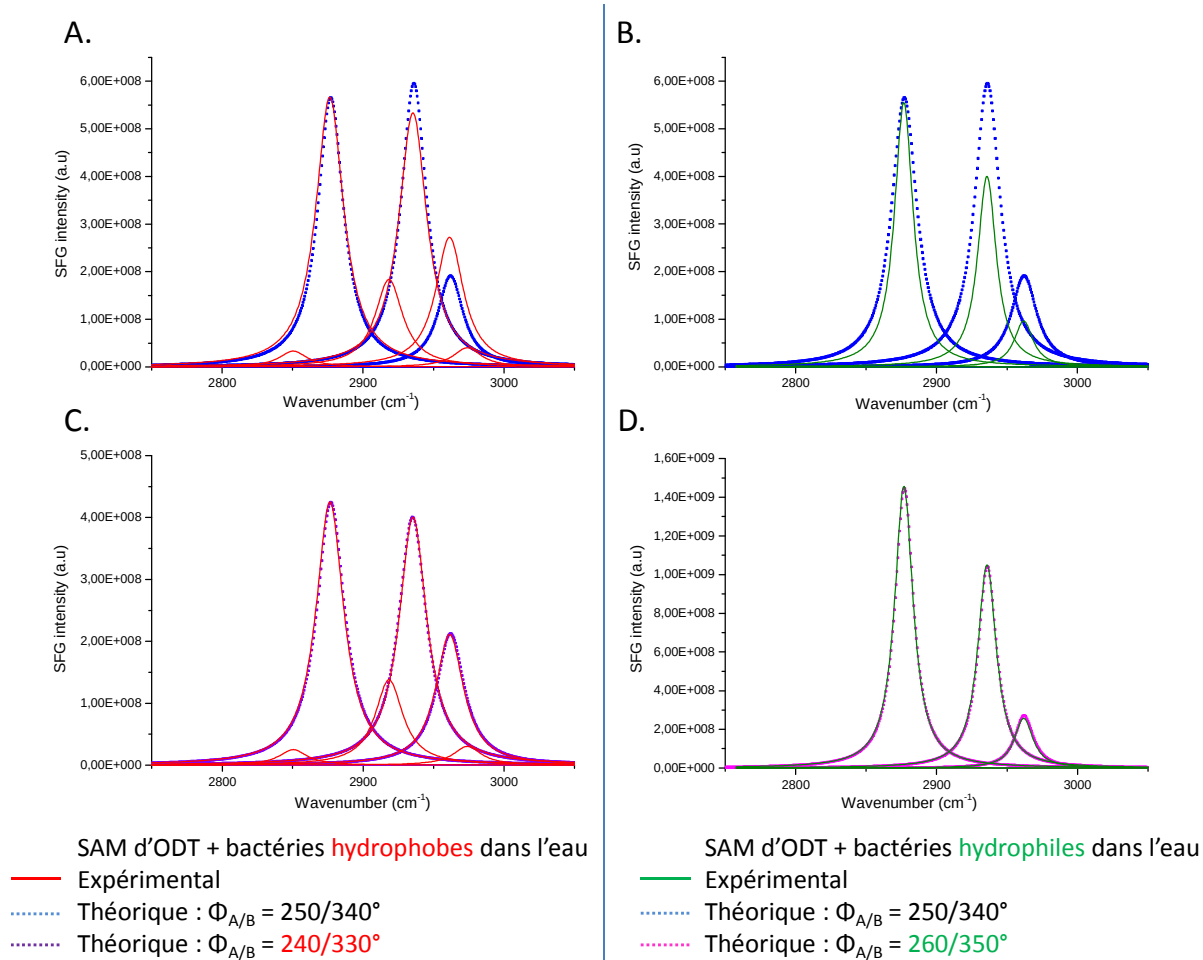


Figure 65 : Comparaison des spectres déconvolués expérimentaux (courbes en traits pleins) de la SAM d'ODT exposée aux bactéries dans l'eau distillée avec les spectres théoriques (traits pointillés) A,B. en supposant que les molécules d'ODT possèdent la même conformation que lorsqu'elles sont exposées à l'eau pour les bactéries hydrophobes et hydrophiles respectivement, C. dans l'hypothèse où leur conformation est modifiée suite à l'adhésion des bactéries hydrophobes et décrite par les paramètres suivants : $\Phi_{A/B} = 240 / 330^\circ$ pour les molécules A et B respectivement (traits pointillés violets), et D. dans l'hypothèse où leur conformation est modifiée suite à l'adhésion des bactéries hydrophiles et décrite par les paramètres suivants : $\Phi_{A/B} = 260 / 350^\circ$ pour les molécules A et B respectivement (traits pointillés roses).

En conclusion provisoire de cette partie de notre étude, les spectres SFG de la SAM d'ODT gardent la signature d'une SAM en présence des bactéries, à savoir qu'ils sont dominés par les bandes du méthyle, alors que les bandes des groupes méthylènes restent très peu intenses. Ceci indique que l'interaction avec les bactéries ne détruit pas l'organisation intermoléculaire de la SAM. Ce résultat n'est pas surprenant car une bactérie recouvre environ 2200 molécules d'ODT (deux molécules d'ODT sont espacées de 5 Å, cf. chapitre II – 2 – 4).

De plus, nous observons des changements mesurables et reproductibles des intensités relatives des bandes de vibration des groupements méthyle, qui indiquent que la SAM ajuste légèrement sa conformation suivant la nature de son environnement. L'exposition aux

bactéries hydrophiles induit une inclinaison plus faible du groupe CH_3 terminal de l'ODT. Au contraire, lorsque le substrat est exposé aux bactéries *Lactococcus lactis* modifiées PrtP+ hydrophobes, l'inclinaison du méthyle augmente. L'amplitude de variation ne dépasse pas 10° de l'air aux bactéries hydrophiles. Comme nous l'avons déjà évoqué dans le chapitre II, elle est observable grâce à l'extrême sensibilité de la SFG à l'inclinaison du méthyle. En revanche, la SFG est très peu sensible à l'orientation des groupes méthylène pour la conformation de l'ODT dans la SAM, ce qui nous a fait renoncer à l'idée d'exploiter l'intensité des bandes CH_2 . L'ensemble de ces résultats décrivant la conformation de la SAM d'ODT exposée à l'air, à une solution aqueuse puis à des bactéries est résumé schématiquement dans la Figure 66.

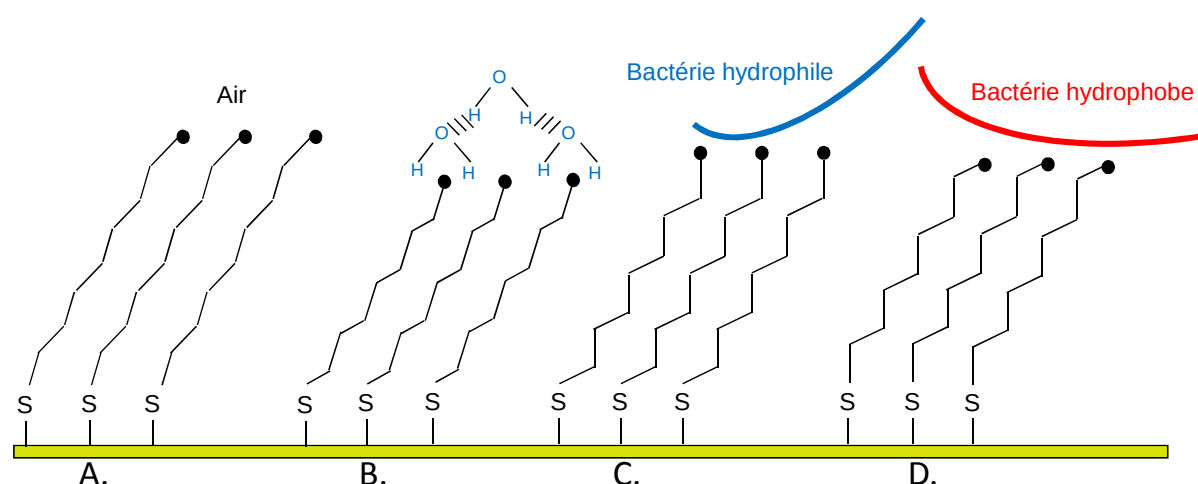


Figure 66 : Schéma de la conformation de la SAM d'ODT exposée : A. à l'air, B. à l'eau, C. aux bactéries *Lactococcus lactis* hydrophiles et D. aux bactéries *Lactococcus lactis* modifiées PrtP+ hydrophobes. Les changements des angles twist et tilt du méthyle sont exagérés pour une meilleure visualisation du changement conformationnel de la chaîne d'ODT.

Remarque : Des résultats similaires ont été obtenus sur des monocouches autoassemblées de PentaDécaneThiol (PDT) (cf. Annexe 1.C). Le PDT est une autre molécule de la série des alcanethiols aliphatiques, qui comporte 15 atomes de carbone. De ce fait, dans la SAM les groupements méthyle sont plus inclinés sur la surface que dans le cas de l'ODT (voir Figure 11 du chapitre II : la structure de la SAM étant indépendante du nombre d'atomes de carbone, l'inclinaison du méthyle ne dépend que de la parité de ce nombre). L'enjeu est donc de vérifier que les propriétés que nous observons sont bien dues à la structure générale d'une SAM de molécules d'alcane tout trans, et ne sont pas spécifiques à l'ODT, et pour savoir si nos conclusions restent valables dans le cas où les groupements méthyles sont plus inclinés sur la surface : l'annexe 1.C montre que les deux molécules donnent des résultats cohérents.

Spectre SFG de la SAM d'ODT en contact avec un film primaire protéique

Nous avons vu précédemment à travers les mesures d'angle de contact (cf. chapitre III – 3 – 1) que les supports de la SAM d'ODT étaient recouverts d'un film homogène de protéines pour des concentrations en protéines comprises entre 0,01 et 0,5 mg.mL⁻¹. Par la suite, nous avons choisi la concentration de BSA à 0,1 mg.mL⁻¹, qui est normalement suffisante pour recouvrir la paroi bactérienne en protéines. En effet, si l'on considère les dimensions de la protéine BSA ($2.4 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2$ à pH = 5,5) et celles de la bactérie lactique ($\sim 3 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2$), il faut au plus $\approx 10^5$ protéines pour recouvrir une bactérie. Par conséquent, pour une concentration bactérienne de $4 \cdot 10^9$ UFC/mL, on estime que la paroi cellulaire est recouverte de protéines pour une concentration minimale de BSA = 0,06 mg.mL⁻¹.

Nous avons vérifié dans un premier temps que les groupements méthyles et méthylènes de la protéine BSA ne contribuent pas au spectre de la SAM d'ODT. Pour ce faire, nous avons adsorbé des protéines sur une SAM d'ODT deutéré qui ne présente pas elle-même de vibrations C-H. Le succès de la fonctionnalisation de la surface d'or par les molécules d'ODT deutéré a été contrôlé par spectroscopie SFG dans la gamme de longueur d'onde des groupes CD₂ et CD₃ (cf. Annexe 2.F) et par mesure d'angle de contact ($\theta_i = 109 \pm 2^\circ$) sur toute la surface.

L'intensité des modes de vibration des groupes CH₃ de la protéine BSA est négligeable (< 0,1%) devant celle de la SAM d'ODT exposée au film protéique (cf. ci-dessous) et les modes de vibration d'élongation des groupes CH₂ sont indétectables (Figure 67) : la protéine BSA ne contribue pas au signal SFG dans la gamme spectrale 2750 – 3100 cm⁻¹.

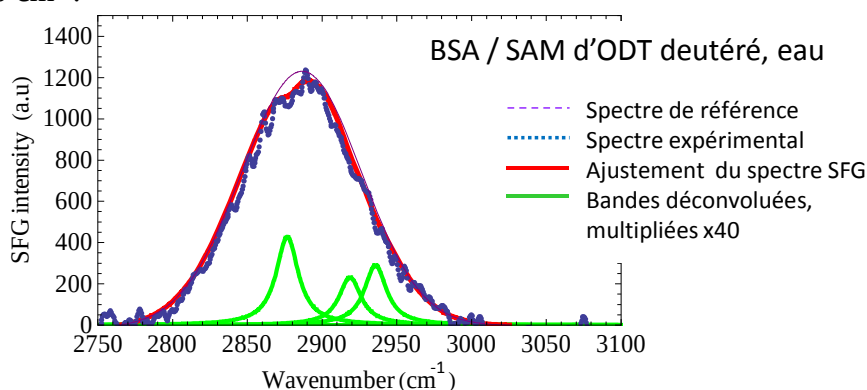


Figure 67 : Spectre SFG expérimental de la SAM d'ODT deutéré en contact avec les protéines BSA dans l'eau distillée (courbe bleue) et ajustement obtenu (courbe rouge). La courbe en pointillés violets représente le profil spectral du faisceau IR en milieu aqueux et les bandes vertes, les bandes déconvoluées. Ici, les bandes déconvoluées ont été multipliées par un facteur $\sim x40$ par rapport à celles de la Figure 68.

Les travaux de la littérature rapportent que pour d'autres types de surfaces (silice, nanoparticules d'or, etc...), les groupes méthyles de la protéine BSA adsorbée donnent lieu à un signal SFG (101) (102) (103) (104) (150). Il faut donc en conclure que sur nos supports

SAM, les protéines BSA adsorbées ne sont pas bien alignées ou ordonnées. On peut aussi envisager que pour la conformation adoptée par la BSA sur la surface SAM d'ODT, il existe des centres d'inversions locaux entre les groupes méthyles et méthylènes qui annuleraient le signal SFG.

Le spectre SFG expérimental de la SAM d'ODT recouverte d'un film protéique de BSA dans l'eau distillée et sa déconvolution sont représentés Figure 68.B. La déconvolution du spectre a été obtenue à partir de l'équation (2) en utilisant une différence de phase $\Delta\phi = \Delta\phi_{\text{(hydrophile)}} = 260^\circ$ et un recouvrement protéique de la surface de $95 \pm 5 \%$ en bon accord avec le recouvrement total estimé par les mesures d'angles de contact (cf. chapitre III – 3 – 2). Comme le montre la Figure 68, un spectre quasi identique à celui de l'eau distillée a été obtenu : les bandes des modes de vibration d'élongation du groupe méthyle sont visibles révélant l'intégrité de la SAM : la protéine BSA ne peut pas s'infiltrer entre les chaînes d'ODT sans détruire l'organisation du film, car une protéine dans son état replié (forme « normal ») recouvre ~ 235 molécules d'ODT. Si cela se produisait, on n'obtiendrait pas le spectre typique d'une SAM (bandes du méthyle intenses, bandes du méthylène très faibles). La valeur du paramètre phénoménologique R obtenue à partir de la déconvolution du spectre ($R = 5,5 \pm 0,3$) est identique à celle obtenue dans l'eau.

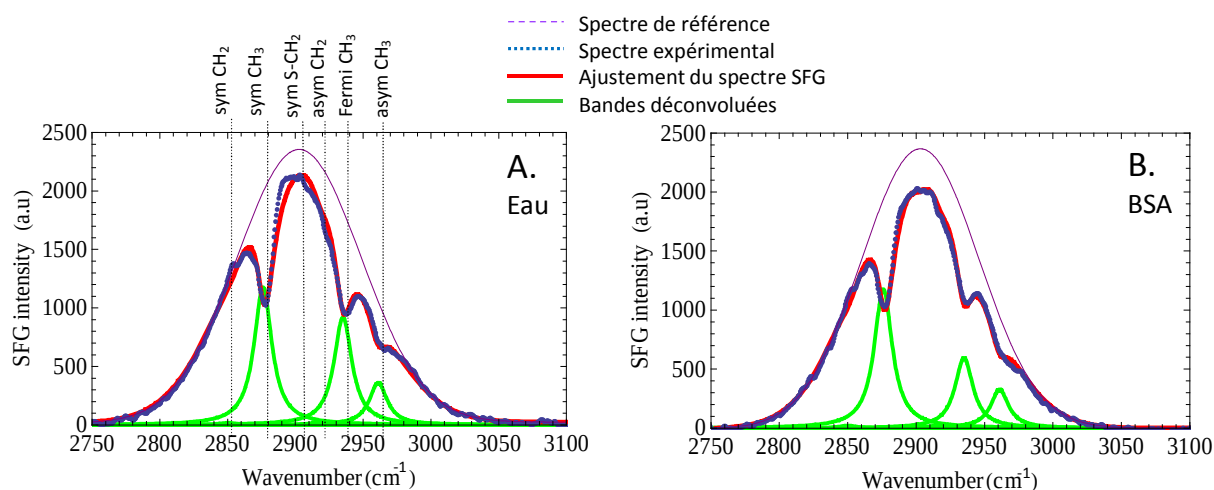


Figure 68 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT (courbe bleue) et l'ajustement obtenu (courbe rouge) : A. dans l'eau distillée et B. après une exposition de 90 minutes à une solution protéique de BSA (recouvrement 95%). La courbe en pointillés violets représente le profil spectral du faisceau IR en milieu aqueux et les bandes vertes, les bandes déconvoluées. Les deux spectres ont été réalisés durant la même série d'expériences.

La modélisation du spectre expérimental SFG de la SAM d'ODT recouverte d'un film de protéines a été réalisée en considérant également que l'indice de réfraction des protéines est le même que celui de l'eau. Les paramètres de la conformation de la SAM d'ODT en contact avec la BSA sont rassemblés dans le Tableau 5. La molécule d'ODT adopte la même géométrie face au film primaire de BSA qu'en présence d'eau distillée : les chaînes alkyle se redressent par rapport à la conformation de la SAM d'ODT à l'air.

SAM d'ODT	Paramètre R	Angle $\Phi_{(A/B)}$ (°) ($\pm 3^\circ$)	Angle tilt $_{(A/B)}$ du CH ₃ (°) ($\pm 1^\circ$)
à l'air	3,7	243 / 332	55,1 / 15,8
dans l'eau distillée	5,8 $\pm$ 0,5	250 / 340	52,5 / 11,9
+ BSA (0,1 mg.mL ⁻¹)	5,3 $\pm$ 0,3	248 / 338	53,2 / 12,9
dans l'eau distillée			

Tableau 5 : Résultats de la déconvolution du spectre SFG et de la modélisation (angles de « twist » de la chaîne Φ et angles d'inclinaison « tilt » du groupe méthyle des molécules A et B du modèle présenté au chapitre II – 2) de la SAM d'ODT exposée aux protéines BSA.

Spectres SFG de la SAM d'ODT recouverte d'un film de BSA et en contact avec une suspension bactérienne (protocole 1)

Les spectres SFG obtenus présentent toujours les trois bandes caractéristiques correspondant aux vibrations d'élongation du groupe méthyle de la molécule d'ODT (Figure 69). La déconvolution des spectres SFG a été réalisée avec les mêmes contraintes sur les paramètres que celles utilisées pour la déconvolution du spectre SFG de la SAM d'ODT en contact avec le film protéique de BSA : une différence de phase fixée à 260°, les fréquences et les demi-largeurs à mi-hauteur des Lorentziennes Γ sont fixes. Une déconvolution des spectres SFG par la formule (2), correspondant au cas où les bactéries auraient déplacé des protéines, qui conduirait à un spectre comprenant deux contributions (des bactéries et des protéines), n'a pas permis d'obtenir un bon ajustement. En revanche une déconvolution correcte a été obtenue en supposant que les molécules d'ODT sont exposées à un seul type de biomolécules : ceci conduit à penser que les bactéries ne déplacent pas la BSA à la surface de l'ODT.

D'après les résultats de la déconvolution des spectres SFG rassemblés dans le Tableau 6, le rapport R est différent de celui observé pour la SAM d'ODT recouverte uniquement de protéines, que les bactéries soient hydrophiles ou hydrophobes. On notera aussi que la différence observée lorsque les bactéries hydrophobes et hydrophiles sont adsorbées directement sur la SAM d'ODT (en absence de protéines) n'apparaît plus (ou du moins n'est pas plus grande que la barre d'erreur).

La modélisation des spectres (Tableau 6) montre que l'adhésion bactérienne sur un film protéique de BSA redresse les groupes méthyles de l'ODT SAM (l'angle twist $\Phi_{A/B}$ augmente donc l'angle tilt $_{A/B}$ CH₃ diminue) et ce quelque-soit la nature de la paroi bactérienne.

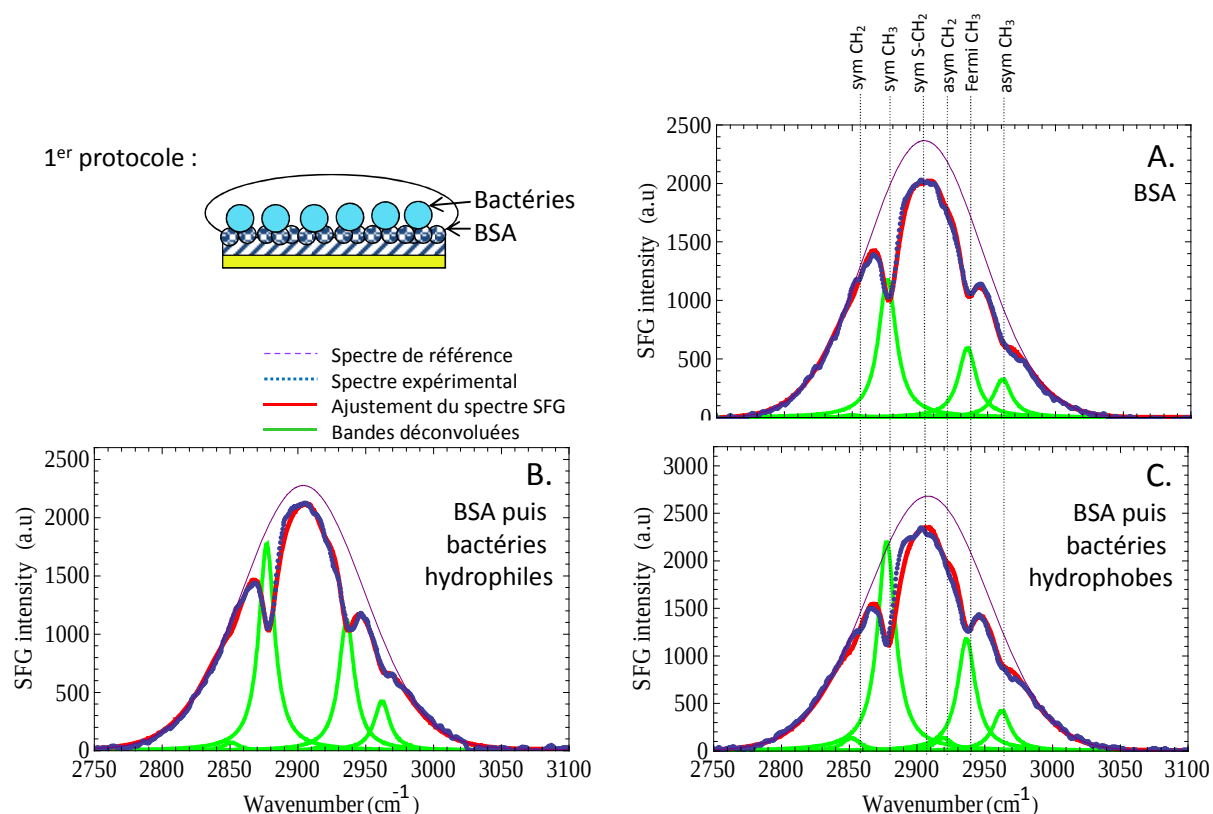


Figure 69: Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT (courbe bleue) et l'ajustement obtenu (courbe rouge) : A. exposée au film primaire protéique BSA seul, B. après 90 minutes d'adhésion des bactéries *Lactococcus lactis* hydrophiles sur le film primaire protéique BSA et C. après 90 minutes d'adhésion des bactéries *Lactococcus lactis* PrtP+ hydrophobes sur le film primaire protéique BSA. La courbe en pointillés violets représente le profil spectral du faisceau IR en milieu aqueux et les bandes vertes, les bandes déconvoluées.

Spectres SFG de la SAM d'ODT en contact avec une suspension de bactéries et de protéines (protocole 2)

Selon le protocole 2 décrit dans la section III – 1 – 2, nous avons exposé la SAM d'ODT à une solution contenant à la fois des protéines BSA et des bactéries dans l'eau distillée afin de mimer le type d'environnement le plus fréquemment rencontré en milieu naturel. Les mesures de zétamétrie présentées dans le paragraphe III – 3 – 1 ont montré que dans une telle suspension, les bactéries étaient partiellement solvatées par les protéines (~50%). Le mélange BSA / bactéries contient donc des bactéries partiellement solvatées par des protéines et des protéines libres, qui sont en excès.

Les spectres SFG pour les deux souches bactériennes et leur déconvolution sont présentés sur les Figure 70.A et Figure 70.B. Nous avons utilisé l'équation (1) pour l'ajustement des spectres avec la différence de phase $\Delta\phi = 260^\circ$. L'optimisation de l'ajustement du spectre expérimental a été obtenue avec un recouvrement uniforme du support par une entité biologique. Les bandes de vibration des modes du groupe méthyle issues de la déconvolution des spectres sont illustrées sur les Figure 70.C et Figure 70.D.

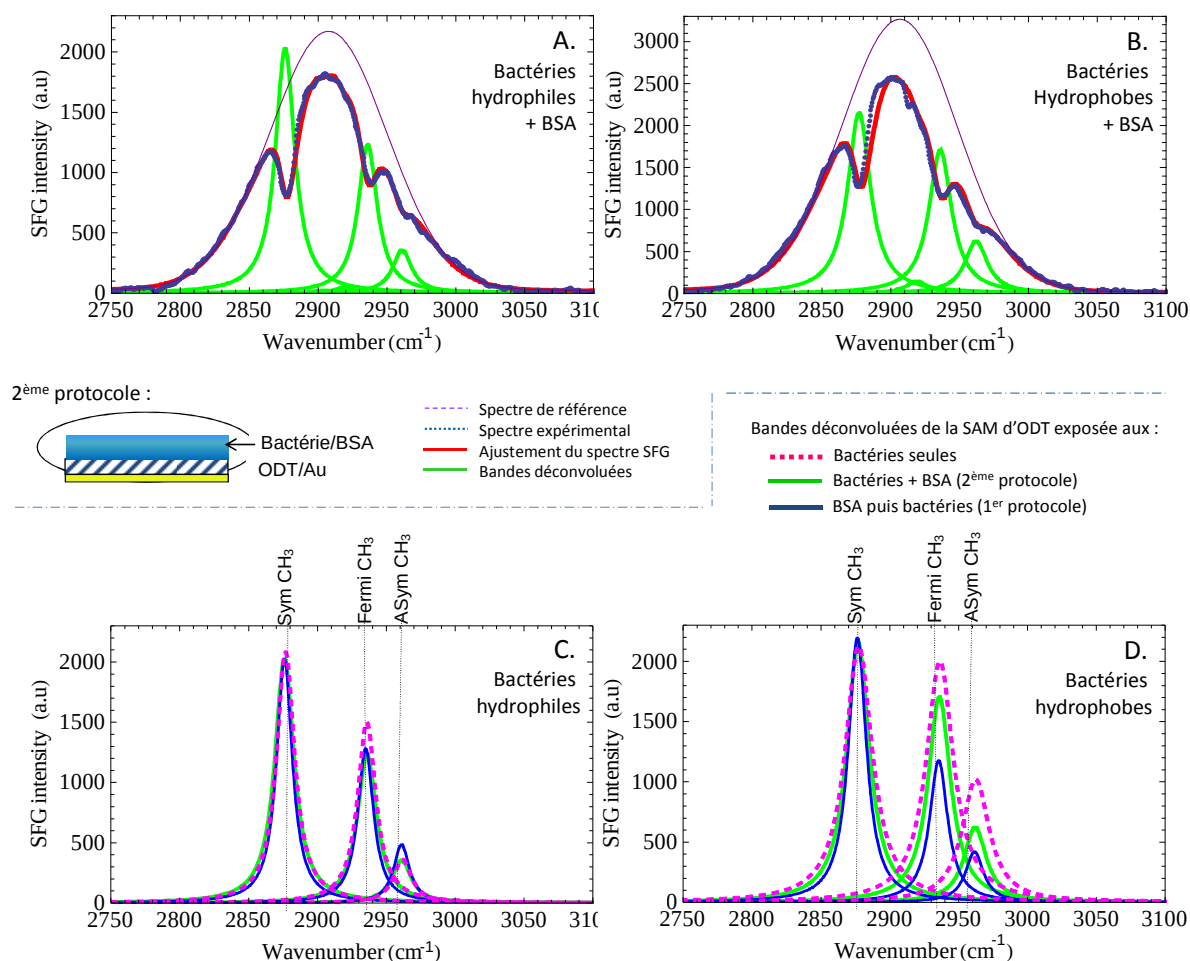


Figure 70 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT (courbe bleue) et l'ajustement obtenu (courbe rouge) : A. exposée aux bactéries *Lactococcus lactis* hydrophiles et à la BSA en suspension, B. exposée aux bactéries *Lactococcus lactis* PrtP+ hydrophobes et à la BSA en suspension. La courbe en pointillés violets représente le profil spectral du faisceau IR en milieu aqueux et les bandes vertes, les bandes déconvoluées. Bandes déconvoluées des spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT: C. suite à l'adhésion des bactéries *L. lactis* hydrophiles seules (traits pointillés roses), en présence de BSA (courbe verte) et sur un film primaire protéique de BSA (courbe bleue), D. suite à l'adhésion des bactéries *L.lactis* PrtP+ hydrophobes seules (traits pointillés roses), en présence de BSA (courbe verte) sur un film primaire protéique de BSA (courbe bleue) dans l'eau distillée.

Les valeurs du rapport phénoménologique R et les paramètres de conformation de la molécule d'ODT sont rapportés dans le Tableau 6. La valeur du rapport R de la SAM d'ODT est identique pour les deux souches bactériennes et met en évidence que le dépôt de la suspension BSA / bactéries a pour effet de redresser les groupements méthyle de la SAM. La modélisation des spectres montre que ce redressement du groupement méthyle terminal correspond à une diminution de l'angle tilt_{A/B} CH₃ de $4,3 \pm 2,5^\circ$ et $5 \pm 2,5^\circ$ pour les molécules A et B de la SAM d'ODT, respectivement (Tableau 6).

La présence des protéines BSA en solution avec les bactéries change donc l'effet de l'adhésion bactérienne : celle-ci dépendante du caractère hydrophobe ou hydrophile de la bactérie quand il n'y a pas de protéine sur la SAM d'ODT, devient indépendante du caractère hydrophobe ou hydrophile des bactéries comme dans le cas de l'adhésion sur un film primaire

de BSA. Le fait que le caractère hydrophobe / hydrophile de la paroi bactérienne soit masqué vis-à-vis de la SAM suggère que la SAM n'est pas en contact direct avec les bactéries mais plutôt avec les protéines comme il va être discuté ci-après.

ODT exposé à	Paramètre R	Angle $\Phi_{A/B}$ ($\pm 3^\circ$)	Angle tilt _{A/B} CH ₃ ($\pm 1^\circ$)
Film de BSA (0,1 mg.mL ⁻¹), eau	5,3 $\pm$ 0,3	248 / 338	53,2 / 12,9
Bactéries hydrophiles, eau	8,8 $\pm$ 0,5	260 / 350	48,9 / 7,5
Bactéries hydrophiles sur film de BSA, eau	7,7 $\pm$ 0,9	256 / 346	50,6 / 9,4
Bactéries hydrophiles + BSA, eau	10,5 $\pm$ 1,5	264 / 350 $\pm 4^\circ$	47,5 / 6,5 $\pm 1,5^\circ$
Bactéries hydrophiles solvatées par BSA, eau	10 $\pm$ 0,6	262 / 352	48 / 6,7
Bactéries hydrophobes, eau	3,8 $\pm$ 0,5	238 / 328	55,8 / 16,8
Bactéries hydrophobes sur film de BSA, eau	10 $\pm$ 2	263 / 353 $\pm 4^\circ$	47 / 6,6 $\pm 2^\circ$
Bactéries hydrophobes + BSA, eau	8 $\pm$ 2	256 / 346 $\pm 6^\circ$	50,4 / 9,4 $\pm 2,5^\circ$
Bactéries hydrophobes solvatées par BSA, eau	5,8 $\pm$ 0,5	250 / 340	52,5 / 11,9

Tableau 6 : Résultats de la déconvolution des spectres SFG (paramètre $R = \frac{I_{sym CH_3} + I_{Fermi}}{I_{Asym CH_3}}$) et de la modélisation des spectres SFG (angle de « twist » des chaînes Φ et inclinaison (« tilt ») du groupe méthyle pour les molécules A et B respectivement) de la SAM d'ODT exposée aux bactéries et aux protéines.

Spectres SFG de la SAM d'ODT en contact avec des bactéries solvatées par des protéines BSA (protocole 3)

La SAM d'ODT est exposée à une suspension de bactéries solvatées par la BSA, après élimination des protéines libres en excès (3^{ème} protocole, cf. chapitre III – 1). La déconvolution (obtenue comme pour la suspension de bactéries en présence de protéines) et la modélisation des spectres SFG sont résumées dans le Tableau 6. On retrouve dans ce protocole 3 une différence de comportement entre les bactéries hydrophobes et hydrophiles : dans le cas des bactéries *L. lactis* hydrophiles solvatées par la BSA, le changement conformationnel de la SAM d'ODT est le même que pour les bactéries seules ou en présence de BSA : le groupe méthyle en bout de chaîne se redresse significativement par rapport à la SAM d'ODT exposée à l'eau ; au contraire, pour les bactéries *L. lactis* mutées PrtP+ hydrophobes solvatées par la BSA, le rapport R est quasiment le même que celui obtenu pour la SAM d'ODT exposée à l'eau ou aux protéines BSA, compris entre celui obtenu pour la

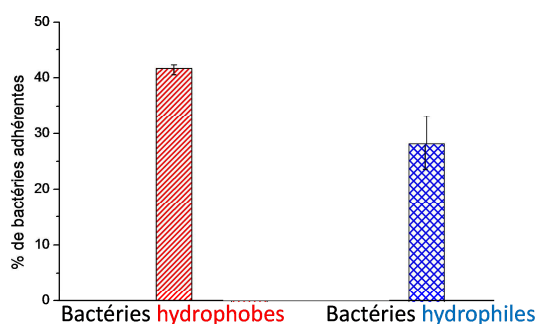
SAM d'ODT exposée aux bactéries hydrophobes nues et celui obtenu pour la SAM d'ODT exposée à la suspension BSA / bactéries.

III – 2 – 4 : Caractérisation par microscopie confocale de l'attachement des bactéries *L. lactis* sur la SAM d'ODT

Comme indiqué au chapitre III – 1 – 3, nous mesurons par imagerie de fluorescence la densité de bactéries sur la SAM. Ceci requiert le changement de flacon et le retournement de l'échantillon (face de la SAM vers le bas) et donc l'élimination de la couche d'eau, et à cette occasion des bactéries peu liées peuvent se détacher de la SAM. Le pourcentage des bactéries adhérentes sur la SAM est plus important pour les bactéries hydrophobes (42 ± 2 %) que pour les bactéries hydrophiles (28 ± 5 %, Figure 71.A) avec une dispersion de valeurs plus importante dans le cas des bactéries hydrophiles. On notera que cette dispersion des résultats dans le cas des bactéries qui adhèrent le moins bien peut s'expliquer par le fait que le détachement lors du retournement de l'échantillon est probablement lié à l'élimination de la couche d'eau, un processus qui peut être violent à l'échelle d'une bactérie, que l'on ne contrôle pas très bien, qui varie donc d'une manipulation à l'autre, et qui a sans doute d'autant plus d'effet lorsque les bactéries sont moins liées.

On observe aussi que le biofilm bactérien qui se développe sur la SAM d'ODT après l'adhésion dépend de la nature de la bactérie : le biofilm de bactéries hydrophobes est plus cohésif que celui des bactéries hydrophiles : les deux biofilms ont une épaisseur similaire, mais le biofilm « hydrophile » est moins dense (Figure 71.B).

A. Suite à la première étape de la colonisation bactérienne



B. Suite à la formation du biofilm

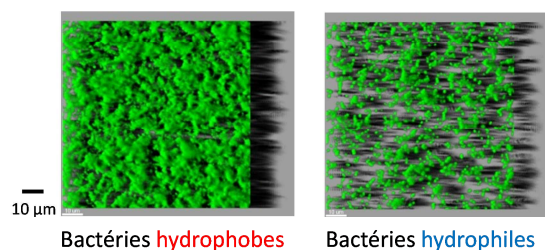


Figure 71 : A. Pourcentage de bactéries adhérentes sur la SAM d'ODT après adhésion bactérienne dans l'eau distillée et le retournement de la surface. B. Images de fluorescence au microscope confocal ($92.6 \times 91.5 \mu\text{m}^2$) des biofilms bactériens obtenus après exposition au milieu nutritionnel pendant 24 heures. L'ombre noire à droite correspond à l'épaisseur du biofilm.

Dans le cas des bactéries dont l'adhésion a été faite en présence de protéines (Figure 72.A), la densité de bactéries est considérablement réduite. La réduction est la plus forte lorsque la SAM a été recouverte d'un film primaire protéique avant l'adhésion (protocole 1) : dans ce cas, on ne dénombre plus aucune bactérie hydrophile. La différence

entre bactéries hydrophobes et hydrophiles est très marquée : la densité de bactéries hydrophobes est toujours significativement supérieure à celle des bactéries hydrophiles. Les images du biofilm bactérien formé sur ces SAM d'ODT en présence de protéines sont montrées sur la Figure 72.B.

L'imagerie de fluorescence apporte ainsi des informations complémentaires à celles obtenues en SFG sur la « force » de l'adhésion bactérienne: avec le protocole expérimental assez strict requis pour la spectroscopie SFG, nous n'avons pas pu sonder par cette méthode cette force de l'adhésion. Il ressort des deux types d'expériences que nos mesures SFG reflètent l'adhésion des bactéries « fortement » et « faiblement liées ». Les images de fluorescence montrent par ailleurs que l'effet des protéines sur la force de l'adhésion bactérienne est spectaculaire.

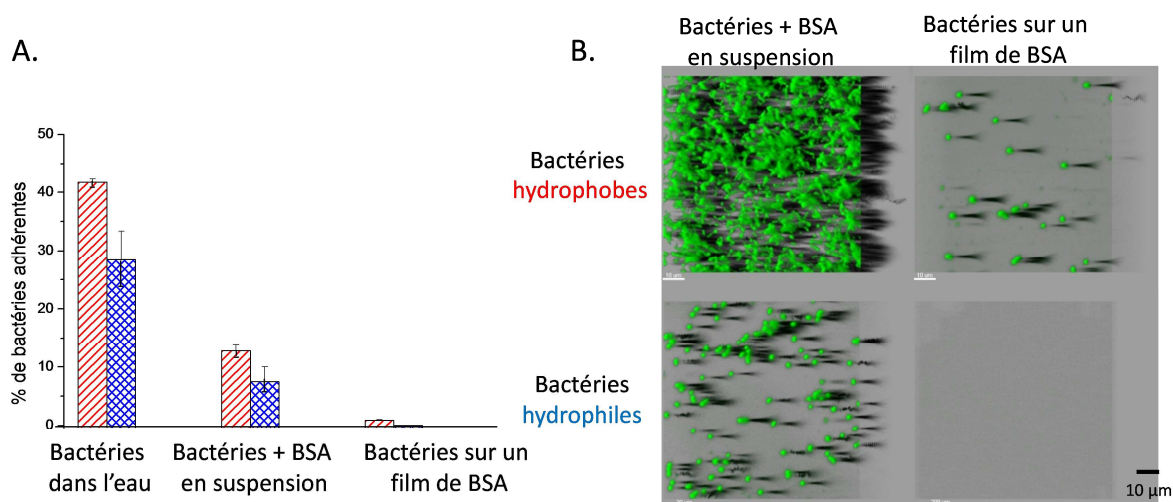


Figure 72 : A. Pourcentage de recouvrement de la SAM d'ODT après adhésion bactérienne, qui a été réalisée soit dans l'eau distillée, soit en présence de protéines BSA en solution (protocole 2), soit sur un film primaire de protéines BSA (protocole 1), après retournement de la surface. B. Images de fluorescence au microscope confocal ($92.6 \times 91.5 \mu\text{m}^2$) des biofilms bactériens obtenus après exposition au milieu nutritionnel pendant 24 heures. L'ombre noire à droite correspond à l'épaisseur du biofilm.

III – 3 – 5 : Discussion sur la biocontamination de la SAM d'ODT

L'étude de l'adhésion bactérienne sur des surfaces dites « antiadhésives » a parfois conduit à une divergence de résultats (cf. chapitre I – 4 – 3) sans doute par manque de connaissances sur les interactions biomolécules – surface à l'échelle moléculaire, ce qui fait l'objet de ce travail de thèse. En particulier, nous nous sommes intéressés à l'étude de la biocontamination de la surface « brosse » SAM d'ODT, une surface d'intérêt dans le domaine des surfaces antiadhésives (47).

Pour ce faire, nous avons employé la spectroscopie SFG pour sonder l'interface de la SAM d'ODT exposées à différentes entités biologiques (bactéries et/ou protéines) ce qui est

réalisé pour la première fois à notre connaissance, et la microscopie de fluorescence confocale pour quantifier les bactéries en « forte » interaction avec le substrat.

Lorsque les chaînes d'ODT sont exposées à un solvant aqueux (eau distillée ou solution de nitrate de potassium à 10^{-1} mol.L⁻¹), les mesures SFG montrent qu'elles se redressent légèrement par rapport à la géométrie de la surface à l'air : les angles tilt du groupe méthyle terminal de la chaîne augmentent de 2,6° et 3,9° pour les molécules A et B respectivement (cf. chapitre II – 3 – 2). Ce faible ajustement des angles au sein de la molécule d'ODT en présence de solvant révèle que l'interaction entre la SAM et les molécules d'eau est très faible : l'organisation des chaînes carbonées de la SAM reste intacte, ce qui n'est pas très surprenant puisque les nombreuses interactions de van der Waals entre les groupes méthylènes tout au long de la chaîne représentent une énergie cumulée bien supérieure à celle de l'interaction d'un groupement méthyle avec l'eau (entre un substrat très hydrophobe ($\theta_i = 109^\circ$) et un liquide « hydrophile » par excellence). L'obtention de faibles variations des angles tilt du groupe CH₃ permettent également de valider la modélisation réalisée dans ce travail.

Le redressement du groupe méthyle au contact de l'eau peut s'expliquer en terme d'interaction hydrophobe / hydrophile. Lorsqu'une molécule (ici, le groupement terminal de la chaîne d'ODT) est en contact avec un milieu hydrophile, elle est solvatée par les molécules d'eau **(151)**. Dans le cas où il s'agit d'une molécule hydrophobe (telle la chaîne d'ODT), les interactions molécule / eau sont plus faibles que les interactions eau / eau. Afin de stabiliser l'énergie du système, l'interface entre molécules hydrophobes et hydrophiles est minimisée par séparation entre phase hydrophobe et phase hydrophile, ce qui est plus favorable qu'un mélange des deux phases. Pour la SAM d'ODT, la meilleure séparation de phase serait obtenue pour des groupements méthyle terminaux perpendiculaires à la surface, mais cette conformation coûterait trop d'énergie car il est douteux qu'en pied de chaîne les liaisons or-soufre puissent supporter la torsion de la chaîne alkyle correspondante. On observe donc qu'un redressement relatif des groupements méthyle.

Les résultats obtenus par spectroscopie SFG montrent qu'au contact des bactéries, l'ODT adapte légèrement sa conformation en fonction du caractère hydrophobe / hydrophile de l'enveloppe bactérienne (Tableau 4). Les variations de l'inclinaison du méthyle sont faibles (environ 10°). Comme dans le cas de l'eau, l'organisation du film d'ODT n'est pas détruite. L'évolution de l'inclinaison des groupements méthyle en fonction du caractère hydrophobe / hydrophile est interprétable directement en fonction des éléments discutés à propos de l'interaction avec une couche d'eau. Si les bactéries sont hydrophiles, les méthyles se redressent comme dans le cas de l'eau, pour la même raison. On remarque que l'effet des bactéries hydrophiles est plus fort que celui de l'eau (diminution de l'angle tilt CH₃ de 3,6 et 4,4° pour les molécules A et B respectivement, Figure 66.C). Ceci appelle deux commentaires : d'une part cela exclut le fait qu'une couche d'eau « épaisse » (de plus d'une monocouche) existe entre les bactéries et le substrat (sinon, on observerait la même inclinaison de CH₃ que dans le cas où l'ODT est exposé à l'eau seule). D'autre part les bactéries s'avèrent « plus hydrophiles » que l'eau elle-même. Ceci a l'air paradoxal, mais il ne

faut pas oublier que nous comparons un solvant « simple » avec des objets vivants plus complexes. Les bactéries ont probablement une meilleure capacité que l'eau à s'adapter à un support hydrophobe.

Dans le cas où la SAM d'ODT est exposée aux bactéries hydrophobes, l'analyse des spectres SFG montre que le groupe méthyle tend à se coucher (Figure 66.D). Ici, les bactéries et le support sont tous les deux hydrophobes : maximiser le nombre d'interactions et donc la surface de contact entre eux permet de stabiliser en énergie le système {SAM d'ODT – bactéries hydrophobes en solution}. Par conséquent, en couchant le méthyle terminal de la chaîne d'ODT, les bactéries sont en contact avec le groupe CH₃ mais également avec le groupe CH₂ voisin du groupe méthyle. Il y a une augmentation du nombre d'interactions de van der Waals entre les deux espèces.

On notera aussi que les changements conformationnels des molécules d'ODT exposées aux bactéries dans l'eau et dans la solution de nitrate de potassium sont les mêmes démontrant que la présence d'ions n'influencent pas l'adhésion bactérienne sur la SAM d'ODT.

Quelle que soit la nature des bactéries, les angles twist et tilt du méthyle terminal de la chaîne d'ODT sont peu différents de ceux mesurée dans l'air (~10°) ce qui exclut l'existence de liaisons covalentes entre les cellules et la SAM d'ODT.

Les résultats obtenus par microscopie confocale permettent d'établir une relation entre ces changements conformationnels et les forces d'adhésion entre les bactéries et la SAM d'ODT, y compris sur la formation et la structure des biofilms bactériens : le recouvrement par des bactéries « fortement » adhérentes sur la SAM d'ODT (c'est-à-dire supportant l'élimination du solvant) est plus important pour la souche bactérienne hydrophobe (maximisation des interactions avec l'ODT) que pour la souche hydrophile (redressement du groupement terminal).

Jusqu'à présent, les études menées sur l'adhésion bactérienne (en absence de protéines) prennent en compte l'impact de l'état de la surface (rugosité, hydrophobicité, fonctionnalisation) sur l'adhésion, mais aucune ne tient compte de l'impact de l'adhésion sur la surface. Ceci pourrait alors expliquer des résultats contradictoires ou incompris de certaines recherches (34) (42) (71). En effet, certaines surfaces composées de broches (comme c'est le cas pour le support étudié ici), fonctionnalisées par un groupe terminal connu pour limiter l'adhésion bactérienne, ne donnent pas le résultat escompté. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'adhésion bactérienne change la conformation de ce groupe fonctionnel, qui de ce fait pourrait perdre en partie sa propriété antiadhésive vis-à-vis des bactéries. Nos résultats indiquent qu'il faut se soucier de la conformation de la surface *en présence* des bactéries, qui peut différer après l'adhésion des bactéries de celle qui a été recherchée.

Les résultats de l'étude menée ici ne peuvent cependant pas être généralisés : il s'agit de l'adhésion de bactéries particulières, de forme coccoïde et relativement lisses (sans pilis ou flagelles), sur un substrat particulier. L'effet de l'impact d'autres bactéries sur une surface fonctionnalisée différemment ne peut pas être prédit. De plus, dans le monde du vivant, la surface n'est pas en contact uniquement avec des bactéries mais également avec des protéines,

des nutriments, et d'autres microorganismes, qui influent également sur l'adhésion bactérienne et que nous allons discuter maintenant.

L'étude préliminaire par SFG de la SAM d'ODT recouverte d'un film de protéines BSA montre des spectres identiques à ceux obtenus lorsque la surface est en contact avec de l'eau distillée. La protéine BSA est un édifice moléculaire complexe dont la surface présente à la fois des parties hydrophobes et des parties hydrophiles, le ratio dépendant de la conformation de la protéine qui peut varier en fonction de l'environnement : il est donc impossible d'interpréter notre résultat de manière précise. Nous nous contentons donc de remarquer que l'augmentation du rapport R correspond au fait que le film de BSA est nettement plus hydrophile que l'ODT (Annexe 2.E), ce qui va dans le sens général de nos observations.

Lorsque la SAM d'ODT est exposée aux bactéries solvatées par la BSA (protocole 3), l'orientation du groupe méthyle de l'ODT reste différente selon le caractère hydrophobe / hydrophile de la bactérie. Les bactéries hydrophobes solvatées par la BSA génèrent un aplatissement de la partie terminale de l'ODT mais moindre que celui mesuré dans le cas des bactéries hydrophobes nues alors que les bactéries hydrophiles solvatées par la BSA ont le même effet sur la conformation de l'ODT que les bactéries nues. Cette observation peut s'interpréter simplement en considérant que la paroi des bactéries hydrophobes solvatées par la BSA présente une plus grande hydrophilie que les bactéries nues atténuant l'effet d'aplatissement de la chaîne d'ODT.

Les données SFG montrent que la modification structurale de la SAM d'ODT revêtue d'un film primaire protéique puis colonisée par les bactéries (protocole 1) ou exposées à une solution de BSA et de bactéries (protocole 2) est similaire pour les deux souches bactériennes :

- en présence de protéines, la SAM d'ODT ne discerne plus le caractère hydrophobe / hydrophile des parois bactériennes alors qu'une différence était observée lorsque seules les bactéries sont présentes sur la SAM d'ODT.
- le paramètre R obtenu est identique à celui mesuré pour la SAM d'ODT exposée aux bactéries hydrophiles seules.

Considérons le cas où la SAM d'ODT est recouverte d'un film de BSA puis colonisée par les bactéries (protocole 1). Le paramètre $R_{(\text{bactéries hydrophobes sur le film de BSA})}$ est différent du rapport $R_{(\text{BSA seule})}$ et du rapport $R_{(\text{bactéries hydrophobes seules})}$, et n'est pas compris entre ces deux derniers rapports. Nous pouvons en conclure que les bactéries ne déplacent pas les protéines BSA et qu'elles ne sont pas en contact direct avec la SAM d'ODT. Néanmoins, le spectre SFG expérimental de la SAM d'ODT en contact avec des protéines « surmontées » par les bactéries est différent de celui de la SAM d'ODT en contact avec seulement des protéines ce qui montre que l'adhésion bactérienne perturbe suffisamment le film protéique pour que cela impacte la conformation de la SAM d'ODT à travers les protéines. Les protéines peuvent en

effet changer de conformation pour s'adapter à un nouvel environnement biologique. Une réorganisation structurale de la couche externe du film primaire (qui est au contact des bactéries) peut se transmettre aux couches inférieures du film jusqu'aux protéines BSA en contact avec l'ODT. Cette réorganisation structurale du film de BSA ne dépend pas du caractère hydrophile / hydrophobe des bactéries. On obtient alors le mécanisme de l'adhésion bactérienne sur un film primaire de protéines BSA sur la SAM d'ODT proposé dans la Figure 73.A.

Il est à noter que ce changement structural du film primaire protéique résultant de la colonisation bactérienne est en accord avec la déconvolution des spectres SFG : un facteur de recouvrement de $95 \pm 5 \%$ par une seule entité biologique était nécessaire.

Notons qu'un tel changement conformationnel des protéines BSA résultant de la colonisation bactérienne devrait avoir une signature en SFG, à condition de sonder les modes de vibration des fonctions amides des protéines dans la gamme de fréquences $1600-1800 \text{ cm}^{-1}$ (cf. Conclusions et Perspectives). Nous n'avons pas eu le temps de mener à bien cette étude, seulement de réaliser une étude préliminaire (cf. Annexe 3.A).

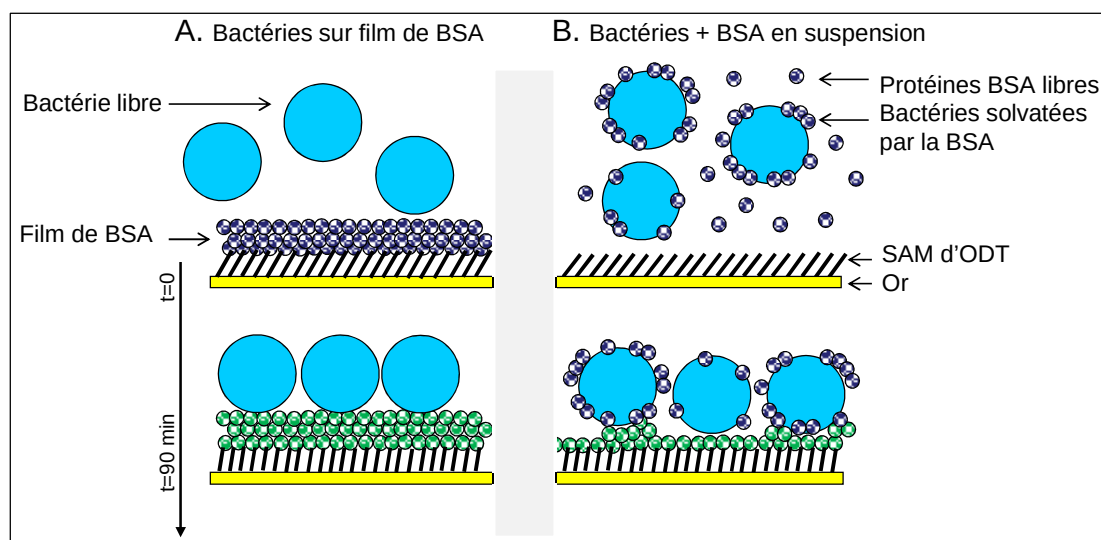


Figure 73: Schémas proposés pour la colonisation bactérienne de la SAM d'ODT A. En présence d'un film primaire protéique BSA. B. En présence de protéines BSA au sein de la suspension bactérienne.

Lorsque les bactéries et les protéines sont présentes de manière concomitante au sein de la suspension déposée sur la SAM (protocole 2), il y a à la fois symbiose entre les bactéries et les protéines BSA (bactéries solvatées par les protéines comme le montrent les mesures SFG et de mobilité électrophorétique) et compétition entre l'adhésion bactérienne et l'adsorption protéique. Le transport des biomolécules jusqu'à la surface est une étape clé de la colonisation, déterminant si les bactéries peuvent adhérer directement au film d'ODT ou si elles se trouvent à nouveau (comme dans le cas d'un film primaire de protéines) sur un film protéique. Il est connu que les protéines, biomolécules de plus petite taille que les bactéries, diffusent beaucoup plus vite en solution que les bactéries. Typiquement, on trouve des valeurs de coefficient de diffusion de l'ordre de $6.10^{-11} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ pour les protéines BSA dans des solvants aqueux à température ambiante ($T = 22-25^\circ\text{C}$) (152) (153) et de l'ordre de

$10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour des bactéries non motiles (i.e. ne possédant pas la capacité de se mouvoir par elles-mêmes, dépourvues de flagelles ou de pilis, ce qui est le cas pour les bactéries *Lactococcus lactis* étudiées ici) (154).

Le fait d'obtenir le même changement conformationnel de la SAM d'ODT lors de la colonisation bactérienne en présence de protéines ou sur un film primaire protéique est compatible avec la conclusion que les protéines à l'état libre diffusent effectivement plus vite vers la surface et la colonisent avant que les bactéries n'adhèrent (Figure 73.B). La différence avec le cas de l'adhésion sur un film primaire de protéines préadsorbées est que les bactéries sont partiellement solvatées par des protéines, mais cela ne se traduit pas par des différences mesurables par SFG. Les conclusions obtenues dans le cas du film primaire sont valables dans le cas de la coadsorption. Ce résultat n'est pas surprenant du fait que l'inclinaison des groupements méthyle caractérise ici l'interaction de l'ODT avec les protéines et non avec les bactéries.

Cette spécificité de la spectroscopie SFG permet aussi d'expliquer l'apparente discordance avec les données de microscopie confocale. On aurait pu s'attendre à ce que le recouvrement bactérien de la SAM d'ODT en présence de protéines et quelle que soit la nature de la bactérie soit le même qu'en présence de bactéries hydrophiles seules du fait du redressement quasi identique des chaînes de l'ODT. Les mesures de microscopie confocale montrent que l'adhésion des bactéries dépend très fortement de la présence des protéines, de la manière dont celles-ci sont introduites (i. e. avant ou pendant la colonisation bactérienne) et du caractère hydrophobe ou hydrophile des bactéries.

En se basant sur le mécanisme d'adhésion bactérienne proposé par spectroscopie SFG et en considérant qu'en microscopie confocale, les substrats ont été retournés (détachement de la surface SAM des bactéries les plus faiblement adhérentes), il est possible d'interpréter l'ensemble des résultats (Figure 74). Quelle que soit la nature des bactéries, le recouvrement bactérien de la SAM d'ODT est plus faible en présence qu'en absence de protéines ce qui signifie que les bactéries sont plus faiblement liées au film de BSA qu'au substrat.

Un autre fait remarquable est que la « force » d'adhésion bactérienne au substrat est différente selon que la SAM est préalablement recouverte d'un film protéique (protocole 1) ou exposée à une suspension contenant les bactéries et la BSA (protocole 2). Rappelons que dans ce dernier cas, les bactéries sont aussi partiellement solvatées par la BSA ce qui suggère que l'interaction {bactérie solvatée par BSA – BSA} est plus forte (recouvrement bactérien de l'ordre de 15 %) que l'interaction {bactérie – BSA} (recouvrement bactérien quasi nul).

Un autre résultat obtenu par microscopie confocale est que le nombre de bactéries adhérentes à la SAM d'ODT est systématiquement plus faible dans le cas des bactéries hydrophiles par rapport aux bactéries hydrophobes. Considérant les propriétés de la BSA et en accord avec les mesures d'angle de contact (la surface est plus hydrophile en présence de protéines), on peut supposer que la protéine adopte une géométrie où ses groupements hydrophobes sont plutôt exposés face à la SAM d'ODT hydrophobe et en conséquence, que ses groupements hydrophiles font face aux bactéries. En raisonnant uniquement en terme d'interaction hydrophobe / hydrophile, l'adhésion des bactéries hydrophiles devrait donc être

plus forte que celle des bactéries hydrophobes, ce qui n'est pas observé. D'autres types d'interactions doivent donc être mis en jeu. Les mesures de mobilité électrophorétique montrent que les bactéries tout comme les protéines sont des entités chargées négativement avec une charge négative plus importante portée par les bactéries hydrophiles par rapport à celle portée par les bactéries hydrophobes : il existe donc une répulsion coulombienne entre le film de protéines et les bactéries, plus forte pour les bactéries hydrophiles que pour les bactéries hydrophobes. L'interaction bactérie / BSA serait préférentiellement gouvernée par des interactions électrostatiques.

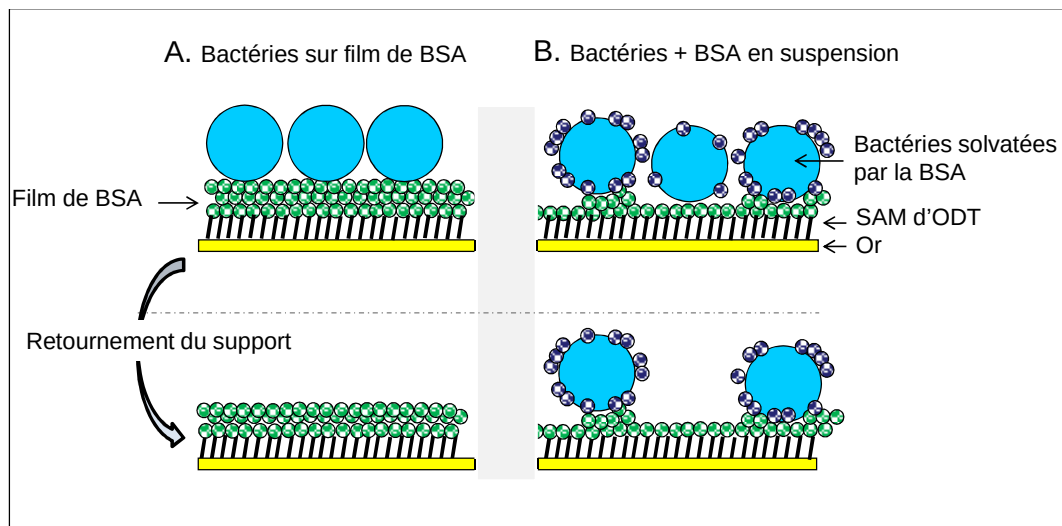


Figure 74 : Décrochement des bactéries par élimination du liquide et retournement de l'échantillon, basé sur les résultats SFG et de microscopie confocale de fluorescence, A. quand les bactéries ont été déposées sur un film primaire protéique BSA. B. quand les bactéries ont été déposées en présence de protéines BSA en suspension.

Des études ont déjà été menées pour étudier l'adhésion bactérienne en présence de protéines, mais uniquement dans le cas où les protéines étaient sous la forme d'un film primaire protéique et en analysant le caractère hydrophobe / hydrophile de la surface revêtue de protéines ou en analysant les forces d'adhésion par AFM **(9) (155)**.

Il a été montré que la présence d'un film de BSA diminuait fortement l'adhésion de souches bactériennes hydrophobes de bactéries à gram positif *Staphylococcus aureus* **(17)** sur une surface de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) et *Staphylococcus epidermidis* (deux bactéries pathogènes mais proches des bactéries *Lactococcus lactis* hydrophobes de cette étude) ainsi que celle des bactéries *Staphylococcus saprophyticus* sur le polymère perfluoro éthylène propylène (FEP) **(74)**. La présence de protéines augmente le caractère hydrophile de la surface (ce qui a été également observé dans la présente étude par des mesures d'angle de contact) et diminue les forces d'interaction entre les bactéries et la surface. Un revêtement de protéines BSA sur une surface de silice diminue l'adhésion des bactéries *S. epidermidis* et permet la formation de colonies bactériennes plus petites et moins denses sur la surface que sur une surface de silice seule **(16)**. Un revêtement de sérum fœtal bovin (SFB) ou de fibronectine (FN) sur des surfaces autoassemblées masque les propriétés du substrat et donc

masque la composition chimique de la SAM **(98)**. En contact avec des bactéries, la protéine SFB (composée majoritairement de protéines BSA) interagit de manière non spécifique avec les bactéries : les forces d'adhésion sont faibles. Au contraire, l'interaction de la protéine FN avec les bactéries est de type ligand-accepteur ce qui augmente les forces d'adhésion entre les bactéries et le revêtement de fibronectine.

Toutes ces recherches sont focalisées sur l'influence du revêtement protéique sur l'adhésion bactérienne, et leurs résultats ont été discutés en termes d'interactions spécifiques ou non entre les bactéries et les protéines ou en termes de caractère hydrophobe / hydrophile de la paroi bactérienne. Nous avons démontré dans ce travail que ce ne sont pas les seuls facteurs à considérer : l'adhésion bactérienne est également susceptible de changer la conformation de la surface revêtue de protéines ce qui influence par la suite l'adhésion bactérienne et son développement par des forces d'interactions différentes entre les bactéries et la SAM (prise en compte de la charge portée par les différentes entités biologiques).

A travers ce travail de thèse, on retrouve les résultats expérimentaux de la littérature :

- la spectroscopie SFG montre que la SAM d'ODT ne « voit » plus le caractère hydrophobe / hydrophile des bactéries lorsqu'il y a présence du film primaire protéique BSA.
- le protocole utilisé (retournement de la SAM) montre par microscopie confocale que les forces d'adhésion sont plus faibles entre les bactéries et la surface lorsqu'il y a présence du film de BSA.

La combinaison de la spectroscopie SFG avec la microscopie confocale nous a permis d'aller encore plus loin dans la compréhension du biofouling des surfaces « brosses » : compréhension de la nature des interactions suivant l'absence ou la présence de protéines. Egalement, nous avons mis en évidence le fait que si les protéines sont présentes pendant l'adhésion bactérienne, la force d'interaction entre les bactéries et la surface est plus forte qu'avec un film protéique primaire. Par rapport à un environnement naturel contenant des protéines, les études d'adhésion bactérienne sur un film primaire protéique surestime l'effet antiadhésif de la surface.

Conclusions et Perspectives

Dans le cadre du contrôle de la biocontamination des surfaces par des bactéries pathogènes, les méthodes de lutte anti-biofilm de bactéries pathogènes s'orientent autour de deux axes :

- une lutte en aval de la formation du biofilm : recherche de désinfectants bactéricides (induisant la mort des bactéries) contenant par exemple des antimicrobiens ou des antibiotiques (avec le danger que comporte la dissémination des antibiotiques, qui entraîne l'apparition de souches résistantes).
- une lutte en amont de la formation du biofilm (i.e. prévention de la formation du biofilm) : recherche de surfaces antiadhésives, bactéricides ou bactériostatiques (la bactérie est vivante mais incapable de croître).

Au cours de ce travail de recherche fondamentale, nous nous sommes intéressés à ce second axe en considérant une surface « brosse » constituée d'une SAM d'ODT. Deux souches de bactéries *Lactococcus lactis*, modèles de bactéries pathogènes telles que *Streptococcus*, ont été étudiées, l'une hydrophobe et l'autre hydrophile. Nous nous sommes efforcés de répondre à deux questions afin de mieux comprendre et contrôler l'adhésion bactérienne dans un environnement naturel :

- la présence des bactéries sur la surface a-t-elle un impact détectable sur la conformation des brosses ?
- l'adsorption protéique sur cette surface est-elle un atout contre la biocontamination (i.e. la colonisation de la surface en milieux aqueux par les microorganismes) ?

Pour y répondre, la technique employée est la spectroscopie de Génération de Fréquence Somme (SFG) qui permet d'étudier à l'échelle moléculaire des interfaces en contact avec un milieu biologique. C'est un outil unique car la SFG permet de sonder *in situ* des échantillons sans les détruire. La spectroscopie vibrationnelle SFG possède également une grande sensibilité de détection grâce à l'acquisition du signal dans le domaine du visible plutôt que dans le domaine de l'infrarouge. De plus, il a été montré lors de ce travail que cette spectroscopie est une technique très sensible à la conformation des molécules : de faibles modifications de conformation de la SAM donnent lieu à de grands changements spectraux. La microscopie confocale de fluorescence a également été utilisée pour étudier la nature des interactions bactéries-protéines-SAM. Ces deux techniques se sont révélées très complémentaires.

La présence des bactéries sur la surface a-t-elle un impact sur la conformation des brosses ?

L'étude réalisée par spectroscopie SFG permet de déterminer de façon quantitative la conformation des molécules d'ODT à l'air mais également en contact avec un milieu biologique. Nous avons démontré que l'adhésion bactérienne a un effet sur la conformation de la SAM d'ODT. Lorsque l'adhésion des bactéries *Lactococcus lactis* est réalisée dans l'eau distillée, la conformation des molécules d'ODT dépend du caractère hydrophobe / hydrophile de la paroi bactérienne. En présence de bactéries hydrophiles, la surface hydrophobe évolue de manière à limiter les points de contact avec le milieu biologique et le groupe méthyle terminal des chaînes d'ODT se redresse. Au contraire, au contact de bactéries hydrophobes, les interactions hydrophobe / hydrophobe ont pour effet de coucher les groupes méthyle de la SAM.

Lorsque l'adhésion des bactéries lactiques est réalisée en présence de protéines modèles d'albumine de sérum bovin (BSA), adsorbées au préalable sur la SAM d'ODT (film primaire protéique, « protein coating ») ou au sein de la suspension bactérienne (afin de mimer au mieux l'environnement naturel), la conformation de la SAM d'ODT n'est plus la même que celle obtenue par l'adhésion bactérienne dans l'eau distillée. Les chaînes de la SAM d'ODT sont en contact avec les protéines BSA hydrophiles, elles-mêmes en contact avec les bactéries hydrophobes ou hydrophiles, et se redressent pour limiter les points de contact entre une surface hydrophobe et un milieu hydrophile. La nature de la paroi bactérienne (caractère hydrophobe / hydrophile) est alors masquée par la présence des protéines mais la présence des bactéries a un effet sur le film primaire protéique qui est perçu par les molécules d'ODT (probablement dû à un changement conformationnel des protéines BSA au contact des bactéries).

En conclusion, la présence des bactéries a un impact sur la conformation de la surface « en brosse » qui dépend du caractère hydrophobe / hydrophile des bactéries lorsqu'elles sont seules en suspension et qui ne dépend plus de ce caractère lorsque des protéines sont présentes.

L'adsorption protéique sur la SAM d'ODT est-elle un atout contre la biocontamination (i.e. colonisation de la surface en milieux aqueux par les microorganismes) ?

Les résultats obtenus par spectroscopie SFG ont montré le même effet de l'adhésion bactérienne sur la conformation de la SAM lorsque les protéines BSA sont présentes avant ou pendant la colonisation par les souches hydrophobes ou hydrophiles. Rappelons que lors de cette étude spectroscopique, l'adhésion bactérienne est forcée (i.e. rinçage « précautionneux ») et qu'on réalise un dépôt de bactéries sur la SAM (i.e. les bactéries fortement et faiblement adhérentes sont présentes à la surface).

L'étude réalisée par microscopie confocale de fluorescence sur le nombre de bactéries fortement adhérentes sur le support (i.e. après retournement de la surface, les bactéries faiblement adhérentes se décrochant de la surface) montre une différence selon le procédé d'introduction des protéines sur la SAM. Lorsque les protéines forment au préalable un film primaire protéique sur le support, le nombre de bactéries adhérant à la surface revêtue de BSA est quasi nul. Au contraire lorsque les protéines sont présentes dans la suspension bactérienne au moment de la colonisation de la SAM par les bactéries hydrophobes ou hydrophiles (i.e. dans des conditions plus proches de l'environnement naturel), le recouvrement des bactéries fortement adhérentes au support est de l'ordre de 10%, soit une valeur intermédiaire entre le recouvrement des bactéries en l'absence de protéines (environ 40%) et sur le film primaire protéique ($\approx 0\%$). Les bactéries solvatées par des protéines adhèrent donc plus fortement à un film protéique que les bactéries nues.

En conclusion, la présence des protéines de BSA réduit l'adhésion des bactéries sur la SAM d'ODT et cede manière beaucoup plus radicale pour la souche hydrophile. Nos études se rapprochent d'autres travaux montrant que le revêtement d'une surface par un film primaire protéique est un atout contre la biocontamination. L'approche originale de notre travail a été de prendre aussi en considération que dans un environnement naturel, les bactéries adhérentes sont elles-mêmes solvatées par les protéines. Dans ce cas, l'effet antiadhésif du film primaire protéique est réduit. Cet aspect devrait pris en considération pour le développement de nouveaux matériaux.

Limites de notre étude et perspectives

Lors de cette thèse, l'étude de l'adhésion bactérienne à l'échelle moléculaire s'est focalisée sur une unique SAM au contact d'une seule espèce bactérienne de la famille des coques et d'une seule protéine plasmatique. De plus, le choix de mettre en œuvre la SFG en réflexion à travers le film d'eau nous a empêché d'étudier le comportement de la SAM lors de la formation du biofilm. Ce premier travail a permis de sonder les propriétés de surface de la SAM d'ODT mais la spectroscopie SFG offre également d'autres possibilités.

Nous savons que l'adhésion bactérienne est un processus multifactoriel et dépend entre autre de la nature de la bactérie, de ses propriétés de surface, de sa concentration... Une expérience complémentaire (cf. Annexe 3.B) utilisant une souche hydrophobe de *Staphylococcus aureus* (AH1331 super GFP) à une concentration 1000 fois inférieure à celle utilisée pour les bactéries lactiques, confirme la fonction antiadhésive de la SAM d'ODT.

Pour pouvoir généraliser les résultats de notre travail, il faudrait étudier systématiquement l'adhésion de bactéries de structures (bactéries pourvues d'appendices extracellulaires, en forme de bâtonnets...) et de propriétés de surface différentes. Par exemple, l'UBBHM dispose d'une souche de bactéries *L. lactis* modifiées recouvertes de pilis qui pourrait faire l'objet d'une étude à court terme. Dans les interactions protéine – bactérie, des interactions spécifiques ligands-récepteur, qui n'ont pas été considérées dans le cadre de ce

travail, peuvent être mises en jeu : des protéines telles que la fibronectine, le fibrinogène ou la laminine du plasma sanguin peuvent interagir spécifiquement avec des bactéries *Staphylococcus* **(17)**.

La SAM d'ODT s'avère être une surface très intéressante pour ses propriétés antiadhésives de bactéries hydrophobes ou hydrophiles, sans ou en présence de protéines. Le choix de la surface a été motivé par le contrôle très facile de son auto-organisation et par notre connaissance approfondie de sa conformation et de la modélisation de son spectre SFG. D'autres études ont montré que des SAM se terminant par d'autres groupements que le groupe méthyle tels que le tri-éthylène glycol **(156)**, le tri-éthylène glycol méthyl éther ou un groupement amide secondaire **(27)**, ont aussi des propriétés antiadhésives. Ces structures « brosses » sont stables et leur étude devrait permettre d'explorer des interactions plus spécifiques et/ou plus fortes entre la bactérie et la surface. On peut aller au-delà en greffant des ligands ciblant spécifiquement certaines protéines **(157)** plutôt que des fonctions chimiques simples.

Des améliorations expérimentales ouvriraient également d'autres perspectives. Le changement de l'arrangement optique permettrait de suivre la cinétique de formation du biofilm par spectroscopie SFG. Expérimentalement, on utiliserait un prisme fonctionnalisé par des nanoparticules d'or sur lesquelles les molécules d'ODT s'adsorbent **(158) (159)**. L'émission SFG serait obtenue par réflexion totale interne des faisceaux incidents et émis grâce aux ondes évanescentes à la surface du prisme en contact avec la suspension bactérienne. On s'affranchirait alors de l'absorption par la couche d'eau. La principale difficulté de cette étude repose sur la fonctionnalisation du prisme, sa reproductibilité et sa stabilité.

La spectroscopie SFG offre l'opportunité de sonder les protéines elles-mêmes ce qui permettrait de confirmer l'hypothèse avancée lors de ce travail selon laquelle les bactéries provoqueraient un changement de conformation des protéines BSA au sein du film primaire protéique et de quantifier ces changements structuraux. Elle repose sur l'étude vibrationnelle de la fonction amide, connue pour être sensible à la conformation des protéines (entre 1500 et 1800 cm^{-1}). Dans le cas des protéines, différents groupes vibrent à une fréquence caractéristique dépendant de leur environnement chimique et donc dépendant de la structure secondaire de la protéine dans laquelle ils évoluent (hélices alpha, feuillets bêta, turns...). Selon l'intensité relative des différents modes de vibration observée en spectroscopie SFG, il est alors possible de déterminer le pourcentage d'hélices alpha (bande amide I autour de 1660 cm^{-1}) et de feuillets bêta (deux bandes amide I autour de 1630 et 1680 cm^{-1}) au sein de la protéine adsorbée et de relier cette valeur à une conformation possible de la protéine. En effet, plus la protéine présente un pourcentage d'hélices alpha (ou de feuillets bêta) important, plus l'intensité du mode de vibration associé est intense. La combinaison d'expériences SFG réalisées avec des faisceaux visible, infrarouge et SFG polarisés s ou p (i.e. faisceaux ppp, ssp, spp, etc...) permet de déduire l'orientation de ces hélices et feuillets au sein de la protéine **(160)**.

Ceci est plus difficile que de détecter les modes C-H (notamment parce qu'il faut s'affranchir de l'absorption par l'eau atmosphérique), mais la faisabilité de cette étude avec notre dispositif expérimental a été démontrée lors d'une étude préliminaire (cf. Annexe 3.A).

Le dispositif expérimental SFG permet aussi un accès facile à la gamme spectrale permettant de sonder la présence et l'organisation d'un film d'eau au-dessus de la SAM et entre protéines et bactéries ($3000 - 3300 \text{ cm}^{-1}$). Il existe une littérature abondante dans laquelle les interfaces de l'eau liquide et gazeuse ont été étudiées **(161) (162) (163) (164) (165)**. Dans le cas présent, l'observation du film d'eau permettra probablement d'obtenir des informations donnant accès à une compréhension plus complète à l'échelle moléculaire de la bio-adhésion.

Annexes

Annexe 1 : Complément au chapitre II

A - Spectres SFG de la SAM d'ODT sur Au(111) sur mica

De façon générale, les supports d'or sur mica sont considérés de meilleure qualité que les supports d'or sur verre. Les images AFM ont montré que pour les deux types de supports, des terrasses d'or d'environ $1\text{-}2\ \mu\text{m}^2$ étaient obtenus et délimités par des « crevasses » de 20 à 30 nm de profondeur. Néanmoins, les supports d'or sur mica que nous avons utilisés (fournis par Phasis) présentent également des trous de 20 à 30 nm de diamètre sur toute la surface d'or. Ces défauts sont quelque peu inquiétants. Dans cette annexe, cette hypothèse sera vérifiée par des mesures de spectroscopie SFG.

La fonctionnalisation des supports d'or sur mica est réalisée de la même façon que celle des supports de verre (cf. chapitre II – 2 – 1) avec une solution d'ODT. Les spectres SFG de la SAM d'ODT / Au / mica sont acquis pendant le même temps d'acquisition que ceux de la SAM d'ODT / Au / verre à l'air et dans l'eau distillée (Figure 75).

Nous avons obtenu des SAM d'ODT sur le mica qui donnent de bons spectres à l'air. L'ajustement du spectre SFG de la SAM d'ODT mesuré à l'air est quasiment identique à celui pour la SAM d'ODT sur du verre.

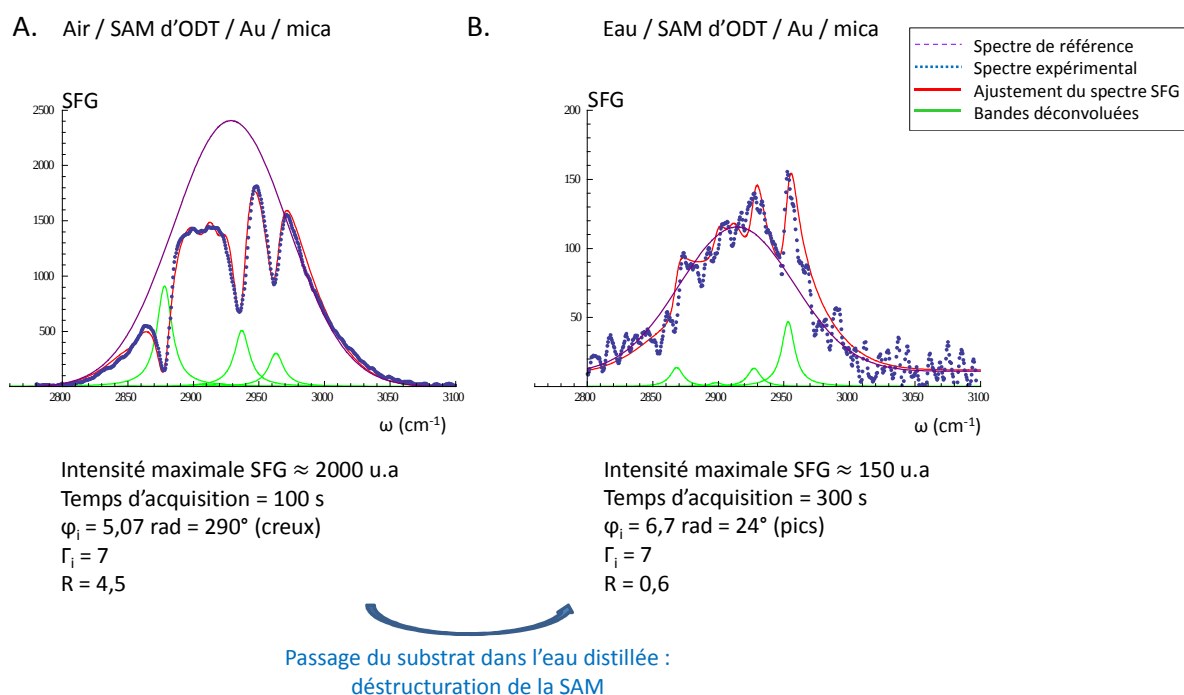


Figure 75 : Spectres expérimentaux SFG de la SAM d'ODT sur Au/mica (traits pointillés bleus) et ajustement obtenu (courbe rouge) A. enregistré à l'air et B. dans l'eau distillée. La courbe violette représente le profil spectral du faisceau IR en milieu aqueux et les bandes vertes, les bandes déconvoluées.

Cependant, lorsque la SAM d'ODT sur mica est mis en contact avec l'eau distillée, on obtient des spectres 30 fois moins intenses. Il subsiste un signal du méthyle faible, sans que le signal du méthylène n'augmente significativement, avec une phase ($\Delta\phi = 24^\circ$) très différente de celle ($\Delta\phi = 260^\circ$) de la SAM sur du verre dans l'eau. Ce changement très marqué de la phase en présence d'eau est intrigant, de même que la très forte perte d'intensité globale. Cette dernière nous a fait renoncer à utiliser le mica comme support.

B- Déconvolution des spectres SFG et incertitudes

Les spectres expérimentaux SFG de la SAM d'ODT en contact avec les différents environnements biologiques (eau, bactéries, protéines, etc...) sont déconvolués avec le logiciel Mathematica en utilisant la formule suivante (1) :

$$I_{SFG}(\omega_{IR}) \propto g(\omega_{IR}) \left| \chi_{NR} e^{i\varphi_{NR}} + \sum_v \frac{A_v e^{i\varphi_v}}{\omega_{IR} - \omega_v + i\Gamma_v} \right|^2$$

Les paramètres ayant été définis au chapitre II – 3 – 2.

Le nombre de paramètres étant important, l'ajustement automatique réalisé par le logiciel est long et donne parfois des résultats non physiques. L'expérience montre que l'ajustement « manuel » à l'aide de la fonction « Manipulate » de Mathematica permet d'obtenir l'ajustement plus rapidement tout en permettant à l'expérimentateur de comprendre comment les différents paramètres affectent le spectre. Avec cette fonction, chaque paramètre peut être modifié à l'aide d'un curseur en visualisant instantanément les variations du spectre calculé, qui est superposé au spectre expérimental, jusqu'à l'obtention d'un bon ajustement visuel entre la courbe déconvoluée et le spectre expérimental (Figure 76).

La reproductibilité des spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT exposée à l'air et de leur déconvolution sont représentées Figure 77.

L'incertitude estimée sur la valeur du rapport R est de $\pm 0,5$ dans le cas de la SAM d'ODT exposée à l'air ce qui correspond à une incertitude de $\pm 1^\circ$ sur l'angle tilt du groupe méthyle en bout de chaîne après modélisation.

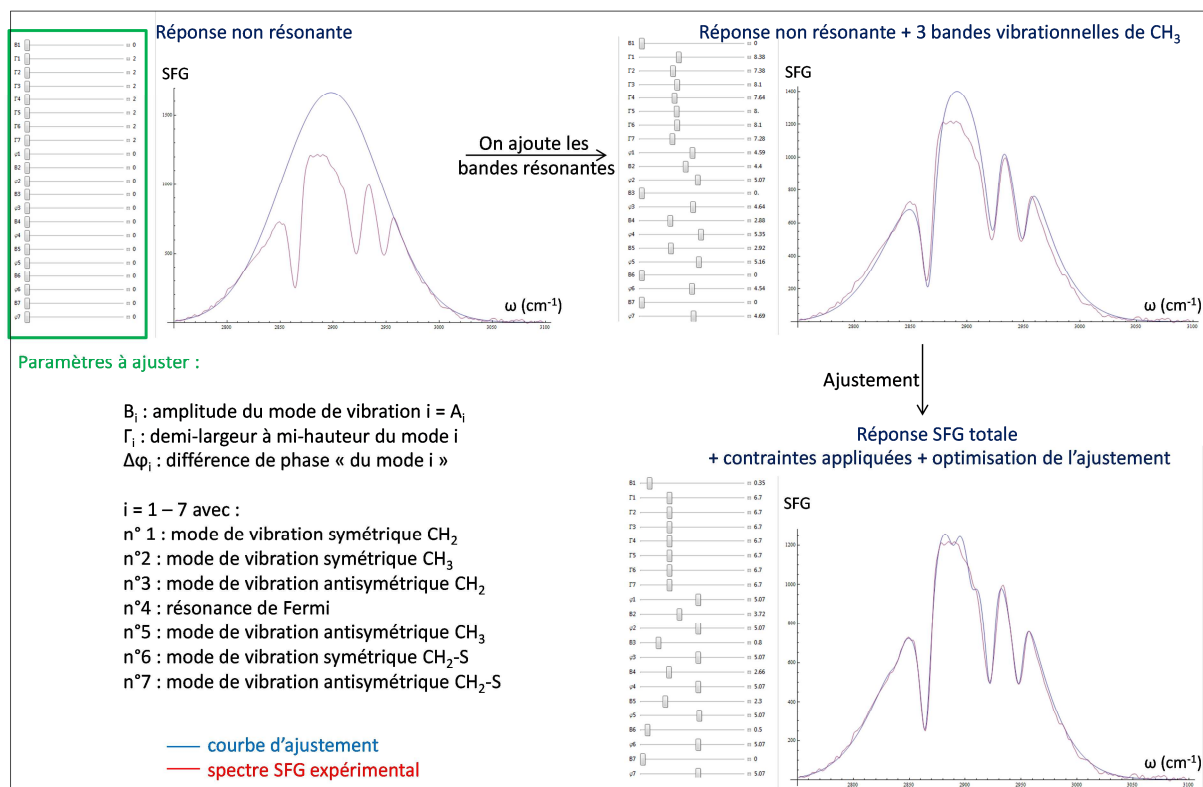


Figure 76 : Ajustement (courbe rouge) du spectre expérimental SFG (traits pointillés bleus) de la SAM d'ODT exposée à l'air avec la fonction « Manipulate » du logiciel Mathematica et en utilisant la formule mathématique ci-dessus. Les contraintes appliquées afin d'obtenir une solution unique à l'équation sont : Γ_v constantes pour tous les modes de vibrations v et $\Delta\phi_v$ fixes = $290^\circ = 5.07$ rad pour l'ODT à l'air). La courbe en pointillés violets représente le profil spectral du faisceau IR en milieu aqueux et les bandes vertes, les bandes déconvoluées.

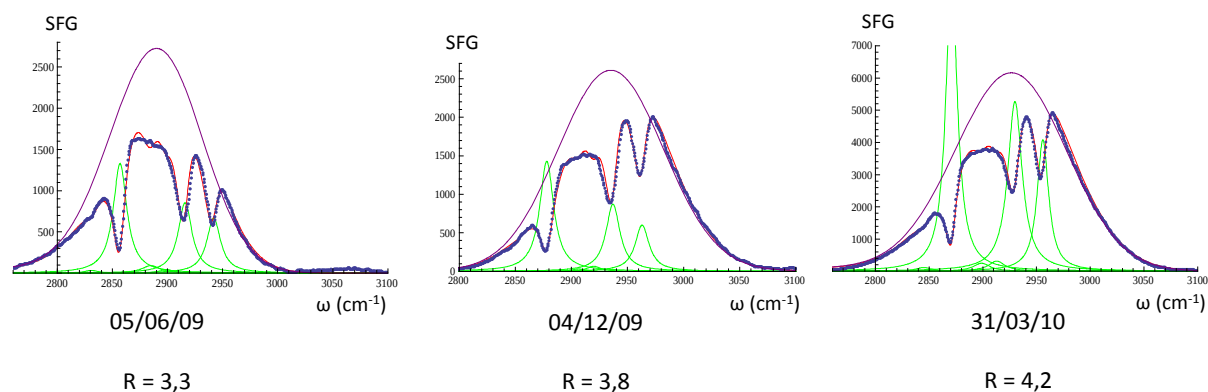


Figure 77 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT à l'air (traits pointillés bleus) réalisés à différentes dates et ayant conduit aux valeurs de R les plus éloignées. La courbe en violet représente le profil spectral du faisceau IR, les bandes vertes sont les bandes déconvoluées.

C - Spectres SFG de la SAM de PDT

Afin de confirmer l'impact de l'adhésion bactérienne sur des « broches » de chaînes alkyles (i.e. la SAM d'ODT), un autre support a été étudié. Il s'agit du SAM de PentaDécaneThiol (PDT), composé d'un groupe thiol, de quatorze groupes méthylènes et d'un groupe méthyle, soit trois groupes méthylènes de moins que l'ODT SAM. Si on se réfère à la Figure 11 du chapitre II, l'inclinaison du groupe méthyle est plus forte pour un nombre impair d'atomes de carbone que pour un nombre pair (Figure). On peut se demander comment cette inclinaison initiale plus forte va se traduire lors de l'interaction avec l'eau et les bactéries.

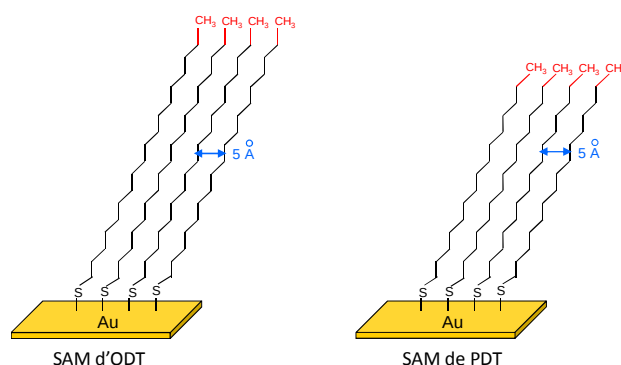


Figure 78 : Représentation schématique de la SAM d'ODT SAM et de la SAM de PDT en conformation tout trans.

Les SAM de PDT sont préparés comme ceux d'ODT. L'adhésion bactérienne également. Des images en épifluorescence (non montrées) ont été acquises et ont donné le même recouvrement bactérien sur le PDT SAM que sur l'ODT SAM soit d'environ $70 \pm 10 \%$.

Les spectres SFG de la SAM de PDT sont réalisés dans les mêmes conditions que ceux de l'ODT SAM. Dans un premier temps, la SAM de PDT est exposée à l'air (Figure .A) puis dans l'eau pure ou contenant du KNO_3 (Figure .B). A l'air, du fait de l'inclinaison plus forte du groupe méthyle dans le PDT, le spectre est dominé par la bande de vibration asymétrique, tandis que les deux autres bandes du méthyle sont assez peu intenses. Le rapport R devient nettement inférieur à 1. Dans l'eau la bande asymétrique décroît fortement.

La déconvolution des spectres SFG de la SAM de PDT exposée à l'air ou dans l'eau distillée est également réalisée avec les mêmes contraintes décrites au chapitre III (Tableau 7). Le spectre expérimental SFG de la SAM de PDT exposée à une solution de KNO_3 à $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ n'est pas montré car identique à celui de la SAM de PDT exposée à l'eau distillée.

La présence d'eau distillée en contact avec la SAM augmente le rapport R par rapport à la valeur obtenue de R lorsque la SAM de PDT est exposé à l'air. Le même effet de l'eau est

observé pour l'ODT SAM et la SAM de PDT confirmant les résultats obtenus sur la SAM d'ODT.

L'adhésion des bactéries *Lactococcus lactis* modifiées PrtP+ hydrophobes est ensuite effectuée sur la SAM de PDT pendant 90 minutes dans l'eau distillée. Le support est ensuite rincé délicatement afin d'enlever toutes les bactéries qui n'auraient pas encore adhérees et d'obtenir un recouvrement bactérien homogène sur la surface. Des images en épifluorescence (non montrées) ont été acquises et ont donné le même recouvrement bactérien sur la SAM de PDT que sur la SAM d'ODT soit d'environ $70 \pm 10 \%$. Une lame de CaF_2 est ensuite ajoutée au-dessus de la suspension bactérienne afin de limiter l'épaisseur de la couche d'eau et donc l'absorption du faisceau infrarouge.

Finalement, le spectre expérimental SFG de la SAM de PDT exposée aux bactéries hydrophobes et sa déconvolution sont réalisés comme celle de la SAM d'ODT exposée aux bactéries (Figure .C). Le meilleur ajustement des spectres expérimentaux est obtenu en considérant un recouvrement bactérien de 70 % ce qui est en accord avec les résultats de fluorescence et avec une différence de phase de 236° (support face à un environnement hydrophobe, cf. chapitre III). Le rapport $R_{\text{PDT+bactéries hydrophobes,eau}}$ vaut $1,8 \pm 0,5$: il diminue par rapport à $R_{\text{PDT+eau}}$.

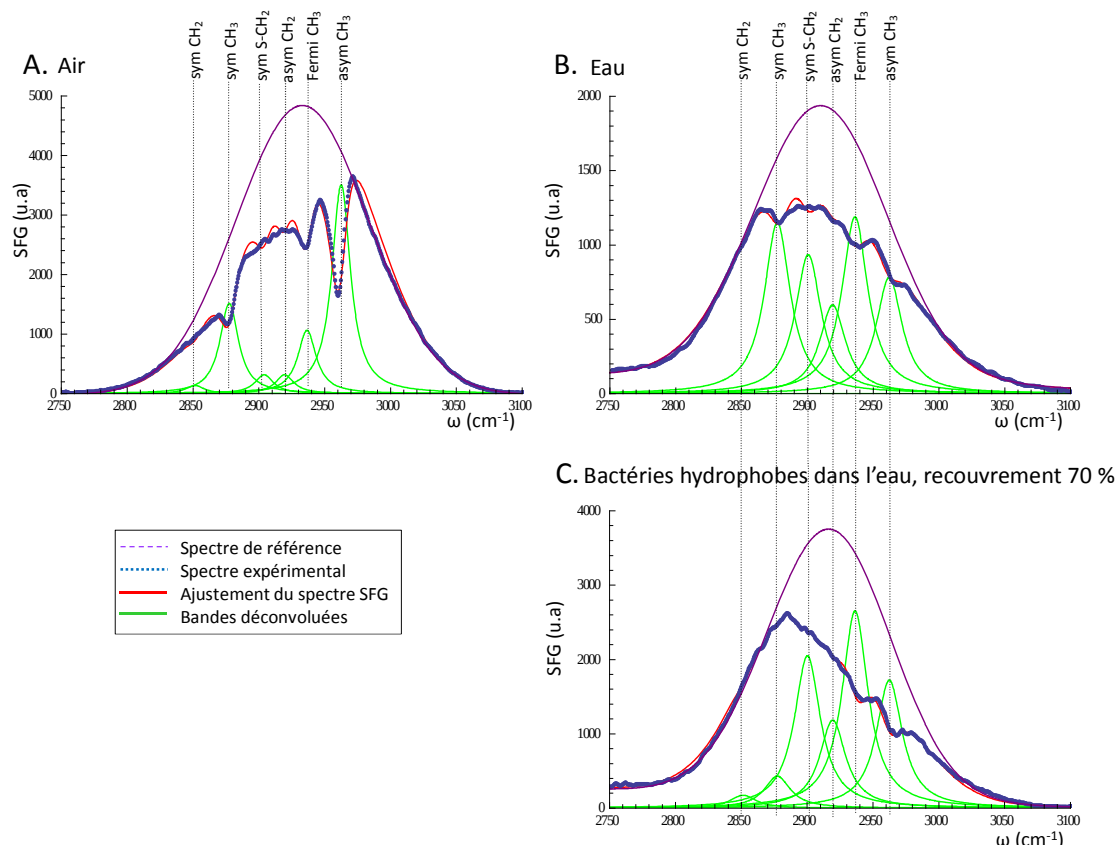


Figure 79 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM de PDT (traits pointillés bleus) et leurs ajustements (courbe rouge) A. exposée à l'air, B. exposée à l'eau distillée et C. exposée aux bactéries *L.lactis* modifiées PrtP+ après 90 minutes d'adhésion dans l'eau distillée. La courbe en pointillés violets représente le profil spectral du faisceau IR en milieu aqueux et les bandes vertes, les bandes déconvoluées.

Paramètres de l'ajustement	SAM de PDT à l'air	SAM de PDT dans l'eau distillée
Fréquences des modes de vibrations :		
Symétrique CH ₂	2851 cm ⁻¹	2851 cm ⁻¹
Symétrique CH ₃	2877 cm ⁻¹	2877 cm ⁻¹
Symétrique CH ₂ -S	2905 cm ⁻¹	2905 cm ⁻¹
Antisymétrique CH ₂	2918 cm ⁻¹	2918 cm ⁻¹
Résonance de Fermi	2936 cm ⁻¹	2936 cm ⁻¹
Antisymétrique de CH ₃	2962 cm ⁻¹	2962 cm ⁻¹
Phase fixe pour tous les modes de vibrations ϕ	290 °	260°
Demi-largeur à mi-hauteurs Γ identique pour tous les modes de vibrations	8,5 ± 1 cm ⁻¹	11 ± 1 cm ⁻¹
Rapport R obtenu	0,75 ± 0,1	3 ± 0,5

Tableau 7 : Données obtenues lors de l'ajustement des spectres SFG expérimentaux de la SAM de PDT à l'air et dans l'eau distillée selon l'équation (1).

Une modélisation du spectre SFG expérimental de la SAM de PDT est effectuée afin de quantifier plus précisément les changements conformationnels de la SAM de PDT selon l'environnement biologique auquel il est exposé. Celle-ci est décrite au chapitre II – 2 et les résultats obtenus sont groupés dans le Tableau 8.

PDT exposé à	Paramètre R (± 0.5)	Angle $\Phi_{A/B}$ (± 3°)	Angle tilt _{A/B} CH ₃ (± 1°)
l'air	0,75	258 / 348	39,9 / 64,9
l'eau distillée	3	215 / 305	20 / 53,1
bactéries hydrophobes, eau	1,8	229 / 319	26,3 / 60,7

Tableau 8 : Résultats de la modélisation des spectres SFG (angle twist Φ et tilt du groupe méthyle pour les molécules A et B respectivement) et de la déconvolution des spectres SFG (paramètre $R = \frac{I_{sym CH_3} + I_{Fermi}}{I_{Asym CH_3}}$).

Tout comme pour la SAM d'ODT, l'eau distillée a un effet brosse sur les chaînes alkyles qui se redressent alors que l'adhésion des bactéries hydrophobes dans l'eau tend à coucher le méthyle terminal de la SAM : l'angle tilt CH₃ augmente de 6 et 7° (pour les molécules A et B respectivement) par rapport à celui de la SAM de PDT en contact avec l'eau distillée. Néanmoins, l'adhésion bactérienne ne permet pas de retrouver la conformation de la SAM de PDT à l'air (conformation la plus « couchée »). L'ODT et le PDT étant des molécules semblables, les mêmes explications décrites au chapitre III – 5 s'appliquent pour décrire le comportement de la SAM de PDT face à l'eau ou à l'adhésion des bactéries hydrophobe.

Malheureusement, l'étude de l'adhésion des bactéries *L. lactis* hydrophiles dans l'eau distillée et celle de l'adsorption des protéines n'a pas pu être réalisée par manque de temps. On peut néanmoins supposer que les résultats de l'impact des milieux biologiques sur la conformation de la SAM de PDT seraient les mêmes que ceux sur la conformation de la SAM de l'ODT (ce qui est le cas pour l'instant pour l'air, l'eau et l'adhésion des bactéries hydrophobes).

En conclusion, les expériences réalisées sur la SAM de PDT confortent les conclusions faites sur la SAM d'ODT qui peuvent alors être étendues à toutes les brosses composées de chaînes alkyles.

Méthode de dénombrement	Classique (UFC/mL)	Micro-spots (UFC/mL)
Suspension de <i>L. lactis hydrophobe</i>	148.10 ⁷ 136.10 ⁷ (14.10 ⁸ 15.10 ⁸)	10.10 ⁸ 2 µspots à 13.10 ⁸ 18.10 ⁸ 19.10 ⁸ 20.10 ⁸ 2 µspots à 1.10 ⁹ 2.10 ⁹ 5.10 ⁹
Résultat dénombrement	1,4.10 ⁹	1,6.10 ⁹
Suspension de <i>L. lactis hydrophile</i>	45.10 ⁸ 49.10 ⁸	46.10 ⁸ 37.10 ⁸ 2.10 ⁹ 2 µspots à 4.10 ⁹ 5.10 ⁹ 8.10 ⁹ 9.10 ⁹
Résultat du dénombrement	8,7.10 ⁹	9.10 ⁹

Tableau 9: Comparaison de la détermination du nombre d'unités formant colonies (UFC) par micro-spots et par la méthode classique.

B - Caractère hydrophobe / hydrophile et acide / base de Lewis des bactéries

Lorsqu'une particule colloïdale idéale (ici, la cellule bactérienne) est immergée dans un solvant, différentes interactions existent entre la particule et le solvant :

- des interactions de van der Waals. En milieu aqueux, les forces de Keesom (interaction dipôle-dipôle) et de Debye (interaction dipôle-dipôle induit) sont négligeables. Seules sont à considérer les forces de London (interaction de dispersion) aussi appelée interaction de Lifshitz-van der Waals en milieux aqueux **(11)**.
- des interactions acide / base de Lewis (interactions électrostatiques)
- des interactions polaires (hydrophobe / hydrophile dans le cas du solvant eau).

Le caractère hydrophobe / hydrophile et acide / base de Lewis des particules colloïdales en solution et en particulier des bactéries, peut être déterminé par la méthode de l'Adhésion Microbienne aux Solvants (MATS pour Microbial Adhesion To Solvents) **(166)**.

Afin de comparer le caractère acidobasique d'une particule, il faut choisir deux solvants ayant des caractéristiques accepteur / donneur d'électrons différentes mais possédant les mêmes tensions de surface de Lifshitz-van der Waals et le même caractère polaire / apolaire. De la même façon, le caractère hydrophobe / hydrophile d'une particule sera déterminé en utilisant l'eau et un solvant apolaire.

Pour caractériser les deux souches bactériennes, nous avons utilisé les couples de solvants (Tableau 10) :

- le chloroforme (accepteur d'électron, acide de Lewis) et l'hexadécane afin de déterminer le caractère électron-donneur de la souche bactérienne
- l'acétate d'éthyle (donneur d'électron, base de Lewis) et le décane afin de déterminer le caractère électron-accepteur de la souche bactérienne
- l'eau et l'hexadécane (apolaire) et l'eau et le décane (apolaire) afin de déterminer le caractère hydrophobe / hydrophile de la souche bactérienne

Solvant	γ_L^{LW}	γ_L^+	γ_L^-
Chloroforme	27,2	3,8	0
Hexadécane	27,7	0	0
Acétate d'éthyle	23,9	0	19,4
Décane	23,9	0	0

Tableau 10 : Caractéristiques énergétiques (mJ.m^{-2}) des solvants utilisés pour la MATS selon la Ref. (166) : γ_L^{LW} représente la composante de Lifshitz-van der Waals, γ_L^+ la composante électron-accepteur et γ_L^- la composante électron-donneur.

Les mesures de MATS sont réalisées en mélangeant 2,4 mL de la suspension bactérienne (10^8 UFC/mL) avec 0,4 mL de chaque solvant sous agitation. La solution est ensuite laissée au repos pendant 15 minutes afin d'assurer la complète séparation entre la

phase aqueuse et la phase organique (phase du solvant). L'affinité microbienne pour chaque solvant est alors calculée de la façon suivante :

$$\%_{affinité} = \frac{D.O._i - D.O._f}{D.O._i} \times 100$$

où $D.O._i$, la densité optique mesurée à 400 nm de la suspension bactérienne dans l'eau avant ajout du solvant

$D.O._f$, la densité optique mesurée à 400 nm de la suspension bactérienne dans l'eau après l'étape de séparation de phase

Si $\%_{affinité} \rightarrow 0\%$ alors $D.O._i \approx D.O._f$: les bactéries n'ont aucune affinité pour le solvant

Si $\%_{affinité} \rightarrow 100\%$ alors $D.O._f \approx 0$: les bactéries ont une grande affinité pour le solvant.

Pour chaque mesure, sept échantillons sont préparés afin de faire varier le temps d'agitation de 10 à 120 secondes.

Résultats

Les suivis cinétiques par la méthode MATS du pourcentage d'affinité des deux souches de bactéries dans différents solvants sont représentés sur la Figure 79.

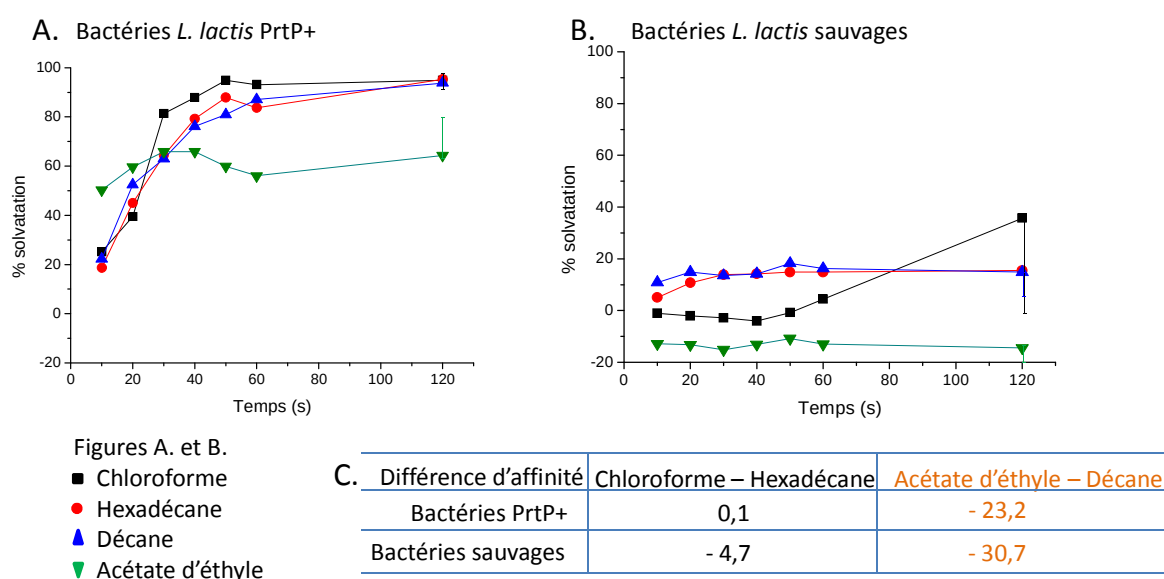


Figure 79 : Suivi cinétique par la méthode MATS de A. la souche bactérienne modifiée PrtP+, B. la souche sauvage, C. Tableau récapitulatif de la différence d'affinité observée à $t = 120$ s pour les deux couples de solvants utilisés et pour les deux souches bactériennes.

On remarque que quelque soit les solvants, l'état stationnaire de solvation des bactéries *L. lactis* non modifiées est immédiat alors que pour les bactéries *L. lactis* modifiées

PrtP+ il est atteint au bout de 60 secondes. De plus, la souche modifiée présente une plus grande affinité pour tous les solvants que la souche sauvage.

Le caractère hydrophobe / hydrophile des bactéries est directement déterminé par le pourcentage de solvation des bactéries pour l'hexadécane et le décane : 95% d'affinité est obtenu pour la souche modifiée PrtP+ et seulement 20% pour la souche sauvage (Figure 79). Ceci montre que la modification génétique portant sur la protéase de la paroi bactérienne a rendu la bactérie *L. lactis* PrtP+ beaucoup plus hydrophobe que la bactérie sauvage (qui est plutôt hydrophile).

Au contraire, les propriétés acide / base de Lewis de la paroi bactérienne des deux souches bactériennes sont les mêmes : les différences d'affinités des couples de solvants « chloroforme / hexadécane » d'une part et « acétate d'éthyle / décane » sont du même ordre de grandeur pour chacune des deux souches et ces différences sont plus importantes pour le couple « acétate d'éthyle / décane » (environ + |25| %, Figure 79.C). Ces résultats indiquent que les parois bactériennes des bactéries *L. lactis* sauvages et modifiées PrtP+ ont essentiellement un caractère acide de Lewis.

C - Cinétique de croissance des bactéries *L. lactis*

Afin d'obtenir une suspension bactérienne homogène et dans un état stationnaire précoce (i.e. la population bactérienne est homogène et jeune : les bactéries ne se dénaturent pas encore et ont toutes les mêmes propriétés physicochimiques), la cinétique de croissance des bactéries est étudiée.

Protocole

La croissance des bactéries est un phénomène spécifique à chaque souche. La courbe de croissance pour atteindre un état dit stationnaire est une donnée importante en microbiologie permettant de caractériser l'état physiologique de la bactérie en fonction du temps. La cinétique de croissance des cellules bactériennes est obtenue à partir de mesures de densité optique à intervalle de temps régulier telle que schématisée sur la Figure 80. En utilisant le modèle de Gompertz ($f(t, \theta_1)$), on peut avoir accès au taux de croissance maximum μ_{max} et au temps de latence lag (Figure 80) **(167)** :

$$f(t, \theta_1) = \ln(D.O._0) + \ln\left(\frac{D.O._{max}}{D.O._0}\right) \times \exp\left[-\exp\left(\frac{\mu_{max} e^1}{\ln\left(\frac{D.O._{max}}{D.O._0}\right)} \times (lag - t) + 1\right)\right]$$

avec t , le temps

$\theta_1 = (D.O._{max}, D.O._0, lag, \mu_{max})$

$D.O._{max}$, la densité optique maximale mesurée

$D.O._0$, la densité optique minimale appelée densité optique témoin.

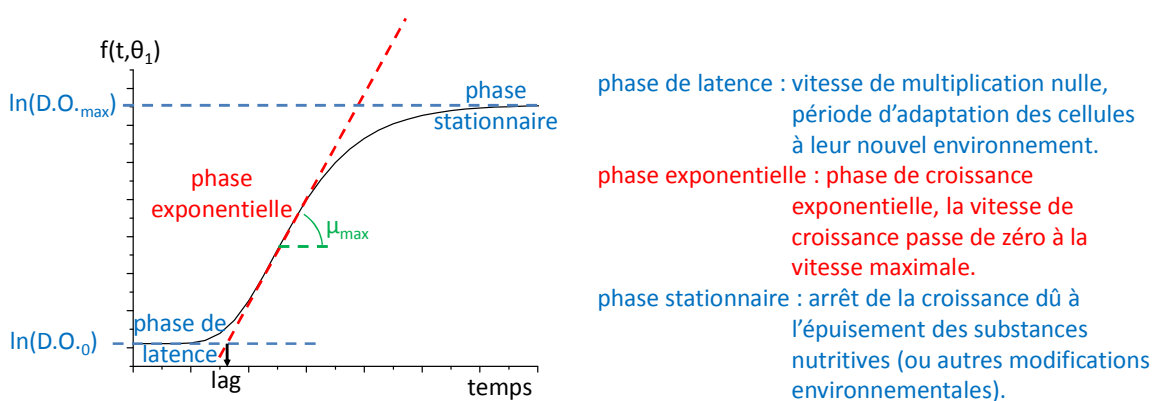


Figure 80 : Modèle de Gompertz.

Des courbes de croissance des bactéries ont été réalisées à partir de suspension bactérienne à trois concentrations différentes.

Expérimentalement, la souche est mise en culture dans le milieu {M17 + 0,5% (masse/volume) glucose} durant toute une nuit puis repiquée une fois et remise également durant toute une nuit à l'étuve. Lors du troisième repiquage, trois solutions sont préparées :

1 mL de la solution bactérienne du deuxième repiquage est prélevé puis placé dans 100 mL du milieu {M17 + 0,5% (masse/volume) glucose} formant ainsi la solution S_1 ; 0,5 mL de la solution bactérienne du deuxième repiquage est prélevé puis placé dans 100 mL du milieu {M17 + 0,5% (masse/vol) glucose} formant ainsi la solution S_2 ; 0,25 mL de la solution bactérienne du deuxième repiquage est prélevé puis placé dans 100 mL du milieu {M17 + 0,5% (masse/vol) glucose} formant ainsi la solution S_3 .

Chaque solution est ensuite suivie par dénombrement en prélevant de 1 mL de la culture bactérienne à des intervalles de temps réguliers (60 min) et pendant une durée de 24 h. En parallèle, les concentrations de suspensions bactériennes sont également déterminées par mesure de la densité optique au spectrophotomètre (ThermoSpectronic, Helios ϵ) à une longueur d'onde de 620 nm : longueur d'onde sensible à la biomasse bactérienne par diffusion de la lumière par les bactéries.

Résultats

Les courbes de la densité optique et du dénombrement en fonction du temps donnent des tendances identiques (Figure 81) : lorsque les bactéries sont re-suspendues dans un nouveau milieu de culture, un temps de latence apparaît (pas de développement bactérien car les bactéries s'acclimatent d'abord à ce nouveau milieu) suivi par une croissance exponentielle du nombre de bactéries dans le milieu pour finir par atteindre un palier (phase stationnaire). Pour une faible concentration initiale en bactérie (solution S_3), on peut voir un temps de latence d'environ deux heures. On remarque également que la phase de croissance est exponentielle et qu'elle dure environ 7 heures pour la solution S_1 , 8 heures pour la solution S_2 et 9 heures pour la solution S_3 . On atteint alors la phase stationnaire où il y a un équilibre entre les bactéries qui se divisent et celles qui meurent. Les trois solutions donnent des courbes parallèles entre elles pour la phase exponentielle, comme attendu car les trois solutions sont composées des mêmes bactéries à des concentrations différentes. Le décalage vers la droite pour les suspensions bactériennes à faible concentrations initiales en bactéries s'explique par le fait que les bactéries ont accès à plus de milieu nutritif par bactérie que les suspensions à forte concentrations bactériennes. La phase stationnaire est donc atteinte plus tard dans le temps.

Après analyse des courbes de croissance par le modèle de Gompertz, on obtient :

- temps de latence : $\text{lag} = 1,01$
- taux de croissance : $\mu_{\text{max}} = 1,38 \text{ min}^{-1}$
- temps de génération (i.e. temps nécessaire au doublement de la population) : $T_g = 30,15 \text{ minutes}$.

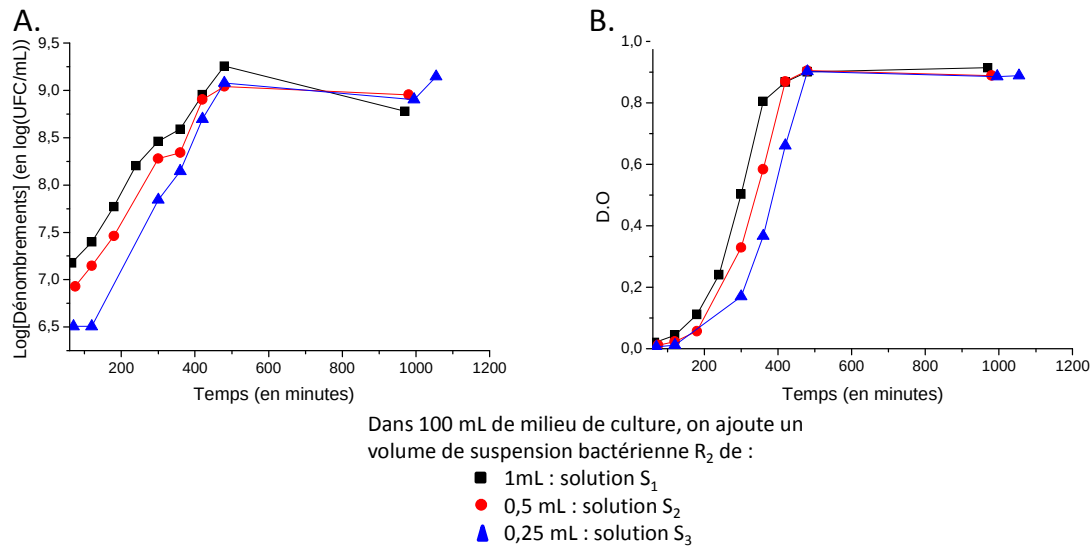


Figure 81 : Courbe de croissance des bactéries *L. lactis* modifiées *PrtP+* en fonction du temps A. selon le log(dénombrements) et B. selon la mesure de la densité optique ($D.O_{620nm}$) pour la solution S_1 en noire, S_2 en rouge et S_3 en bleue.

On souhaite obtenir une suspension bactérienne dans un état stationnaire précoce à une concentration de l'ordre de 10^9 UFC/mL après une nuit d'incubation à 30°C (c'est-à-dire au bout de 17 heures). Il s'agit donc d'obtenir la même suspension bactérienne que la solution S_1 au temps $t = 10$ heures. A partir de l'analyse de ces courbes, il a été déterminé qu'il fallait ajouter 16 μL de suspension bactérienne provenant du 2^{ème} repiquage à 100 mL de milieu de culture frais pour obtenir la suspension bactérienne dans un état stationnaire précoce au bout de 17 heures d'incubation.

D - Principes théoriques de la microscopie de fluorescence

Le diagramme de Perrin-Jablonski montre les processus photophysiques primaires (Figure 82). Il représente des niveaux d'énergie électronique et les sous-niveaux vibrationnels d'une molécule organique ainsi que les transitions radiatives (avec émission ou absorption d'un photon) et non radiatives qui ont lieu entre ces niveaux et ces sous-niveaux. Ces différents processus sont :

- la fluorescence : processus radiatif de l'état S_1 à S_0 .

- et deux processus non radiatifs : la conversion interne (C.I.) qui est une transition entre états électroniques de même spin. On passe alors de S_n à S_m ; et la conversion inter-système (C.I.S.) qui est une transition entre deux états de spin différents. On passe alors de S_n à T_n .

Une fois peuplé, l'état triplet T_n peut lui aussi se désactiver :

- par phosphorescence : processus radiatif de l'état T_1 à T_0 .

- et par la conversion inter-système T_n vers S_n .

Quand on excite en phase condensée une molécule dans un état électronique excité singulet S_n , il intervient très rapidement une conversion interne suivie d'une relaxation vibrationnelle où les molécules excitées arrivent sur le niveau vibrationnel le plus bas de l'état S_1 se désexcitant par les processus radiatifs ou non décrits au-dessus.

Lors de l'excitation d'une molécule, deux problèmes majeurs peuvent être rencontrés :

- le photo-blanchiment : suite à l'excitation photonique, la molécule à l'état excitée a tendance à être plus réactive ou photodétruite, donnant naissance à des photo-produits. Ces derniers sont souvent non fluorescents. Ceci se traduit donc par une perte progressive de l'intensité de fluorescence émise par un échantillon.
- la saturation : lorsque l'intensité de fluorescence ne varie plus linéairement avec l'énergie incidente (processus monophotonique) ou le carré de l'énergie (processus biphotonique), il peut se produire des effets non linéaires d'interactions rayonnement / matière conduisant à des problèmes d'interprétation des résultats (ionisation, etc...).

Dans ces deux cas, le signal de fluorescence peut-être difficile à traiter.

Pour que la molécule absorbe, il faut lui apporter une certaine énergie. En effet, lorsqu'une molécule absorbe un photon, elle peut être portée dans différents niveaux vibrationnels d'un état excité selon l'énergie E apportée par la source excitatrice :

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

avec c , la célérité de la lumière

h la constante de Planck

λ , la longueur d'onde de la lumière incidente.

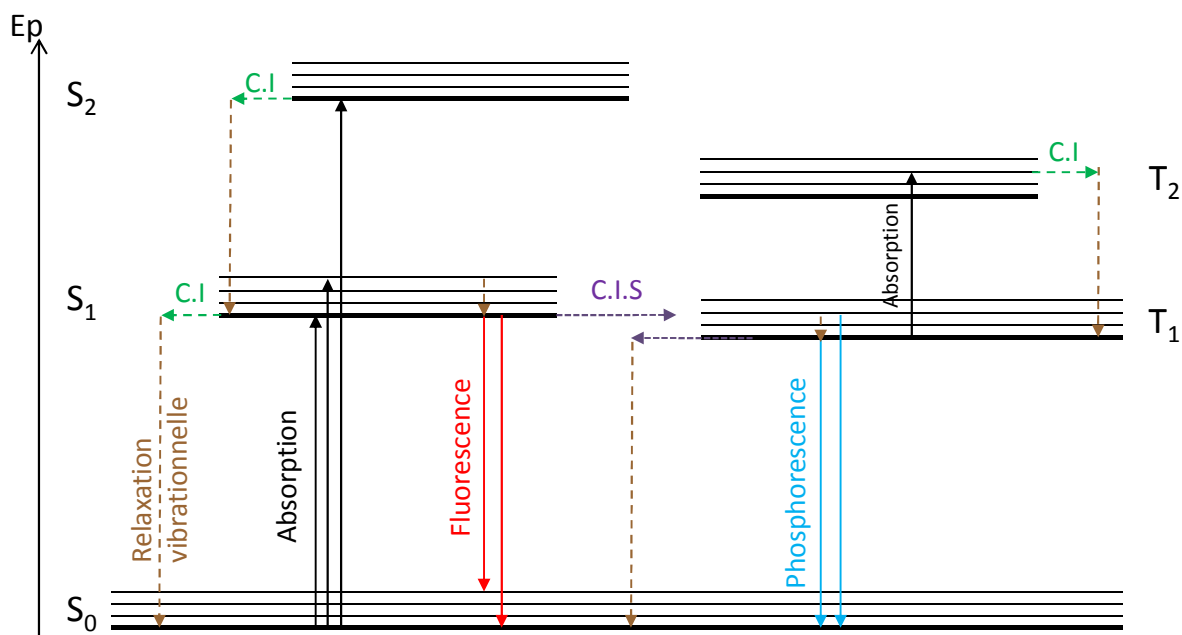


Figure 82 : Diagramme de Perrin-Jablonski. Les traits pleins verticaux représentent les divers processus radiatifs et les lignes pointillées verticales la relaxation vibrationnelle. Le sigle C.I. représente la conversion interne et C.I.S. la conversion inter-système.

En phase gazeuse, l'énergie absorbée par une molécule ne peut prendre que certaines valeurs discrètes d'énergie et le spectre d'absorption correspond donc à un spectre de raies.

En phase condensée, les molécules ne sont plus isolées et de nombreuses interactions ont lieu avec le milieu environnant, ce qui conduit à un continuum d'états vibrationnels. L'ensemble des transitions possibles entre l'état fondamental et ce continuum crée une « enveloppe » qui correspond au spectre d'absorption.

Les conversions internes qui se produisent lors de la désexcitation d'une molécule sont à l'origine des pertes d'énergie entre les photons d'excitation et les photons d'émission. Ainsi la longueur d'onde correspondant au maximum d'émission est toujours supérieure à la longueur d'onde centrale d'absorption car l'émission se produit le plus souvent à partir de l'état vibrationnel de plus basse énergie de l'état singulet excité. Ce phénomène est appelé déplacement de Stokes. Ce déplacement est une caractéristique importante : en effet si le déplacement de Stokes est faible, il sera difficile de séparer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission au moyen de filtres. La détection efficace du signal de fluorescence sans bruit parasite provenant de l'excitation sera alors compromise. De plus, si le recouvrement entre les deux spectres est important, une réabsorption des photons de fluorescence émis peut se produire et provoquer des distorsions dans le spectre d'émission.

Il faut donc connaître parfaitement le spectre d'absorption de la molécule à étudier pour accorder la longueur d'onde du laser / lampe UV sur l'absorption désirée et le spectre d'émission pour l'observer aux bonnes longueurs d'onde.

E - Adsorption protéique sur la SAM d'ODT, mesures d'angle de contact

Des études cinétiques d'angle de contact, complémentaires aux mesures effectuées sur la SAM d'ODT recouverte de protéines, ont été réalisées au goniomètre « macroscopique ».

Une goutte de solution protéique à la concentration de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans l'eau distillée a été déposée sur la SAM d'ODT nue. L'étude cinétique (Figure 83.A) montre que l'angle de contact diminue au cours du temps ($\theta_{10\text{min(ODT+BSA)}} = 80^\circ$) reflétant une adsorption de la protéine sur la surface hydrophobe de la SAM d'ODT dans un temps très court.

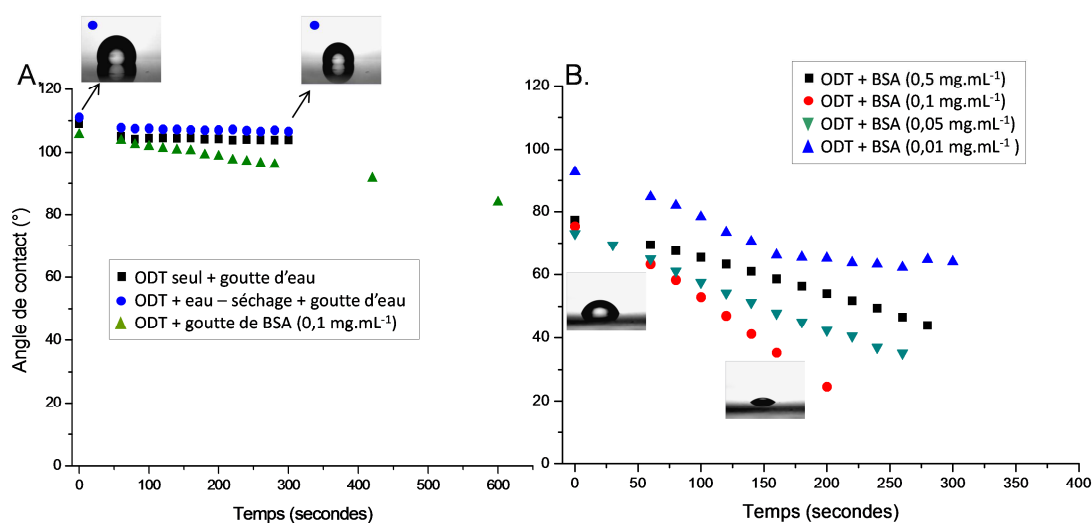


Figure 83: Cinétique de l'angle de contact sur la SAM d'ODT A. mesures de contrôle et B. mesures suite à l'adsorption de différentes concentrations de protéines BSA. Les images de l'étalement de la goutte d'eau en fonction du temps sont également présentées.

Après adsorption protéique sur la SAM d'ODT pendant 90 minutes (i.e. les protéines BSA ont eu le temps de s'adsorber sur la surface), quelque-soit la concentration protéique (variant de $0,05$ à 1 mg.mL^{-1}), la cinétique montre que l'angle de contact initial vaut $\theta_{i(\text{ODT+BSA } 0,05-1 \text{ mg.mL}^{-1})} = 73 \pm 3^\circ$ et qu'il diminue au cours du temps (Figure 83.B). Cette diminution est le reflet de la compétition de différents facteurs : réarrangement des molécules au sein de la goutte sur la surface (qui a tendance à étaler la goutte d'eau s'il y a une forte affinité entre l'eau et la surface sondée) et évaporation de la goutte (i.e. rétraction).

Seule la cinétique d'angle de contact réalisée sur la SAM d'ODT après adsorption de BSA à une concentration de $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ est différente. En effet, l'angle de contact initial vaut $\theta_{i(\text{ODT+BSA } 0,01 \text{ mg.mL}^{-1})} = 91 \pm 2^\circ$ et la courbe $\theta_i = f(t)$ présente deux régimes : elle diminue fortement puis présente très rapidement (en moins de 150 secondes) un plateau avec une valeur d'angle de contact $\theta_{(\text{plateau, ODT+BSA } 0,01 \text{ mg.mL}^{-1})} = 68 \pm 2^\circ$ (donnée incluse dans le Tableau 3) proche de la valeur de l'angle de contact initial obtenue pour les autres concentrations de BSA utilisées. Les phénomènes physico-chimiques ne sont pas encore totalement élucidés mais on peut supposer que le premier régime correspond à une étape de

« mouillage » : la goutte d'eau relaxe de son angle de contact initial vers une valeur pseudo-équilibre θ_{plateau} où la couche de protéines est modifiée (changement de conformation de la protéine ou modification de l'assemblage des protéines à la surface). Cette première étape interviendrait uniquement pour des concentrations assez faibles de protéines afin de permettre la réorganisation structurale des protéines et/ou film protéique. Au contraire, le second régime résulte de l'adsorption de la goutte d'eau sur la surface BSA / SAM d'ODT: on se retrouve dans le régime initial pour des concentrations protéiques plus importantes et on obtient alors $\theta_{(\text{plateau, ODT+BSA } 0,01\text{mg/mL})} \approx \theta_{i(\text{ODT+BSA } 0,05-1 \text{ mg/mL})}$.

Comparaison des résultats obtenus au goniomètre « macroscopique » et « picoLitre »

La faible divergence des angles de contact initiaux entre le goniomètre « macroscopique » et « picoLitre » observé (cf. Tableau 3, chapitre III – 3 – 2) peut s'expliquer par le fait qu'au goniomètre « macroscopique », le temps initial n'est pas le vrai temps « $t = 0$ » = $t_{(\text{dépôt goutte})}$ car ce temps est décompté par un chronomètre déclenché manuellement (le temps indiqué correspond à un temps réel de 2 à 10 s). Au contraire, les images et les angles de contact initiaux donnés par le goniomètre « picoLitre » permettent d'obtenir le véritable temps initial car l'acquisition des images par la caméra commence avant le dépôt automatique de la goutte d'eau distillée sur la surface.

De plus, les gouttes sont réalisées de manière manuelle au goniomètre « macroscopique » et n'ont donc pas toutes exactement le même volume au contraire du goniomètre « picoLitre », un facteur influençant l'angle de contact de la goutte d'eau. En effet, l'angle de contact dépend du réarrangement des molécules au sein de la goutte sur la surface : plus une goutte sera volumineuse, plus elle contiendra de molécules pouvant interagir avec la surface, au cours du temps ces molécules peuvent se réorganiser et donner lieu à un étalement ou à une rétraction de la goutte et donc à une modification de l'angle de contact. Enfin, la valeur de l'angle de contact dépend des conditions de température et d'humidité de la pièce influant sur l'évaporation de la goutte déposée sur le support. Au laboratoire, les deux goniomètres ne sont pas placés dans la même pièce.

En conclusion, les données obtenues au goniomètre « picoLitre » apparaissent plus fiables que celles obtenues au goniomètre « macroscopique » et reflètent la réalité de l'adsorption protéique sur la SAM mais sont plus difficiles à acquérir expérimentalement.

F - Caractérisation de la SAM d'ODT deutéré

La surface SAM d'ODT deutéré a été caractérisée par spectroscopie SFG et par mesures d'angle de contact. L'angle de contact initial d'une goutte d'eau déposée sur le support mesurée au goniomètre « macroscopique » ($\theta_i = 109 \pm 2^\circ$) révèle une surface hydrophobe homogène identique à la surface d'ODT SAM hydrogéné.

La spectroscopie SFG de la SAM d'ODT deutéré exposée à l'air a été réalisée dans la gamme spectrale des groupements CD_3 et CD_2 soit entre 2000 et 2300 cm^{-1} (Figure 86). La déconvolution du spectre expérimental a été réalisée selon l'équation (1) (cf. chapitre II – 3 – 2) dont les contraintes sur les paramètres sont les mêmes que celles sur la SAM d'ODT hydrogéné. En particulier, la différence de phase est fixée à la valeur $\Delta\varphi = 290^\circ$, les demi-largeurs à mi-hauteurs sont fixes et on considère tous les modes de vibrations des groupes CD_3 et CD_2 .

La déconvolution des spectres montre qu'il existe sept modes de vibration dans la SAM de molécules d'ODT deutéré en accord avec la littérature (170) :

- la vibration d'élongation symétrique et antisymétrique du groupe CD_3 à 2073 et 2218 cm^{-1} respectivement
- la vibration de la résonance de Fermi du groupe CD_3 à la pulsation 2130 cm^{-1}
- la vibration d'élongation symétrique et antisymétrique du groupe CD_2 à 2100 et 2200 cm^{-1} respectivement
- les deux vibrations de la résonance de Fermi du groupe CD_2 à 2142 et 2165 cm^{-1}

En conclusion, la fonctionnalisation du substrat d'or par les molécules d'ODT deutéré permet d'obtenir une SAM d'ODT deutéré homogène sur toute sa surface.

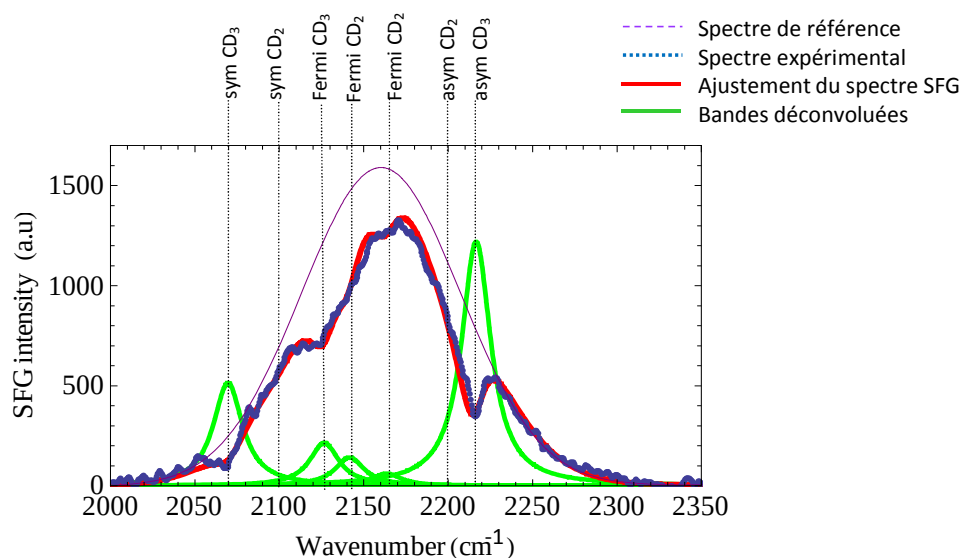


Figure 84 : Spectre expérimental de la SAM d'ODT deutéré exposée à l'air (en traits bleus pointillés) et du cristal GaAs exposé à l'air (courbe pointillée violette). L'ajustement réalisé suite à la déconvolution du spectre expérimental est également présent (courbe rouge) ainsi que les bandes déconvoluées (courbes vertes).

G - Mesure de l'interaction bactérie – protéine par la méthode de Bradford

Méthode de Bradford

La concentration des protéines « adsorbées » sur la paroi bactérienne a été déterminée par la méthode chimique de Bradford. Elle consiste à utiliser le bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G250) **(168) (169)** dont le spectre d'absorption se modifie lors de son interaction non covalente avec les protéines (Figure 85).

Expérimentalement, on détermine dans un premier temps une courbe étalon qui mesure l'évolution de l'absorbance à 595 nm d'une solution de bleu de Coomassie en fonction d'ajout de concentration croissante de protéines BSA (Figure 86.A).

Il n'est pas possible de mesurer directement la concentration de protéines liées aux bactéries dans une suspension {bactéries + BSA} dans la mesure où :

- au sein de cette suspension, coexistent de la protéine libre et de la protéine « fixée »
- le bleu de Coomassie n'est pas spécifique à la BSA et peut se fixer aux protéines de surface des bactéries

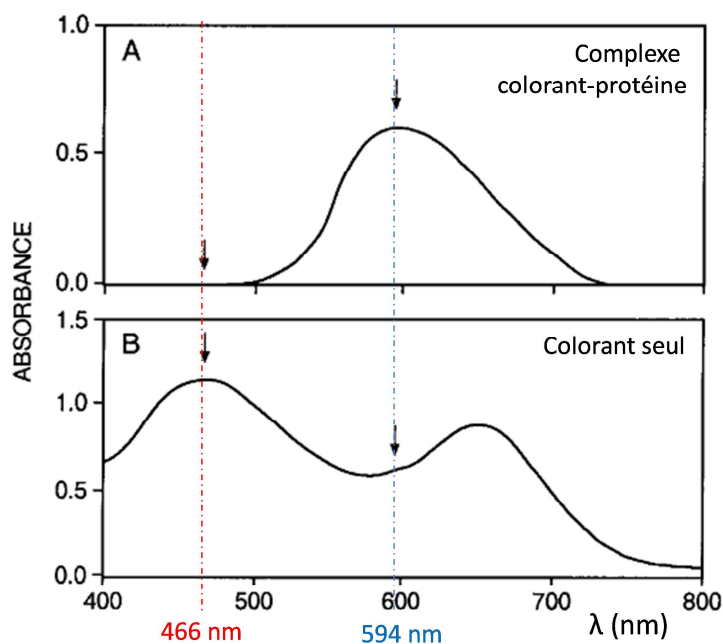
Pour s'affranchir de ces possibles artefacts de mesure, la suspension {bactéries + BSA} a été centrifugée (10 minutes, 7000xg) puis 1 mL du surnageant (contenant la BSA libre et éventuellement les déchets bactériens) a été diluée dans 0,8 mL du colorant de Bradford. On mesure l'absorbance de cette solution à 595 nm que l'on compare à la courbe étalon pour déterminer la concentration protéique de ce surnageant. De façon complémentaire, une suspension de bactéries seules est aussi centrifugée dans les mêmes conditions puis mélangée au bleu de Coomassie pour déterminer la concentration du colorant fixé aux déchets bactériens. Par différenciation on a alors accès à la concentration de protéine BSA liée aux bactéries.

Résultats

La concentration des protéines adsorbées sur les parois bactériennes, déterminée par la méthode de Bradford, donne les résultats suivants (Figure 86) :

- 86% des bactéries *L.lactis* PrtP+ hydrophobes sont recouvertes de protéines BSA
- 56% des bactéries *L.lactis* hydrophiles sont recouvertes de protéines BSA

lorsque l'on considère que les protéines à la surface des bactéries ont la même forme que celle en solution (forme « normal ») et recouvre totalement la paroi bactérienne.



C. Structure du bleu de Coomassie

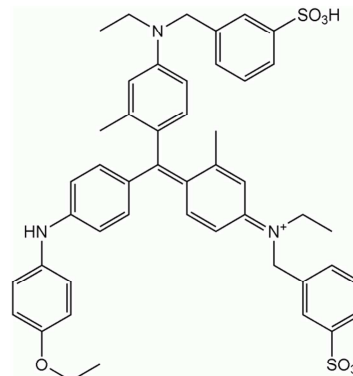
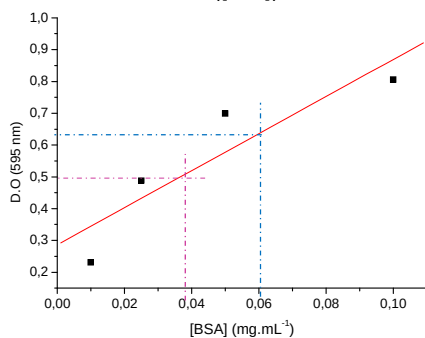


Figure 85 : Spectres d'absorption A. du bleu de Coomassie en interaction avec des protéines, B. du bleu de Coomassie seul dans l'eau distillée, figure adaptée de la Ref (169) et C. structure du colorant de Bradford.

A.

Courbe étalon D.O=f([BSA])



$\Delta D.O_{\text{phobes}} = 0,5$
 $\Delta D.O_{\text{philes}} = 0,64$

B.

Surnageant de :	D.O (595 nm)	[BSA] _{surnageant}	[BSA] _{paroi bactérienne}
Bactéries phobes	0,284		
Bactéries phobes + BSA	0,787	0,038	0,062
Bactéries philes	0,132		
Bactéries philes + BSA	0,769	0,06	0,04

$$[BSA]_{\text{surnageant}} + [BSA]_{\text{paroi bactérienne}} = [BSA]_{\text{totale}} = 0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$$

Données : $M_{\text{BSA}} = 66\,267 \text{ g.mol}^{-1}$

$$S_{\text{forme N de la BSA}} = 30 \times 80 \text{ \AA}^2 = 2,4 \times 10^{-17} \text{ m}^2$$

$$A_{\text{surface d'une bactérie}} = 4 \cdot \pi \times r^2 = 3,14 \times 10^{-12} \text{ m}^2$$

$$N_A = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

$$\text{nbr total de bactéries/L} = 5 \times 10^{12} \text{ UFC/L}$$

Calculs : $A/S = 130\,833 \text{ BSA sur 1 bactérie}$
 or $[SAB] = \text{Nbr BSA/L} \times M_{\text{BSA}} / N_A$
 donc $\text{nbr de bactéries+BSA/L} = \text{Nbr BSA/L} / (A/S)$

Taux de bactéries recouvertes totalement de BSA =

$$\text{nbr de bactéries+BSA/L} / \text{nbr total de bactéries/L} \times 100$$

$$= 86 \% \text{ de bactéries hydrophobes}$$

$$= 56 \% \text{ de bactéries hydrophiles}$$

Figure 86: A. Courbe étalon de l'absorbance (D.O., densité optique) en fonction de la concentration de protéines BSA et B. Résultats de la mesure de D.O. pour les différentes solutions.

La valeur pour les protéines « adsorbées » à la surface des bactéries hydrophiles est en accord avec les mesures de mobilités électrophorétiques mais celle pour les bactéries hydrophobes non. En considérant les deux méthodes (mesures de M.E. et méthode de Bradford), les mesures de mobilité électrophorétique sont plus pertinentes et plus fiables que celles obtenues par la méthode de Bradford.

En effet, il y a une incertitude sur la concentration des protéines au sein de la solution car celles-ci peuvent s'adsorber sur les parois de la cuve. Une étude concernant l'adsorption de la BSA sur les cuves d'absorbance au cours du temps avec et sans colorant de Bradford aurait dû être menée. De plus, le fait que le colorant de Bradford ne soit pas spécifique aux protéines BSA ajoute de l'incertitude car peut-être que les bactéries au cours de temps relarguent d'autres protéines qui peuvent ensuite se complexer avec le bleu de Coomassie.

Enfin, le taux de recouvrement des protéines sur la paroi bactérienne est déterminé en supposant que les protéines en interaction avec les bactéries gardent la même forme que celle en solution et que les protéines tapissent la paroi bactérienne en se couchant et en ne formant qu'une monocouche. Il est possible qu'une protéine BSA en interaction avec les bactéries interagisse également avec d'autres protéines.

En conclusion, les mesures de concentration protéique suite à l'interaction entre la protéine BSA et les bactéries lactiques ne sont pas probantes et les valeurs données ci-dessus sont surestimées. Par la suite, seuls les résultats de zétamétrie sont utilisés, soit un taux de recouvrement des bactéries par les protéines d'environ 50% pour les deux souches de bactéries.

H - Effet de l'hétérogénéité du recouvrement bactérien sur les spectres SFG

L'adhésion des bactéries *L.lactis* dans l'eau distillée sur la SAM d'ODT peut conduire à deux systèmes selon le protocole de rinçage (cf. chapitre III) :

- sans prendre de précautions particulières, la SAM d'ODT est recouverte de bactéries formant des réseaux (i.e. recouvrement bactérien hétérogène)
- en prenant des précautions particulières lors du rinçage, le recouvrement bactérien de la SAM d'ODT est homogène et est estimé à $60 \pm 10 \%$ grâce à diverses techniques.

Dans cette annexe, les spectres SFG de la SAM d'ODT en contact avec les bactéries *L. lactis* modifiées PrtP+ hydrophobes formant un tapis bactérien homogène (Figure .A) ou un réseau bactérien (Figure .B) ont été acquis puis déconvolués selon la méthode expliquée au chapitre III – 2. Selon le type de recouvrement bactérien de la surface, différentes formes spectrales sont obtenues. En particulier pour des spectres SFG réalisés le même jour et avec le même temps d'acquisition, l'intensité maximale du spectre SFG est deux fois plus importante dans le cas où le recouvrement bactérien est hétérogène sur la SAM que pour un recouvrement homogène. Ceci indique que les faisceaux visible et infrarouge sont probablement moins absorbés par le milieu biologique environnant la surface ce qui est en accord avec l'obtention un recouvrement hétérogène de la surface (i.e. moins de bactéries sont présentes sur la surface analysée par les faisceaux donc moins d'absorption).

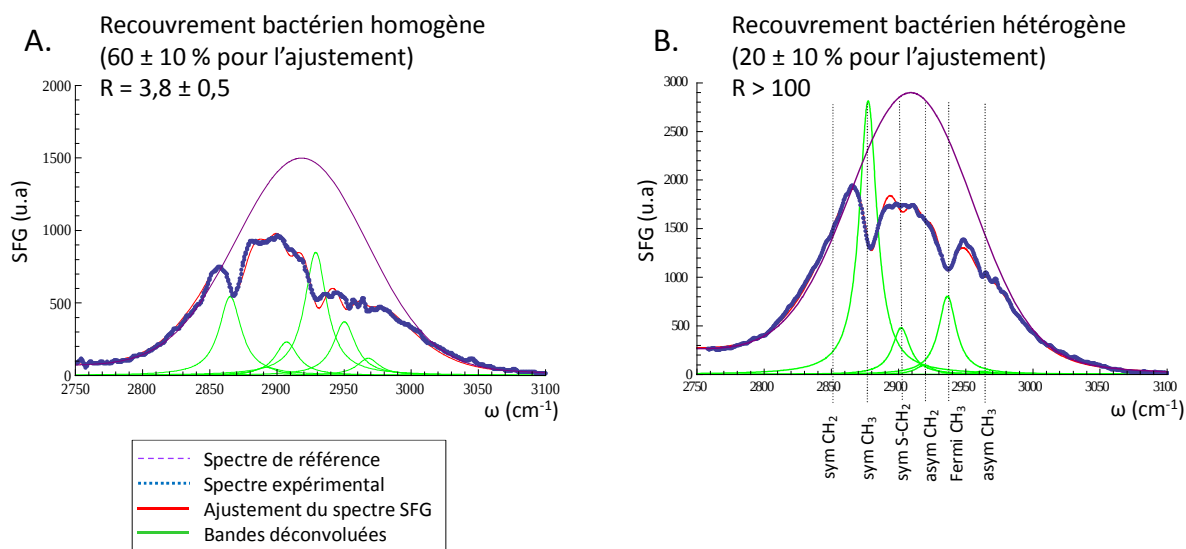


Figure 89 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT (traits pointillés bleus) et leurs déconvolution (courbe rouge) A. lorsque la surface est recouverte de façon homogène par les bactéries *L. lactis* modifiées PrtP+ et B. lorsque la surface est recouverte de façon hétérogène par les bactéries *L. lactis* modifiées PrtP+. La courbe en pointillés violets représente le profil spectral du faisceau IR en milieu aqueux et les bandes vertes, les bandes déconvoluées.

Lorsque la SAM d'ODT est recouverte par les bactéries de façon hétérogène (Figure .B), le meilleur ajustement du spectre expérimental SFG est obtenu pour un

recouvrement bactérien de $20 \pm 10 \%$ ce qui paraît raisonnable. Malgré la prise en compte d'un recouvrement bactérien plus faible que dans le cas d'un recouvrement bactérien homogène de la SAM, la valeur du rapport R (i.e. conformation des molécules d'ODT) n'est pas du tout la même que celle obtenue pour un recouvrement homogène : R augmente drastiquement ($R > 100$).

Lorsque la valeur du rapport R est trop importante (typiquement $R > 20-30$), le spectre SFG expérimental ne peut plus être modélisé sans changer uniquement la valeur de l'angle twist. Pour modéliser correctement le spectre, il faudrait changer l'angle tilt θ voire les angles ψ_1 des molécules A et B : les molécules d'ODT ne formeraient plus une structure en monocouches autoassemblées. De plus, les spectres SFG de la SAM d'ODT en contact avec des réseaux bactériens ne sont pas reproductibles. Par conséquent, l'analyse de spectres SFG et l'obtention des conformations de la SAM d'ODT en contact avec un milieu biologique hétérogène ne sont plus possibles.

En conclusion, il est important de contrôler l'état de la surface en contact avec les bactéries et de s'assurer du bon recouvrement bactérien homogène de la SAM d'ODT en réalisant des rinçages dits « précautionneux ». Ces résultats montrent encore une fois la sensibilité de la technique SFG.

Annexe 3 : Complément aux Perspectives - expériences préliminaires

A - Conformation de la protéine BSA adsorbée sur la SAM d'ODT par SFG

Il existe différentes méthodes permettant de déterminer la conformation ou d'obtenir des informations structurales sur une protéine, notamment le dichroïsme circulaire (une spectroscopie d'adsorption basée sur la mesure de la différence d'adsorption de composés chiraux) qui permet de déterminer entre autres choses le pourcentage relatif d'hélices alpha et de feuillets bêta au sein de la protéine (171). Cette dernière méthode est d'une utilisation relativement facile pour étudier les protéines en solution mais s'avère très difficile à mettre en œuvre dans le cas de protéines adsorbées. La détection des bandes vibrationnelles (i.e. bandes amides) d'une protéine par la spectroscopie de génération de fréquence somme (SFG) constitue une alternative plus sensible au dichroïsme circulaire afin d'étudier la conformation des protéines à une interface (172).

Dans le cas des protéines, différents groupes (Tableau 11) vibrent à une fréquence caractéristique dépendant de leur environnement chimique et donc dépendant de la structure secondaire de la protéine dans laquelle ils évoluent (hélices alpha, feuillets bêta, turns...). Selon l'intensité relative de ces différents modes de vibration observés en spectroscopie SFG, il est alors possible de déterminer le pourcentage d'hélices alpha (bande amide I autour de 1660 cm^{-1}) et de feuillets bêta (deux bandes amide I autour de 1630 et 1680 cm^{-1}) au sein de la protéine adsorbée et de relier cette valeur à une conformation possible de la protéine.

Structure secondaire	Vibrations	$\omega(\text{cm}^{-1})$
Hélice alpha	stretching C=O bande amide I	1650 – 1670
	couplage entre les modes pliage N-H et le stretching C-N bande amide II	1530 – 1570
	stretching N-H bande amide A	3050 – 3060
Feuillets bêta	stretching C=O, mode B_2 stretching C=O, mode B_1/B_3 bande amide I	1620-1630-1640 1680
Turns		1672-1682
Structure désordonnées		1650

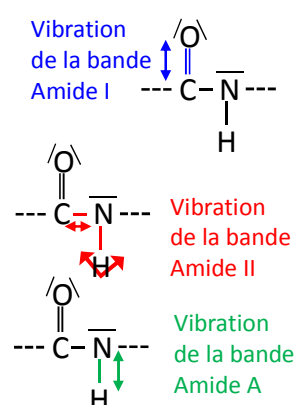


Tableau 11 : Modes de vibration des différentes structures secondaires au sein d'une protéine dans l'eau distillée. Données provenant des Ref. (172) (173) (174).

La principale difficulté de la spectroscopie SFG dans ce domaine spectral provient de l'absorption de l'eau atmosphérique qui était inexistante entre 2750 et 3100 cm^{-1} et qui perturbe le spectre SFG des protéines. L'OPA et le système permettant la recombinaison des faisceaux infrarouge et visibles jusqu'à l'échantillon sont alors enfermés dans des boîtes hermétiques et purgés (système FT-IR purge gas generator, Whatman, USA) qui dessèche l'air.

Une expérience préliminaire a consisté à réaliser l'adsorption protéique dans l'eau deutérée (l'eau liquide absorbe à 1645 cm^{-1}) en déposant une goutte (environ 50 μL) de BSA à 10 mg.mL^{-1} dans l'eau deutérée sur la SAM d'ODT avant d'ajouter la lame CaF_2 . Aucune rinçage n'a été effectué afin d'obtenir une concentration la plus importante possible en protéines ce qui pourrait donner lieu à un signal SFG plus important. On observe alors les bandes caractéristiques des protéines sur le spectre expérimental de la protéine adsorbée sur la SAM d'ODT (Figure 87) :

- la vibration d'élongation C=O de la bande amide I de l'hélice alpha à 1633 cm^{-1} .
- la bande amide I attribuée aux feuillets bêta à 1694 cm^{-1} .
- la vibration d'élongation C=O des groupes -COOH des acides aminés de la structure primaire de la protéine BSA à 1734 cm^{-1} .

Le déplacement de la fréquence de la bande amide I de $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ par rapport à la valeur de 1652 cm^{-1} donnée par des mesures FTIR (175) est dû au solvant deutéré et a déjà été observé dans la littérature.

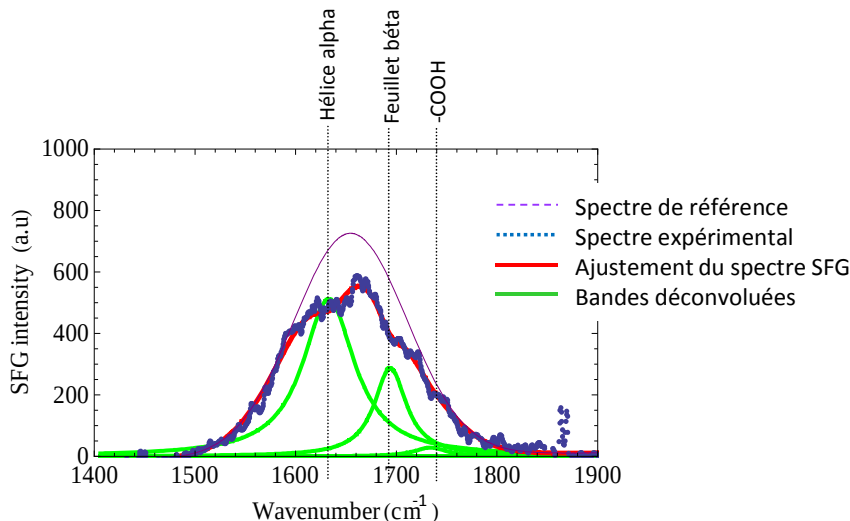


Figure 87 : Spectre SFG expérimental des protéines BSA (10 mg.mL^{-1}) adsorbées sur la SAM d'ODT (courbe bleue) dans l'eau deutérée et l'ajustement obtenu (courbe rouge). La courbe en pointillés violets représente le profil spectral du faisceau IR et les bandes vertes, les bandes déconvoluées.

Par la suite, l'adsorption des protéines de BSA sur la SAM d'ODT pourra être réalisée dans les mêmes conditions que l'étude SFG entre 2750 et 3100 cm^{-1} : adsorption de BSA à 0,1 mg.mL^{-1} dans l'eau deutérée pendant 90 minutes puis rinçages.

De plus, l'adsorption de BSA sur le substrat pourra être réalisée à différentes valeurs de pH dans une solution acide de D-Cl et basique de DO⁻ afin de faire varier la conformation de la BSA. Ainsi il sera possible de corréler les éventuels changements d'intensité de la bande amide I attribuée aux hélices alpha et de celle attribuée aux feuillets bêta aux différentes conformations de la protéine.

En conclusion, l'étude de l'adsorption protéique sur une surface fonctionnalisée par spectroscopie SFG permet de déterminer l'effet de la protéine sur la conformation de la SAM d'ODT mais elle pourra également déterminer l'effet de la SAM d'ODT et des bactéries sur la conformation de la protéine BSA. Ainsi, les interactions mises en jeu entre une protéine et un substrat ou des biomolécules pourront être décrites de façon plus complète.

B - Effet antiadhésif de la SAM d'ODT pour l'adhésion de bactéries *Staphylococcus aureus*

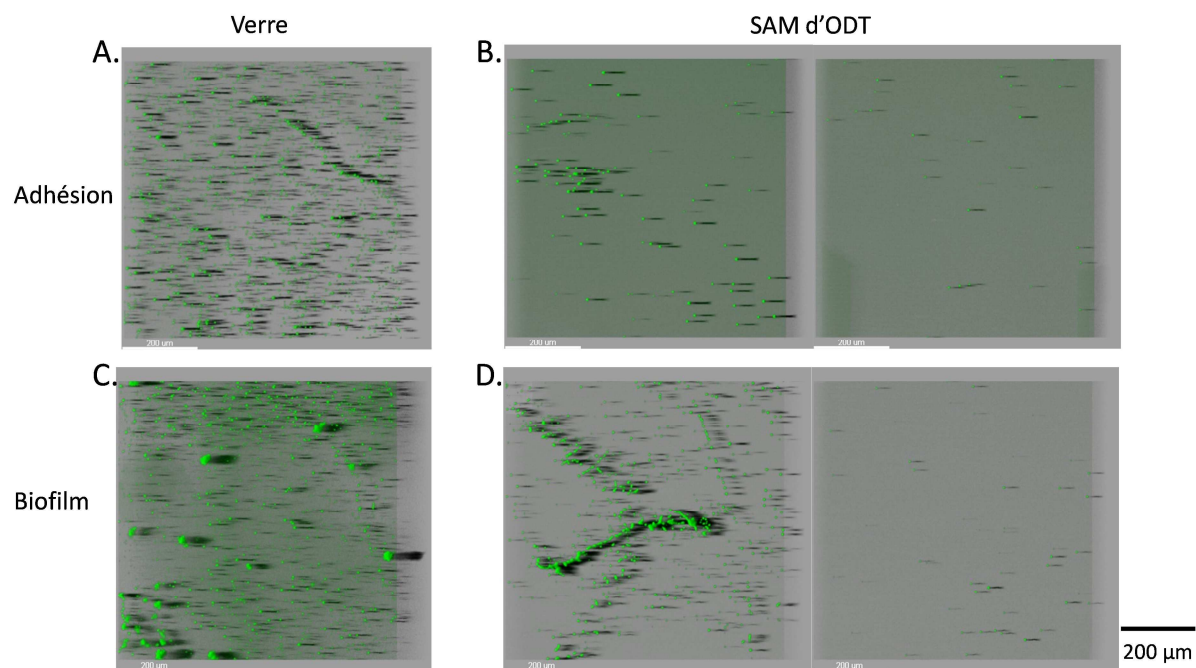
Nous avons étudié l'effet antiadhésif des supports en utilisant une concentration bactérienne plus conforme aux études microbiologiques, avec une procédure de rinçage adoptée par une grande majorité de microbiologistes et en n'utilisant non plus les souches non pathogènes des bactéries *Lactococcus lactis* mais une souche pathogène de *Staphylococcus aureus* (souche *Staph. Aureus* AH1331 super GFP morphologiquement et physicochimiquement proche de la souche *L. lactis* modifiée PrtP+). Seule l'étude par la microscopie confocale a été réalisée.

L'adhésion bactérienne sur la SAM d'ODT est réalisée en immergeant le support dans la suspension bactérienne (10^6 UFC/mL, c'est-à-dire 1000 fois moins que la suspension de bactéries *L. lactis*) pendant deux heures. Le support est ensuite rincé par passage successif dans l'eau distillée (six fois) (i.e. rinçage « abrupt »). Finalement, la SAM d'ODT colonisée par les bactéries est retournée puis déposée dans une boîte de pétri contenant de l'eau distillée (observation de l'adhésion bactérienne au microscope confocal) ou contenant du milieu de culture (mise à l'étuve pendant 24 heures à 37°C afin d'observer le biofilm résultant). L'adhésion bactérienne et la formation du biofilm résultant a également été réalisée sur un support verre (préalablement nettoyé par une solution détergente RBS à 5% et par une succession de rinçages à l'eau distillée à 50°C puis à température ambiante) afin de comparer les résultats obtenus avec la SAM.

Les images de fluorescence (Figure 88) montrent une diminution du nombre de bactéries *Staphylococcus aureus* hydrophobes adhérentes sur la SAM d'ODT par rapport au support verre : les forces d'adhésion des bactéries hydrophobes sont plus faibles sur la SAM (lui aussi hydrophobe) que sur le support verre hydrophile. L'incubation du support colonisé par les bactéries pendant 24 heures à l'étuve donne lieu à peu de biofilms dans le cas du support verre (Figure 88.C) et à aucun biofilm dans le cas de la SAM (Figure 88.D).

La structure « brosse » des chaînes d'ODT confère ainsi une forte propriété antiadhésive des bactéries hydrophobes pathogènes, bien meilleure qu'un support hydrophile qui limite pourtant l'adhésion des bactéries hydrophobes par des interactions défavorables.

En considérant les résultats obtenus sur la souche hydrophile des bactéries *L. lactis* sur la SAM d'ODT dans des conditions microbiologiques « anormales » (i.e. forte concentration bactérienne et rinçage particulier, cf. chapitre III – 3), on peut supposer que l'adhésion de souches bactériennes *Staphylococcus aureus* hydrophiles sur la SAM d'ODT serait quasi-inexistante dans des conditions microbiologiques « normales ». En présence de protéines (avant ou pendant la colonisation bactérienne), la SAM devrait rester totalement antiadhésive que ce soit avec des bactéries hydrophobes ou hydrophiles.



*Figure 88 : Images de fluorescence au microscope confocal ($780 \times 780 \mu\text{m}^2$) des bactéries *Staphylococcus aureus* A. après deux heures d'adhésion sur le verre, B. après deux heures d'adhésion sur la SAM d'ODT (les deux images correspondent à deux zones différentes du support), C. après 24 heures d'incubation à l'étuve sur le verre et D. après 24 heures d'incubation à l'étuve sur la SAM d'ODT (les deux images correspondent à deux zones différentes du support). L'ombre noire correspond à la projection de la profondeur du biofilm. Les supports verre et ODT SAM ont été retournés après l'adhésion bactérienne et plusieurs rinçages.*

La SAM d'ODT s'avère donc être une surface très intéressante pour une application antiadhésive de bactéries pathogènes ou non.

Articles

L'ensemble de ce travail a fait l'objet de deux articles :

- « Non-Invasive Vibrational SFG Spectroscopy Reveals That Bacterial Adhesion Can Alter the Conformation of Grafted “Brush” Chains on SAM », Emilie Bulard, Ziang Guo, Wanquan Zheng, Henri Dubost, Marie-Pierre Fontaine-Aupart, Marie-Noëlle Bellon-Fontaine, Jean-Marie Herry, Romain Briandet, and Bernard Bourguignon. *Langmuir* 2011, 27, 4928–4935.
- « Competition of bovine serum albumin adsorption and bacterial adhesion onto surface-grafted ODT brushes – *in situ* study by vibrational SFG and fluorescence confocal microscopy », Emilie Bulard, Marie-Pierre Fontaine-Aupart, Henri Dubost, Wanquan Zheng, Marie-Noëlle Bellon-Fontaine, Jean-Marie Herry and Bernard Bourguignon. *Accepted à Langmuir*, 2012.

Liste des figures

Figure 1 : Pluridisciplinarité de ce travail de thèse.	11
Figure 2 : Exemples d'habitats colonisés par des bactéries dans la vie quotidienne.	14
Figure 3 : Diversité morphologique des bactéries.....	15
Figure 4 : Représentation schématique d'une paroi bactérienne.....	15
Figure 5: Les différents niveaux d'organisation d'une protéine. La structure primaire correspond à celle de la protéine BSA.	18
Figure 6 : Vue schématique de l'adsorption d'une protéine..	20
Figure 7 : Développement d'un biofilm bactérien sur une surface.	21
Figure 8 : Schéma de principe d'une surface « brosse ».	24
Figure 9 : Les différentes techniques SFG appliquées à l'étude de l'interaction entre une protéine transmembranaire et une membrane artificielle.	30
Figure 10 : Schéma de fonctionnalisation du substrat d'or par les molécules d'ODT.....	36
Figure 11: Vue de l'interface ODT/Au(111).....	37
Figure 12 : Schéma de principe d'un microscope AFM.	38
Figure 13 : Principe de la mesure de force d'adhésion.	39
Figure 14 : Angle de contact d'une goutte déposée sur une surface en fonction de leurs affinités.	40
Figure 15 : Schéma de principe d'un goniomètre	40
Figure 16 : Les différentes techniques spectroscopiques non linéaires d'ordre 2.....	44
Figure 17 : Schémas de principe de la SFG	47
Figure 18 : Vue schématique de la chaîne laser.	48
Figure 19 : Vue schématique de l'effet de l'amplificateur régénératif sur les impulsions du laser Mira.....	49
Figure 20 : Principe de l'effet paramétrique dans un cristal non linéaire.	50
Figure 21 : Vue schématique de l'OPA.	52
Figure 22 : Principe du « pulse-shaper » – montage « 4f ».....	54
Figure 23 : Trajets optiques des faisceaux visible et infrarouge jusqu'à l'échantillon.	54
Figure 24 : Polarisation s et polarisation p.....	55
Figure 25: Les différents modes de vibrations des groupes CH ₂ et CH ₃	58
Figure 26: Esquisse vue du dessus de la structure de la surface de la SAM d'ODT résumant les résultats obtenus par STM, SFG et diffraction des rayons X..	60
Figure 27 : Description géométrique de la molécule d'ODT dans le repère XYZ	61
Figure 28: Vues du dessus et en perspective de la SAM d'ODT, correspondant à une description réaliste, respectant toutes les données de la littérature (SFG, diffraction X, STM).	62
Figure 29 : Conformation de la molécule d'ODT exposée à l'air et ses projections sur les différents plans lors du déroulement du calcul.....	64
Figure 30 : Schéma expérimental d'une expérience SFG réalisée à l'air et dans l'eau.	66
Figure 31 : Images topographiques d'AFM en mode oscillant de la surface d'or sur mica et sur verre, avant et après fonctionnalisation par les molécules d'ODT.....	70

Figure 32 : A. Image topographique de la SAM d'ODT en mode contact force-volume.....	71
Figure 33 : Cinétique de l'angle de contact de gouttes d'eau déposées sur la SAM d'ODT observées au goniomètre « macroscopique »	72
Figure 34: Gouttes d'eau déposées sur la SAM d'ODT observées à l'aide du goniomètre « picoLitre ».	72
Figure 35 : Spectre expérimental de la SAM d'ODT exposée à l'air	73
Figure 36 : Spectre SFG expérimental de la SAM d'ODT ses différentes déconvolutions.....	76
Figure 37 : Données obtenues sur les modes de vibration des molécules butanethiol et décanethiol isolées par le calcul ab initio basé sur la théorie Hartree-Fock.....	77
Figure 38 : Représentation schématique de la variation du rapport R	80
Figure 39 : Bandes de vibration de l'ODT dans la SAM.	81
Figure 40 : Culture bactérienne	85
Figure 41 : Courbes de survie au cours du temps d'une suspension bactérienne	85
Figure 42 : Structure 3D de la protéine HSA et composition en acides aminés de la protéine BSA.	86
Figure 43 : Schéma de principe de l'adhésion bactérienne sur la SAM d'ODT.....	87
Figure 44 : Schéma du protocole expérimental de préparation d'un film de protéines à la surface de la SAM d'ODT.	88
Figure 45 : Schéma de principe d'une mesure de mobilité électrophorétique (M.E.).	90
Figure 46 : Principe de fonctionnement d'un MEB	92
Figure 47 : Schéma de principe d'un microscope optique droit fonctionnant en épifluorescence.....	93
Figure 48 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de l'acridine orange	93
Figure 49 : Principe de l'obtention de l'image 3D de l'échantillon par microscopie confocale de fluorescence.....	94
Figure 50 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence du SYTO9.....	95
Figure 51: Mobilité électrophorétique en fonction du pH d'une suspension bactérienne	96
Figure 52 : Dénombrements des bactéries en présence de protéines BSA	96
Figure 53: Mobilité électrophorétique en fonction d'une suspension bactérienne en présence ou non de BSA.	97
Figure 54: Mesures de mobilité électrophorétique en fonction d'une suspension bactérienne recouvertes ou non de BSA.	98
Figure 55 : Images en épifluorescence de l'adhésion bactérienne sur la SAM d'ODT selon le rinçage effectué.	99
Figure 56 : Images au microscope électronique à balayage de bactéries sur la SAM d'ODT.	99
Figure 57 : Images AFM topographiques de la surface de la SAM d'ODT suite à l'adsorption de protéines BSA réalisées en mode contact	101
Figure 58 : Cartographie des angles de contact initiaux de l'eau sur la SAM d'ODT suite à l'adsorption protéique.	102
Figure 59 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT exposée aux solvants	104
Figure 60 : Courbe de l'absorption de l'eau liquide en fonction du nombre d'onde	104
Figure 61 : Comparaison des spectres SFG déconvolués expérimentaux de la SAM d'ODT exposée à l'eau distillée avec les spectres théoriques	105

Figure 62 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT exposée aux bactéries.	106
Figure 63 : Spectre SFG expérimental du support d'or exposé aux bactéries <i>Lactococcus lactis</i> PrtP+ hydrophobes.	106
Figure 64 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT exposée aux bactéries selon le recouvrement bactérien	108
Figure 65 : Comparaison des spectres déconvolués expérimentaux de la SAM d'ODT exposée aux bactéries dans l'eau distillée avec les spectres théoriques.....	110
Figure 66 : Schéma de la conformation de la SAM d'ODT exposée aux solvants et aux bactéries.....	111
Figure 67 : Spectre SFG expérimental de la SAM d'ODT deutéré en contact avec les protéines BSA dans l'eau distillée	112
Figure 68 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT exposée aux protéines.	113
Figure 69: Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT exposée à une suspension bactérienne sur le film primaire protéique.	115
Figure 70 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT exposée à une suspension bactérienne contenant des protéines	116
Figure 71 : Bactéries adhérentes sur la SAM d'ODT en absence de protéines.....	118
Figure 72 : Bactéries adhérentes sur la SAM d'ODT en présence de protéines	119
Figure 73: Schémas proposés pour la colonisation bactérienne de la SAM d'ODT.....	123
Figure 74 : Décrochement des bactéries par élimination du liquide et retournement de l'échantillon, basé sur les résultats SFG et de microscopie confocale de fluorescence.....	125
Figure 75 : Spectres expérimentaux SFG de la SAM d'ODT sur Au/mica	134
Figure 76 : Ajustement du spectre expérimental SFG de la SAM d'ODT exposée à l'air avec la fonction « Manipulate » du logiciel Mathematica.....	137
Figure 77 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT à l'air réalisés à différentes dates et ayant conduit aux valeurs de R les plus éloignées..	137
Figure 78 : Représentation schématique de la SAM d'ODT SAM et de la SAM de PDT en conformation tout trans.	138
Figure 79 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM de PDT	139
Figure 80 : Principe du dénombrement	142
Figure 81 : Suivi cinétique par la méthode MATS des bactéries.	145
Figure 82 : Modèle de Gompertz.	147
Figure 83 : Courbe de croissance des bactéries.....	149
Figure 84 : Diagramme de Perrin-Jablonski.	151
Figure 85: Cinétique de l'angle de contact sur la SAM d'ODT en présence de BSA.	152
Figure 86 : Spectre SFG expérimental de la SAM d'ODT deutéré exposée à l'air	154
Figure 87 : Spectres d'absorption du bleu de Coomassie	156
Figure 88: Résultats de la méthode de Bradford	156
Figure 89 : Spectres SFG expérimentaux de la SAM d'ODT exposée aux bactéries selon un recouvrement homogène ou hétérogène.....	158
Figure 90 : Spectre SFG expérimental des protéines BSA adsorbées sur la SAM d'ODT....	161
Figure 91 : Images de fluorescence au microscope confocal des bactéries <i>Staphylococcus aureus</i> adhérentes sur le verre et sur la SAM d'ODT.....	164

Liste des tableaux

Tableau 1: Combinaison du positionnement des cristaux de BBO et d'AgGaS ₂ et gamme spectrale infrarouge obtenue..	53
Tableau 2 : Fréquences de vibration des modes d'élongation de C-H de l'ODT auto-assemblé observées par SFG.....	59
Tableau 3 : Angle de contact initial de la SAM d'ODT après adsorption de protéines BSA	102
Tableau 4 : Résultats de la déconvolution des spectres SFG et de leur modélisation de la SAM d'ODT exposée aux solvants et aux bactéries.....	109
Tableau 5 : Résultats de la déconvolution du spectre SFG et de la modélisation de la SAM d'ODT exposée aux protéines	114
Tableau 6 : Résultats de la déconvolution des spectres SFG et de la modélisation des spectres SFG de la SAM d'ODT exposée aux bactéries et aux protéines.	117
Tableau 7 : Données obtenues lors de l'ajustement des spectres SFG expérimentaux de la SAM de PDT à l'air et dans l'eau distillée selon l'équation (1).	140
Tableau 8 : Résultats de la modélisation des spectres SFG et de la déconvolution des spectres SFG de la SAM de PDT.....	140
Tableau 9: Comparaison de la détermination du nombre d'unités formant colonies (UFC) par micro-spots et par la méthode classique.....	143
Tableau 10 : Caractéristiques énergétiques (mJ.m ⁻²) des solvants utilisés pour la MATS	144
Tableau 11 : Modes de vibration des différentes structures secondaires au sein d'une protéine dans l'eau distillée.....	160

Liste des abréviations

3D	3 Dimensions
AA	Acide Aminé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	Atomic Force Microscopy (Microscopie à Force Atomique)
AgGaS ₂	cristal de ThioGallate d'Argent
AgO	Oxyde d'Argent
Al ₂ O ₃	triOxyde d'Aluminium
APTS	Acide ParaToluèneSulfonique
ARN	Acide RiboNucléique
BBO	cristal de Bêta Borate de Baryum
BSA	Bovin Serum Albumin (Albumine de Sérum Bovin)
CCD	Charge Coupled Device (Récepteurs à Transferts de Charge)
CNRZ	Collection Nationale de Recherches Zootechniques (anciennement, Centre de Recherches de Jouy-en-Josas)
D.C.	Dichroïsme Circulaire
DLVO	théorie de Derjaguin et Landau, Verwey et Overbeek
D.O.	Densité Optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GaAs	Arséniure de Gallium
HSA	Human Serum Albumin (Albumine de Sérum Humain)
IAS	Infections Associées aux Soins
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
IR	InfraRouge
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
M17A	gel d'Agar du milieu de culture M17
M17B	Bouillon du milieu de culture M17
MATS	Microbial Adhesion To Solvent
MCBL	Microscope Confocal à Balayage Laser
M.E.	Mobilité Electrophorétique
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MIMA2	Microscopie et Imagerie des Micro-organismes, Animaux et Aliments (plateforme à l'INRA de Massy)
Nd	Néodyme
NEXAFS	Near Edge X-Ray Absorption Fine Structure (spectroscopie de Structure Fine près du seuil d'Absorption de Rayons X)
PDT	PentaDécaneThiol
PEG	PolyEthylèneGlycol
PET	Poly(Téréphtalate d'Ethylène)

PMMA	PolyMéthacrylate de Méthyle
PrtP+	protéases PrtP ancrées dans les parois cellulaires des bactéries Actives
ODT	OctaDécaneThiol
OPA	Optical Parametric Amplifier (Amplificateur Paramétrique Optique)
OTS	OctadecylTrichloroSilane
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sa	Saphir
SAM	Self-Assembled Monolayer (Monocouche Auto-Assemblée)
SFG	Sum Frequency Generation (Génération de Fréquence Somme)
SHG	Second Harmonic Generation (Génération de Seconde Harmonique)
SPM	Scanning Probe Microscopy (Microscopie à Sonde de Balayage)
STM	Scanning Tunneling Microscopy (Microscopie à Effet Tunnel)
TEG	TriEthylèneGlycol
Ti	Titane
TOF SIMS	Time-Of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (spectrométrie de Masse à Ionisation Secondaire en Temps de vol)
TSB	Tryptone Soja Bouillon
UFC	Unité Formant Colonie
UHV	UltraHigh Vacuum (système Ultra Vide)
X-Ray	Rayons X
YLF	Fluorure d'Yttrium-Lithium
YVO ₄	OrthoVanadate d'Yttrium
ZnSe	Sélénure de Zinc

Liste des notations

A_v	amplitude de la courbe Lorentzienne relative au mode de vibration v .
$A(\omega_m)$	amplitude du champ $\mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega_m)$
α	tenseur de polarisabilité Raman
α_S	angle formé par les atomes $\widehat{C_0SAu}$.
α_{SC}	angle d'azimut : angle de rotation autour de la liaison Au – S
$\langle \beta^{(2)} \rangle$	moyenne de l'hyperpolarisabilité sur toutes les orientations possibles des molécules
c	célérité de la lumière
ϵ_0	permittivité du vide
$\mathbf{e}_i$	vecteur unitaire pointant dans la direction d'espace i
$\mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega_m)$	champ électrique
$\mathbf{E}_{IR}$	champ électrique de l'onde infrarouge
$g(\omega_{IR})$	profil spectral du faisceau infrarouge
Γ_v	demi-largeur à mi-hauteur de la courbe Lorentzienne relative au mode de vibration v , $2\Gamma = \text{FWHM}$ (Full Width at Half Maximum).
h	constante de Planck
H_{SFG}	hamiltonien d'interaction SFG
I_v	intensité maximale du mode de vibration v
$\mathbf{k}$	vecteur d'onde
λ	longueur d'onde
lag	temps de latence des bactéries
L_{ijv}	coefficients de Fresnel de chaque mode de vibration v
N	densité volumique des molécules contenues dans le milieu
η	viscosité du milieu
$\mathbf{P}^{(1)}$	polarisation à l'ordre 1
$\mathbf{P}^{(2)}$	polarisation à l'ordre 2
$\mathbf{p}$	quantité de mouvement des photons
φ_{NR}	phase spectrale (i.e. différence de phase entre la réponse non résonnante et la réponse résonnante du mode de vibration v)
φ_v	phase du mode de vibration v
$\Delta\varphi = \varphi_{NR} - \varphi_v$	différence de phase entre la réponse non résonnante et la réponse résonnante du mode de vibration v
ψ_f et ψ_i	fonctions d'onde de l'état final et initial, respectivement
ψ_0	angle de rotation autour de la liaison S – C ₀
ψ_1	angle de rotation autour de la liaison C ₀ – C ₁ entre les deux premiers groupes méthylènes voisins de l'atome de soufre.
Φ	angle de rotation de la chaîne carbonée autour de l'axe moyen de la chaîne

q	charge portée par la bactérie
$\mathbf{r}$	vecteur position d'un point de l'espace (xyz)
R	rapport entre l'intensité de la vibration symétrique du groupe CH_3 (y compris la résonance de Fermi qui emprunte une partie de son intensité au mode de vibration d'élongation symétrique de CH_3) et l'intensité de la vibration antisymétrique du groupe CH_3
T	température
T_g	temps de génération des bactéries
Θ	angle d'inclinaison de la chaîne alkyle par rapport à la verticale de la surface
θ_i	angle de contact initial de la goutte d'eau sur une surface
μ	moment dipolaire moyen des molécules
μ_ν	moment de transition dipolaire infrarouge de la vibration ν
μ_{sym}	moment de transition dipolaire de la vibration symétrique du groupe méthyle
μ_{asym}	moment de transition dipolaire de la vibration antisymétrique du groupe méthyle
μ_{max}	taux de croissance des bactéries
ω_ν	fréquence du mode de vibration ν
ω_{IR}	fréquence infrarouge
ω_{SFG}	fréquence SFG
ω_{vis}	fréquence visible
$\chi^{(1)}$	susceptibilité linéaire
$\chi^{(2)}$	susceptibilité non linéaire à l'ordre 2
$\chi_{\text{R}}^{(2)}$	susceptibilité résonnante d'ordre 2
$\chi_{\text{NR}}^{(2)}$	susceptibilité non résonnante d'ordre 2

Bibliographie

1. **Gibbon, D., Donlan, R.** *Bacterial population on a metal surface in an industrial condenser*. Visual Resources. American Society for Microbiology, Washington, DC. www.microbelibrary.org : accessed January 2002.
2. **Houssin, C.** *Cours M1 Biologie, mention génomes, cellules, développement, évolution, cours de génétique et physiologie microbienne*. Université Paris Sud 11 : 2011.
3. **Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P.** *Biology of microorganisms*. Brock edition.
4. **Young, K.D.** *The selective value of bacterial shape*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. : 2006, 70(3). 660-703.
5. **Institut Pasteur.** source : <http://www.inserm.fr/actualites/rubriques/actualites-societe/les-bacteries-e.-coli-une-menace-pour-l-homme>.
6. **Euzéby, J.P.** *Abrégé de bactériologie générale et médicale*. Document internet pour les étudiants de l'école nationale vétérinaire de Toulouse : 2007.
7. **InVS & Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN).** *Enquête nationale de prévalence 2006 des infections nosocomiales*.
8. **InVs - Institut de veille sanitaire.** *Surveillance des toxi infections alimentaires collectives*. 2011.
9. **Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F.** *Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-materials interactions*. European Cells and Materials : 2004, 8. 37-57.
10. **An, Y.H., Friedman, R.J.** *Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces*. J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.) : 1998, 43. 338-348.
11. **van Oss, C.J., Chaudhury, M.K., Good, R.J.** *Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems*. Chem. Rev : 1988, 88. 927-941.
12. **Speranza, G., Gottardi, G., Pederzoli, C., Lunelli, L., Canteri, R., Pasquardini, L., Carli, E., Lui, A., Maniglio, D., Brugnara, M., Anderle, M.** *Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces*. Biomaterials : 2004, 25. 2029-2037.
13. **Scheuerman, T.R., Camper, A.K., Hamilton, M.A.** *Effects of substratum topography on bacterial adhesion*. Col. Interf. Sci. : 1998, 208. 23-33.
14. **Bunt, C.R., Jones, D.S., Tucker, I.G.** *The effects of pH, ionic strength and organic phase on the bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) test*. Inter. J. Pharm. : 1993, 99. 93-98.
15. **Al-Makhlafi, H., McGuire, J., Daeschel, M.** *Influence of preadsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces*. Appl. Envir. Microbiol. : 1994, 60(10). 3560-3565.
16. **Tang, H., Wang, A., Liang, X., Cao, T., Salley, S.O., McAllister III, J.P., Ng, K.Y.S.** *Effect of surface proteins on *Staphylococcus epidermidis* adhesion and colonization on silicone*. Colloids Surf. B : 2006, 51 (1). 16-24.

17. **Hermann, M., Vaudaux, P.E., Pittit, D., Auckenthaler, R., Lew, P.D., Schumacher-Perdreau, F., Peters, G., Waldvogel, F.A.** *Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococci isolates to foreign material.* J. Infect. Dis. : 1988, 158. 693-701.
18. **Latour, R.A. Jr.** *Biomaterials: protein-surface interactions.* Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering : 2005, DOI: 10.1081.
19. **Williams, F.D.** *On the mechanisms of biocompatibility.* Biomaterials : 2008, 29. 2936-2953.
20. **Larsericsdotter, H., Oscarsson, S., Buijs, J.** *Structure, stability and orientation of BSA adsorbed to silica.* J. Colloid Interf. Sci. : 2005, 289. 26-35.
21. **Soderquist, M.E., Walton, A.G.** *Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces.* J. Colloid Interf. Sci. : 1980, 75(2). 386-397.
22. **Kim, J-H., Yoon, J-Y.** *Protein adsorption on polymer particles.* Encyclopedia of surface and colloid science : 2002. 4373-4381.
23. **Hlady, V., Buijs, J.** *Protein adsorption on solid surfaces.* Curr. Opin. Biotechnol. : 1996, 7(1). 72-77.
24. **Kim, J., Qian, W., Al-Saigh, Z.** *Measurements of water absorption enthalpy on polymer surfaces and its effect on protein adsorption.* Surf. Sci. : 2011, 605. 419-423.
25. **Rosegren, A.** *Cell-protein-material interactions on bioceramics and model surfaces.* Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the faculty of science and technology : 2004.
26. **Liu, Y., Strauss, J., Camesano, T.A.** *Adhesion forces between Staphylococcus epidermidis and surfaces bearing self-assembled monolayers in the presence of model proteins.* Biomaterials : 2008, 29. 4374-4382.
27. **Ostuni, E., Chapman, R.G., Liang, M.N., Meluleni, G., Pier, G., Ingber, D.E., Whitesides, M.G.** *Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells.* 2001 : Langmuir, 17. 6336-6343.
28. **Debeaufort, F., Voilley, A., Guilbert, S., Le Meste, M., Lorient, D., Simastos, D.** *L'eau dans les aliments.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris : 2002. 549.
29. **Muller, R., Eidt, A., Hiller, K-A., Katzur, V., Subat, M., Schweikl, H., Imazato, S., Ruhl, S., Schamlz, G.** *Influences of protein films on antibacterial or bacteria-repellent surface coatings in a model system using silicon wafers.* Biomaterials : 2009, 30. 4921-4929.
30. **Pringle, J.H., Fletcher, M.** *Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces.* Appl. Environ. Microbiol. : 1986, 51. 1321-1325.
31. **Lindsay, D., von Holy, A.** *Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know.* J. Hosp. Inf. : 2006, 64. 313-325.
32. **Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M.** *Microbial biofilms.* Annu. Rev. Microbiol : 1995, 49. 711-745.
33. **MBW, group.** *The role of the biofilm matrix in structural development.* Math. Med. Biol : 2004, 21(2). 147-166.

34. **Sivakumar, P.M., Iyer, G., Natesan, L., Doble, M.** *3'-hydrox-4-methoxychalcone as a potential antibacterial coating on polymeric biomaterials.* Appl. Surf. Sci. : 2010, 256. 6018-6021.
35. **Vacheethasane, K., Marchant, R.E.** *Surfactant polymers designed to suppress bacterial (Staphylococcus epidermidis) adhesion on biomaterials.* World Biomaterials Congress : 2000.
36. **Abu-Lail, N.I., Camesano, T.A.** *Role of lipopolysaccharides in the adhesion, retention and transport of Escherichia coli JM109.* Environ. Sci. Technol. : 2003, 37. 2173-2183.
37. **Sapers, G.M., Fett, W.F., Rajkowski, K.T., Miller, R.L., Mattrazzo, A.M.** *Factors limiting the efficacy of decontamination washes for fresh produce.* wyndmoor.arserrc.gov/Page/2000/6896 : s.n.
38. **Alt, E., Leipold, F., Milatovic, D., Lehmann, G., Heinz, S., Schömig, A.** *Hydrogen peroxide for prevention of bacterial growth on polymer biomaterials.* Ann. Thorac. Surg. : 1999, 68. 2123-2128.
39. **Dahiya, R.S., Speck, M.L.** *Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on Staphylococcus aureus.* J. Dairy. Sci. : 1968, 51(10). 1568-1572.
40. **Barthlott, W., Neinhuis, C.** *Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces.* Planta : 1997, 202. 1-8.
41. **Crick, C.R., Ismail, S., Pratten, J., Parkin, I.P.** *An investigation into bacterial attachment to an elastomeric superhydrophobic surface prepared via aerosol assisted deposition.* Thin Solid Films : 2011, 519. 3722-3727.
42. **Fadeeva, E., Truong, V.K., Stiesch, M., Chichkov, B.N., Crawford, R.J., Wang, J., Ivanova, E.P.** *Bacterial retention on superhydrophobic titanium surfaces fabricated by femtosecond laser ablation.* Langmuir : 2011, 27. 3012-3019.
43. **Zdyrko, B., Klep, V., Li, X., Kang, Q., Minko, S., Wen, X., Luzinov, I.** *Polymer brushes as active nanolayers for tunable bacteria adhesion.* Mater. Sci. Eng. C : 2009, 29. 680-684.
44. **Nejadnik, M.R., van der Mei, H.C., Norde, W., Busscher, H.J.** *Bacterial adhesion and growth on a polymer brush-coating.* Biomaterials : 2008, 29. 4117-4121.
45. **Senaratne, W., Andruzzi, L., Ober, C.K.** *Self-assembled monolayers and polymer brushed in biotechnology: current applications and future perspectives.* Biomacromolecules : 2005, 6. 2427-2448.
46. **Zheng, J., Li, L., Tsao, H-K., Sheng, Y-J., Chen, S., Jiang, S.,.** *Strong repulsive forces between protein and oligo(ethylene glycol) self-assembled monolayers: a molecular simulation study.* Biophys. J. : 2005, 89. 158-166.
47. **Senaratne, W., Andruzzi, L., Ober, C.K.** *Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: current applications and future perspectives.* Biomacromolecules : 2005, 6. 2427-2448.
48. **Liang, M.N., Smith, S.P., Mettalo, S.J., Choi, I.S., Prentiss, M., Whitesides, G.M.** *Measuring the forces involved in polyvalent adhesion of uropathogenic Escherichia coli to mannose-presenting surfaces.* PNAS : 2000, 97(24). 13092-13096.
49. **Keller, P.** *Rapport d'activité du groupe Architecture moléculaire et macromoléculaire des fluides organisés et des interfaces.* Institut Curie, Paris : 2010.

50. **Nuzzo, G.R., Allara, D.L.** Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* : 1983, 105. 4481-4483.
51. **Nuzzo, R.G., Dubois, L.H., Allara, D.L.** Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 1. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* : 1990, 112(2). 558-569.
52. **Chen, X., Chen, Z.** SFG studies on interactions between antimicrobial peptides and supported lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Acta* : 2006, 1758. 1257-1273.
53. **Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G.M., Laibinis, P.E.** Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. *J. Phys. Chem. B.* : 1998, 102(2). 426-436.
54. **Ostuni, E., Yan, L., Whitesides, G.M.** The interaction of proteins and cells with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold and silver. *Coll. Surf. B: Biointerf.* : 1999, 15. 3-30.
55. **Wink, Th., van Zuilen, S.J., Bult, A., van Bennekom, W.P.** Self-assembled monolayers for biosensors. *Analyst* : 1997, 122. 43R-50R.
56. **Ulma, A.** Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* : 1996, 96. 1533-1554.
57. **An, Y.H., Friedmand, R.J.** Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J. Microbiol. Meth.* : 1997, 30(2). 141-152.
58. **Nebe-von-Caron, G., Stephens, P.J., Hewitt, C.J., Powell, J.R., Badley, R.A.** Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J. Microbiol. Meth.* : 2000, 42. 97-114.
59. **Park, K.D., Kim, Y.S., Han, D.K., Kim, Y.H., Lee, E.H.B., Suh, H., Choi, K.S.** Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces. *Biomaterials* : 1998, 19. 851-859.
60. **Jacobs, A., Lafolie, F., Herry, J.M., Deboux, M.** Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: cell surface properties and adhesion rate. *Coll. and Surf. B: Biointerf.* : 2007, 59. 35-45.
61. **Binning, G., Quate, C.F., Gerber, C.** Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* : 1986, 56. 930-933.
62. **Lesko, S.** *Mesure des forces interparticulaires par microscopie à force atomique, application à la cohésion du ciment.* Thèse de l'école doctorale Carnot - laboratoire de physique de l'université de Bourgogne : 2005.
63. **Rieu, J-P.** *Physic of biological systems.* Cours de l'université Claude Bernard Lyon 1 (pdf) : s.n.
64. **Dufrêne, Y.F.** Refining our perception of bacterial surfaces with the atomic force microscope. *J. Bacteriol.* : 2004, 186(11). 3283-3285.
65. **Razatos, A., Ong, Y-L., Sharma, M.M., Georgiou, G.** Evaluating the interaction of bacteria with biomaterials using atomic force microscopy. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* : 1998, 9. 1361-1373.
66. **Ong, Y-L., Razatos, A., Georgious, G., Sharma, M.M.** Adhesion forces between e.coli bacteria and biomaterial surfaces. *Langmuir* : 1999, 15. 2719-2725.

67. **Verwey, E.J.W., Overbeek, J.Th.G.** *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Dover Publications : 1999. ISBN: 0486409295.
68. **Ecole des mines, Cours.** *Les fondamentaux de la cristallisation et de la précipitation*. 2011.
69. **Müller, D.J., Engel, A.** *The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions*. Biophysical Journal : 1997, 73. 1633-1644.
70. **Hermansson, M.** *The DLVO theory in microbial adhesion*. Colloid Surf. B: Biointerf. : 1999, 14. 105-119.
71. **Cheng, G., Zhang, Z., Chen, S., Bryers, J.D., Jiang, S.** *Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces*. Biomaterials : 2007, 28. 4192-4199.
72. **Gottenbos, B., Grijpma, D.W., van der Mei, H.C., Feijen, J., Busscher, H.J.** *Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria*. J. Antimicrob. Chemother. : 2001, 48(1). 7-13.
73. **Gottenbos, B., van der Mei, H.C., Klatter, F., Grijpma, D.W., Feijen, J., Nieuwenhuis, P., Busscher, H.J.** *Positively charged biomaterials exert antimicrobial effects on gram-negative bacilli in rats*. Biomaterials : 2003, 24(16). 2707-2710.
74. **Hogt, A.H., Dankert, J., Feijen, J.** *Adhesion of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus to a hydrophobic biomaterial*. J. Gen. Microbiol. : 1985, 131. 2485-2491.
75. **Vadillo-Rodriguez, V., Busscher, H.J., Norde, W., de Vries, J., van der Mei, H.C.** *Relations between macroscopic and microscopic adhesion of Streptococcus mitis strains to surfaces*. Microbiology : 2004, 150. 1015-1022.
76. **Castner, D.G., Ratner, B.D.** *Biomedical surfaces science: foundations to frontiers*. Surface Science : 2002, 500. 28-60.
77. **Bottomley, L.A.** *Scanning probe microscopy*. Anal. Chem. : 1998, 70. 425R-475R.
78. **Shen, Y.R.** *Surface nonlinear optics: a historical perspective*. IEEE Journal on selected topics in quantum electronics : 2000, 6(6). 1375-1379.
79. **Peremans, A.** *Spectroscopies optiques non linéaires pour l'analyse des interfaces*. 2004 : s.n., Dissertation en vue de l'obtention du grade d'agréé de l'enseignement supérieur (pdf) - Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix.
80. **Joffre, M.** *Cours d'optique non linéaire*. Ecole prédoctorale : Interaction lumière-matière : du nanomètre au millimètre (Ecole d'été Les Houches) : 2009.
81. **Courtois, J-Y.** *Optique non linéaire (les lasers et leurs applications scientifiques et médicales)*. Institut d'Optique Théorique et Appliquée - Université Paris XI (pdf) : s.n.
82. **Sioncke, S., Verbiest, T., Persoons, A.** *Second-order nonlinear optical properties of chiral materials*. Materials Science and Engineering R : 2003, 42. 115-155.
83. **Shen, Y.R.** *Surfaces probed by nonlinear optics*. Surf. Sci. : 1994, 299-300. 551-562.
84. **Zhu, D.X., Shen, Y.R.** *Surface vibrational spectroscopy by infrared-visible sum frequency generation*. Phys. Rev. B : 1987, 35(6). 3047-3050.
85. **Bourguignon, B., Zheng, W., Carrez, S., Ouvrard, A., Fournier, F., Dubost, H.** *Deriving the complete molecular conformation of self-assembled alkanethiol molecules from sum-frequency generation vibrational spectra*. Phys. Rev. B : 2009, 79. 125433.

86. **Walter, S.R., Geiger, F.M.** *DNA on stages: showcasing oligonucleotides at surfaces and interfaces with second harmonic and vibrational sum frequency generation* . J. Phys. Chem. Lett. : 2010, 1. 9-15.
87. **Diesner, M-O., Welle, A., Kazanci, M., Kaiser, P., Spatz, J., Koelsch, P.** *In vitro observation of dynamic ordering processes in the extracellular matrix of living, adherent cells.* Biointer. : 2011, 6(4). 171-179.
88. **Diesner, M.O., Howell, Kurz, V., Verreault, D., Koelsch, P.** *In vitro characterization of surfaces properties through living cells.* J. Phys. Chem. Lett. : 2010, 1. 2339-2342.
89. **Ye, S., Nguyen, K.T., Le Clair, S.V., Chen, Z.** *In situ molecular level studies on membrane related peptides and proteins in real time using sum frequency generation vibrational spectroscopy.* J. Struct. Biol. : 2009, 168. 61-77.
90. **Li, W., Nicol, F., Szoka Jr., F.C.** *GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery.* Adv. Drug Deliv. Rev. : 2004, 56. 967-985.
91. **Hsieh, C-S., Campen, R.K., Verde, A.C.V., Bolhuis, P., Nienhuys, H-K., Bonn, M.** *Ultrafast reorientation of dangling OH groups at the air-water interface using femtosecond vibrational spectroscopy.* Phys. Rev. Lett. : 2011, 107(11). 116102-116106.
92. **Li, Q., Chou, K.C.** *Two-dimensional IR-visible sum frequency generation spectroscopy - a unique probe of surface electronic states at buried interfaces.* Proc. of SPIE : s.n., Vol. 7396, 79360Q. 1-9.
93. **Ying, P., Jin, G., Tao, Z.** *Competitive adsorption of collagen and bovine serum albumin - effect of the surface wettability.* Colloids Surf. B : 2004, 33. 259-263.
94. **Rosergren, A., Oscarsson, S., Mazzochi, M., Krajewski, A., Ravaglioli, A.** *Protein adsorption onto two bioactive glass-ceramics.* Biomaterials : 2003, 24. 147-155.
95. **Farris, S., Introzzi, L., Biagioni, P., Holz, T., Schiraldi, A., Piergiovanni, L.** *Wetting of biopolymer coatings: contact angle kinetics and image analysis investigation.* Langmuir : 2011.
96. **Su, T.J., Lu, J.R., Thomas, R.K., Cui, Z.F.** *Effect of pH on the adsorption of bovine serum albumin at the silica/water interface studied by neutron reflection.* J. Phys. Chem. B : 1999, 103. 3727-3736.
97. **Chen, X., Davies, M.C., Roberts, C.J., Tendler, S.J.B, Williams, P.M.** *Recognition of protein adsorption onto polymer surfaces by scanning force microscopy and probe-surface adhesion measurements with protein-coated probes.* Langmuir : 1997, 13. 3606-3611.
98. **Liu, Y., Strauss, J., Camesano, T.A.** *Adhesion forces between Staphylococcus epidermidis and surfaces bearing self-assembled monolayers in the presence of model proteins.* Biomaterials : 2008. 4374-4382.
99. **Decuzzi, P., Ferrari, M.** *Modulating cellular adhesion through nanotopography.* Biomaterials : 2010. 179.
100. **He, Y., Chang, Y., Hower, J.C., Zheng, J., Chen, S., Jiang, S.** *Origin of repulsive force and structure/dynamics of interfacial water in OEG-protein interactions: a molecular simulation study.* Phys. Chem. Chem. Phys : 2008, 10. 5539-5544.

101. **Koffas, T.S., Kim, J., Lawrence, C.C., Somorjai, G.A.** *Detection of immobilized protein on latex microsphere by IR-visible sum frequency generation and scanning force microscopy.* Langmuir Lett. : 2003, 19(9). 3563-3566.
102. **Wang, J., Buck, S.M., Chen, Z.** *Sum frequency generation vibrational spectroscopy studies on protein adsorption.* J. Phys. Chem. B. : 2002, 106. 11666-11672.
103. **Chen, X., Flores, S.C., Lim, S-M. L., Zhang, Y., Yang, T., Kherb, J., Cremer, P.S.** *Specific anion effects on water structure adjacent to protein monolayers.* Langmuir : 2010, 26(21). 16447-16454.
104. **Kim, J., Somorjai, G.A.** *Molecular packing of lysozyme, fibrinogen, and bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces studied by infrared-visible sum frequency generation and fluorescence microscopy.* JACS : 2003, 125. 3150-3158.
105. **Le clair, S., Nguyen, K., Chen, Z.** *Sum frequency generation studies on bioadhesion: elucidating the molecular structure of proteins at interfaces.* J. Adhes. : 2009, 85(8). 484-511.
106. **Wang, J., Buck, S.M., Chen, Z.** *The effect of surface coverage on conformation changes of bovine serum albumin molecules at the air-solution interface detected by sum frequency generation vibrational spectroscopy.* Analyst : 2003, 128. 773-778.
107. **Bulard, E., Guo, Z., Zheng, W., Dubost, H., Fontaine-Aupart, M-P., Bellon-Fontaine, M-N., Herry, J-M., Briandet, R., Bourguignon, B.** *Non-invasive vibrational SFG spectroscopy reveals that bacterial adhesion can alter the conformation of grafted "brush" chains on SAM.* Langmuir : 2011, 27. 4928-4935.
108. **Himmerlhaus, M., Eisert, F., Buck, M., Grunze, M.** *Self-assembly of n-alkanethiol monolayers. A study by IR-visible sum frequency generation (SFG).* J. Phys. Chem. B. : 2000, 104. 576-584.
109. **Fenter, P., Eisenberg, P.** *Chain-length dependence of the structures and phases of CH₃(CH₂)(n-1)SH self-assembled on Au(111).* Phys. Rev. Lett. : 1993, 70(16). 2447-2450.
110. **Ahn, Y., Saha, J.K., Schatez, G.C., Jang, J.** *Molecular dynamics study of the formation of a self-assembled monolayer on gold.* J. Phys. Chem. C : 2011, 115. 10668-10674.
111. **Guo, Z., Zheng, W., Hamoudi, H., Dablemont, C., Esaulov, V.A., Bourguignon, B.** *On the chain length dependence of CH₃ vibrational mode relative intensities in sum frequency generation spectra of self assembled alkanethiols.* Surf. Sci. : 2008, 602. 3551-3559.
112. **Kondoh, H., Iwasaki, M., Shimada, T., Amemiya, K., Yokoyama, T., Ohta, T.** *Adsorption of thiolates to singly coordinated sites on Au(111) evidences by photoelectron diffraction.* Phys. Rev. Lett. : 2003, 90(6). 066102-1-4.
113. **Marcoux, P.R.** *Annexe F. Microscopie à Force Atomique.* Cours de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Section Microtechnique - pdf : s.n.
114. **Woodward, R.P.** *Contact angle measurements using the drop shape method.* Portsmouth, VA: First Ten Angstroms Inc. : 1999.
115. **Modaressi, H., Garnier, G.** *Mechanism of wetting and absorption of water droplets on sized paper: effects of chemical and physical heterogeneity.* Langmuir : 2002, 18. 642-649.

116. **Petrov, P.G., Petrov, J.G.** *Comparison of the static and dynamic contact angle hysteresis at low velocities of the three-phase contact line.* Colloid Surf. : 1991, 61. 227-240.
117. **Petrov, P.G., Petrov, J.G.** *A combined molecular-hydrodynamic approach to wetting kinetics.* Langmuir : 1992, 8. 1762-1767.
118. **Bonn, M., Ueba, H., Wolf, M.** *Theory of sum-frequency generation spectroscopy of adsorbed molecules using the density matrix method - broadband vibrational sum-frequency generation and applications.* J. Phys.: Condens. Matter : 2005, 17. S201-S220.
119. **Holman, J., Davies, P.B., Nishida, T., Ye, Shen., Neivandt, D.J.** *Sum frequency generation from Langmuir-Blodgett multilayer films on metal and dielectric substrates.* J. Phys. Chem. B : 2005, 109. 18723-18732.
120. **Kaindl, R.A., Wurm, M., Reimann, K., Hamm, P., Weiner, A.M., Woerner, M.** *Generation, shaping and characterization of intense femtosecond pulses tunable from 3 to 20 μ m.* J. Opt. Soc. Am. B : 2000, 17(12). 2086-2094.
121. **DirectIndustry.** *Données industrielles.*
122. **Aguero, G., Aicardi, J.P., Leyris, J.P.** *Luminescence dans les cristaux de AgGaS₂.* J. Physique : 1981, 42. 317-322.
123. **Fournier, F.** *Spectroscopie non linéaire femtoseconde de molécules adsorbées et dynamique de l'interaction adsorbat-substrat : application à CO, à la glace et aux molécules auto-assemblées sur Pt(111), Pd(111), Au(111).* Thèse de l'Université Paris XI, UFR Scientifique d'Orsay : 2003.
124. **Ron, H., Cohen, H., Matlis, S., Rappaport, M., Rubinstein, I.** *Self assembled monolayers on oxidized metals. 4. Superior n-alkanethiol monolayers on copper.* J. Phys. Chem. B : 1998, 102. 9861-9869.
125. **Ruan, C.M., Bayer, T., Meth, S., Sukenik, C.N.** *Creation and characterization of n-alkylthiol and n-alkylamine self-assembled monolayers on 316L stainless steel.* Thin Solid Films : 2002, 419. 95-104.
126. **Richter, L.J., Petralli-Mallow, T.P., Stephenson, J.C.** *Vibrationally resolved sum-frequency generation with broad-bandwidth infrared pulses.* Optics Letters : 1998, 23(20). 1594-1596.
127. **Chaquin.** *Chapitre X : Spectroscopie de vibration.* Cours de l'Université de Paris VII (Jussieu) - pdf : s.n.
128. **Schlenoff, J.B., Li, M., Ly, H.** *Stability and self-exchange in alkanethiol monolayers.* J. Am. Chem. Soc. : 1995, 117. 12528-12536.
129. **Shen, Y.R.** *The principles of nonlinear optics.* Wiley : 2002, ISBN 978-0-471-43080-3.
130. **Superfine, R., Huang, J.Y., Shen, Y.R.** *Nonlinear optical studies of the pure liquid/vapor interface: vibrational spectra and polar ordering.* Phys. Rev. Lett. : 1991, 66(8). 1066-1069.
131. **Yeganeh, M.S., Dougal, S.M., Polizzoti, R.S., Rabonowitz, P.** *Interfacial atomic structure of a self-assembled alkyl thiol monolayer/Au(111), a sum frequency generation study.* Phys. Rev. Lett. : 1995, 74. 1811-1814.
132. **Busson, B., Tadjeddine, A.** *Non-uniqueness of parameters extracted from resonant second-order nonlinear optical spectroscopies.* J. Phys. Chem. C : 2009, 113. 21895-21902.

133. **Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H.** *Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt.* International Dairy Journal : 2003, 13. 3-13.
134. **Chapot-Chartier, M-P., Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Andre, G., Mistou, M-Y., Trieu-Cuot, P., Furlan, S., Bidnenko, E., Courtin, P., Péchoux, C., Hols, P., Dufrêne, Y.F., Kulakauskas, S.** *Cell surface of Lactococcus lactis is covered by a protective polysaccharide pellicle.* J. Biol. Chem. : 2010, 285(14). 10646-10471.
135. **Habimana, O., Le Goff, C., Juillard, V., Bellon-Fontaine, M-N., Buist, G., Kulakauskas, S., Briandet, R.** *Positive role of cell wall anchored proteinase PrtP in adhesion of lactococci.* BMC Microbiol. : 2007, 7(36). 1-8.
136. **Giaouris, E., Chapot-Chartier, M-P., Briandet, R.** *Surface physicochemical analysis of natural Lactococcus lactis strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties.* Int. J. Food Microbiol. : 2009, 131. 2-9.
137. **Poquet, I., Bolotin, A., Gruss, A.** *Optimisation de la production de protéines hétérologues exportées chez Lactococcus lactis par inactivation de HtrA, son unique protéase de ménage de surface.* Lait - INRA, EDP Sciences : 2001, 81. 37-47.
138. **Sardin, S., Morrier, J-J., Benay, G., Barsotti, O.** *In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties.* Journal of Oral Rehabilitation : 2004, 31(2). 140-148.
139. **Carter, D.C., Ho, J.X.** *Structure of serum albumin.* Advances in protein chemistry : 1994, 45. 153-205.
140. **Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., Ken-ichi, F.** *Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS.* Biophys. Res. Commun. : 1990, 173(2). 639-646.
141. **Petitpas, I., Grüne, T., Bhattacharyo, A.A., Curry, S.** *Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids.* J. Mol. Biol. : 2001, 314(5). 955-960.
142. **Carter, D.C., Ho, J.X.** *Structure of serum albumin.* Adv. Prot. Chem. : 1994, 45. 153-205.
143. **Delgado, A.V., Gonzales-Caballero, F., Hunter, R.J., Koopal, L.K., Lyklema, J.** *Measurement and interpretation of electronkinetic phenomena.* Pure Appl. Chem. : 2005, 77(10). 1753-1805.
144. **Bayer, M.E., Sloyer, J.L.Jr.** *The electrophoretic mobility of Gram-negative and Gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis.* J. Gen. Microbiol. : 1990, 136. 867-874.
145. **Zworykin, V.A., Hillier, J., Snyder, R.L.** *A scanning electron microscope .* ASTM. Bull. : 1942, 117. 15-23.
146. **Wells, O.C., Joy, D.C.** *The early history and future of the SEM.* Surf. Interface Anal. : 2006, 38. 1738-1742.
147. **Falcone, R.D., Correa, N.M., Biasutti, M.A., Silber, J.J.** *Acid-base and aggregation processes of acridine orange base in n-heptane/AOT/water reverse micelles.* Langmuir : 2002, 18. 2039-2047.
148. **van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A.J.B.** *Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion.* Appl. Environ. Microbiol. : 1987, 53(8). 1898-1901.

149. **Miller, R., Treppo, S., Voigt, A., Zingg, W., Neumann, A.W.** *Contact angle kinetics of human albumin solutions at solid surfaces.* Colloid Surf. : 1993, 69. 203-208.
150. **Wang, J., Buck, S.M., Even, M.A., Chen, Z.** *Molecular responses of proteins at different interfacial environments detected by sum frequency generation vibrational spectroscopy.* J. Am. Chem. Soc. : 2002, 124. 13302-13305.
151. **Chottard, J-C., Depezay, J.C., Leroux, J.P.** *Chimie fondamentale, Etudes biologiques et médicales, II Structure moléculaire.* Hermann Paris : 1995. 214-218.
152. **Koutsopoulos, S., Unsworth, L.D., Nagai, Y., Zhang, S.** *Controlled release of functional proteins through designer self-assembling peptide nanofiber hydrogel scaffold.* PNAS : 2009, 106(12). 4623-4628.
153. **Fardet, A., Hoebler, C., Djelveh, G., Barry, J-L.** *Restricted bovine serum albumin diffusion through the protein network of pasta.* J. Agric. Food Chem; : 1998, 46. 4635-4636.
154. **Kim, J.M., Breuer, K.S.** *Enhanced diffusion due to motile bacteria.* Phys. Fluids : 2004, 16(9). L78-L81.
155. **Shakenraad, J.M., Busscher, H.J.** *Cell-polymer interactions: the influence of protein adsorption.* Colloid Surf. : 1989, 42. 331-343.
156. **Hou, S., Burton, E.A., Simon, K.A., Blodgett, D., Luk, Y-Y., Ren, D.** *Inhibition of Escherichia coli biofilm formation by self-assembled monolayer of functional alkanethiols on gold.* Appl. Environ. Microbiol. : 2007, 73(13). 4300-4307.
157. **Zhang, Z., Chen, S., Jiang, S.** *Dual-functional biomimetic materials: nonfouling poly-carboxybetaine) with active functional groups for protein immobilization.* Biomacromolecules : 2006, 7. 3311-3315.
158. **Yeganeh, M.S., Dougal, S.M., Silbernagel, B.G.** *Sum frequency generation studies of surfaces of high-surface-area powdered materials.* Langmuir : 2006, 22. 637-641.
159. **Tourillon, G., Dreesen, L., Volcke, C., Sartenar, Y., Thiry, P.A., Peremans, A.** *Total internal reflection sum-frequency generation spectroscopy and dense gold nanoparticles monolayers: a route for probing adsorbed molecules.* Nanotechnology : 2007, 18. 415301-415308.
160. **Wang, J., Lee, S-H., Chen, Z.** *Quantifying the ordering of adsorbed proteins in situ.* J. Phys. Chem. B : 2008, 112(7). 2281-2290.
161. **Shen, Y.R., Ostroverkhov, V.** *Sum-frequency vibrational spectroscopy on water interfaces: polar orientation of water molecules at interfaces.* Chem. Rev. : 2006, 106. 1140-1154.
162. **Zhang, Z., Piatkowski L., Bakker, H.J., Bonn, M.** *Ultrafast vibrational energy transfer at the water/air interface revealed by two-dimensional surface vibrational spectroscopy.* Nat. Chem. : 2011, 3. 888-893.
163. **Jena, K.C., Hore, D.K.** *Water structure at solid surfaces and its implications for biomolecule adsorption.* Phys. Chem. Chem. Phys : 2010, 12. 14383-14404.
164. **Du, Q., Superfine, R., Freysz, E., Shen, Y.R.** *Vibrational spectroscopy of water at the vapor/water interface.* Phys. Rev. Lett. : 1993, 70(15). 2313-2316.
165. **Eftekhari-Bafrooei, A., Borguet, E.** *Effect of surface charge on vibrational dynamics of interfacial water.* JACS Communication : 2009, 131. 12034-12035.

166. **Bellon-Fontaine, M-N., Rault, J., van Oss, C.J.** *Microbial adhesion to solvents: a nobel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acide-base properties of microbial cells.* Colloids Surf. B : 1996, 7. 47-53.
167. **Baty, F., Delignette-Muller, M-L.** *Estimating the bacterial lag time: which model, which precision?* Int. J. Food Microbiol. : 2004, 91. 261-277.
168. **Bradford, M.M.** *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem. : 1976, 72. 248-254.
169. **Zor, T., Selinger, Z.** *Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies.* Anal. Biochem. : 1996, 236. 302-308.
170. **Clayton, S.C., Lee, Y., Richter, J., Stephenson, J.C., Briggman, K.A.** *In situ, vibrationnally resonant sum frequency spectroscopy study of the self-assembly of dioctadecyl disulfide on gold.* Langmuir : 2002, 18(20). 7549-7556.
171. **Martin, S.R., Schilstra, M.J.** *Circular dichroism and its application to the study of biomolecules.* Methods Cell Biol. : 2008, 84. 263-293.
172. **Fu, L., Wang, Z., Yan, E.C.Y.** *Chiral vibrational structures of proteins at interfaces probed by sum frequency generation spectroscopy.* Int. J. Mol. Sci. : 2001, 12. 9404-9425.
173. **Chen, X., Wang, J., Sniadecki, J.J., Even, M.A., Chen, Z.** *Probing alpha-helical and beta-sheet structures of peptides at solid/liquid interfaces with SFG.* Langmuir : 2005, 21. 2662-2664.
174. **Vass, E., Hollosi, M., Besson, F., Buchet, R.** *Vibrational spectroscopic detection of beta and gamma turns in synthetic and natural peptides and proteins.* Chem. Rev. : 2003, 103. 1917-1954.
175. **Shanmugam, G., Polavarapu, P.L.** *Vibrational circular dichroism spectra of protein films: thermal denaturation of bovine serum albumin.* Biophys. Chem. : 2004, 111. 73-77.