HAL
open science

Imagerie moléculaire corrélative de nanosondes fonctionnalisées pour l'étude de l'hétérogénéité physico-chimique spatiale de microorganismes associés aux surfaces.

Baptiste Chappaz

To cite this version:

Baptiste Chappaz. Imagerie moléculaire corrélative de nanosondes fonctionnalisées pour l'étude de l'hétérogénéité physico-chimique spatiale de microorganismes associés aux surfaces.. Chimie théorique et/ou physique. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS125 . tel-01424125

HAL Id: tel-01424125

https://theses.hal.science/tel-01424125v1

Submitted on 2 Jan 2017

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

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

NNT : 2015SACLS125

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 571
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Spécialité de doctorat : Chimie

Par

Monsieur Baptiste CHAPPAZ

Imagerie moléculaire corrélative de nanosondes fonctionnalisées pour l'étude de l'hétérogénéité physico-chimique spatiale de microorganismes associés aux surfaces.

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 27 novembre 2015 :

Composition du Jury :

Mme F. PONCIN-EPAILLARD, Directrice de Recherche, CNRS, Présidente
Mme M. MERCIER-BONIN, Chargée de Recherche, INRA, Rapporteur
Mme N. OULAHAL, Maître de Conférences, Université Lyon 1, Rapporteur
Mme M.-N. BELLON-FONTAINE, Professeur, AgroParisTech, Examinatrice
Mme C. DABLEMONT, Maître de Conférences, Université Paris-Sud, Examinatrice
M. P. ROGER, Professeur, Université Paris-Sud, Examinateur
Mme M.-P. FONTAINE-AUPART, Directrice de Recherche, CNRS, Directrice de thèse

À Stéphane et Pascale.

Il n'y a pas d'émotion, il n'y a que la paix.
Il n'y a pas d'ignorance, il n'y a que la connaissance.
Il n'y a pas de passion, il n'y a que la sérénité.
Il n'y a pas de chaos, il n'y a que l'harmonie.
Il n'y a pas de mort, il n'y a que la Force.

Remerciements

Ce travail a été financé par une bourse de l'École Doctorale 470 « Chimie de Paris-Sud » devenue en 2015 l'École Doctorale 571 « Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes » (2MIB) de l'Université Paris-Saclay. Je tiens tout d'abord à remercier Patrick Berthet et Christophe Colbeau-Justin, directeurs respectifs de ces ED, pour la confiance qu'ils m'ont apporté et renouvelé chaque année pour me permettre de mener à bien ce travail.

À l'issue de ces années de thèse, je repars avec la tête remplie de souvenirs et de connaissances diverses acquise en côtoyant une grande diversité de personnes. Je suis conscient qu'en écrivant ces lignes destinées à leur exprimer ma reconnaissance, je risque d'en oublier, mais il faut qu'elles sachent que cela ne veut pas dire que je n'en garderai pas souvenir !

Ces quelques années de thèse dans l'équipe G de Biophysique et Biophotonique de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay ont avant tout été possibles grâce à Philippe Brechignac, directeur de l'ISMO à mon arrivée, puis Bernard Bourguignon par la suite, qui m'ont fait confiance pour intégrer le laboratoire et m'ont assuré les meilleures conditions de travail possible. À ce titre je leur exprime ma profonde gratitude.

De même, je remercie énormément Marie-Pierre Fontaine-Aupart qui a dirigé ce travail de thèse en assurant un encadrement et un investissement importants sans lequel ce travail n'aurait pas été aussi abouti.

Ma gratitude va également à l'ensemble des personnes qui ont participé activement à ce projet par leurs discussions constructives, et en m'ouvrant la porte de leur unité pour y réaliser quelques expériences : Karine Steenkeste au sein de notre équipe mais aussi Romain Briandet, Marie-Noëlle Bellon-Fontaine et Jean-Marie Herry à l'unité Bioadhésion, Biofilms et Hygiène des Matériaux (B2HM) de l'Institut MICALIS (INRA-AgroParisTech, Massy) à travers leurs connaissances importantes de l'aspect microbiologique, Philippe Roger et Bénédicte Lepoittevin de l'équipe Synthèse

de Molécules et Macromolécules Bioactives (SM_2B) à l'Institut de Chimie Moléculaire et de Matériaux d'Orsay (ICMMO, Orsay) pour la synthèse et la caractérisation de nanoparticules organiques fluorescentes chargées, et enfin Rachel Méallet-Renault, Gilles Clavier et Chloé Grazon de l'équipe Nanosystèmes, fluorescence et électrochimie : de nouveaux composés actifs aux spectroscopies innovantes du laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires (PPSM-ENS Cachan) pour leurs apports dans l'utilisation de nanoparticules chargées négativement et dans le domaine de la spectroscopie de fluorescence.

Par sa présence au quotidien ponctuée de nombreuses discussions aussi bien scientifiques que diverses, de rires, de moqueries (gentilles, et réciproques ! ;-)), de sandwichs sans poisson ni fromage, et d'Oréo frits, je remercie vivement Alan Jenkin Chan, Docteur 1 mois plus tôt, et je lui adresse tous mes vœux de réussite dans sa vie future. Je garderai un excellent souvenir du plus chinois des philippins et si je lui ai proposé maintes fois sans le mettre en pratique, il reste le bienvenu s'il veut que je lui fasse découvrir ma belle région d'origine (si si Alan, on est très accueillants ! !).

Alan a été bien aidé dans l'ambiance au quotidien au bâtiment 106 : j'adresse ma gratitude à Siddarth "Darth Sid" Sivankutty, Nicolas Bourg, Pierre Bon, Sandrine Lécart (qui m'aura aussi bien épaulée pour l'utilisation du microscope confocal et plus généralement des installations au CPBM), Sandrine Lévêque-Fort, Guillaume Dupuis et Chantal Jucha. À tous un grand merci pour la bonne humeur quotidienne, les discussions diverses, les conseils...
De la même manière qu'à Alan, je souhaite à Nicolas le meilleur pour la fin de sa thèse ! J'espère juste qu'après avoir passé 3 ans à réclamer des gâteaux notamment aux stagiaires, les siens lors de son pot de thèse seront à la hauteur ! ;-)

À propos de stagiaires, j'ai eu l'occasion d'en accueillir un certain nombre qui ont contribué activement à ce travail : Velia Bouzerara, Bérénys Cruz, Pierre Wahl, Nathan Fritsch-Vinson et Amina Chetini. Je leur exprime ma profonde reconnaissance pour le travail qu'ils ont accompli avec moi et qui ont permis de faire avancer ces travaux.

Je remercie également Margareth Renault, Alexis Canette, Morgan Guilbaud pour ce qu'ils m'ont apporté lors de mes différents séjours à Massy et qui m'auront été d'une aide précieuse dans mon travail au quotidien.

Une pensée également pour Jérôme Bruzaud, doctorant qui a récemment terminé sa thèse et que je remercie pour les discussions que l'on a pu avoir.
Enfin merci à Bruno Carnez, pour l'aide précieuse dans la préparation des milieux nécessaires lorsque j'ai eu à lui en demander, mais aussi pour les longues discussions que l'on a eues autour de centres d'intérêt communs, et à Gilles Gerlot à qui je souhaite "longue vie et prospérité" !

Sur un aspect plus personnel je tiens à remercier tout particulièrement mes amis et ma famille qui m'ont soutenu pendant ces années, de près ou de loin. Un petit coucou sympathique à Yann qui sera venu passer quelques week-end fort sympathiques, qui m'auront fait parfois oublier les tracas de la thèse.

Enfin, et avant qu'elle me fasse payer pour le restant de mes jours de l'avoir oubliée, je remercie infiniment Clémence, pour son soutien au quotidien, d'avoir supporté (pas toujours sans broncher !) tout ce qui accompagne la vie au quotidien avec un thésard, mais elle aura vraiment tout fait pour que j'ai le moins de soucis possibles à me faire en dehors de ceux inhérents à la thèse.

Et également merci aussi à ceux que je n'ai pas cités parce que je les ai oubliés (honte à moi !) et à tous je souhaite le meilleur pour l'avenir, et qui sait, à bientôt peut-être !

Que la Force soit avec vous tous, à jamais ! May the Force be with you, ever !

Table des matières

I Introduction au travail de thèse 1

Introduction générale 3

Chapitre 1 : L'adhésion bactérienne et la croissance de biofilms : le contexte de ce travail de thèse 9

1.1 Généralités sur les bactéries 9
1.1.1 Hétérogénéité physico-chimique spatiale 13
1.2 *Lactococcus lactis* et *Listeria innocua* : deux bactéries modèles pour notre étude 15
1.3 L'adhésion bactérienne : aspects physico-chimiques 19
1.4 Les biofilms bactériens 29

II Résultats et discussion 33

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des propriétés physico-chimiques de nanoparticules fluorescentes organiques chargées 35

2.1 Principe de la polymérisation radicalaire en émulsion 35
2.2 Synthèse des nanoparticules cationiques et optimisation de la fraction molaire en comonomère ammonium 38
2.3 Propriétés des nanoparticules anioniques 43
2.4 Caractérisation structurale et physico-chimique des nanoparticules . . 44
2.4.1 Contrôle de la charge des nanoparticules 44
2.4.2 Structure, taille, monodispersité des nanoparticules 45

Annexe : matériels & méthodes 51

2.A Synthèse des nanoparticules cationiques 51
2.B Détermination du rendement de la synthèse par thermogravimétrie . . 52
2.C Structure, taille et homogénéité des nanoparticules par microscopie électronique 53
2.D Détermination du rayon hydrodynamique des nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière 55

2.E Détermination du rayon hydrodynamique des nanoparticules par spectroscopie de corrélation de fluorescence . . . 57
2.F Détermination des concentrations des solutions de nanoparticules . . 59
2.G Spectroscopies d'absorption et de fluorescence des nanoparticules . . . 60
2.H Contrôle de la charge de surface des nanoparticules par zêtamétrie . . 60

Chapitre 3 : Interaction nanoparticules-bactéries à l'état planctonique 63
3.1 Caractérisation des souches bactériennes . . . 63
3.1.1 Croissance bactérienne . . . 63
3.1.2 Caractère hydrophobe/hydrophile et acide-base de Lewis . . . 65
3.1.3 Charge de surface . . . 67
3.2 Les nanoparticules sont-elles toxiques pour les bactéries ? . . . 68
3.2.1 Croissance bactérienne . . . 68
3.2.2 Survie des bactéries . . . 70
3.3 Saturation des sites chargés d'une bactérie par les nanoparticules . . . 70
3.4 Caractérisation de l'interaction bactéries-nanoparticules par spectroscopie de corrélation de fluorescence . . . 73
3.5 Visualisation de l'interaction nanoparticules-bactéries . . . 75
3.5.1 Par imagerie de fluorescence . . . 75
3.5.2 Par microscopie électronique . . . 76

Annexe : matériels & méthodes 81
3.A Souches bactériennes utilisées . . . 81
3.B Obtention des suspensions bactériennes . . . 82
3.C Dénombrement des bactéries viables-cultivables . . . 83
3.D Cinétiques de croissance et courbes de survie des bactéries . . . 85
3.E Détermination du caractère hydrophobe/hydrophile et acide-base de Lewis des bactéries par MATS . . . 87
3.F Imagerie de l'interaction nanoparticule-bactérie . . . 89

Chapitre 4 : Adhésion bactérienne et croissance d'un biofilm : rôle des interactions physico-chimiques 91
4.1 La surface d'adhésion . . . 93
4.2 Adhésion bactérienne . . . 95
4.2.1 Quelles interactions conditionnent l'adhésion de nos bactéries sur une surface de verre ? . . . 95
4.2.2 Les nanoparticules « perturbent-elles » les bactéries adhérentes ? 100
4.2.3 Quels effets sur l'adhésion des modifications des propriétés de surface des bactéries ? . . . 103
4.2.3.1 Bactéries en interaction avec les NP+ . . . 104
4.2.3.2 Bactéries en interaction avec par les NP- . . . 111

4.3 Croissance de biofilms et impact de la microhétérogénéité de charges de surface . . . 114
4.3.1 Aspects expérimentaux . . . 114
4.3.2 Colonisation de la surface par les bactéries de *Listeria innocua* 2.7 . . . 115
4.3.3 Cinétique de croissance des biofilms de *L. innocua* 2.7 . . . 121

Annexe : matériels & méthodes **127**
4.A Protocole d'adhésion bactérienne . . . 127
4.B Croissance de biofilms . . . 129
4.C Marquage des bactéries pour leur observation en microscopie de fluorescence . . . 129
4.D Imagerie de fluorescence . . . 131

III Synthèse et perspectives **137**

Chapitre 5 : Synthèse et perspectives **139**

Liste d'abréviations **I**

Bibliographie **III**

Valorisation scientifique **XIII**

Première partie .

Introduction au travail de thèse

Introduction générale

Si l'on se réfère à la littérature scientifique, les publications relatives aux traitements de surface anti- ou pro-adhésion bactérienne occupent une place croissante avec un nombre de publications pratiquement multiplié par 4 depuis 2005 ! Une telle prolifération d'articles révèle deux faits : que le sujet constitue un défi scientifique d'importance mais que les traitements de surface existants ne sont pas à la hauteur des espérances !

N'est-ce pas le fait que la « microbiologie des surfaces » a encore de nombreux défis à relever ? Ce n'est pas surprenant quand on considère qu'il a fallu depuis les travaux pionniers de Pasteur attendre la fin du XXème siècle, pour reconnaître que dans les environnements naturels le mode de vie des bactéries en suspension (état planctonique) ne constituait qu'un état transitoire, la vie microbienne se déroulant principalement sur des surfaces : il s'y développe un écosystème dynamique dans lequel les bactéries pionnières adhérentes peuvent, si les conditions sont favorables, coloniser la surface et former des films de quelques microns à quelques millimètres d'épaisseur appelés biofilms. A partir de cet état adhérent, les microorganismes développent des caractéristiques très différentes de celles de leurs équivalents planctoniques : modifications de leur métabolisme cellulaire, de leur structure, production d'un gel de polymères (exopolysaccharides, protéines, acides nucléiques... au sein d'un réseau de canaux d'eau assurant une véritable vascularisation de la biostructure), mise en place de communication chimique, etc... autant de phénomènes leur permettant d'assurer un développement et une vie pérennes y compris dans des environnements hostiles.

Toutes les interfaces solide-liquide sont potentiellement propices à l'adhésion bactérienne et à la formation de biofilms. Ainsi ces consortiums microbiens ubiquitaires colonisent les sols, les matériaux, les végétaux, les organismes vivants... et sont source de lourds problèmes industriels et sociétaux : accélération des phénomènes de corrosion, contamination des équipements des industries agroalimentaires, des réseaux de distribution d'eau potable, des matériaux à usage médical (outils, prothèses, implants, cathéters, ...) à l'origine de la majorité des infections nosocomiales.
Cependant, les biofilms ne sont pas que « démons » et peuvent être mis à profit dans

des domaines aussi variés que la dépollution, la décontamination des eaux usées ou le recyclage des nutriments dans les écosystèmes, et le développement des nouvelles biotechnologies telles que les piles à combustible ou le bio-emballage.

Comprendre les mécanismes d'organisation de la vie sur les surfaces (bioadhésion) constitue un défi scientifique passionnant. C'est aussi un impératif pour apporter des réponses pertinentes aux questionnements de la société et des industries sur la manière de maîtriser la contamination par des agents infectieux, les traitements de décontamination efficaces, peu polluants, non cancérigènes à utiliser et/ou inventer..., mais aussi sur la possibilité de développer de nouvelles bioénergies, les stratégies à mettre en place pour améliorer la biodécontamination, le bioemballage, etc..., en résumé la question qui se pose est : comment minimiser les effets délétères des biofilms mais aussi exploiter leurs nombreuses potentialités pour différentes applications ?

Comprendre la bioadhésion, c'est disséquer l'ensemble des paramètres qui vont contrôler les premières étapes de formation des biofilms c'est-à-dire l'adhésion des bactéries aux surfaces, leur prolifération, les interactions entre elles jusqu'à former une structure 3D. Ce sujet d'une grande complexité doit prendre en compte les propriétés biologiques et physico-chimiques spatiales des bio-interfaces mettant en jeu microorganismes, surface réceptrice et fluide environnant, propriétés qu'il est difficile d'identifier et de quantifier à l'échelle moléculaire.

Les microbiologistes, en utilisant les outils de la génétique et de la biologie moléculaire, ont grandement contribué à une meilleure compréhension de la réactivité bactérienne tant au niveau biochimique que génomique : un certain nombre de gènes et de leur expression ainsi que des moteurs moléculaires ont pu être identifiés comme des facteurs clés de l'adhésion aux surfaces et de la formation des biofilms. Plus rares sont les études qui s'intéressent aux aspects purement physico-chimiques qui contrôlent les processus interfaciaux impliqués dans l'adhésion. Expérimentalement, elles reposent très souvent sur des mesures macroscopiques telles que (i) la mesure des angles de contact dans différents solvants pour préciser le caractère hydrophile/hydrophobe et les tensions de surface du substrat et de la surface des bactéries (à partir d'un tapis cellulaire) ou (ii) la mesure de la mobilité électrophorétique pour estimer le potentiel zêta et ainsi la densité de charge globale de la surface des cellules. Ces données sont utilisées pour évaluer les énergies d'interaction aux interfaces et utilisent des modèles théoriques issus de la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, et Overbeek). On

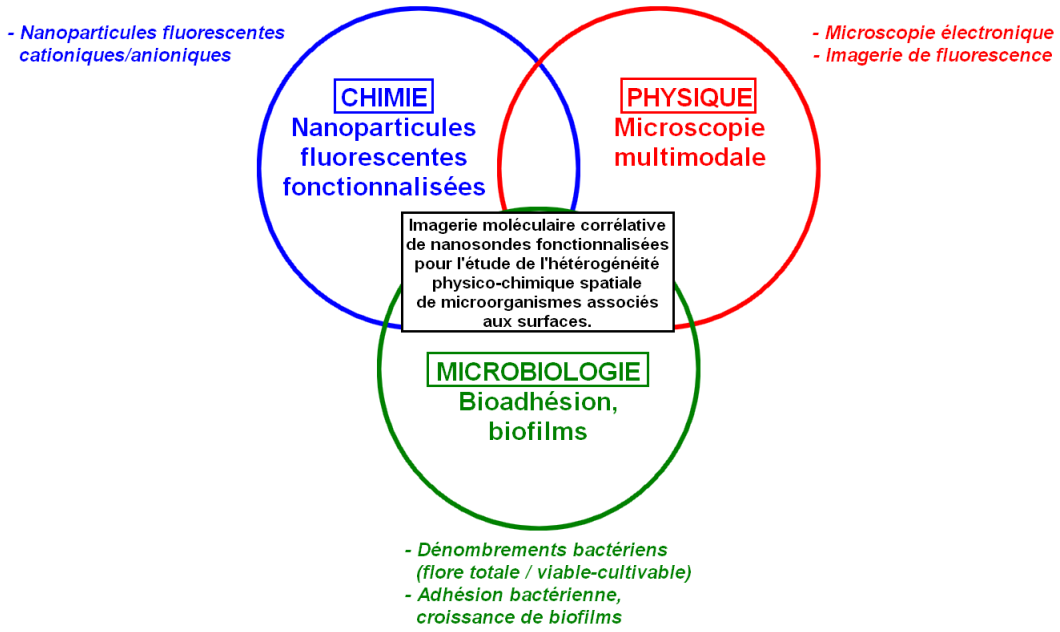
comprend aisément que ces outils développés pour décrire les interactions entre particules colloïdales imperméables et non déformables (particule « dure »), avec une surface plane et homogène dans un fluide éventuellement ionique, n'ont qu'un succès limité pour décrire le processus de bioadhésion : une bactérie est au contraire une bioparticule « molle », avec une surface perméable, hétérogène chimiquement et structurellement (du fait de la présence d'appendices exocellulaires par exemple) et pouvant s'adapter biologiquement (par la production de protéines d'adhésion, etc...), la surface d'adhésion peut être rugueuse, le fluide suspendant naturel va contenir des protéines, des sucres, etc... L'énergie d'interaction bactérie-substrat ainsi déterminée ne sera qu'une donnée indicative. Il y a moins de dix ans que les physico-chimistes ont à leur disposition des outils aussi performants que les manipulations génétiques des biologistes pour décrire nano- et macroscopiquement les interactions bactérie-bactérie et bactérie-substrat. Des avancées remarquables ont été obtenues en utilisant la microscopie par force atomique (AFM) couplée à de la spectroscopie de force. De nouveaux modèles d'analyse électrocinétique de la mobilité électrophorétique des bactéries adaptées à la notion de bioparticule « molle » ont aussi été développés.
Un autre axe de recherche en constant développement porte sur la visualisation, de manière non-invasive et à l'échelle de la cellule unique, de la dynamique de l'adhésion bactérienne et de la formation du biofilm. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse où nous avons combiné les outils de la physique (imagerie de fluorescence, imageries électroniques) et de la chimie (nanosondes organiques fluorescentes fonctionnalisées en surface). Grâce à ces outils, il a été possible d'apporter un regard tout particulier sur le rôle de la micro-hétérogénéité de charges de la paroi des bactéries pour sonder s'il s'agit d'un facteur qui régit la réactivité des bio-interfaces.
Il s'agit d'un travail interdisciplinaire faisant appel aux concepts et méthodes de la physique, de la chimie, et de la microbiologie et qui s'articule autour des principaux points suivants :

— La synthèse de nanoparticules organiques fluorescentes fonctionnalisées en surface et leur caractérisation en termes de structure, propriétés physico-chimiques, propriétés de fluorescence au moyen d'un panel de méthodes biophysiques et biochimiques. Cette étude fait l'objet du chapitre 2 de ce manuscrit.

— La caractérisation et la visualisation de l'interaction nanoparticules-bactéries en suspension à l'aide d'outils complémentaires (spectroscopie de corrélation de fluorescence, imagerie d'intensité de fluorescence, microscopie électronique) afin de mettre en lumière l'existence éventuelle d'une hétérogénéité des pro-

priétés de surface des bactéries planctoniques. Dans ce contexte, la toxicité des nanoparticules vis-à-vis des bactéries a aussi été contrôlée par des mesures microbiologiques de dénombrement. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le chapitre 3.

— La quantification (par dénombrement des bactéries viables-cultivables) et la visualisation (par imagerie de fluorescence en mode time-lapse) de l'adhésion bactérienne au niveau de la cellule unique ainsi que la dynamique de formation des biofilms à partir d'un modèle expérimental d'étude, bactérie-substrat-fluide suspendant simple et robuste assurant une bonne reproductibilité et une étude comparative des expériences. L'ensemble de cette étude est rapporté dans le chapitre 4.



En amont de la présentation des résultats expérimentaux, le chapitre 1 propose une description structurale et fonctionnelle des bactéries en particulier celles utilisées dans le cadre de ce travail et mettant l'accent sur leurs propriétés physico-chimiques de surface (charge, hydrophobie/hydrophilie, caractère acide-base de Lewis...), leur aptitude à synthétiser des polymères extracellulaires... autant de paramètres qui comme nous l'avons décrit précédemment vont agir sur le processus de bioadhésion. Dans ce chapitre sont aussi rappelés les différents modèles théoriques dérivés de la théorie DLVO et les mesures expérimentales qui constituent une approche pour décrire

l'adhésion bactérienne. Ce travail a été réalisé en utilisant une combinaison de méthodes de spectroscopie, d'imagerie optique et électronique, de microbiologie... dont les principes et performances sont présentés en amont des dispositifs utilisés dans le cadre de ce travail (annexes des chapitres 2 à 4).

Nous avons à travers ce travail de thèse ouvert un axe de recherche fondamental novateur et transdisciplinaire qui a permis de mettre en synergie les compétences d'un ensemble d'équipes de laboratoires aujourd'hui rassemblés au sein de l'université Paris-Saclay : à côté de l'équipe « Biophysique-Biophotonique » de l'ISMO, l'équipe « Bioadhésion, Biofilms et Hygiène des Matériaux » de l'Institut MICALIS (INRA-AgroParisTech), l'équipe « Synthèse de Molécules et Macromolécules Bioactives » de l'Institut de Chimie Moléculaire et Matériaux d'Orsay, et l'équipe « Nanosystèmes, Fluorescence et Électrochimie » du laboratoire de Photo-physique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires de l'École Normale Supérieure de Cachan.

1. L'adhésion bactérienne et la croissance de biofilms : le contexte de ce travail de thèse

Ce travail de thèse vise à mieux définir les paramètres physico-chimiques de surface (bactéries, substrat) qui contrôlent la bioadhésion et la formation des biofilms. Il apparaissait donc important de commencer ce manuscrit par un rappel des connaissances actuelles dans ce domaine.

1.1. Généralités sur les bactéries

Structure des bactéries

Les bactéries sont des cellules *procaryotes* (à la différence des cellules *eucaryotes*, elles ne possèdent pas de noyau) naturellement présentes dans notre environnement. On les retrouve dans des fluides plus ou moins complexes (air ou milieu liquide), soit à l'état planctonique (i.e. les bactéries sont libres) ou accrochées à une surface (biotique ou abiotique).

On distingue essentiellement 3 formes de bactéries (figure 1.1) :
— les bactéries sphériques ou en forme d'œuf (« coccoïdes »),
— les bactéries cylindriques, en forme de bâtonnet,
— les bactéries en forme de spirales.

En plus de cette diversité de forme, on trouve aussi une diversité de taille qui peut varier de quelques micromètres à une centaine de microns, et de constituants de la paroi (figure 1.2) qui peut exprimer des appendices cellulaires (flagelles, pili, curli, ...) favorisant la mobilité ou l'attachement de la bactérie à un substrat (adhésion) ou avec d'autres cellules voisines (échange d'information génétique, agrégation et formation de biofilms) [1] (figure 1.3).

1. Oxaran et al. 2012.

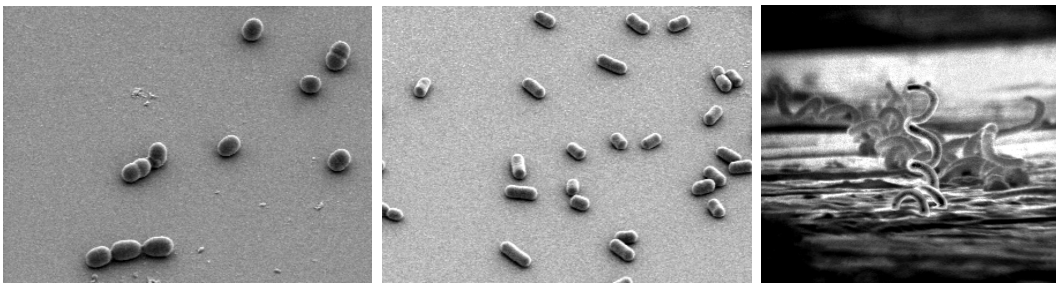


Figure 1.1. – *Imagerie par microscopie électronique de bactéries de forme sphérique, cylindrique, et en spirale.*

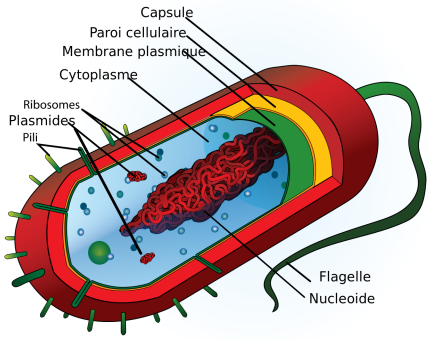
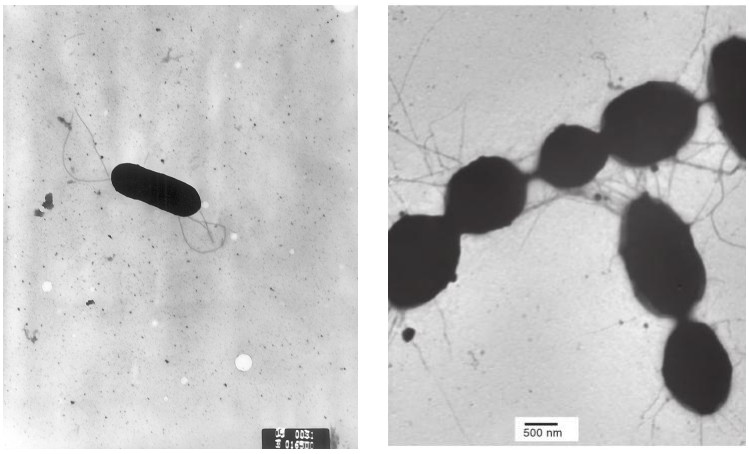


Figure 1.2. – *Coupe schématique d'une bactérie (*Ruiz Villarreal *2008).*



(a) ***(b)***

Figure 1.3. – *Illustrations par microscopie électronique (a) de flagelles sur des bactéries Listeria monocytogenes (Elizabeth White, Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL)) et (b) de pili à la surface de bactéries Lactococcus lactis (adaptée de (*Piard *et* Briandet *2015)).*

Les flagelles sont de longs appendices ancrés à la paroi bactérienne. Ils peuvent être aussi bien situés à une extrémité de la bactérie que répartis tout autour d'elle, et en nombre plus ou moins important [2]. Ils se développent aussi selon les conditions de milieu extérieur telle la température. Par exemple *Listeria innocua* possèdera des flagelles si elle se développe à 25 °C et n'en possède plus à 37 °C.
Les pili sont plus petits que les flagelles, et ancrés dans la membrane cytoplasmique. Ils sont répartis tout autour de la bactérie.

Dans le cadre de ce travail de thèse, l'élément de la structure d'une bactérie qui nous intéresse principalement est la paroi bactérienne, l'interface entre la cellule et son environnement (fluide suspendant, substrat, matrice d'exopolymères au sein des biofilms). Une bactérie pourra être classée, selon la structure de sa paroi, dans l'une des deux catégories suivantes : les bactéries à caractère Gram positif (Gram+) et celles à Gram négatif (Gram-) selon leur réaction au colorant de Gram.

Quel que soit le caractère de la bactérie, on trouvera toujours une membrane cytoplasmique d'une dizaine de nanomètres d'épaisseur qui entoure le cytoplasme, dans lequel est condensé l'ADN (*nucléoïde*) associé à des protéines (figure 1.2). Parfois, certaines bactéries sont aussi capables de s'entourer d'une capsule (souvent de nature polysaccharidique, mais parfois protéique) la protégeant contre la phagocytose et influençant son adhésion à des substrats.

La membrane cytoplasmique est constituée de phospholipides en double couche ($\sim$ 30 %), et de protéines structurales et enzymatiques qui leur sont associées ($\sim$ 70 %) (figure 1.4). Elle joue un rôle essentiel dans le transport de nutriments à l'intérieur de la bactérie, dans la respiration des bactéries aérobies, et dans la synthèse des polymères de la paroi bactérienne.

Malgré la forte pression osmotique (5 à 20 atmosphères) qui règne à l'intérieur du cytoplasme, la bactérie ne se déforme pas et conserve sa morphologie grâce à l'existence d'une paroi rigide constituée de polymères. Ceux-ci et leur mode de liaison varient selon les espèces bactériennes mais une entité de base, spécifique des bactéries, est partout présente : le peptidoglycane. Il s'agit d'un polymère complexe formé (i) d'une « épine dorsale » faite d'une alternance de molécules de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique, identique pour toutes les bactéries, (ii) d'un ensemble de

2. Houry et al. 2009.

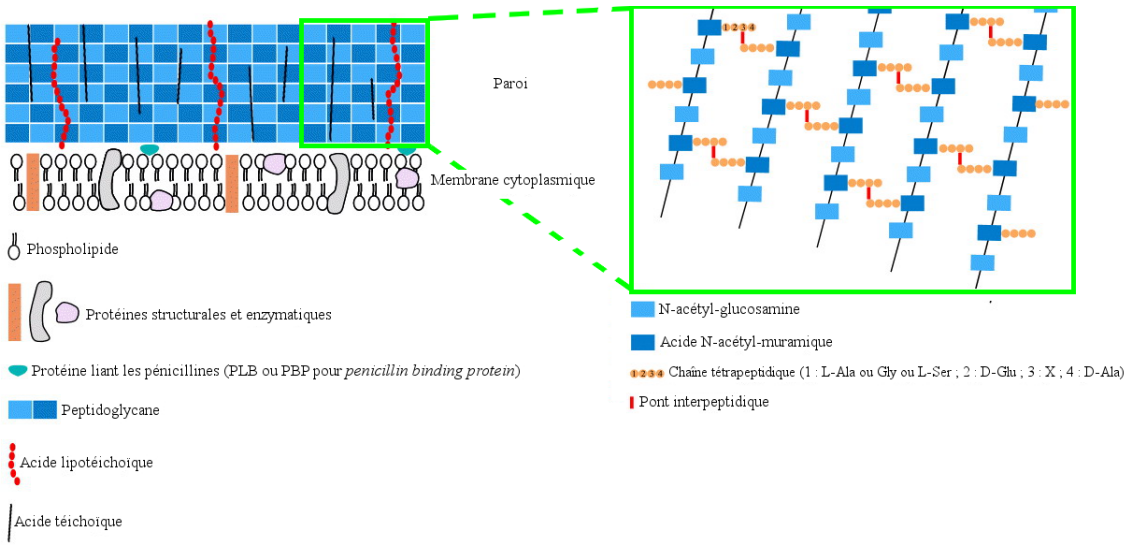


Figure 1.4. – *Gauche : schéma de constitution de la membrane cytoplasmique et de la paroi d'une bactérie à caractère Gram+. Dans l'encadré vert, la structure détaillée du peptidoglycane constitutif de la paroi. Adaptés de (*CREBS *2011).*

Tableau 1.1. – *Quelques différences importantes entre les bactéries à caractère Gram+ et Gram-. D'après (*GHUYSEN *et* HAKENBECK *1994).*

	Bactéries Gram+	Bactéries Gram-
Peptidoglycane	présent	présent
- épaisseur	$\sim 100\,\text{nm}$	$\sim 10\,\text{nm}$
- proportion de la paroi	50-90 %	10-20 %
- acides téichoïques et teichuroniques	généralement présents	absents
- lipopolysaccharides et lipoprotéines	absents	présents
Membrane externe	absente	présente
Membrane cytoplasmique	présente	présente
- épaisseur	$\sim 10\,\text{nm}$	$\sim 10\,\text{nm}$
- acides lipotéichoïques	présents	absents
Point isoélectrique	pH 2 à 3	pH 5 à 6

chaînes latérales peptidiques identiques, composées de 4 acides aminés et attachées à l'acide N-acétylmuramique et (iii) d' un ensemble de « ponts interpeptidiques » identiques. (figure 1.4) ; les chaînes latérales de tétrapeptides et les ponts interpeptidiques varient d'une espèce bactérienne à une autre.

La structure de la paroi bactérienne se différencie ensuite selon le caractère Gram- ou Gram+ de la cellule. Le tableau 1.1 permet de lister les principales caractéristiques qui différencient chacun des deux types de parois bactériennes. On ne détaillera ici que la paroi des bactéries Gram+, dont font partie les espèces étudiées dans ce travail de thèse. Pour cette catégorie de cellules, les nombreuses couches de peptidoglycane (quelques dizaines de nanomètres) représentent jusqu'à 90 % des constituants de la paroi. Elles sont traversées par de grande chaînes polymériques, les acides lipotéichoïques, qui assurent la liaison avec la membrane plasmique. D'autres chaînes comme les acides téichoïques, sont aussi contenues dans la couche de peptidoglycanes et assurent sa stabilité (figure 1.4).
Les composés organiques les plus externes (polysaccharides, protéines) vont conférer à la bactérie ses propriétés physico-chimiques de surfaces (charge, hydrophobie, caractère donneur-accepteur d'électrons) et être des acteurs essentiels de son interaction avec le milieu environnant (fluide suspendant, substrat).

1.1.1. Hétérogénéité physico-chimique spatiale

Les propriétés physico-chimiques de la paroi des bactéries sont à considérer pour tenter d'établir un lien avec le processus de bioadhésion.
Ces propriétés ont été essentiellement mesurées de façon macroscopique. On citera par exemple la charge de la surface d'une cellule qui peut être obtenue par des méthodes électrophorétiques, le caractère hydrophile/hydrophobe et acide-base de Lewis par des mesures de partage dans différents solvants ou par des mesures d'angle de contact. Certaines de ces méthodes sont utilisées dans ce travail et décrites dans les annexes.
Cependant, si l'on parvient à atteindre l'échelle moléculaire, on montre que ces propriétés physico-chimiques de surface des bactéries ne sont pas homogènes.

Ainsi, dès 1973, Marshall et Cruickshank montraient par microscopie électronique

la présence de charges positives réparties sur l'ensemble de la surface d'une bactérie [3]. Ils ont émis l'hypothèse sans pouvoir le démontrer que cette microhétérogénéité de charge pourrait être à l'origine de l'orientation spécifique de bactéries à des interfaces liquide-liquide et solide-liquide.
Plus récemment, l'utilisation de pointes spécifiquement fonctionnalisées d'AFM a permis de caractériser l'hétérogénéité de l'hydrophobicité de surface de bactéries [4], qui pourrait également influencer l'orientation de la cellule lors de son adhésion au substrat. Plus généralement, dès 2003, Vadillo-Rodríguez et al. en utilisant la microscope à force atomique, ont montré que les interactions entre la surface des bactéries et son environnement ne peuvent être décrites qu'en ne considérant que les propriétés physico-chimiques globales de la surface des cellules [5].

À notre connaissance aucune étude n'a pu montrer l'influence d'une micro-hétérogénéité de charge à la surface des bactéries sur leur comportement bioadhésif.
Dans ce travail de thèse nous nous attacherons donc à contrôler l'influence de cette micro-hétérogénéité de charge sur des souches bactériennes décrites ci-après.

3. Marshall et Cruickshank 1973.
4. Dorobantu et al. 2008.
5. Vadillo-Rodríguez et al. 2003.

1.2. *Lactococcus lactis* et *Listeria innocua* : deux bactéries modèles pour notre étude

Lactococcus lactis

Quelques données historiques

Lactococcus lactis (ou *L. lactis*) a été la première bactérie isolée en culture en 1873 par Joseph Lister qui l'avait alors nommée *Bacterium lactis* car reconnue comme responsable de la fermentation lactique[6]. Ce fut aussi une des premières observations par microscopie réalisée par Weigmann en 1899, à partir de crème et de lait caillé[7]. En 1909, elle fut renommée *Streptococcus lactis* sur la base d'espèces isolées depuis des produits fermentés[8].
L'évolution des travaux de taxonomie ont permis dès 1919 à Orla-Jensen de définir deux sous-espèces distinctes : *Streptococcus lactis* et *Streptococcus cremoris*[9], et en 1985 à Schleifer et al. de séparer un genre distinct de celui des *Streptococcus* et *Enterococcus*, appelé *Lactococcus* en référence à la fonction et à la forme de la bactérie et inspiré par le genre déjà existant de *Lactobacillus*[10].
Les bactéries *Lactococcus* et plus particulièrement les deux sous-espèces *lactis* et *cremoris* de la souche *L. lactis* sont aujourd'hui largement utilisées à l'échelle industrielle pour la fermentation du lait et la préparation de produits laitiers.

Ses propriétés structurales et physico-chimiques

On sait aujourd'hui qu'il existe une grande diversité génétique chez les bactéries *Lactococcus*[11] qui s'accompagne d'une grande variabilité de leurs propriétés physico-chimiques de surface et donc de leur adhésion[12].

Les bactéries du genre *Lactococcus* sont des bactéries lactiques de forme coccoïde (figure 1.5). Elles peuvent se présenter isolées (diamètre de 0,5 – 1 µm) ou regroupées

6. Lister 1873.
7. Weigmann 1899.
8. Lohnis 1909.
9. Orla-Jensen 1919.
10. Schleifer et al. 1985.
11. Kelly et Ward 2002.
12. Giaouris, Chapot-Chartier et Briandet 2009 ; Habimana, Legoff et al. 2007 ; Leriche, Chassaing et Carpentier 1999 ; Mercier et al. 2002.

en paires ou en chaînes (figure 1.5).

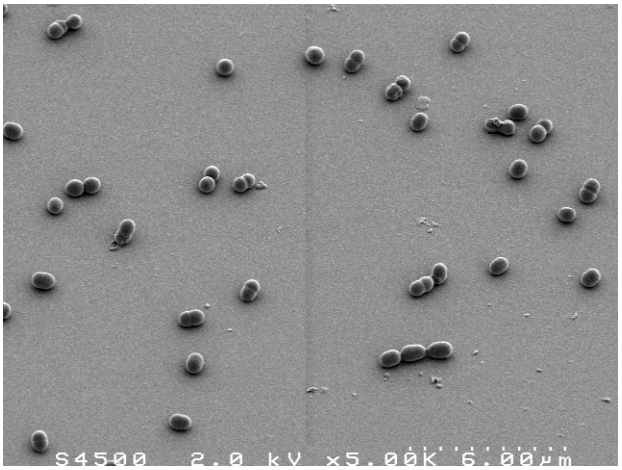


Figure 1.5. *– Imagerie par microscopie électronique de bactéries L. lactis.*

Les bactéries de *L. lactis* sont à caractère Gram+ et mésophiles. La plupart des souches présente une charge de surface globale négative [13] et un caractère hydrophile [14], et leur surface ne présente en général ni pilis ni flagelle. Cependant, il est possible de modifier l'expression génétique d'une souche bactérienne et par là même ses propriétés de surface. Ainsi Habimana et al. ont montré que l'expression d'une protéinase *PrtP* à la surface de la bactérie *L. lactis* la rendait hydrophobe [15]. Les propriétés d'adhésion de la cellule sont alors modifiées par rapport à celles de la souche sauvage comme par exemple une nette augmentation de l'adhésion de *L. lactis* hydrophobe à des matériaux hydrophobes tel le polystyrène [16]. Certaines mutations génétiques sont aussi capables de faire exprimer des pili à la surface des bactéries *L. lactis* [17], phénomène qui existe mais observé plus rarement chez les souches naturelles [18].
L. lactis a aussi la capacité d'exprimer des polysaccharides extra-cellulaires (EPS) qui vont lui permettre de renforcer son adhésion à des surfaces abiotiques et/ou contribuer à la formation de biofilms [19]. Plus spécifiquement pour *L. lactis*, la production

13. Bulard 2012 ; Habimana et al. 2007.
14. Boonaert et Rouxhet 2000.
15. Habimana et al. 2007.
16. Giaouris, Chapot-Chartier et Briandet 2009.
17. Meyrand et al. 2013 ; Oxaran et al. 2012.
18. Meyrand et al. 2013.
19. Comstock et Kasper 2006 ; Roberts 1996.

d'EPS contribue à la texture du produit fermenté [20], et la protège de la phagocytose [21].

Une autre propriété d'intérêt de *L. lactis* est qu'elle est productrice de bactériocines, des composés protéiques à activité bactéricide ou bactériostatique et reconnus comme inoffensifs pour l'homme [22].
Ces bactériocines ont été utilisées au sein d'emballages alimentaires pour remplacer les traitements chimiques classiques (voir la revue de Gálvez et al. [23]). Une autre approche initialement proposée par Iseppi et al. a consisté à piéger directement des bactéries productrices de bactériocines au sein des emballages afin de prolonger l'activité antimicrobienne au cours du temps [24]. Léonard et al. ont ainsi obtenu des résultats prometteurs en encapsulant des bactéries de *L. lactis*, dans une matrice alginate-caséinate [25] : l'activité anti-listérienne est plus importante qu'avec l'utilisation des seules bactériocines.

L. lactis se présente donc comme une souche d'étude d'intérêt parce qu'il s'agit d'une entité non pathogène, de composition de surface simplifiée (pas de pili ni de flagelle dans les conditions de culture standards) mais qui présente diverses applications industrielles. Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé 2 souches de *L. lactis* : il s'agit de deux variantes de *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, l'une hydrophile (souche sauvage, référence 505) et l'autre rendue hydrophobe par l'expression de la protéinase de surface (PrtP+, référence 507).

Listeria innocua

Quelques données historiques

Le genre *Listeria* tient son nom de Joseph Lister, pionnier de la chirurgie stérile. Il lui a été attribué en 1940, mais sa première description remonte aux années 1920. Ce genre contient aujourd'hui une dizaine d'espèces répartie en 2 branches, la plus importante regroupant *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) et les espèces qui lui sont génétiquement proches parmi lesquelles *Listeria innocua* (*L. innocua*). De toutes les espèces du genre, *L. monocytogenes* est la seule qui possède un caractère

20. Cerning 1990 ; Delcour et al. 1999.
21. Chapot-Chartier et al. 2010.
22. Cleveland et al. 2001.
23. Gálvez et al. 2007.
24. Iseppi et al. 2011.
25. Léonard et al. 2014.

pathogène pour l'homme, cause d'une infection alimentaire gravissime, la listériose.

Ses propriétés structurales et physico-chimiques

Les bactéries appartenant au genre *Listeria* sont en forme de bâtonnets, réguliers et non sporulants (figure 1.6). Elles sont à anaérobie facultative et mésophiles (croissance optimum vers 37 °C). Elles sont communément retrouvées dans les aliments crus, dans les lieux de conditionnement alimentaire et les sols [26].

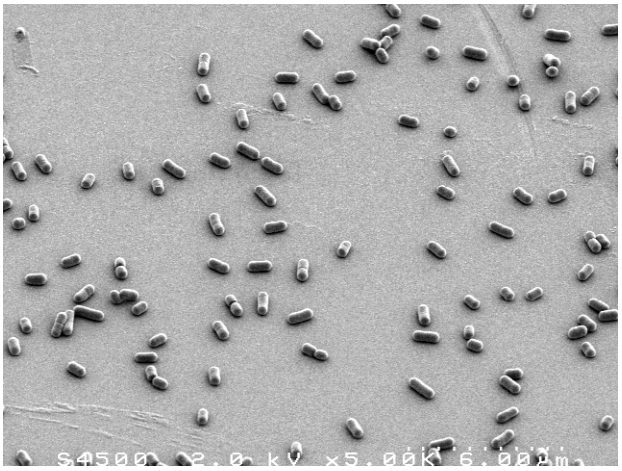


Figure 1.6. *– Imagerie par microscopie électronique de bactéries L. innocua.*

Les cellules de *Listeria* sont des bâtonnets courts et réguliers d'environ 0,5 µm de diamètre et 0,5 – 2 µm de longueur. Elles sont généralement isolées mais peuvent se regrouper en chaînettes courtes.

Les bactéries de *Listeria* possèdent une charge globale de surface négative [27]. Si Bouttier et al. n'ont pas noté d'effet de la température de croissance sur les propriétés physico-chimiques de *L. innocua*, au contraire d'autres travaux tendent à montrer que celle-ci influence la charge de surface et le caractère hydrophobe de certaines souches de *L. monocytogenes* [28].
Les bactéries *Listeria* ne produisent pas de flagelle lorsqu'elles croissent au-delà de

26. Larpent 2000.
27. Bouttier et al. 1995 ; Habimana, Meyrand et al. 2009.
28. Briandet, Meylheuc et al. 1999.

30 °C, mais en produisent à plus basse température (20 – 25 °C) [29].

L'espèce *L. innocua* est aussi très répandue et même plus souvent que *L. monocytogenes* [30]. Ses propriétés voisines de celles de *L. monocytogenes* associées à son innocuité en font un modèle d'étude idéal de l'espèce pathogène.

Dans ce travail nous avons étudié deux souches bactériennes de *L. innocua* : l'une, hydrophile, isolée de lait cru de vache (référence 2.12), l'autre, hydrophobe, isolée par l'ISHA [31] à partir d'un sandwich au poulet (référence 2.7).

1.3. L'adhésion bactérienne : aspects physico-chimiques

L'adhésion d'une bactérie sur une surface est un processus qui peut être décrit en 2 étapes successives :

— les bactéries s'approchent de la surface (étape de transport) puis établissent des interactions physico-chimiques avec le support récepteur [32] : c'est une étape réversible.

— Il s'ensuit un attachement irréversible par la consolidation de liaisons entre la bactérie et la surface.

Les structures polymériques de surface des bactéries (capsule, exo-polymères, pili,...) [33] peuvent consolider l'adhésion à chacune de ces étapes.

Différentes interactions s'établissent au cours de l'adhésion bactérienne

Il s'agit d'interactions non covalentes, qui s'établissent entre la bactérie, la surface d'adhésion et le milieu environnant [34] :

— les interactions de Lifshitz-van der Waals,

— les interactions électrostatiques,

29. Peel, Donachie et Shaw 1988 ; Seeliger et Jones 1986.
30. Larpent 2000.
31. Institut Scientifique d'Hygiène et d'Analyse, Champlan, FR. Site web : http ://www.isha-analyse.fr
32. Van Oss, Chaudhury et Good 1988.
33. An et Friedman 1998.
34. Israelachvili 2011 ; Van Oss 1996.

— les interactions acide-base de Lewis.

Forces de Lifshitz-van der Waals

Les forces de Lifshitz-van der Waals regroupent en fait 3 types d'interactions distinctes :

— les interactions dipôle permanent-dipôle permanent (forces de Keesom) : ce sont des interactions de nature électrostatiques entre 2 molécules polaires, le pôle négatif de l'une étant attiré par le pôle positif de l'autre.

— les interactions dipôle permanent-dipôle induit (forces de Debye) : une molécule polaire crée un champ électrique à proximité, susceptible de polariser une molécule non polaire qui s'en approche ; de manière analogue aux interactions de Keesom on observe alors une interaction attractive entre ces composés.

— les interactions dipôle induit-dipôle induit (forces de London), également appelées forces de dispersion. Ces interactions ont lieu entre des composés non polaires ; chaque composé possède un moment dipolaire permanent nul en moyenne mais pouvant fluctuer au cours du temps et donner à un instant donné un moment dipolaire non nul. Si une autre molécule se trouve à proximité, elle pourra alors obtenir un moment dipolaire induit par le moment dipolaire instantané de la première, et il apparaît alors une attraction entre les composés.

On peut définir l'énergie libre d'interaction due aux interactions de Lifshitz-van der Waals ΔG^{LW} entre 3 composés (par exemple bactérie, substrat, liquide environnant) selon l'équation de Dupré :

$$\Delta G^{LW}_{SBL} = \gamma^{LW}_{SB} - \gamma^{LW}_{SL} - \gamma^{LW}_{BL} \tag{1.1}$$

où S, B, et L se réfèrent respectivement au substrat, à la bactérie et au liquide.

Chacune des tensions interfaciales dues aux forces de Lifshitz-van der Waals entre deux composés peut s'écrire[35] :

$$\gamma^{LW}_{ij} = \gamma^{LW}_{i} + \gamma^{LW}_{j} - 2\sqrt{\gamma^{LW}_{i}\gamma^{LW}_{j}} \tag{1.2}$$

35. Good et Girifalco 1960.

où γ_i^{LW} correspond à la composante de la tension superficielle due aux interactions de Lifshitz-van der Waals du composé i.

Ainsi l'équation 1.1 peut aussi s'écrire :

$$\Delta G_{SBL}^{LW} = 2\left(\sqrt{\gamma_L^{LW}} - \sqrt{\gamma_S^{LW}}\right)\left(\sqrt{\gamma_B^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}}\right) \tag{1.3}$$

On remarque que ΔG_{SBL}^{LW} peut avoir une valeur positive (et donc donner lieu à une interaction répulsive) ou négative (interaction attractive).
En milieu aqueux, selon les propriétés respectives de la bactérie et du support, les interactions de Lifshitz-van der Waals pourront donc grandement influencer l'adhésion bactérienne.

Interactions électrostatiques

Dans un milieu polaire tel que l'eau, il se forme autour d'une particule une double couche électrique qui conditionnera la stabilité de la particule (figure 1.7).
L'une appelée couche de Stern est composée d'ions dont la charge contrebalance celle de la surface de la particule (dans l'exemple de la figure 1.7a, la particule est chargée négativement et la couche de Stern est composée d'ions positifs). Dans cette zone, la diffusion thermique n'est pas suffisante pour dominer les forces électrostatiques. Son épaisseur est de l'ordre de grandeur de la taille des ions adsorbés (quelques Å). Le potentiel d'interaction électrostatique Ψ est inversement proportionnel à la distance par rapport à la surface (figure 1.7b).

La seconde couche ou couche diffuse s'étend quant à elle jusqu'à la phase liquide. L'excès de contre-ions y diminue progressivement en s'éloignant de la surface de la particule, jusqu'à retrouver l'équilibre ionique de la phase aqueuse. Dans la couche diffuse, le potentiel d'interaction électrostatique Ψ décroît de façon exponentielle avec la distance (figure 1.7b).

Ainsi lorsque deux entités se rapprochent (deux particules ou une particule et une surface par exemple), c'est le recouvrement de la double couche électrique associée à chaque entité qui crée les interactions électrostatiques [36].
L'énergie libre correspondante peut être évaluée en utilisant comme modèles une

36. Rutter et Vincent 1980.

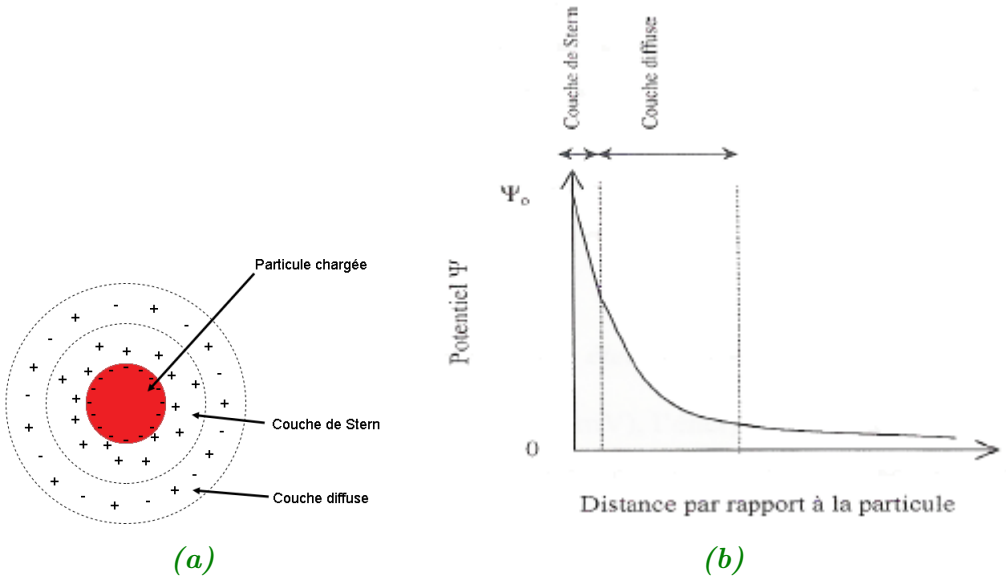


Figure 1.7. – *(a) Structure de la double couche électrique entourant une particule chargée. (b) Représentation de l'évolution du potentiel d'interaction électrostatique en fonction de la distance par rapport à la particule chargée (d'après Adamson, 1990).*

sphère de rayon R et une surface plane. Elle s'écrit sous la forme [37] :

$$\Delta G^{EL} = R\,\Psi_0^2\,\varepsilon \ln\left[1 + \exp\left(-\kappa l\right)\right] \tag{1.4}$$

où l est la distance entre la surface et le bord de la sphère, Ψ_0 est le potentiel de surface de la sphère, ε est la constante diélectrique du milieu ($\varepsilon = 80,2$ pour l'eau à la température de 20°C [38]), et κ est l'inverse de la longueur de Debye (soit l'épaisseur de la couche diffuse).

La longueur de Debye peut être déterminée par la relation [39] :

$$\frac{1}{\kappa} = \sqrt{\frac{\varepsilon k T}{4\pi e^2 \sum_i v_i^2 n_i}} \tag{1.5}$$

où k est la constante de Boltzmann, T la température absolue en degrés Kelvin, e la

37. Visser 1976.
38. Lide 2005.
39. Van Oss 1996.

Tableau 1.2. *– Valeurs de la longueur de Debye en fonction de la concentration en NaCl. D'après (*Israelachvili *2011).*

Concentration en NaCl	Longueur de Debye
0 (eau pure)	~ 1 µm
0,1 mM	30,4 nm
1 mM	9,6 nm
100 mM	0,96 nm

charge de l'électron ($e = 1,6 \times 10^{-19}$ C), et n_i le nombre d'ions (par cm^3) de valence v_i de chaque espèce i présente.
On peut donc remarquer que l'augmentation de la force ionique du milieu aura pour conséquence de diminuer la longueur de Debye $\frac{1}{\kappa}$, diminuant aussi l'épaisseur de la double couche électrique et la valeur de ΔG^{EL}. Dans les milieux de force ionique élevée, les interactions électrostatiques entre une bactérie et une surface chargées seront donc moindres qu'à faible force ionique. Le tableau 1.2 illustre quelques valeurs de la longueur de Debye selon la concentration en électrolyte dans le cas de solutions de NaCl.

L'épaisseur de la double couche électrique dépend non seulement des charges de surface des entités considérées, de la concentration en ions mais aussi de la valence des ions.

Interactions acido-basiques au sens de Lewis

Lorsque la bactérie et le substrat possèdent des doublets non-liants (donneurs d'électrons, base de Lewis) et/ou des lacunes électroniques (accepteurs d'électrons, acide de Lewis), il se produit une interaction entre un donneur d'électrons et un accepteur d'électrons, que van Oss a qualifié alors d'interaction acide-base de Lewis [40]. Ces interactions polaires, non-électrostatiques, et non-covalentes, comprennent notamment en milieu aqueux les interactions hydrophobes attractives et les répulsions hydrophiles.

De la même manière qu'avec les interactions de Lifshitz-van der Waals, on peut définir une énergie d'interaction due à ces forces acido-basiques de Lewis entre une

40. Van Oss 1996.

bactérie, un substrat et son milieu environnant selon l'équation de Dupré :

$$\Delta G_{SBL}^{AB} = \gamma_{SB}^{AB} - \gamma_{SL}^{AB} - \gamma_{BL}^{AB} \tag{1.6}$$

où γ_{ij}^{AB} représente la tension superficielle due aux interactions acides-bases de Lewis entre les composés i et j.
Les interactions acides-bases de Lewis étant asymétriques, la tension superficielle peut se décomposer en paramètres accepteur d'électrons γ^+ et donneur d'électron γ^-, ce qui donne pour une interaction entre 2 composés :

$$\gamma_{ij}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_i^+} - \sqrt{\gamma_j^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_i^-} - \sqrt{\gamma_j^-}\right) \tag{1.7}$$

Ainsi l'équation 1.6 peut aussi s'écrire :

$$\begin{aligned}\Delta G_{SBL}^{AB} = 2\Big(&\sqrt{\gamma_L^+}\left(\sqrt{\gamma_S^-} + \sqrt{\gamma_B^-} - \sqrt{\gamma_L^-}\right) + \sqrt{\gamma_L^-}\left(\sqrt{\gamma_S^+} + \sqrt{\gamma_B^+} - \sqrt{\gamma_L^+}\right) \\ &- \sqrt{\gamma_S^+\gamma_B^-} - \sqrt{\gamma_S^-\gamma_B^+}\Big)\end{aligned} \tag{1.8}$$

À nouveau on remarque qu'en fonction des valeurs de γ^+ et γ^- de chacun des 3 corps, ΔG_{SBL}^{AB} peut tout aussi bien prendre des valeurs négatives (attraction) ou positives (répulsion).

La théorie DLVO pour décrire l'adhésion bactérienne

Une des théories utilisées pour décrire l'adhésion bactérienne d'un point de vue physico-chimique, est la théorie DLVO (Dejarguin, Landau [41], Verwey et Overbeek [42]) développée pour décrire la stabilité des particules colloïdales dures (particules sphériques non déformables).
Dans sa version élémentaire, la théorie DLVO permet d'écrire l'énergie nette d'interaction ΔG entre deux entités (comme une bactérie et un substrat) comme la somme des énergies d'interaction dues au interactions de Lifshitz-van der Waals et aux interactions électrostatiques (elle ne tient pas compte des interactions acide-base de

41. Dejarguin et Landau 1941.
42. Verwey et Overbeek 1948.

Lewis)[43] :

$$\Delta G_{adh} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{EL} \tag{1.9}$$

La figure 1.8 illustre des courbes d'énergie d'interaction en fonction de la distance, entre une sphère et un plan semi-infini (modèle de l'interaction « bactérie-substrat ») dans le cas d'un milieu de force ionique faible (pour se rapprocher du cas de l'eau distillée) ou élevée (cas de l'eau physiologique).

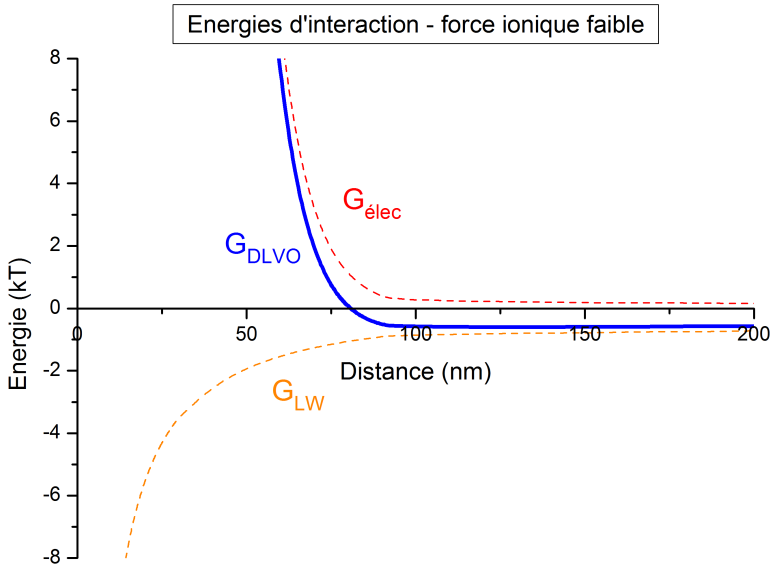
On observe que dans des milieux de force ionique élevée, les interactions électrostatiques ne s'exercent qu'à très courtes distances, et ce sont les interactions de Lifshitz-van der Waals qui prédominent et au contraire, dans un milieu de faible force ionique, les deux types d'interaction sont aussi importantes l'une que l'autre.
Ce modèle prédictif a été vérifié dans quelques cas. On citera les travaux de Bouttier et al. concernant l'adhésion de bactéries *L. innocua* sur une surface de verre[47] : ils ont obtenu 1 log d'écart entre l'adhésion dans un milieu PBS de force ionique I = 0,0015 mol/L ($\sim$ 3,3 log UFC/cm^2) et celle dans un milieu de force ionique I = 0,15 mol/L ($\sim$ 4,3 log UFC/cm^2).
Habimana et al. ont obtenu un résultat analogue concernant l'adhésion de *L. lactis* après 1 h d'adhésion sur du verre[48].

Mais bon nombre d'autres études ont montré que ce simple modèle ne suffisait pas pour supporter les résultats expérimentaux de l'interaction bactérie-substrat[49]. La théorie DLVO a donc été étendue afin de prendre en compte d'autres interactions illustrant l'effet du caractère hydrophobe/hydrophile : les interactions polaires (ou acides-bases de Lewis). L'énergie nette d'interaction s'écrit alors :

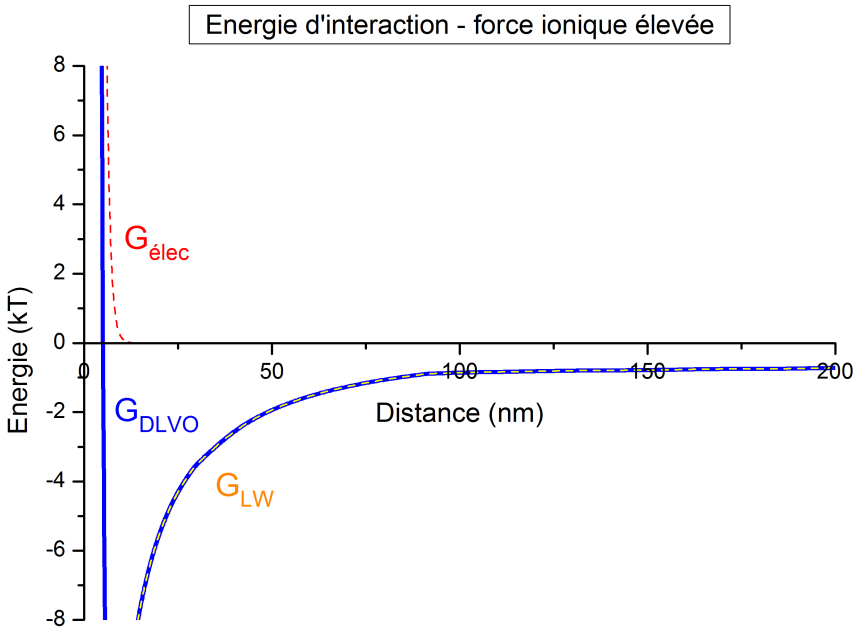
$$\Delta G_{adh} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{EL} + \Delta G^{AB} \tag{1.10}$$

où ΔG^{AB} est la composante due aux interactions acides-bases de Lewis.
L'introduction de la composante acide-base de Lewis a permis d'expliquer un certain

43. Van Oss 1996.
44. Bos, Mei et Busscher 1999 ; Rijnaarts et al. 1995.
45. Rijnaarts et al. 1995.
46. Israelachvili 2011.
47. Bouttier et al. 1995.
48. Habimana et al. 2007.
49. Hermansson 1999 ; Marshall et Cruickshank 1973.



(a) Milieu de force ionique faible ($I = 0{,}001\,M$).



(b) Milieu de force ionique élevée ($I = 0{,}1\,M$).

Figure 1.8. – *Énergies d'interaction électrostatique (G_{elec}), de Lifshitz-van der Waals (G_{LW}) et totale (G_{DLVO}).*
Paramètres utilisés : constante de Hamaker $A = 1{,}54\,kT$[44] *; verre : $\zeta = -78{,}8\,mV$ ($I = 0{,}001\,M$) ou $\zeta = -24{,}9\,mV$ ($I = 0{,}1\,M$)*[45] *; bactérie : diamètre $D \sim 1\,\mu m$, et $\zeta = -46{,}0\,mV$ (force ionique faible) ou $\zeta = -25{,}9\,mV$ (force ionique élevée) (moyenne des résultats sur l'ensemble des souches, cf. chapitre 3) ; longueurs de Debye $\kappa^{-1} = 9{,}6\,nm$ ($I = 0{,}001\,M$) ou $0{,}96\,nm$ ($I = 0{,}1\,M$)*[46]

nombre de résultats pourtant incohérents vis-à-vis de la théorie DLVO classique : ainsi, Jucker et al. ont observé que l'adhésion de *Stenotrophomonas maltophilia*, bactérie globalement chargée positivement, n'était pas favorisée sur le verre pourtant chargé négativement [50]. La différence a pu être expliquée par l'étude de l'interaction entre les polysaccharides produits par *S. maltophilia* dont l'interaction avec SiO_2 est prévue comme répulsive par la théorie DLVO étendue [51].

Il reste que ce modèle d'interaction bactérie-substrat reste souvent trop simpliste : une bactérie en suspension dans un milieu liquide ne peut pas être considérée comme une particule colloïdale dure en suspension dans un milieu homogène. En effet, son mouvement n'est pas uniquement gouverné par le mouvement brownien (une bactérie peut parfois "nager" jusqu'à un substrat grâce à ses appendices de surface ou être soumise à un flux de liquide orienté), la forme de la bactérie n'est pas que sphérique, sa surface n'est surement pas parfaitement homogène (en termes de structuration, rugosité, composition chimique, etc), son environnement naturel est généralement complexe avec la présence d'ions de différentes valences, de protéines, etc... De même, la théorie DLVO ne prend pas en compte les propriétés du substrat (rugosité, porosité...) ni des paramètres tels que la température, la dynamique d'interaction bactérie-substrat, etc...

L'approche expérimentale pour déterminer l'énergie d'interaction bactérie-substrat

L'énergie libre d'interaction bactérie-substrat (ΔG_{adh}) estimée expérimentalement repose sur l'équation suivante :

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{SB} - (\gamma_{SL} + \gamma_{BL}) \tag{1.11}$$

ne prenant en compte que les énergies libres interfaciales globales entre :

— d'une part la bactérie (B) et le substrat(S) donnée par γ_{SB},

— d'autre part la bactérie et le substrat chacun en interaction avec le liquide environnant (L), qui s'écrivent respectivement γ_{BL} et γ_{SL}.

La détermination de chacune de ces tensions superficielles est obtenue à partir de

50. Jucker, Harms et Zehnder 1996.
51. Jucker, Harms, Hug et al. 1997.

l'équation d'Young :

$$\gamma_{Lv} \cos\theta_1 = \gamma_{Sv} - \gamma_{SL} \tag{1.12}$$

$$\gamma_{Lv} \cos\theta_2 = \gamma_{Bv} - \gamma_{BL} \tag{1.13}$$

où v se réfère à la phase vapeur. Expérimentalement on mesure l'angle de contact entre un liquide et une surface (celle-ci pouvant être le substrat θ_1, ou une bactérie θ_2). La tension de vapeur du liquide γ_{Lv} est connue ; les énergies libres interfaciales γ_{Sv} (resp. γ_{Bv}) et γ_{SL} (resp. γ_{BL}) sont reliées entre elles par l'équation suivante (exemple où la surface est le substrat) :

$$\gamma_{SL} = \frac{\left(\sqrt{\gamma_{Sv}} - \sqrt{\gamma_{Lv}}\right)^2}{1 - 0,015\sqrt{\gamma_{Sv}\gamma_{Lv}}} \tag{1.14}$$

Absolom et al. ont ainsi montré une bonne corrélation entre les travaux de modélisation et les observations expérimentales pour plusieurs souches bactériennes [52] ; Uyen et al. ont montré que le calcul de l'énergie libre d'adhésion pouvait être considéré comme un paramètre prédictif fiable robuste [53]. D'autres travaux de la littérature vont également dans ce sens [54].

L'approche peut être complexifiée en faisant intervenir une séparation entre les composantes de Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}) et polaire (ou acide-base de Lewis, γ^{AB}) dans l'équation de Young-van Oss [55] :

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2\left(\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^{+}\gamma_L^{-}} + \sqrt{\gamma_S^{-}\gamma_L^{+}}\right) \tag{1.15}$$

Cette approche nécessite de déterminer les angles de contact avec au moins 3 liquides dont on connait les composantes γ_L^{LW}, γ_L^{+} et γ_L^{-} (tels que l'eau, le diiodométhane et le formamide). Un système de 3 équations à 3 inconnues permet ensuite de trouver les paramètres pour la surface (γ_S^{LW}, γ_S^{+} et γ_S^{-}).

Cette technique des angles de contact fonctionnera parfaitement pour obtenir les énergies interfaciales de substrats et de liquides, mais elle pose des problèmes expé-

52. Absolom et al. 1983.
53. Uyen et al. 1985.
54. Fletcher et Pringle 1985 ; Pratt-Terpstra, Weerkamp et Busscher 1987.
55. Van Oss, Chaudhury et Good 1988.

rimentaux quant à la détermination de l'énergie libre de surface de bactéries : les cellules peuvent interagir avec les gouttelettes de liquide, ou encore sécher ce qui modifiera leurs propriétés de surface [56].

On notera enfin que cette approche expérimentale ne fait pas intervenir les interactions électrostatiques.

1.4. Les biofilms bactériens

Qu'est-ce qu'un biofilm ?

La notion de biofilm a été pour la première fois évoquée par Henrici et Zobbell dans les années 1930 et 1940 [57]. C'est Costerton qui a par la suite montré leur caractère ubiquitaire [58], puis proposé comme définition du biofilm bactérien : un ensemble de populations bactériennes adhérant les unes aux autres et/ou aux surfaces et interfaces, incluant les floculats et agrégats microbiens ainsi que les populations adhérentes à l'intérieur des pores de médias poreux [59].
Nous ne considérerons ici que les bactéries initialement en interaction avec un substrat. Suite à la première étape d'adhésion que nous venons de décrire, que se passe-t-il ensuite ? La figure 1.9 illustre les différentes étapes correspondant au développement d'un biofilm.

Les bactéries adhérentes commencent d'abord par se multiplier soit directement sur la surface soit par dépôt des cellules planctoniques (étape 2). Elles pourront ensuite "consolider" leur position sur le support par le biais d'organites extra-cellulaires (adhésion des flagelles ou des pilis) et/ou, si les cellules possèdent l'information génétique et le substrat nutritif nécessaire, par la synthèse ou l'excrétion de polymères extra-cellulaires (polysaccharides, protéines, ADN, lipides...) (étapes 3-4). Leur coalescence pourra aboutir à la formation d'une matrice mucoïde organique qui, associée aux bactéries, constitue le biofilm (étape 5). Au sein de cette biostructure il existe aussi un véritable réseau de canaux d'eau permettant d'alimenter les bactéries en nutriments et en oxygène. Cependant, depuis la surface jusqu'à la base du biofilm,

56. Busscher et al. 1984.
57. Henrici 1933 ; Zobell 1943.
58. Costerton, Geesey et Cheng 1978.
59. Costerton, Lewandowski et al. 1995.

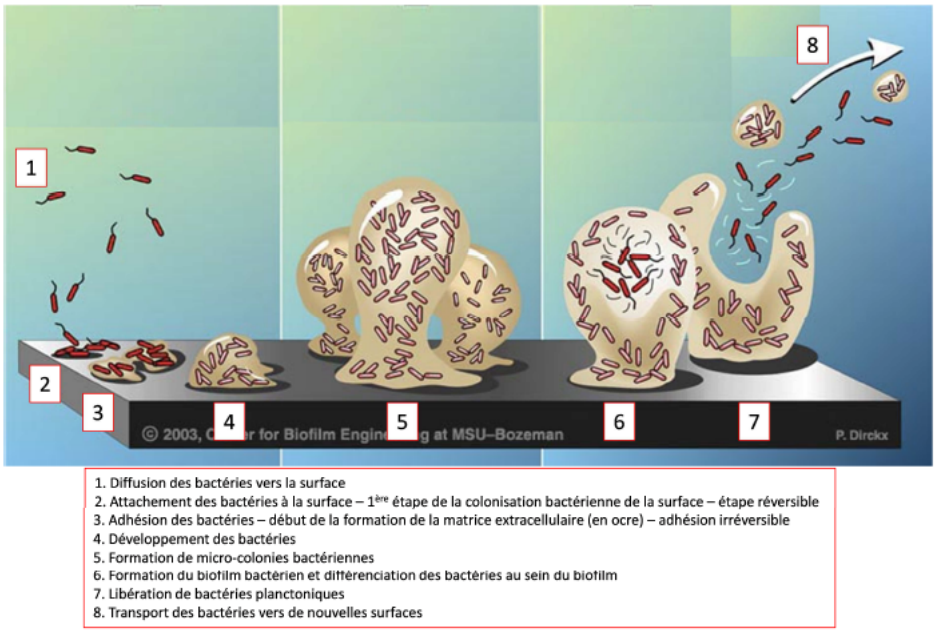


Figure 1.9. *– Développement d'un biofilm bactérien. D'après (*Bulard *2012), adaptée de (*MBW *2004).*

il peut apparaître une hétérogénéité chimique et nutritionnelle qui peut faire évoluer les bactéries vers des phénotypes de tolérance à ces conditions de stress et/ou une modification de leurs propriétés physiologiques.

Le biofilm comme mode de vie des bactéries leur confère plusieurs avantages, dont on citera principalement :

— une action restreinte des traitements antibiotiques et des désinfectants chimiques,
— une protection contre les traitements mécaniques, les conditions d'environnements hostiles auxquels elles ne survivraient pas à l'état planctonique (hautes températures, pH, déshydratation...),
— un réservoir de bactéries viables d'où elles peuvent se détacher afin de coloniser un nouvel environnement (étape 8).

Ainsi la vie communautaire des bactéries au sein des biofilms va avoir des impacts bénéfiques ou néfastes sur notre environnement, notre santé, le domaine de l'industrie alimentaire, etc... On ne peut que recommander la lecture du carnet de sciences

« Biofilms, quand les microbes s'organisent » [60] pour avoir une bonne vue d'ensemble des propriétés des biofilms. Si l'on se réfère aux seules souches bactériennes de notre étude, des multicouches de *L. lactis* pourraient être constitutives de bioemballages pour inhiber le développement de bactéries alimentaires pathogènes alors que des biofilms de *L. monocytogenes* vont générer des infections alimentaires.

Disséquer les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des biofilms constitue donc un défi scientifique important dans l'objectif de mieux contrôler la formation des biofilms « positifs », de prévenir la formation des biofilms « négatifs » ou lutter contre ceux qui sont installés.

60. Briandet, Fechner et al. 2012.

Deuxième partie .

Résultats et discussion

2. Synthèse et caractérisation des propriétés physico-chimiques de nanoparticules fluorescentes organiques chargées

Comme il a été décrit dans l'introduction, l'objectif de ce travail de thèse est de s'intéresser au rôle de l'hétérogénéité physico-chimique spatiale dans l'adhésion des bactéries aux surfaces abiotiques. Notre approche a consisté à utiliser des nanoparticules hydrophiles chargées positivement et négativement (rayon hydrodynamique $\sim 50\,\mathrm{nm}$). Ces nano-objets ont été obtenus dans le cadre de collaborations avec le laboratoire de Synthèse de Molécules et Macromolécules Bioactives (SM_2B) de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO) et le laboratoire de Photophysique et Photochimie Supra- et Macromoléculaires (PPSM) de l'École Normale Supérieure de Cachan. Dans ce dernier cas, les nanoparticules nous ont été gracieusement fournies : nous rappellerons par la suite l'essentiel de leurs propriétés publiées par ailleurs [1]. Nous ne décrirons ici en détail que la synthèse des nanoparticules organiques cationiques fluorescentes (NP+) qui s'intègre dans ce travail de thèse.

2.1. Principe de la polymérisation radicalaire en émulsion

La polymérisation en émulsion est une technique de choix pour obtenir un polymère en milieu aqueux dispersé (aussi appelé latex) à partir d'un ou plusieurs monomères non solubles dans l'eau. Elle permet d'obtenir des suspensions aqueuses de particules sphériques, monodisperses, stabilisées ou non par un tensioactif.

La plupart du temps la polymérisation en émulsion se fait à partir de monomères vinyliques : styrène, diènes, acétate de vinyle ou encore esters acryliques. Elle est amorcée par des composés hydrosolubles qui se décomposent thermiquement ou par des réactions d'oxydo-réduction qui génèreront des radicaux : on utilisera soit des peroxydes (peroxodisulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), mélange peroxyde d'hydrogène

1. Grazon et al. 2011.

(H_2O_2)/ion Fe(II) ou mélange métabisulfite de sodium ($Na_2S_2O_5$)/ion Fe(III)), soit des composés azoïques (4-4'-azobis-(4-acide cyanopentanoïque) (ACPA), dihydrochlorure de 2,2'-azobis(2-méthylpropionamidine) (V-50)).
Pour obtenir une émulsion stabilisée, il est nécessaire d'utiliser un tensioactif : celui-ci pourra être anionique (carboxylate, sulfate), cationique (ammonium), zwittérionique (sulfobétaïne) ou neutre (poly(oxyde d'éthylène)). Le tensioactif pourra éventuellement aussi être un réactif de la polymérisation (monomère ou amorceur).
Dans certains cas, on ajoutera à la réaction de polymérisation d'autres composants tels que des agents de réticulation ou des monomères hydrosolubles afin de moduler les propriétés du polymère obtenu.

La mise en œuvre de la polymérisation radicalaire en émulsion peut se faire selon 3 procédés :

— le procédé dit *batch* dans lequel tous les réactifs sont introduits dès le départ ;
— le procédé *semi-batch* dans lequel une partie des réactifs est présente au départ, les autres étant ajoutés par la suite ;
— la polymérisation ensemencée qui consiste à amorcer une nouvelle polymérisation à partir d'un latex déjà formé.

D'un point de vue cinétique, on peut diviser la polymérisation radicalaire en émulsion en 3 grandes étapes (figure 2.1) :

— étape I : l'étape de nucléation. La polymérisation est amorcée en phase aqueuse et on observe la formation de particules dont le nombre augmente jusqu'à disparition des micelles de tensioactif.
— étape II : le nombre de particules reste constant mais leur taille augmente. Leur croissance se fait par diffusion des gouttelettes de monomères à travers la phase aqueuse, puis par réaction de propagation.
— étape III : les gouttelettes de monomères ont disparu, la réaction se termine à l'intérieur des particules.

L'étape I détermine le nombre de nanoparticules N_{NP} qui dépend notamment de la nature des monomères, du tensioactif, de l'amorceur, de la température et du type de procédé.
Dans l'étape II, la croissance des particules est assurée par réaction de propagation du monomère. Les monomères sont apportés à l'intérieur des gouttelettes par diffusion à travers la phase aqueuse. Dans cette étape, comme la concentration en monomère à l'intérieur des gouttelettes est quasi-constante, la vitesse de polymérisation peut

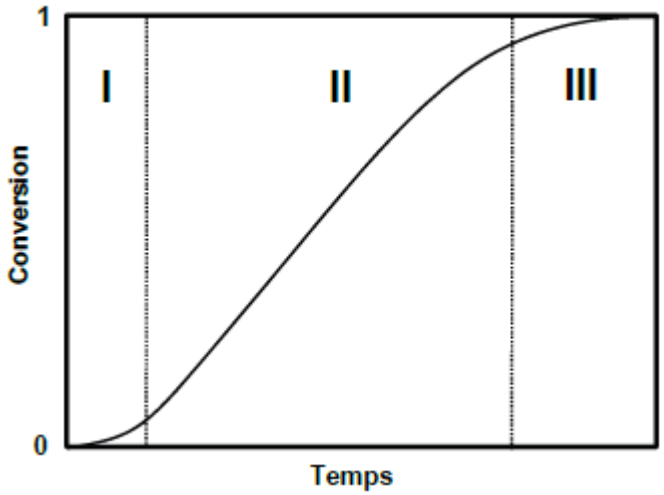


Figure 2.1. *– Cinétique d'une polymérisation en émulsion. Étape I : nucléation ; étape II : état stationnaire ; étape III : fin de la polymérisation. D'après (*Delaittre *2008)*

s'écrire[2] :

$$V_p = -\frac{d[M]_p}{dt} = k_p \cdot [M]_p \cdot [R^{\cdot}] \tag{2.1}$$

où V_p est la vitesse de polymérisation (en mol·L^{-1}·s^{-1}), $[M]_p$ la concentration en monomère dans les particules (en mol/L), k_p la constante de vitesse de propagation (en L·mol^{-1}·s^{-1}) et $[R^{\cdot}]$ la concentration en radicaux (en mol/L).
Les molécules de tensioactif n'ayant pas pris part à la réaction participent à la stabilisation des particules formées.
Dans ce type de polymérisation, le nombre final de particules est en général de l'ordre de 10^{13} – 10^{15} NP/mL.
La polymérisation radicalaire en émulsion est donc une méthode simple, peu coûteuse permettant d'obtenir des particules de taille contrôlée et uniforme en autorisant une flexibilité dans les propriétés finales de celles-ci par l'ajout ou la modification de composants à la réaction : on pourra changer les propriétés électrostatiques par modification du type d'agent tensioactif, ou modifier les propriétés du polymère en incluant un agent de réticulation, ou encore les rendre luminescentes par ajout d'un monomère aux propriétés photophysiques intéressantes.

2. Delaittre 2008.

2.2. Synthèse des nanoparticules cationiques et optimisation de la fraction molaire en comonomère ammonium

Avant le début de ce travail de thèse, le SM_2B avait déjà mis au point la synthèse par polymérisation radicalaire en émulsion de nanoparticules chargées positivement (NP+) [3]. Si l'on se réfère à la description de ce procédé (paragraphe 2.1), il s'agit de polymériser le styrène en présence du comonomère hydrophile, l'iodure de (triméthylamino)méthacrylate, chargé positivement grâce à un groupe ammonium quaternaire qui joue également le rôle de tensioactif. Dans la suite de ce travail on appellera ce composé le « comonomère ammonium » dans un souci de simplification. Les différents composés entrant dans le processus de synthèse en batch sont illustrés figure 2.2 et le mode opératoire détaillé dans l'annexe 2.A en fin de chapitre. Le caractère fluorescent des nanoparticules sera donné par l'incorporation au cours de la synthèse d'un fluorophore, le méthacrylate de BODIPY (figure 2.2).

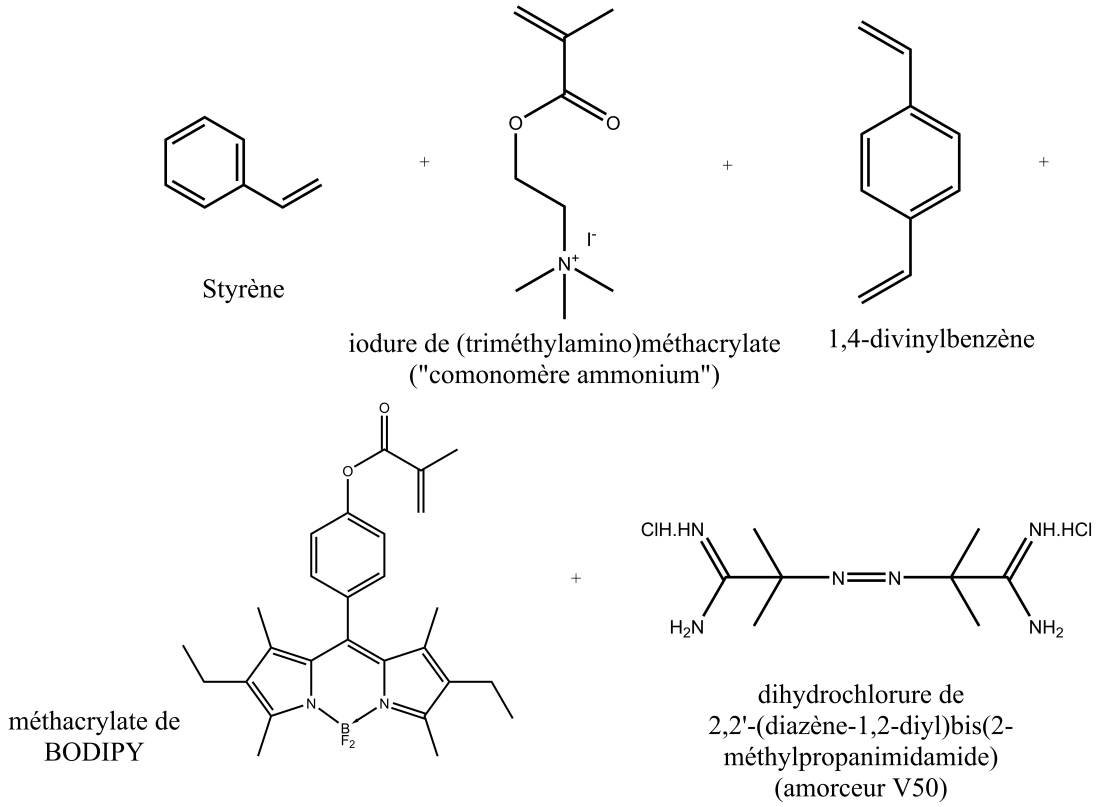


Figure 2.2. *– Structures chimiques des réactifs utilisés pour la synthèse des NP+*

3. Lepoittevin et al. 2006.

La fraction molaire du comonomère ammonium par rapport au styrène permet de définir la taille des nanoparticules que l'on obtient : plus on ajoute de comonomère, plus on obtient des nanoparticules de petite taille[4].
Dans ce travail, les fractions molaires 0 % ; 0,5 % ; 1,5 % et 2 % ont été testées avec pour objectif d'obtenir des nanoparticules de rayon hydrodynamique $\sim$ 50 nm. La figure 2.3 illustre les résultats obtenus. L'évolution de la taille des particules au cours de la synthèse est suivie par des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) (le principe de la méthode est détaillé dans l'annexe 2.D).

On ajoute également à la synthèse un agent réticulant, le divinylbenzène, ce qui a pour effet de rigidifier le polymère obtenu, et le rendre moins sensible à la température.

La formation de NP+, dont le rayon hydrodynamique ne change plus au-delà de 3 à 4 heures d'expérience est observée pour des fractions de comonomère inférieures à 1,5 %. La réaction est toutefois poursuivie pendant 24 h afin d'optimiser la conversion en styrène (voir tableau 2.1). Pour une fraction en comonomère de 2 %, on n'observe pas de formation de nanoparticules. Ceci peut s'expliquer par une hydrophilie trop importante du polymère du fait de la grande quantité de comonomère ammonium ajoutée : on assiste alors à une solubilisation dans l'eau du copolymère final.

Lorsque la synthèse a été faite sans ajout de comonomère ammonium, on observe la formation de nanoparticules au cours des premières heures de la synthèse (figure 2.3). Cependant à t = 24 h, les mesures de DLS indiquent une distribution des tailles de nanoparticules associée à la formation d'agrégats dans la solution. La présence du tensioactif dans la réaction permet en effet aux nanoparticules d'être monodisperses ; en son absence, les nanoparticules restent isolées quand l'amorceur (qui est aussi un tensioactif) est présent (début de la réaction) mais une fois ce dernier consommé, plus aucun composé ne peut jouer le rôle de tensioactif dans le milieu, les nanoparticules perdent alors leur stabilité et s'agrègent. On pourrait dans ce cas stopper la réaction au bout de quelques heures mais comme mentionné précédemment et rapporté dans le tableau 2.1, le rendement de conversion en styrène est alors trop faible.

Si l'on poursuit l'analyse des résultats de la figure 2.3, on observe, comme attendu,

4. Lepoittevin et al. 2006.

que la taille des nanoparticules diminue lorsque la fraction molaire du comonomère ammonium augmente entre 0 % et 1,5 %.

La concentration en NP+ (N_{NP}) en fin de synthèse a été déterminée en conjuguant les données de thermogravimétrie (taux de solide τ_{solide}, conversion en styrène) et de DLS (rayon hydrodynamique R_h) récapitulées dans le tableau 2.1 (calculs détaillés dans les annexes 2.B et 2.D). Pour la fraction molaire en comonomère ammonium retenue (1,5 %), on obtient une solution stock de nanoparticules de concentration $\sim 10^{13}$ NP/mL, en bon accord avec ce qui est attendu pour une synthèse en émulsion.

La méthode la plus précise pour déterminer le taux d'incorporation du BODIPY dans chaque NP+ aurait été une méthode spectrophotométrique, mais cela n'a pas été possible : en effet la lumière étant très largement diffusée par une telle suspension, il aurait fallu disposer d'un spectrophotomètre équipé d'une sphère d'intégration pour collecter toute la lumière diffusée. Nous avons ainsi estimé la concentration maximale de BODIPY au sein d'une nanoparticule en considérant que le fluorophore avait été totalement incorporé. Cette hypothèse n'est pas déraisonnable si l'on considère qu'aucune fluorescence n'a été détectée dans chacune des eaux de dialyse des nanoparticules. Cependant on ne peut pas exclure un faible taux d'adsorption du fluorophore sur les surfaces de verre du matériel de synthèse (réacteur en particulier). Sachant que pour notre synthèse, le BODIPY a été introduit dans le réacteur à une concentration de 1 mg/mL, la concentration maximale du fluorophore par nanoparticule est de 10^{-13} mg/NP, soit $\sim 2 \times 10^{-18}$ mol/NP ou encore $\sim 10^6$ molécules de BODIPY par nanoparticule.

Par ailleurs les propriétés spectroscopiques du BODIPY incorporé aux nanoparticules ont été vérifiées. La figure 2.4 illustre les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence. Les maxima d'excitation et d'émission sont centrés respectivement à 529 nm et 540 nm en bon accord avec les données fournies par le LPPSM qui a synthétisé le fluorophore [5]. Le rendement quantique de fluorescence des NP+ n'a pas pu être déterminé mais du fait que l'intensité de fluorescence émise est équivalente à celle des nanoparticules négatives (NP-) pour une même concentration en NPs, il est raisonnable d'estimer que le rendement de fluorescence du BODIPY incorporé au sein des NP+ est du même ordre de grandeur que celui du BODIPY dans les NP- ($\Phi_f = 0{,}20$).

5. Grazon et al. 2011.

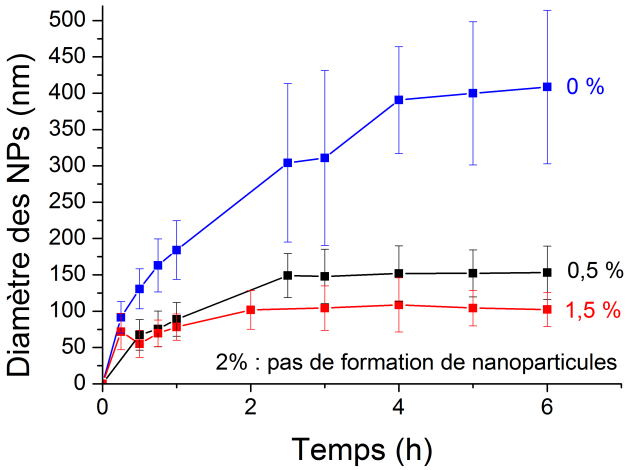


Figure 2.3. – *Influence de la fraction de comonomère ammonium sur la taille des nanoparticules. La courbe rouge correspond à la fraction molaire (1,5 %) du comonomère ammonium retenue pour la synthèse des nanoparticules utilisées dans ce travail. La taille des NP+ a été mesurée par DLS. L'origine des temps correspond au début de la polymérisation (donné par le moment où l'on ajoute l'amorceur).*

Tableau 2.1. – *Paramètres quantitatifs de la synthèse des nanoparticules pour chaque fraction molaire en comonomère ammonium donnant lieu à la formation de nanoparticules stables (mesures réalisées à $t = 24\,\mathrm{h}$). Le taux de solide τ_{solide} est celui obtenu par thermogravimétrie. On en déduit le taux de conversion en styrène en le comparant au taux de solide théorique attendu. Le rayon hydrodynamique (R_h) et l'indice de polydispersité (PdI) sont obtenus par DLS. Les résultats conjoints de thermogravimétrie et de DLS permettent d'obtenir la concentration en nanoparticules dans la solution, N_{NP}, et d'en déduire la concentration en fluorophore dans une nanoparticule, C_B. Toutes ces méthodes sont décrites dans les annexes 2.B et 2.D.*

Fraction comonomère (%mol)	τ_{solide} (%)	Conv. styrène (%)	R_h (nm)	PdI	N_{NP} (NP/mL)	C_B (mol/NP)
0	N/D	N/D	$204,3 \pm 2,3^{(*)}$	$0{,}02^{(*)}$	$(3 \pm 0,1) \times 10^{11\,(*)}$	$10^{-16\,(*)}$
0,5	5,47	64	$86,8 \pm 2,0$	0,19	$(1 \pm 0,07) \times 10^{12}$	$2{\times}10^{-17}$
1,5	6,74	77	$52,0 \pm 0,5$	0,05	$(1 \pm 0,03) \times 10^{13}$	$2{\times}10^{-18}$

$^{(*)}$ Résultat obtenu après 6 h de synthèse. La concentration particulaire N_{NP} a été calculée sur cet échantillon en supposant une conversion en styrène de 100 %.

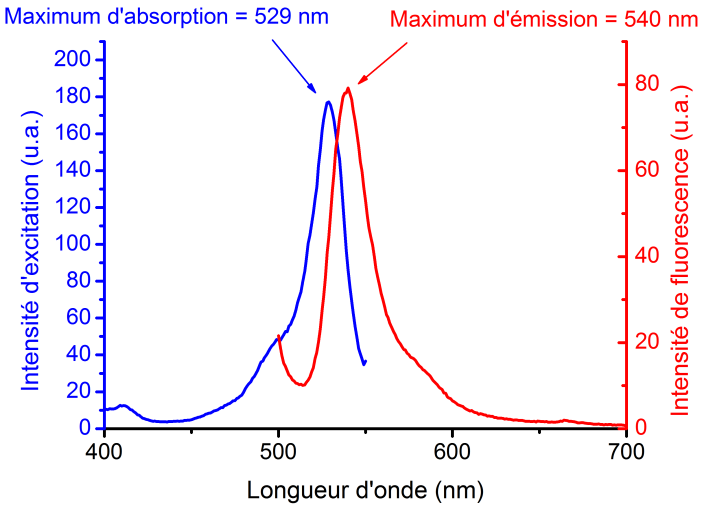


Figure 2.4. *– Spectres d'excitation (bleu) et d'émission de fluorescence (rouge) des NPs fluorescentes. Le spectre d'excitation a été enregistré entre 400 – 550 nm pour une solution de NP+ diluée 2000 fois dans l'eau distillée, à une longueur d'onde d'émission $\lambda_{ém}$ =560 nm, avec une largeur de fente en excitation et en émission de 5 nm. Le trajet optique dans la solution est de 10 mm. Le spectre d'émission de fluorescence a été mesuré pour la même solution à une longueur d'onde d'excitation λ_{exc} =488 nm.*

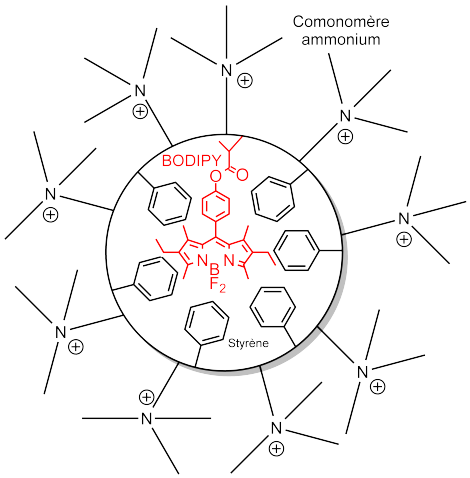


Figure 2.5. *– Schéma de la structure des NP+*

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, les NP+ retenues pour la suite de ce travail sont celles obtenues avec une fraction molaire en comonomère ammonium

de 1,5 % qui mène au meilleur rendement et à une bonne reproductibilité de la synthèse : ces NPs sont stables, ont le rayon hydrodynamique recherché $\sim$ 50 nm et une concentration intraparticule en BODIPY satisfaisante. Leur structure est schématisée figure 2.5 : la nanoparticule renferme en son cœur les groupements hydrophobes (styrène, méthacrylate de BODIPY) du copolymère, tandis que ses chaînes chargées positivement sont orientées vers le solvant. De ce fait, les NP+ ont une hydrophilie de surface marquée. Les groupements ammonium quaternaire n'ayant pas de lacunes électroniques ni de doublets non liants, les NP+ n'ont pas de caractère acide-base de Lewis marqué.

2.3. Propriétés des nanoparticules anioniques

La synthèse des nanoparticules anioniques (NP-) a été réalisée par le laboratoire PPSM de l'ENS Cachan dans le cadre de la thèse de Chloé Grazon et est détaillée dans les travaux de Grazon et al. [6]. Leur structure est schématisée figure 2.6. Il s'agit aussi d'une polymérisation radicalaire en émulsion mais différente de celle utilisée pour la synthèse des NP+. La polymérisation du styrène est réalisée en présence de méthacrylate de BODIPY et d'un copolymère à blocs composés de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) et de poly(acide acrylique) (PAA) assurant à la fois la stabilité de l'émulsion et le rôle d'agent de transfert au cours de la réaction.

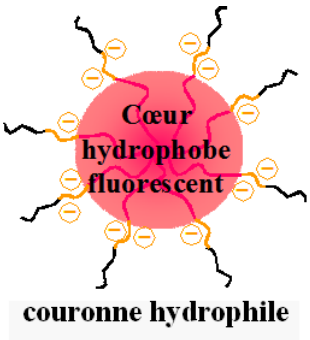


Figure 2.6. *– Schéma de la structure des NP-. D'après (Grazon et al. 2011)*

La concentration de la solution stock fournie par l'ENS Cachan a été estimée à $\sim 10^{13}$ NP/mL. La concentration de BODIPY par nanoparticule a été estimée à

6. Grazon et al. 2011.

$\sim 10^{-18}$ mol de BODIPY/NP ou encore $\sim 10^6$ molécules de BODIPY/NP. On possède donc des NP- intégrant la même quantité de fluorophores que les NP+. Le rendement quantique de fluorescence Φ_f des NP- a pu être déterminé et vaut 0,20.

Tout comme les NP+, les NP- possèdent un caractère de surface hydrophile ; des données de la littérature montrent que les groupements carboxylates de la surface des NP- leur confèrent aussi des propriétés acide-base de Lewis marquées (accepteur et donneur de doublets d'électron) [7].

2.4. Caractérisation structurale et physico-chimique des nanoparticules

2.4.1. Contrôle de la charge des nanoparticules

Nous avons caractérisé la charge des nanoparticules en fonction du pH par zêtamétrie (le principe de la méthode est décrit dans l'annexe 2.H). Le pH de la solution de nanoparticules dans l'eau physiologique diluée au 1/100 (pH $\sim$ 5,5) a été progressivement abaissé jusqu'à une valeur de 2 par ajouts successifs d'acide nitrique HNO_3. L'utilisation d'eau physiologique diluée au 1/100 permet de maintenir la force ionique du milieu constante après ajout de HNO_3. Mais il faudra noter que du fait de « l'écrantage » partiel des charges de surface des nanoparticules par les ions du milieu, les valeurs de mobilité électrophorétique (M.E.) ainsi mesurées sont légèrement abaissées par rapport à celles obtenues dans l'eau distillée (cf. chapitre 3, section 3.3).
Les résultats obtenus pour une solution de $\sim 10^{10}$ NP/mL montrent (figure 2.7) que la M.E. des NP+ reste positive dans la gamme de pH testée (2 – 5,5), ce qui est en accord avec l'absence de caractère acido-basique d'un groupe ammonium quaternaire. La M.E. des NP- est nulle à pH < 3 : les NP- sont donc neutres dans cette gamme de pH. Ceci est en bon accord avec le pKa (~ 4) de l'acide carboxylique du poly(acide acrylique) présent à la surface des NP-, l'acide étant sous sa forme protonée aux pH < 3. Pour les pH > 3, la ME est négative : les NP- ont donc une charge négative, conforme à la présence d'ions carboxylates.

Au pH correspondant à celui non ajusté de l'eau distillée (pH $\sim$ 5,5) qui sera la

7. Briandet, Herry et Bellon-Fontaine 2001.

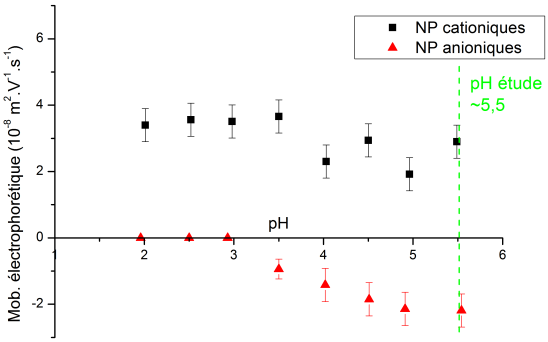


Figure 2.7. *– Courbe de M.E. des nanoparticules en fonction du pH, obtenue dans l'eau physiologique diluée au 1/100 pour une concentration de $\sim 10^{10}$ NP/mL. L'enregistrement a été obtenu pour des solutions soumises à une différence de potentiel $\Delta V = 50$ V.*

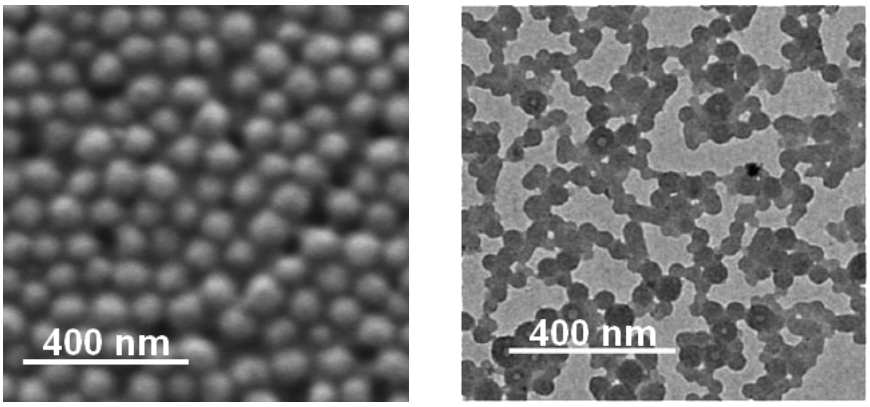
condition utilisée pour le reste de nos expériences, on relève une valeur de M.E. de $(+3{,}0 \pm 0{,}5) \times 10^{-8}\,\mathrm{m^2{\cdot}V^{-1}{\cdot}s^{-1}}$ (soit un potentiel zêta $\zeta = 43 \pm 7\,\mathrm{mV}$) pour les NP+ et de $(-2{,}2 \pm 0{,}5) \times 10^{-8}\,\mathrm{m^2{\cdot}V^{-1}{\cdot}s^{-1}}$ ($\zeta = -32 \pm 7\,\mathrm{mV}$) pour les NP- en bon accord avec des données fournies par ailleurs dans la littérature pour ce type de nanoparticules [8].

2.4.2. Structure, taille, monodispersité des nanoparticules

Nous avons déterminé la taille des nanoparticules par 3 méthodes différentes : la microscopie électronique (à balayage (MEB) pour les NP+ et à transmission (MET) pour les NP-), la DLS et la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS pour *Fluorescence Correlation Spectroscopy*). Les principes de ces méthodes et les systèmes expérimentaux utilisés sont décrits dans les annexes 2.C,2.D et 2.E respectivement.

La figure 2.8a est représentative des images obtenues par MEB d'une population de NP+. On observe des nanosphères bien individualisées avec un rayon moyen $R = 38 \pm 6\,\mathrm{nm}$ mesuré sur un échantillon de 30 nanoparticules. Rappelons que la méthode requiert une déshydratation des échantillons et que le rayon des nanoparticules ainsi calculé ne tient pas compte de la couche de solvatation.

8. Briandet, Herry et Bellon-Fontaine 2001 ; Guiot et al. 2002.



(a) *(b)*

Figure 2.8. *– Structure des NP+ observée par MEB (a) et des NP- observée par MET (b).*

Les NP- utilisées dans le cadre de ce travail ont été caractérisées par MET en milieu déshydraté (figure 2.8b) [9]. Elles sont également sphériques avec un rayon $R = 20 \pm 4\,\text{nm}$.

Le rayon hydrodynamique de ces mêmes nanoparticules a été déterminé dans un premier temps par DLS (figure 2.9). Les résultats montrent une distribution unimodale de NP+ et NP-. Les rayons hydrodynamiques moyens R_h valent $60 \pm 15\,\text{nm}$ et $30 \pm 6\,\text{nm}$ pour les NP+ et NP- respectivement. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues par microscopie électronique, en bon accord avec une population de particules en solution monomériques entourées de leur sphère d'hydratation.

Pour compléter les mesures de DLS, nous avons effectué des mesures de FCS. La figure 2.10 illustre les courbes obtenues pour chacun des deux types de nanoparticules (cationiques et anioniques).

La courbe d'autocorrélation de fluorescence obtenue avec des NP+ (mesure réalisée juste après synthèse) a pu être ajustée avec un modèle analytique de diffusion brownienne (équation 2.8, annexe 2.E) à une seule composante. Le meilleur ajustement de cette courbe a été obtenu pour une population diffusant avec un temps $\tau_d = 2{,}4 \pm 0{,}2\,\text{ms}$. D'après l'équation de Stokes-Einstein (équation 2.6, annexe 2.D) ce temps correspond à une population de rayon hydrodynamique $R_h = 57 \pm 5\,\text{nm}$,

9. Grazon et al. 2011.

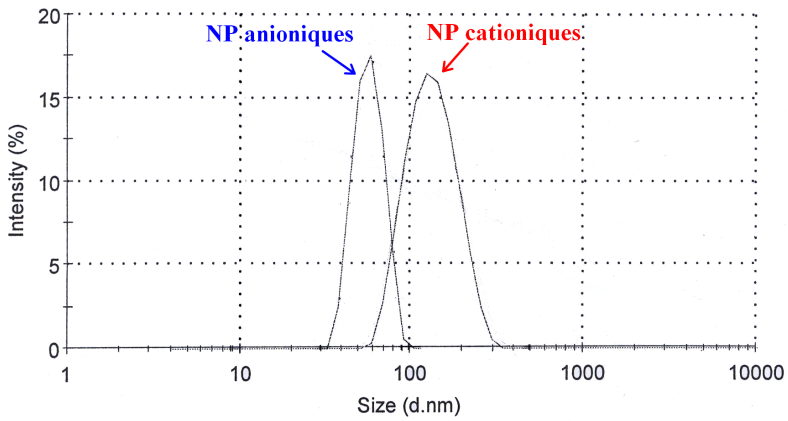


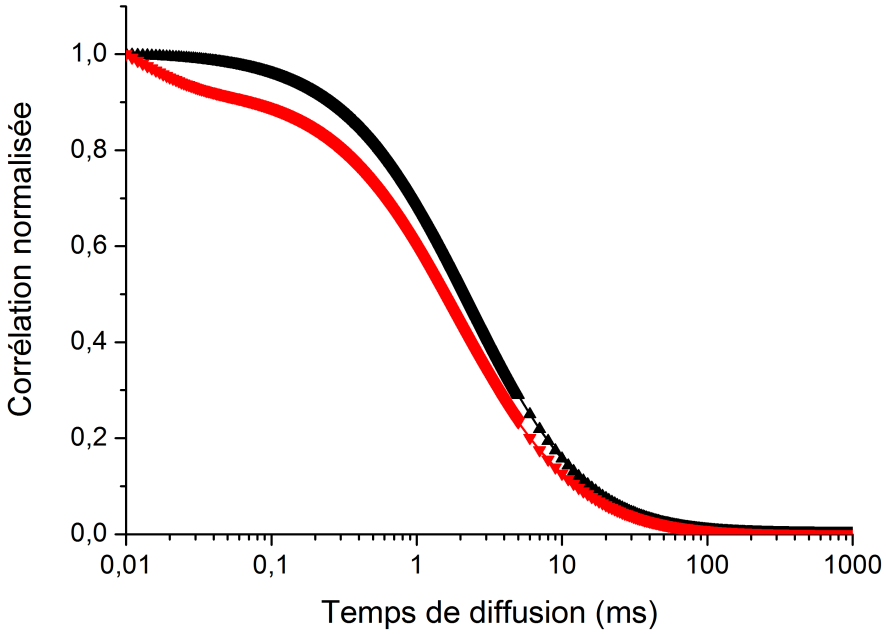
Figure 2.9. *– Distribution en taille des NP+ et NP- mesurée en intensité de la lumière diffusée. Les courbes ont été obtenues sur une solution diluée de nanoparticules (∼ 10^{10} NP/mL) à l'aide d'un laser He-Ne de longueur d'onde $\lambda = 633\,\text{nm}$ et résultent de la moyenne de 2 mesures comportant chacune 10 accumulations du signal pendant 10 secondes.*

en bon accord avec les mesures obtenues en DLS.
Ces nanoparticules ayant été utilisées durant plusieurs mois après leur synthèse, nous avons contrôlé la possible formation d'agrégats au cours du temps.

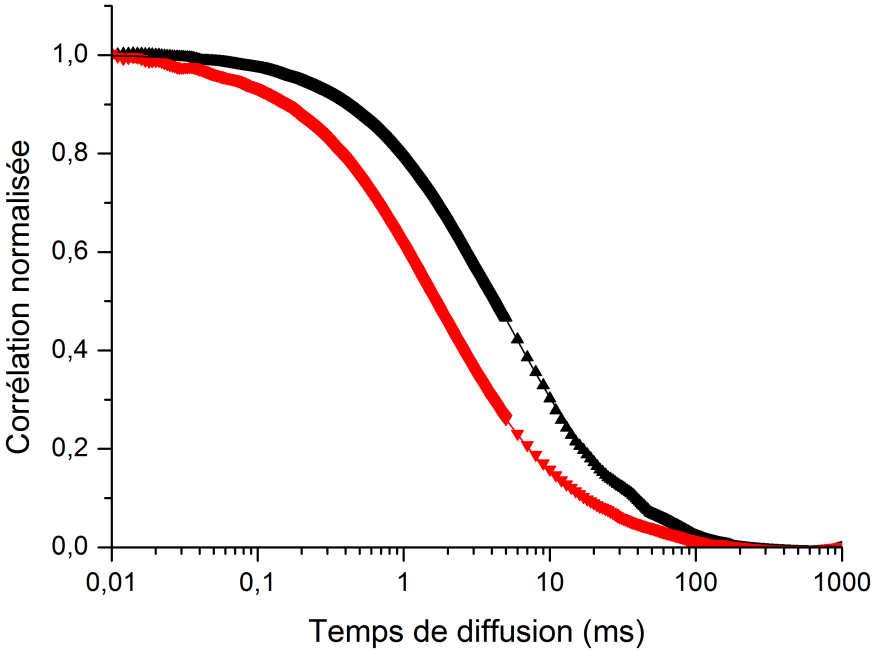
Un décalage de la courbe d'autocorrélation de fluorescence vers les temps plus longs est ainsi observé lorsque les NP+ vieillissent (figure 2.10). Le meilleur ajustement de cette courbe a été obtenu en considérant un modèle de diffusion brownienne à 2 composantes dans l'équation 2.8. Une fraction majoritaire des NP+ ($a_1 = 90 \pm 10\,\%$) diffuse avec un temps $\tau_{d,1}$ correspondant à celui des NP isolées. Une seconde fraction de la population ($a_2 = 10 \pm 10\,\%$) diffuse avec un temps $\tau_{d,2} \sim 50\,\text{ms}$, ce qui correspond à des particules de rayon hydrodynamique $R_{h,2} \sim 1{,}2\,\mu\text{m}$: cette population peut raisonnablement être assimilée à la formation d'agrégats de NP.

De manière tout à fait comparable, l'ajustement des courbes d'autocorrélation de fluorescence pour une solution de NP- obtenues peu de temps après synthèse montre l'existence d'une population unique avec un temps de diffusion $\tau_d = 1{,}7 \pm 0{,}1\,\text{ms}$, ce qui correspond à des particules de rayon hydrodynamique $R_h = 40 \pm 2\,\text{nm}$, en bon accord avec les mesures de DLS.

Les courbes d'autocorrélation de fluorescence obtenues pour une solution plus âgée montre également la présence d'une seconde population qui diffuse avec une durée



(a)



(b)

Figure 2.10. – *Courbes d'autocorrélation de fluorescence des NP+ (en noir) et NP- (en rouge) obtenues, (a) pour des solutions de nanoparticules juste après leur synthèse et purification, et (b) pour des solutions 3 mois après synthèse. Les symboles correspondent aux points expérimentaux, et les lignes continues à l'ajustement des courbes à partir de l'équation 2.8 (annexe 2.E). Les conditions d'acquisition de ces courbes sont décrites dans l'annexe 2.E. Les solutions de nanoparticules utilisées étaient à une concentration* $\sim 10^{10}$ *NP/mL.*

$\tau_{d,2} = 28{,}0 \pm 1{,}5\,\text{ms}$ ($R_{h,2} = 664 \pm 36\,\text{nm}$) et qui correspond à la présence d'agrégats dans la solution (fraction $a_2 = 20 \pm 5\,\%$ de la population).

En conclusion de ce chapitre décrivant la synthèse et la caractérisation de NP+ et NP-, nous avons montré qu'il était possible d'obtenir des solutions de nano-objets sphériques, monodisperses, de rayon hydrodynamique $\sim$ 50 nm, dopés avec un fluorophore (BODIPY) qui permettra leur visualisation en microscopie optique. Chaque type de nanoparticules renferme la même concentration de fluorophore.
Ces nano-objets seront nos outils de caractérisation de propriétés physico-chimiques qui contrôlent l'adhésion des bactéries à un substrat et la formation subséquente des biofilms.
Les principales caractéristiques de ces nanoparticules sont résumées dans le tableau 2.2 suivant :

Tableau 2.2. – *Récapitulatif des propriétés des NP+ et NP-. R_h est le rayon hydrodynamique, C_S est la concentration de la solution stock de nanoparticules, C_B est la concentration en BODIPY par nanoparticule, et ζ est le potentiel zêta des nanoparticules.*

	R_h DLS (nm)	R_h FCS (nm)	C_S (NP/mL)	C_B (molécules/NP)	ζ (mV)
NP+	60 ± 15	57 ± 5	$\sim 10^{13}$	$\sim 10^{6}$	43 ± 7
NP-	30 ± 6	40 ± 2	$\sim 10^{13}$	$\sim 10^{6}$	-32 ± 7

Synthèse et caractérisation des nanoparticules cationiques fluorescentes : Matériels et Méthodes

2.A. Synthèse des nanoparticules cationiques

Réactifs

Le styrène (Fluka, 99 %) a été purifié par distillation sous pression réduite. L'amorceur V50 (dihydrochlorure de 2,2'-azobis(2-méthylpropionamidine), Aldrich, 97 %), le 1,4-divinylbenzène (mélange d'isomères, Aldrich, 80 %) ont été utilisés sans purification supplémentaire. Le méthacrylate de BODIPY a été utilisé tel quel après sa synthèse selon le mode opératoire décrit dans la thèse de Chloé Grazon [10]. De l'eau MilliQ (Millipore) a été utilisée tout au long du procédé.

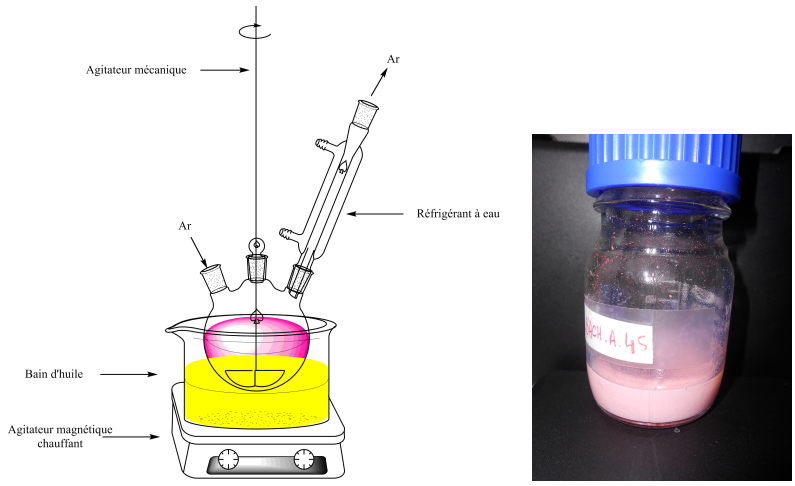
Réacteur

Pour la synthèse des nanoparticules cationiques, nous avons utilisé un réacteur constitué d'un ballon tricol rodé disposé sur un bain d'huile thermostaté à la température de 70 °C (figure 2.A.1) soumis à une agitation mécanique.
Les 3 cols du ballons sont équipés respectivement d'une arrivée d'argon, d'un réfrigérant à eau, et d'un septum assurant l'étanchéité du montage. Ce dernier sera retiré au besoin pour l'introduction des réactifs.

Mode opératoire

À 25 mL d'eau distillée à 70 °C sont ajoutés :
- le comonomère ammonium à la fraction molaire choisie,
- 25 mg de méthacrylate de BODIPY purifié [11] préalablement dissout dans 2,5 mL de styrène (pour minimiser le dépôt sur les parois du ballon),
- 70 µL de divinylbenzène (pour obtenir un polymère réticulé, plus rigide),
- 30,25 mg de V50 pour amorcer la polymérisation.

10. Grazon et al. 2011.
11. Grazon et al. 2011.



(a) *(b)*

Figure 2.A.1. – *(a) Schéma du dispositif utilisé pour la synthèse des nanoparticules. L'ensemble est maintenu sous atmosphère inerte d'argon.*
(b) Solution de NP+ obtenue après synthèse

Le mélange réactionnel est laissé sous atmosphère d'argon pendant 24 heures. On observe au cours du temps l'apparition d'une suspension de couleur rose d'un aspect laiteux témoin de la formation de nanoparticules (figure 2.A.1b).
Le produit est dialysé pendant 3 jours contre de l'eau distillée en utilisant des membranes de dialyse possédant un seuil de rétention de 25 000 g/mol afin d'éliminer les réactifs n'ayant pas réagi. Les eaux de dialyse sont changées chaque jour et sont contrôlées par spectrophotométrie d'absorption UV-visible : c'est ainsi que l'on contrôle l'absence de « fuite » de BODIPY.

2.B. Détermination du rendement de la synthèse par thermogravimétrie

La thermogravimétrie est une technique qui permet de déterminer le rendement de conversion du styrène (composé majoritaire) et ainsi d'établir un rendement de synthèse. Elle repose sur le fait que les monomères sont volatils contrairement au polymère formé. Dans notre cas, les monomères volatils sont le styrène et le divinylbenzène. Ce dernier étant en quantité très faible par rapport au styrène (quantité $\sim$300 fois plus faible), on ne parlera que de conversion du styrène. Par ailleurs, il entre aussi dans la synthèse les composés non volatils que sont le comonomère ammo-

nium et le méthacrylate de BODIPY dont les masses seront intégrées dans le composé d'extrait sec.

Le principe de la thermogravimétrie consiste à déposer une masse connue de la solution de nanoparticules cationiques non diluée obtenue après synthèse, dans un dessicateur (Sartorius MA45, Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, France) puis à chauffer l'échantillon à 120 °C pendant 90 minutes. On obtient alors un extrait sec ou taux de solide des entités non volatilisées.
Le taux de conversion en styrène (en pourcentage) est déterminé à partir de la relation suivante :

$$x = \frac{\tau_{polymère,exp}}{\tau_{solide,th}} = \frac{\tau_{solide} - \tau_{NV}}{\tau_{solide,th}} \tag{2.2}$$

où x est la conversion en styrène, $\tau_{polymère,exp}$ est le taux de solide expérimental du polymère (égal à la valeur totale de l'extrait sec τ_{solide} auquel on soustrait la fraction correspondant aux éventuels monomères non volatils τ_{NV}), et $\tau_{solide,th}$ est le taux de solide théorique correspondant au rapport de la masse initiale de monomère sur la masse totale de la synthèse.

2.C. Structure, taille et homogénéité des nanoparticules par microscopie électronique

Les microscopies électroniques à balayage (MEB) et en transmission (MET) vont permettre une caractérisation structurale (structure, taille et homogénéité) des nanoparticules sous leur forme déshydratée. Voici quelques rappels sur les principes de ces techniques.

Ce sont les microscopes électroniques en transmission qui ont été les premiers mis en service. Le principe en est le suivant : un faisceau d'électrons est envoyé sur un échantillon. Les électrons seront transmis sous différents angles ou sans changement de leur trajectoire initiale dépendant de la composition, de l'épaisseur etc... de l'échantillon. L'image de l'ensemble des électrons transmis est visualisée sur une caméra CCD. Celle-ci sera plus ou moins sombre selon l'épaisseur de l'échantillon : plus l'échantillon sera épais, plus les électrons seront déviés et donc plus l'image sera sombre, et inversement.

Le principe de la microscopie électronique à balayage est schématisé figure 2.C.1. À la différence du MET, ce sont les électrons secondaires (énergie $\sim 3 - 5\,\text{eV}$) et les électrons rétrodiffusés qui seront détectés. Ceux-ci proviennent de la surface et/ou d'une faible profondeur de l'échantillon permettant d'obtenir une image topographique et/ou de sa composition.

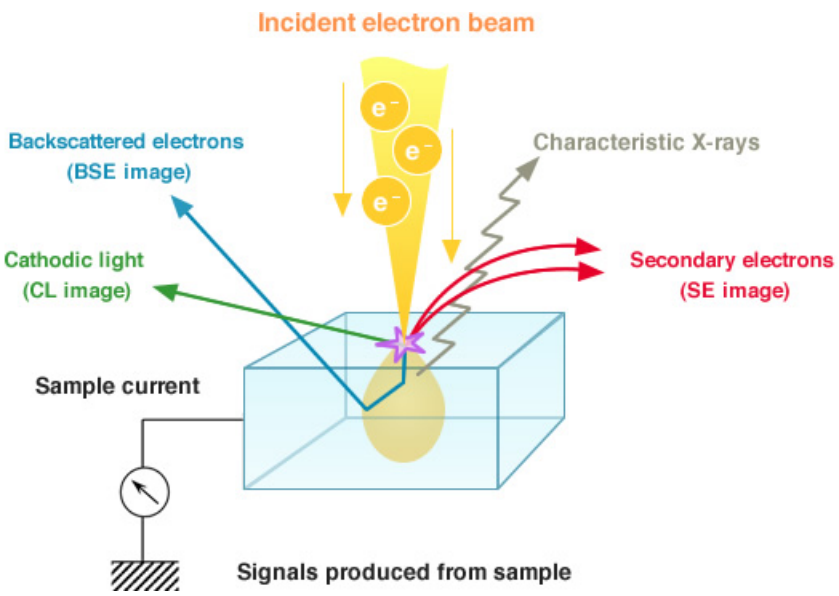


Figure 2.C.1. *– Principe de fonctionnement du MEB(*Introduction to SEM *2015).*

Pour la caractérisation des NP+, les nanoparticules ont été déshydratées par séchage d'un dépôt de la suspension-stock ($\sim 10^{13}\,\text{NP/mL}$) puis dispersées sur le substrat. Elles ont été observées sur un MEB à pression contrôlée possédant un canon à émission de champ (MEB-FEG). Le faisceau d'électrons est accéléré avec une faible tension ($1\,\text{kV}$).
Sur chaque image on détermine manuellement le diamètre d'une trentaine de nanoparticules isolées permettant de calculer un rayon moyen.

Les NP- ont été caractérisées par MET tel que décrit dans la référence [12] et la thèse de Chloé Grazon.

12. Grazon et al. 2011.

2.D. Détermination du rayon hydrodynamique des nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering* - DLS) est une technique permettant de mesurer le rayon hydrodynamique de particules en libre diffusion dans un solvant. Son principe utilise le fait que lorsque les photons d'un laser d'excitation interagissent avec les nanoparticules en suspension, ils sont diffusés dans toutes les directions (diffusion élastique de Rayleigh). On peut mesurer les variations de l'intensité de cette lumière diffusée par les particules au cours du temps, qui provient des variations de la concentration locale des nanoparticules dans le volume d'excitation en raison de leur libre diffusion. La quantification de la lumière diffusée n'a par ailleurs de sens que (i) si l'on s'affranchit des processus de re-diffusion par des particules dans le proche environnement et (ii) si la longueur d'onde d'excitation n'est pas absorbée par les entités du milieu, ce qui impose d'utiliser des solutions particulaires diluées et des longueurs d'onde d'excitation appropriées.

Un traitement mathématique défini par une fonction d'autocorrélation $g(q, \tau)$ permet de comparer l'intensité de la lumière diffusée dans des intervalles de temps τ courts (de sorte que l'intensité de la lumière diffusée varie peu autour d'une valeur moyenne) :

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \tag{2.3}$$

Si la fonction d'autocorrélation décroît rapidement, c'est que le signal mesuré varie rapidement, ce qui correspond au déplacement de particules de petite taille. Réciproquement, une décroissance plus lente du signal est caractéristique de particules de plus grosse taille (figure 2.D.1).

Pour des échantillons monodisperses, la fonction $g(\tau)$ peut être ajustée par le modèle analytique suivant (aussi appelé méthode des cumulants) :

$$g(\tau) = A + B \exp\left(-2Dq^2\tau\right) \tag{2.4}$$

où D est le coefficient de diffusion, q le vecteur d'onde, A la ligne de base de la fonction (généralement égale à 1) et B un facteur dépendant de la géométrie expérimentale.

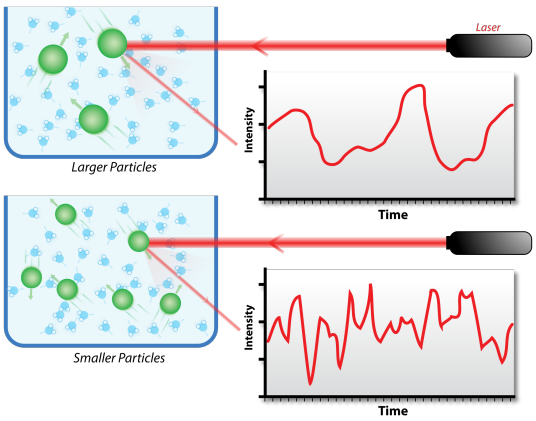


Figure 2.D.1. *– Principe de la DLS. De petites particules provoquent des variations rapides de signal, au contraire de particules plus larges.(* JONES *2010)*

Le vecteur d'onde q est quant à lui défini par :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \tag{2.5}$$

où λ est la longueur d'onde du rayonnement utilisé, θ est l'angle d'observation et n l'indice de réfraction du solvant.

La représentation logarithmique de la fonction $g(\tau) - A$ permet de déterminer directement le coefficient de diffusion moyen D donné par la pente de la droite et un indice de polydispersité (PdI) qui correspond à l'écart σ de la droite par rapport aux points expérimentaux.

L'équation de Stokes-Einstein permet ensuite d'obtenir le rayon hydrodynamique R_h des nanoparticules :

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \tag{2.6}$$

où k est la constante de Boltzmann ($k = 1{,}38 \times 10^{-23}\,\mathrm{J{\cdot}K^{-1}}$), T est la température absolue exprimée en Kelvin, η est la viscosité de la solution (en Pa·s) et D est le coefficient de diffusion (en $\mathrm{m^2{\cdot}s^{-1}}$).

Les mesures de DLS ont été effectuées sur un appareil ZetaSizer NanoZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Royaume-Uni) piloté par le logiciel DTS. Les échantillons sont

dilués dans de l'eau distillée et introduits dans une cuve transparente en polystyrène de 1 cm de trajet optique. Ils sont ensuite soumis au rayonnement d'un laser He-Ne de longueur d'onde $\lambda = 633\,\text{nm}$. Le signal est recueilli à un angle de 173° par un photo-multiplicateur. Le traitement des données est assuré automatiquement par le logiciel intégré à l'appareil.

2.E. Détermination du rayon hydrodynamique des nanoparticules par spectroscopie de corrélation de fluorescence

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est une autre technique permettant notamment de déterminer le rayon hydrodynamique des nanoparticules. À la différence de la DLS, l'excitation laser est focalisée à travers l'objectif d'un microscope. Il s'ensuit un faible volume d'excitation ($\sim 1\,\text{fL}$ avec le dispositif expérimental utilisé dans le cadre de ce travail et décrit dans l'annexe 4.D) permettant l'étude de phénomènes de diffusion moléculaire à l'échelle de la molécule unique (concentration très faible de l'ordre de 1 nM). Aussi à la différence de la DLS, ce ne sont plus les fluctuations temporelles de l'intensité de la lumière diffusée qui sont analysées mais celles de l'intensité de la fluorescence des molécules qui diffusent à travers le volume d'excitation (figure 2.E.1).

D'un point de vue expérimental, il s'agit de compter le nombre de photons de fluorescence émis durant un intervalle de temps défini et de réaliser ce comptage sur un nombre significatif d'intervalles tout comme exposé ci-dessus pour les mesures de DLS. On obtient ainsi une courbe appelée « vecteur d'intensité » qui reflète les fluctuations temporelles de l'intensité de fluorescence (figure 2.E.1).

Pour chaque vecteur d'intensité, on applique, comme en DLS, une fonction d'autocorrélation, ici normalisée, qui s'exprime par la relation :

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \tag{2.7}$$

où $I(t)$ est l'intensité de fluorescence à l'instant t et $I(t+\tau)$ à l'instant $t+\tau$.

La courbe d'autocorrélation caractéristique correspondante est représentée sur la figure 2.E.1. Elle peut être analysée par un modèle de diffusion brownienne 3D à

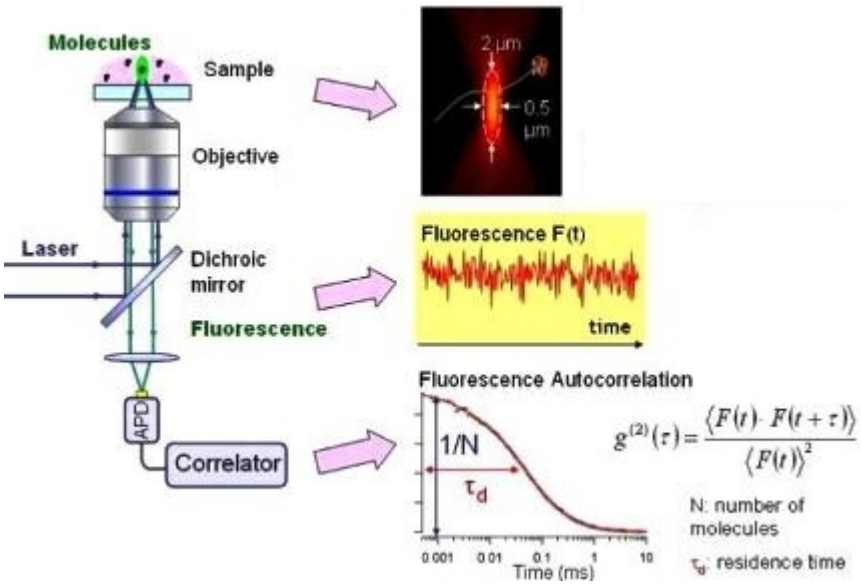


Figure 2.E.1. – *Schéma de principe de la FCS. En haut à droite : illustration du volume d'excitation. Au milieu : vecteur d'intensité obtenu par une mesure. En bas : courbe d'autocorrélation obtenue par application de la fonction $g(\tau)$ sur le vecteur d'intensité précédent. Adapté de : (*Ferrand *2009).*

une ou plusieurs composantes (équation 2.8) donnant ainsi accès à des paramètres caractéristiques de la molécule diffusante tels que son temps de diffusion τ_D, le nombre N de molécules fluorescentes diffusant dans le volume d'excitation [13] :

$$g(\tau) = 1 + G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \times \sum_i a_i \left[\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{d,i}}} \sqrt{\frac{1}{1 + r^2 \frac{\tau}{\tau_{d,i}}}} \right] \tag{2.8}$$

où a_i est la fraction de l'espèce i diffusant avec un temps de diffusion translationnelle $\tau_{d,i}$ c'est-à-dire le temps moyen mis par une molécule pour traverser latéralement le volume d'excitation ; et r est le rapport de la largeur du volume d'excitation sur sa hauteur $\frac{\omega_0}{z_0}$ ($\omega_0 \sim 190\,\text{nm}$ et $\frac{\omega_0}{z_0} \sim 0{,}3$ pour notre dispositif expérimental). Le temps de diffusion translationnelle est relié au coefficient de diffusion de l'entité diffusante d'après la relation suivante pour une excitation monophotonique :

$$\tau_d = \frac{\omega_0^2}{4D} \tag{2.9}$$

où D est le coefficient de diffusion translationnelle qui, pour une particule sphérique, est relié à la viscosité du milieu et à la taille de la particule selon l'équation

13. Haustein et Schwille 2007.

de Stokes-Einstein (équation 2.6).

On notera que l'amplitude du signal d'autocorrélation étant inversement proportionnelle au nombre de molécules N présentes dans le volume d'excitation, la FCS requiert de travailler avec de très faibles concentrations de fluorophore de l'ordre du nM-µM pour accéder à l'échelle de la molécule unique.

Expérimentalement, l'acquisition de courbes de FCS s'est faite en utilisant le microscope confocal (décrit dans l'annexe 4.D), équipé d'une unité de détection externe PicoHarp 300 (PicoQuant, Allemagne) pilotée grâce au logiciel PicoQuant SymPhoTime.
Brièvement, l'excitation des échantillons est réalisée par la source laser Argon interne au microscope confocal ($\lambda_{exc} = 488\,\text{nm}$) à travers un objectif apochromatique à immersion à huile, de grossissement ×63 d'ouverture numérique 1,4. La fluorescence est collectée par le même objectif, et dirigée via une fibre optique vers une photodiode à avalanche (Micro Photon Devices, Italie). Un filtre passe-haut à 488 nm (Semrock, USA) est utilisé pour couper le faisceau d'excitation et ne collecter que le signal de fluorescence. Les courbes de FCS sont calculées en temps réel par le module Picoharp : dans ce manuscrit, les courbes présentées correspondent à des moyennes d'au moins 10 acquisitions exploitables de 60 s. Après acquisition, les courbes sont modélisées mathématiquement grâce au logiciel Matlab. Chaque expérience est reproduite *a minima* 3 fois.

2.F. Détermination des concentrations des solutions de nanoparticules

La concentration des solutions stock de nanoparticules cationiques a été déterminée à partir des données de thermogravimétrie et de DLS selon la formule :

$$N_{NP} = \frac{C_{NP}}{\rho_{PS} \times V_{NP}} \tag{2.10}$$

où :

— C_{NP} est la fraction massique des nanoparticules dans la solution, obtenue par thermogravimétrie : $C_{NP} = \frac{\tau_{solide} \times m_{solution}}{V_{solution}}$.

— ρ_{PS} est la masse volumique d'une nanoparticule, assimilée à celle du polystyrène

qui compose majoritairement celle-ci : $\rho_{PS} = 1{,}05\,\mathrm{g{\cdot}cm^{-3}}$.

— V_{NP} est le volume d'une nanoparticule, déterminé à partir de son rayon hydrodynamique mesuré par DLS : $V_{NP} = \frac{4}{3}\pi R_h^3$.

2.G. Spectroscopies d'absorption et de fluorescence des nanoparticules

Les spectres d'absorption des solutions de NP+ et NP- ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible - proche IR Cary 50 (VARIAN, Agilent Technologies) équipé du logiciel d'acquisition Cary WinUV.

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence ont été obtenus à l'aide d'un spectrofluorimètre Cary Eclipse (VARIAN, Agilent Technologies). Le spectre d'émission de fluorescence des NP+ ou NP- a été mesuré en excitant le BODIPY à $\lambda_{exc} = 488\,\mathrm{nm}$ et en collectant sa fluorescence entre $500 - 700\,\mathrm{nm}$. Le spectre d'excitation des NP+ ($\lambda_{ém} = 560\,\mathrm{nm}$) a été enregistré entre $400 - 550\,\mathrm{nm}$ (largeur des fentes en excitation et en émission $5\,\mathrm{nm}$). Le trajet optique dans la solution est de $10\,\mathrm{mm}$.

2.H. Contrôle de la charge de surface des nanoparticules par zêtamétrie

La charge globale de surface d'une particule peut être obtenue par mesure de son potentiel zêta (aussi noté ζ), qui correspond au potentiel électrique de la zone interfaciale entre la surface de la particule et le milieu aqueux. Le potentiel ζ peut être estimé en mesurant la mobilité électrophorétique (M.E.) des particules soumises à un champ électrique[14] définie par :

$$M.E. = \frac{v}{E} \tag{2.11}$$

où v est la vitesse de déplacement de l'objet (nanoparticule ou bactérie) en solution (en $\mathrm{m{\cdot}s^{-1}}$), et E la valeur du champ électrique auquel il est soumis (en $\mathrm{V{\cdot}m^{-1}}$).
La M.E. est caractéristique de l'environnement particulier où est fait la mesure (solvant, viscosité, pH,...).

14. Mozes et Rouxhet 1990.

Dans une solution neutre circulante, l'objet étudié est soumis à 2 types de force :

— la force de frottement $f = 6\pi\eta r v$ (où η est la viscosité du milieu exprimée en Pa·s, et r le rayon d'un objet sphérique exprimé en m.)

— la force électrostatique $f' = qE$ où q est la charge globale (en Coulomb) de l'objet étudié.

Ainsi lorsque l'objet circule à vitesse constante en solution, on a $f = f'$ et la M.E. peut alors s'écrire :

$$M.E. = \frac{q}{6\pi\eta r} \tag{2.12}$$

et s'exprime en $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$. Les valeurs de η, r et v étant nécessairement positives, le signe de la M.E. sera le même que le signe de la charge q de l'entité.

À partir de la mobilité électrophorétique, on détermine également le potentiel ζ (zêta) de l'entité chargée, exprimé en V. Pour cela, on utilisera le modèle de Smoluchowski :

$$\zeta = M.E. \times \frac{\eta}{\epsilon_0 \epsilon_r} = \frac{q}{6\pi\epsilon_0\epsilon_r r} \tag{2.13}$$

où η est la viscosité dynamique du fluide ($\eta = 1{,}00 \times 10^{-3}$ Pa·s pour l'eau), ϵ_0 est la permittivité diélectrique du vide ($\epsilon_0 = 8{,}85 \times 10^{-12}$ F·m^{-1}), et ϵ_r est la permittivité relative du milieu ($\epsilon_r = 78{,}5$ pour l'eau).

On mesure la M.E. à l'aide d'un zétaphéromètre commercial (Zetapheromet II, CAD Instrument). La solution contenant l'objet à analyser est placée dans une cuve de 2 mm d'épaisseur reliée à 2 électrodes (figure 2.H.1) placée sous un microscope (Olympus) et illuminée par un laser He-Ne de longueur d'onde $\lambda = 633$ nm. L'application d'une différence de potentiel entre ces 2 électrodes permet de placer la solution dans un champ électrique de valeur connue (~ 5 V/cm).

Sous l'effet du champ électrique appliqué, les objets chargés se déplacent et leur vitesse est mesurée optiquement. Le déplacement des objets est imagé par une caméra permettant d'obtenir des images à la fréquence d'une image par seconde. La suspension de nanoparticules ou de bactéries est suffisamment diluée pour que l'on puisse observer la mobilité des objets individuels. Une mesure statistique de la vitesse est obtenue par l'application d'un champ électrique oscillant qui, toutes les 10 secondes, change de sens ce qui entraîne un changement de sens de migration des objets.
Lorsque les mesures de M.E. sont réalisées en fonction du pH, la suspension de na-

noparticules ou de bactéries est préparée dans de l'eau physiologique diluée (1/100) afin de minimiser les charges du solvant et le pH est ajusté par ajout de solutions d'acide nitrique (HNO_3) ou de potasse (KOH). Pour les mesures à pH fixe, on utilise de l'eau distillée (pH 5,5).

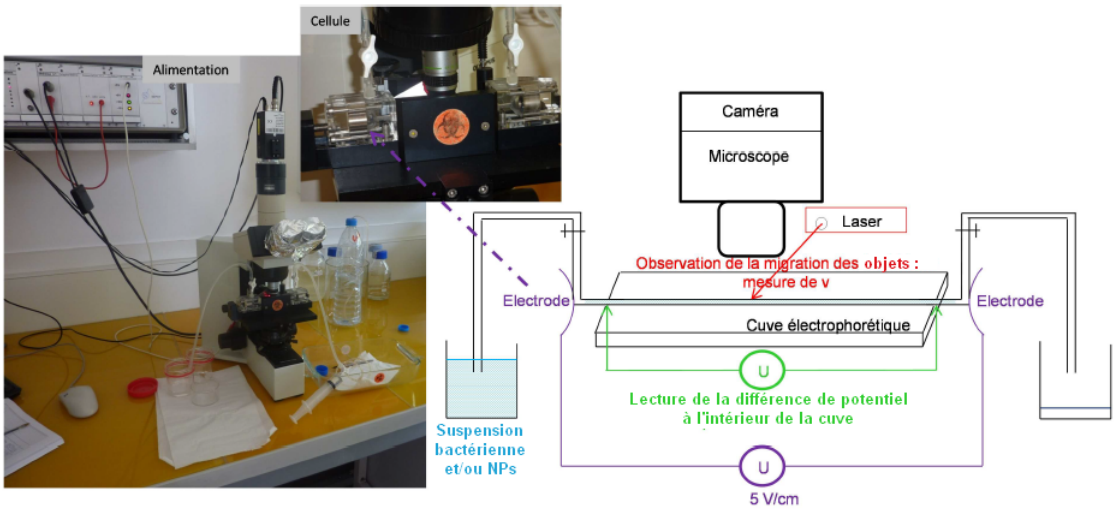


Figure 2.H.1. – *Montage de zêtamétrie. À gauche : vue d'ensemble du microscope sur lequel on dispose la cuve. À droite : description détaillée de la cuve utilisée pour les mesures. On distingue le laser, les électrodes servant à appliquer le champ électrique. La suspension est amenée dans la cuve par un système d'aspiration-éjection à l'aide de seringues.*

3. Interaction nanoparticules-bactéries à l'état planctonique

Ce chapitre décrit l'interaction des NP+ et NP- avec les bactéries à l'état planctonique à l'aide d'un ensemble de techniques microbiologiques et biophysiques complémentaires. Cette étude a été précédée d'une caractérisation des différentes souches bactériennes utilisées et du contrôle de la toxicité des nanoparticules vis-à-vis de ces bactéries. L'ensemble des méthodes et protocoles expérimentaux mis en œuvre sont décrits dans l'annexe à la fin de ce chapitre.

3.1. Caractérisation des souches bactériennes

3.1.1. Croissance bactérienne

La courbe de croissance des bactéries est une donnée importante en microbiologie, puisqu'elle permet de caractériser l'état physiologique de la cellule en fonction du temps. C'est une propriété propre à chaque souche bactérienne. Elle se distingue par différentes phases (annexe 3.D) : une phase de latence pendant laquelle les bactéries s'adaptent à leur milieu, une phase exponentielle qui permet d'obtenir le taux de croissance caractéristique d'une souche bactérienne, une phase stationnaire qui reflète un équilibre entre multiplication et mort des cellules, et enfin une phase de lyse (mort cellulaire).

Nous avons mesuré pour chaque souche bactérienne sa courbe de croissance (figure 3.1). Ces courbes ont été obtenues par des mesures quantitatives et complémentaires de turbidimétrie (mesure d'une absorbance ou densité optique (DO) à 600 nm) des suspensions bactériennes (annexe 3.D) et par dénombrement des bactéries viables-cultivables au cours du temps (UFC) (annexe 3.C). Ces dénombrements permettent d'obtenir des courbes de croissance qui ne sont pas statistiquement différenciées pour les différentes souches étudiées (figure 3.1a). On observe qu'au bout de 6 h, la phase stationnaire n'est pas encore atteinte.

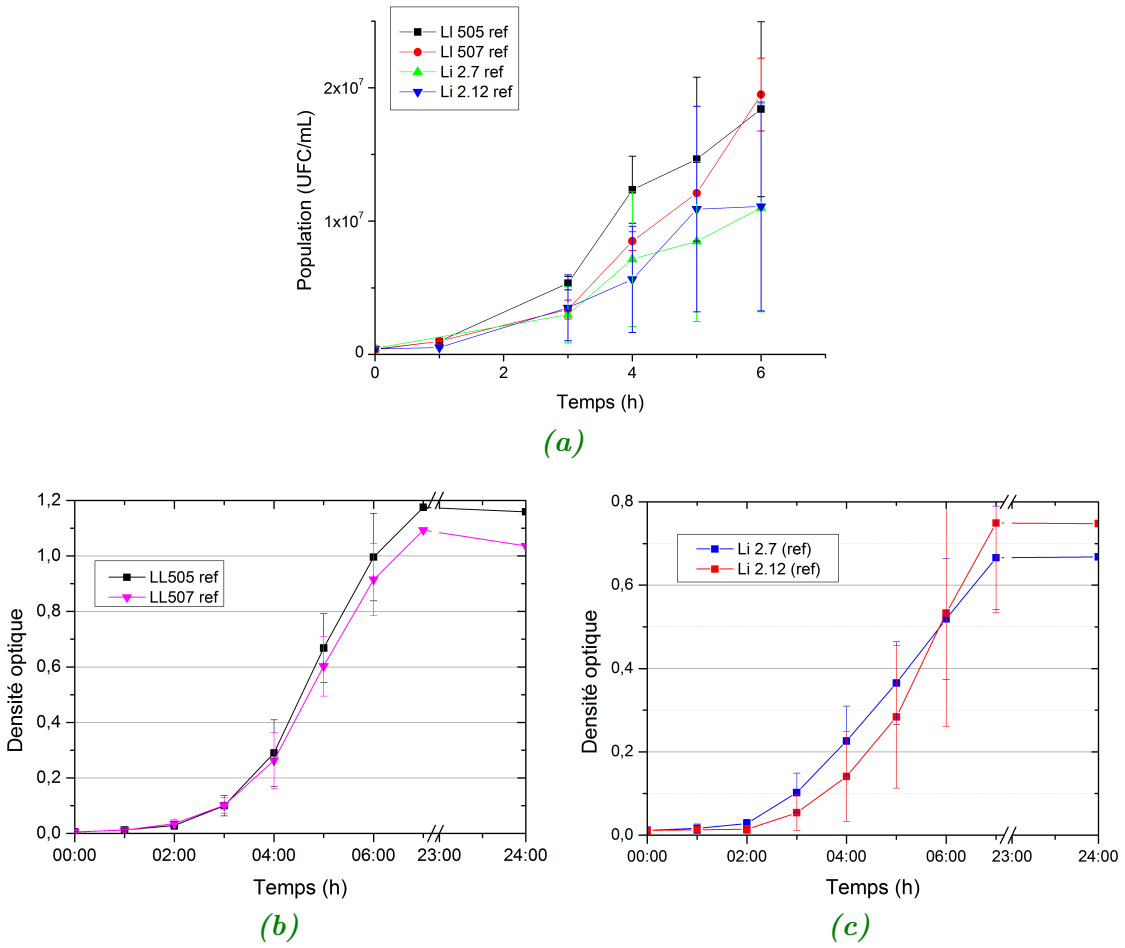


Figure 3.1. – *(a) Courbes de croissance obtenues à partir des dénombrements des bactéries viables-cultivables sur milieu gélosé. (b) et (c) Courbes de croissance obtenues à partir de la lecture de la DO à 600 nm de L. lactis (b) et L. innocua (c). Mesures obtenues à partir de suspensions bactériennes de concentration initiale* $\sim 5 \times 10^5$ *UFC/mL dans leur milieu de culture (respectivement M17B et TSB) et à leur température optimale de croissance (respectivement 30°C et 37°C). pH = 7,1 ± 0,2 – 7,3 ± 0,2 (pH respectifs dans les milieux de culture M17B et TSB).*

Tableau 3.1. – *Temps de latence et taux de croissance obtenus à partir du modèle de Gompertz appliqué aux courbes de croissance par mesure de DO. Les paramètres restent inchangés lorsque l'on ajoute des NP+ ou NP-.*

Souches	Temps de latence	Taux de croissance
L. lactis 505 et 507	$0,7 \pm 0,4$ h	$1,4 \pm 0,3$ h^{-1}
L. innocua 2.7	$1,2 \pm 0,3$ h	$1,1 \pm 0,2$ h^{-1}
L. innocua 2.12	$1,9 \pm 0,3$ h	$1,3 \pm 0,2$ h^{-1}

Les figures 3.1b et 3.1c illustrent les courbes de croissance des différentes souches bactériennes obtenues à partir de la mesure de la DO. Ces courbes enregistrées sur 24 h ont été analysées avec le modèle analytique de Gompertz (annexe 3.D). Les données rassemblées dans le tableau 3.1 montrent que, compte tenu de la précision des mesures, le taux de croissance pour chacune des souches est similaire. Cependant, le temps de latence pour les souches *L. lactis* 505 et 507 apparaît plus court que celui calculé pour les souches *L. innocua*. Ce résultat est à rapprocher des valeurs de DO mesurées pour les souches de *L. lactis* systématiquement supérieures à celles obtenues pour *L. innocua* dès lors que les cellules commencent à se multiplier. Ces divergences apparentes peuvent s'interpréter par la turbidité du milieu de culture M17 utilisé pour les souches *L. lactis* qui, comme expliqué dans l'annexe 3.D, entraîne une sur-évaluation de la mesure de la DO lorsque la concentration cellulaire augmente. On a, à travers cet exemple, une limitation de l'utilisation de la turbidimétrie pour quantifier la croissance cellulaire.

Pour la suite des expériences, nous avons fait le choix d'utiliser des concentrations de suspensions bactériennes correspondant à des cellules encore en phase de croissance (avant la phase stationnaire et le début de la mort cellulaire) : ainsi la concentration de 10^7 UFC/mL a été retenue pour chacune des souches.

3.1.2. Caractère hydrophobe/hydrophile et acide-base de Lewis

Le caractère hydrophobe/hydrophile de chacune des souches bactériennes a été vérifié par la méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvents) [1] telle que décrite

1. Bellon-Fontaine, Rault et Van Oss 1996.

dans l'annexe 3.E. La figure 3.2 illustre les résultats obtenus dans l'eau distillée et dans l'eau physiologique pour chacune des souches étudiées. Les résultats dans l'eau physiologique proviennent de données antérieures [2].

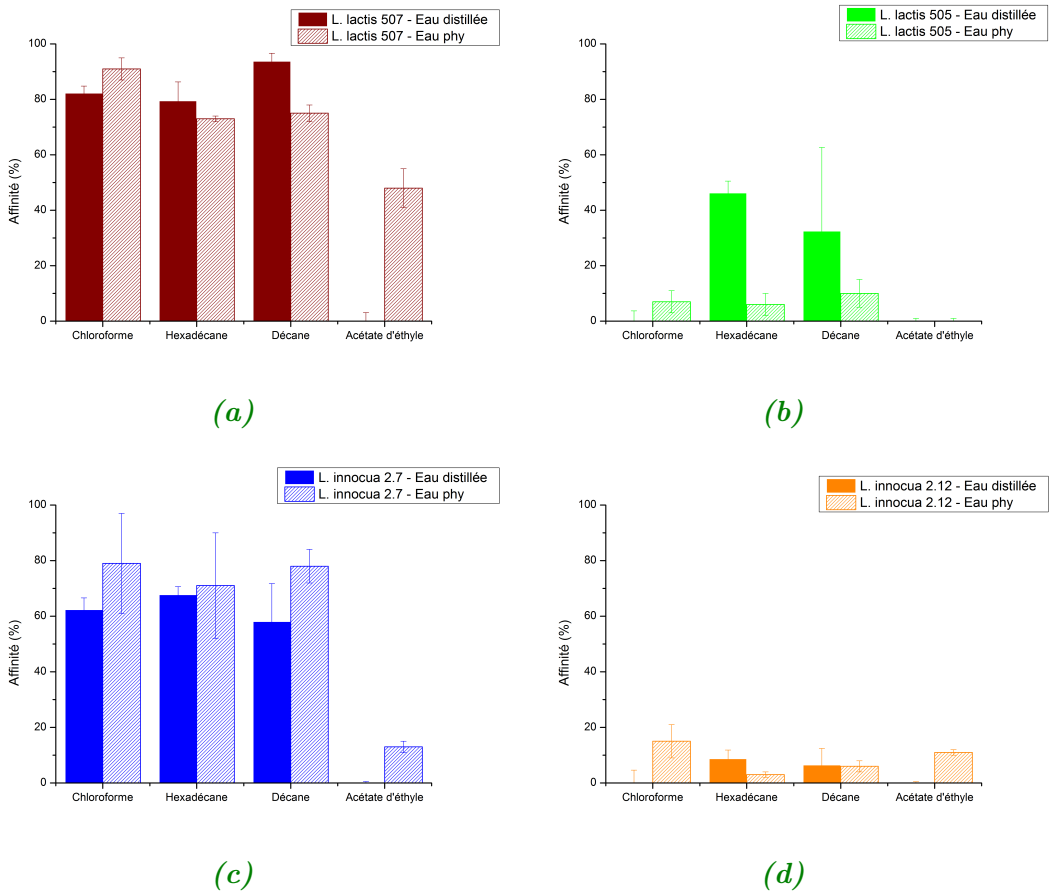


Figure 3.2. *– Résultats de MATS des souches de L. lactis 507 (a) et 505 (b) et des souches de L. innocua 2.7 (c) et 2.12 (d).*

Dans l'eau distillée, les souches *L. lactis* 507 et *L. innocua* 2.7 apparaissent fortement hydrophobes (affinité pour l'hexadécane et le décane $> 60\,\%$) alors que *L. innocua* 2.12 est hydrophile (affinité pour les solvants apolaires $< 10\,\%$). Ces données sont concordantes avec celles rapportées précédemment dans l'eau physiologique [3]. Concernant la souche *L. lactis* 505, elle montre une hydrophilie de surface intermédiaire ($\sim 30-40\%$ d'affinité pour le décane et l'hexadécane). Les mesures antérieures

2. Habimana et al. 2007 ; Wahl 2013.
3. Bulard 2012 ; Habimana et al. 2007 ; Wahl 2013.

Tableau 3.2. *– Mobilités électrophorétiques des souches bactériennes étudiées dans ce travail. Mesures obtenues dans l'eau distillée (pH = 5,5).*

Souches bactériennes	Mobilité électrophorétique ($10^{-8}\,\mathrm{m^2{\cdot}V^{-1}{\cdot}s^{-1}}$)	Potentiel zêta ζ (mV)
L. lactis 505	$-3,3 \pm 0,3$	$-47,5 \pm 4,3$
L. lactis 507	$-3,1 \pm 0,3$	$-44,6 \pm 4,3$
L. innocua 2.7	$-3,3 \pm 0,3$	$-47,5 \pm 4,3$
L. innocua 2.12	$-3,1 \pm 0,3$	$-44,6 \pm 4,3$

dans l'eau physiologique avaient révélé un caractère hydrophile plus important pour cette souche (moins de 10 % d'affinité pour les solvants apolaires [4]). Il se pourrait que ce soient les conditions de cryoconservation des souches (−20 °C dans le cadre de ce travail, −80 °C dans les travaux précédents), ou simplement « l'âge » de la souche bactérienne, qui aient influencé le caractère hydrophile de *L. lactis* 505.

Le caractère donneur d'électron (base de Lewis) ou accepteur d'électron (acide de Lewis) a été évalué en comparant les affinités des bactéries pour chacun des couples de solvants chloroforme-hexadécane et acétate d'éthyle-décane.
Compte-tenu de la précision des mesures, le caractère hydrophile des deux souches *L. lactis* 505 et *L. innocua* 2.12 n'est associé à aucun caractère acide-base de Lewis particulier alors que les souches hydrophobes (*L. lactis* 507 et *L. innocua* 2.7) ont quant à elles un caractère uniquement base de Lewis. On remarquera que globalement, les données sont comparables lorsque les bactéries sont en suspension dans l'eau distillée ou l'eau physiologique.

3.1.3. Charge de surface

La composition de la paroi bactérienne est riche en fonctions carboxylate, phosphate et amine dont l'état d'ionisation dépend du pH du milieu environnant, conférant ainsi une charge globale de surface à la bactérie. Pour chacune des souches bactériennes, celle-ci a été contrôlée par zêtamétrie (annexe 2.H). Les mobilités électrophorétiques (M.E.) mesurées ainsi que les potentiels zêta que l'on déduit (tableau 3.2) permettent de confirmer la charge de surface globalement négative des bactéries

4. Wahl 2013.

L. lactis et *L. innocua*.

Ces données sont en bon accord avec celles déjà obtenues pour la souche *L. lactis* 507 dans l'eau physiologique diluée[5] (M.E. à pH 5,5 valant $(-1.8 \pm 0.3) \times 10^{-8} \mathrm{m}^2.\mathrm{V}^{-1}.\mathrm{s}^{-1}$) : comme commenté précédemment, les ions du milieu peuvent saturer quelques charges de surface des bactéries ce qui diminue la charge négative globale. Concernant la M.E. de la souche *L. lactis* 505, son caractère électronégatif est moins prononcé que celui rapporté précédemment[6], une donnée à mettre en relation avec le caractère moins hydrophile de la souche bactérienne utilisée ici.
La M.E. obtenue dans ce travail pour la souche *L. innocua* 2.12 est aussi comparable à des données de la littérature sur d'autres souches hydrophiles de *Listeria*[7]. À notre connaissance, les propriétés de la souche hydrophobe *L. innocua* 2.7 sont rapportées ici pour la première fois.

3.2. Les nanoparticules sont-elles toxiques pour les bactéries ?

Nous avons vérifié si la présence des NP+ et NP- affectaient ou non la croissance et la survie des souches bactériennes utilisées dans ce travail.
Il s'agissait de contrôler un éventuel effet bactéricide des nanoparticules, notamment des NP+ fonctionnalisées par des groupements ammonium quaternaires bien connus pour avoir des propriétés anti-microbiennes[8].

3.2.1. Croissance bactérienne

Les courbes de croissance des différentes souches bactériennes en présence de nanoparticules sont rapportées sur la figure 3.3 en comparaison de celles obtenues pour les bactéries seules. Elles ont été mesurées en utilisant les deux méthodes décrites précédemment : celle basée sur la mesure de la DO à 600 nm et celle permettant la détermination des populations viables-cultivables.

L'ajout de nanoparticules, qu'elles soient positives ou négatives, aux suspensions bactériennes initiales ne modifie pas significativement les courbes de croissance de

5. Bulard 2012 ; Habimana et al. 2007.
6. Bulard 2012 ; Habimana et al. 2007.
7. Bouttier et al. 1995 ; Bruzaud et al. 2015.
8. Jia, Shen et Xu 2001.

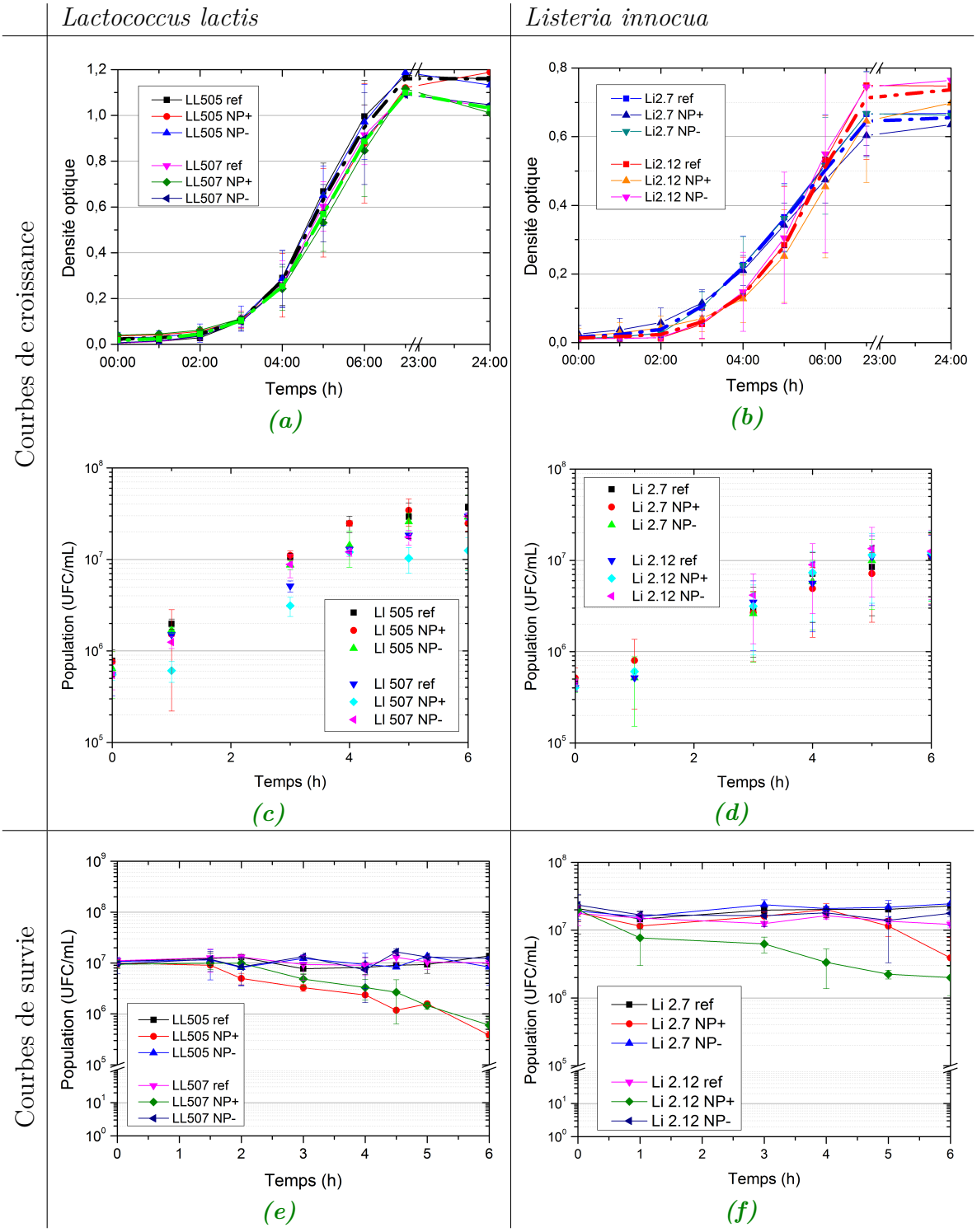


Figure 3.3. – *(a-d) Courbes de croissance de L. lactis et L. innocua en présence ou non des NP+ et NP-, réalisées à partir de suspensions bactériennes de concentrations initiales $\sim 10^5$ bactéries/mL en présence de NP de concentration 2×10^{11} NP/mL, dans leur milieu de culture respectif et à leur température optimale de croissance.*
(e-f) Courbes de survie mesurées dans l'eau distillée pour des suspensions $\sim 10^7$ bactéries/mL.

chacune des souches (figures 3.3a à 3.3d).

3.2.2. Survie des bactéries

La cytotoxicité des nanoparticules a aussi été évaluée en mesurant la survie des bactéries au cours du temps. Pour ce faire, des suspensions bactériennes de concentration 10^7 UFC/mL ont été mises en présence de NP+ et NP- de concentrations 2×10^{11} NP/mL, la plus élevée utilisée dans ce travail. Les populations de bactéries viables-cultivables ont ensuite été dénombrées au cours du temps et les résultats sont rapportés sur les figures 3.3e et 3.3f.

Les populations de chacune des souches bactériennes-témoins sont stables durant les 6 heures de la mesure. Il en est de même lorsque ces souches sont mises en présence des nanoparticules négatives.
En revanche, en présence des nanoparticules positives, on remarque une décroissance de la population bactérienne à partir de 3 heures révélant une certaine toxicité des NP+. Cependant, nos expériences seront réalisées sur des temps caractéristiques de l'ordre de 3 heures, pendant lesquelles la variation de population cellulaire peut être considérée comme peu importante (moins de 1/2 log de décroissance).

3.3. Saturation des sites chargés d'une bactérie par les nanoparticules

La concentration en NP+ nécessaire pour saturer les charges négatives de surface des différentes souches de bactéries a été déterminée à partir de mesures de M.E. dans l'eau distillée. Les courbes obtenues pour les bactéries *L. lactis* et *L. innocua* seules, les nanoparticules seules, et les bactéries en présence de différentes concentrations de nanoparticules sont répertoriées figure 3.4.
Les mesures n'ont pas été réalisées dans l'eau physiologique (autre condition de milieu utilisée dans le cadre de ce travail) : en effet lorsque la conductivité du milieu devient trop importante, la mobilité des bactéries est ralentie jusqu'à devenir immesurable.

Les M.E. des NP+ et NP- dans l'eau distillée valent respectivement $(+5{,}6 \pm 0{,}6)$ et $(-3{,}8 \pm 0{,}4) \times 10^{-8}\,\mathrm{m^2{\cdot}V^{-1}{\cdot}s^{-1}}$ (figures 3.4a et 3.4b). Ces résultats correspondent à des potentiels zêta respectifs de $\zeta_{NP+} = 81 \pm 9\,\mathrm{mV}$ et $\zeta_{NP-} = -55 \pm 6\,\mathrm{mV}$, en bon

accord avec des données de la littérature [9].
Ces valeurs sont plus élevées que celles mesurées précédemment dans l'eau physiologique diluée au 1/100 ($(+3{,}0 \pm 0{,}5)$ et $(-2{,}2 \pm 0{,}5) \times 10^{-8}\,\mathrm{m^2{\cdot}V^{-1}{\cdot}s^{-1}}$ respectivement, cf. figure 2.7) en bon accord avec l'absence d'écrantage des charges en surface des NP par les ions du solvant.

Lorsque des NP- sont ajoutées aux suspensions bactériennes, aucune différence de mobilité électrophorétique n'est observée par rapport aux bactéries seules. Un exemple de mesures est illustré figure 3.4d en présence de bactéries *L. innocua*. Ce résultat apparaît cohérent étant donné la similitude des charges globales négatives de surface des bactéries et des nanoparticules. Cependant, une bactérie recouverte par des nanoparticules voit sa taille augmenter et ainsi pour une charge de surface globale équivalente, la mobilité électrophorétique devrait diminuer (équation 2.12, annexe 2.H). Nous n'observons pas un tel résultat ce qui suggère que pas ou peu de NP- interagissent avec la surface des bactéries : ceci sera confirmé ultérieurement.

En présence de NP+, la mobilité électrophorétique des bactéries évolue avec la concentration en nanoparticules. Qu'il s'agisse des bactéries de *L. lactis* ou *L. innocua*, on relève une mobilité électrophorétique maximale à partir d'un rapport de $\sim 5000\,\mathrm{NP/bactérie}$. Cette mobilité n'évolue plus pour des rapports NP/bactérie plus élevés ce qui signifie que pour ce rapport atteint le recouvrement maximal de la surface des bactéries par les NP+. On remarquera que ces valeurs de mobilité sont plus faibles que celles mesurées pour les nanoparticules seules, ce qui est en bon accord avec le fait que la taille du complexe est plus grande que celle de la nanoparticule seule (équation 2.12).

Un calcul théorique permet d'évaluer le nombre de nanoparticules nécessaires pour recouvrir une bactérie : pour cela, considérant une cellule de *L. lactis* comme une sphère de diamètre $D = 1\,\mu\mathrm{m}$ et *L. innocua* comme un cylindre de longueur $L = 1{,}5\,\mu\mathrm{m}$ et de diamètre $D = 0{,}5\,\mu\mathrm{m}$, on trouve dans chaque cas un ratio de saturation de $\sim 400\,\mathrm{NP/bactérie}$, soit environ 10 fois moins que la valeur expérimentale mesurée. Ce résultat peut s'expliquer par les fortes répulsions électrostatiques entre les nanoparticules rendant leur interaction avec les bactéries moins efficace.

9. Briandet, Herry et Bellon-Fontaine 2001 ; Guiot et al. 2002.

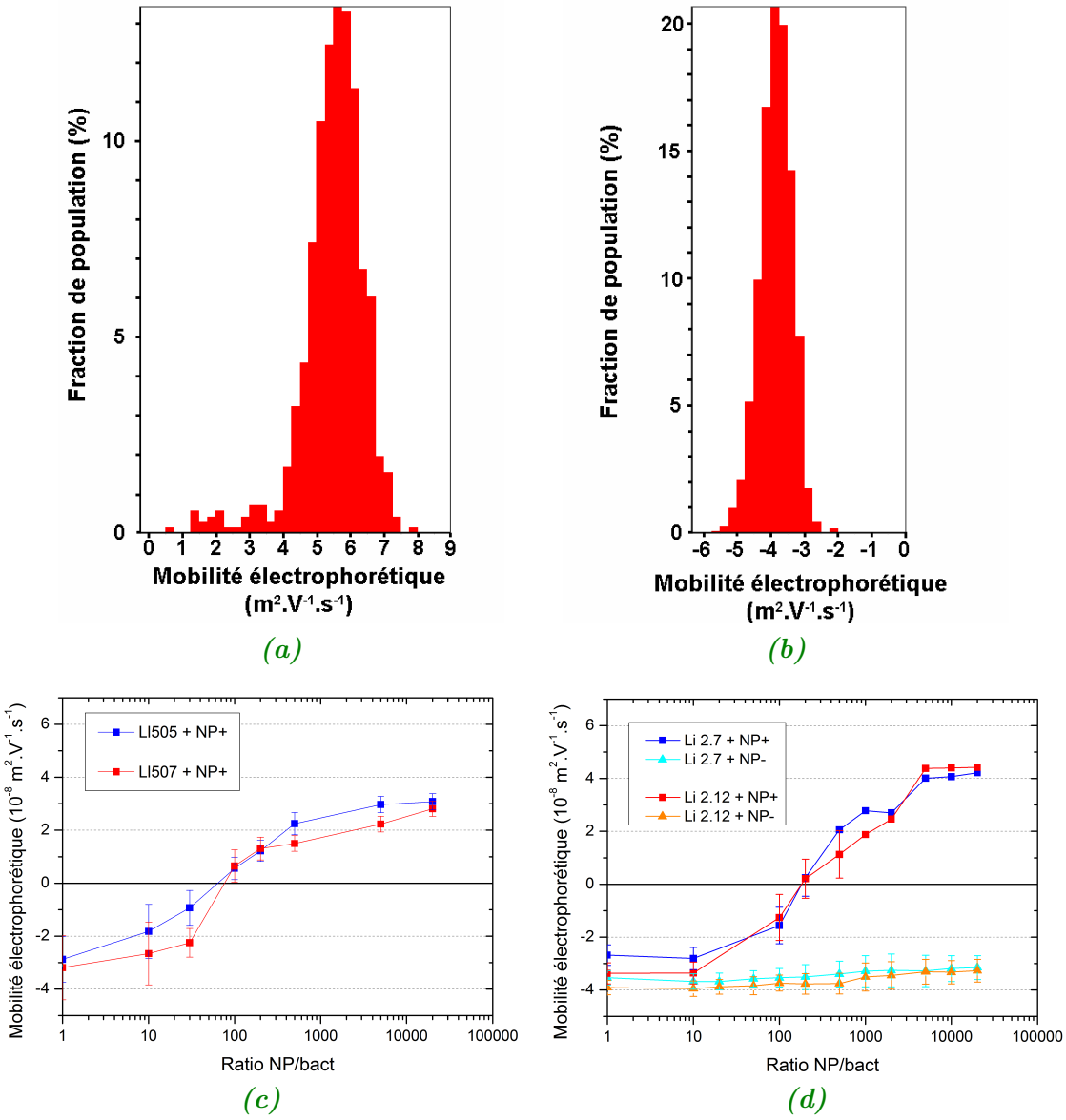


Figure 3.4. – *Distribution de la mobilité électrophorétique (a) des NP+, (b) des NP-. Mobilité électrophorétique des bactéries (c) L. lactis et (d) L. innocua en fonction de la concentration en nanoparticules exprimée en ratio du nombre de nanoparticules par bactérie. Concentration en bactéries : 10^7 UFC/mL ; concentration en nanoparticules : 10^7 à 2×10^{11} NP/mL (soit des rapports NP/bact de 1 à 20 000). Mesures réalisées dans l'eau distillée (pH = 5,5).*

3.4. Caractérisation de l'interaction bactéries-nanoparticules par spectroscopie de corrélation de fluorescence

En plus des mesures de mobilité électrophorétique, des mesures de FCS ont été réalisées afin de confirmer et quantifier l'interaction des nanoparticules avec les différentes souches bactériennes. Il faut noter que seules les nanoparticules fluorescentes sont détectées en FCS, les bactéries n'émettant pas d'autofluorescence dans les conditions d'excitation et de détection de la fluorescence utilisées. Ainsi les mesures de FCS vont permettre de discriminer d'une part les nanoparticules libres en solution, qui ont un temps de diffusion propre à leur taille, et d'autre part les nanoparticules en interaction avec les bactéries qui diffuseront avec un temps caractéristique de la diffusion d'une bactérie.

La figure 3.5 rassemble les courbes d'autocorrélation de fluorescence obtenues pour les particules seules et en présence de bactéries, ainsi que leur ajustement avec un modèle de diffusion brownienne 3D à deux composantes (équation 2.8, annexe 2.E). Les conditions expérimentales requises par la FCS (faible concentration en fluorophore mais aussi signal de fluorescence suffisamment élevé) ont imposé un ratio maximal de ~ 5000 NP/bactérie pour une population bactérienne de 10^7 UFC/mL. Comme décrit précédemment, ce ratio suffit à saturer la surface des bactéries par les nanoparticules.

Des résultats similaires ont été obtenus pour les souches hydrophobe et hydrophile d'une même espèce.

Les courbes d'autocorrélation de fluorescence mesurées pour les NP- seules et en présence de bactéries se superposent (figure 3.5). Leur traitement analytique donne des résultats identiques à ceux obtenus pour les nanoparticules seules (cf. chapitre 2, section 2.4.2).
Ceci n'exclut pas de possibles interactions entre NP- et bactéries mais en trop faible quantité pour engendrer des fluctuations de fluorescence détectables parmi le signal issu des NP- seules en solution.

Au contraire, lorsque les NP+ sont mises en présence des bactéries aussi bien *L. lactis* que *L. innocua*, on observe un net décalage des courbes de corrélation de fluorescence par rapport aux courbes des nanoparticules seules (figure 3.5 a et c). L'analyse des courbes montre pour chaque souche bactérienne que $\sim 50\,\%$ des

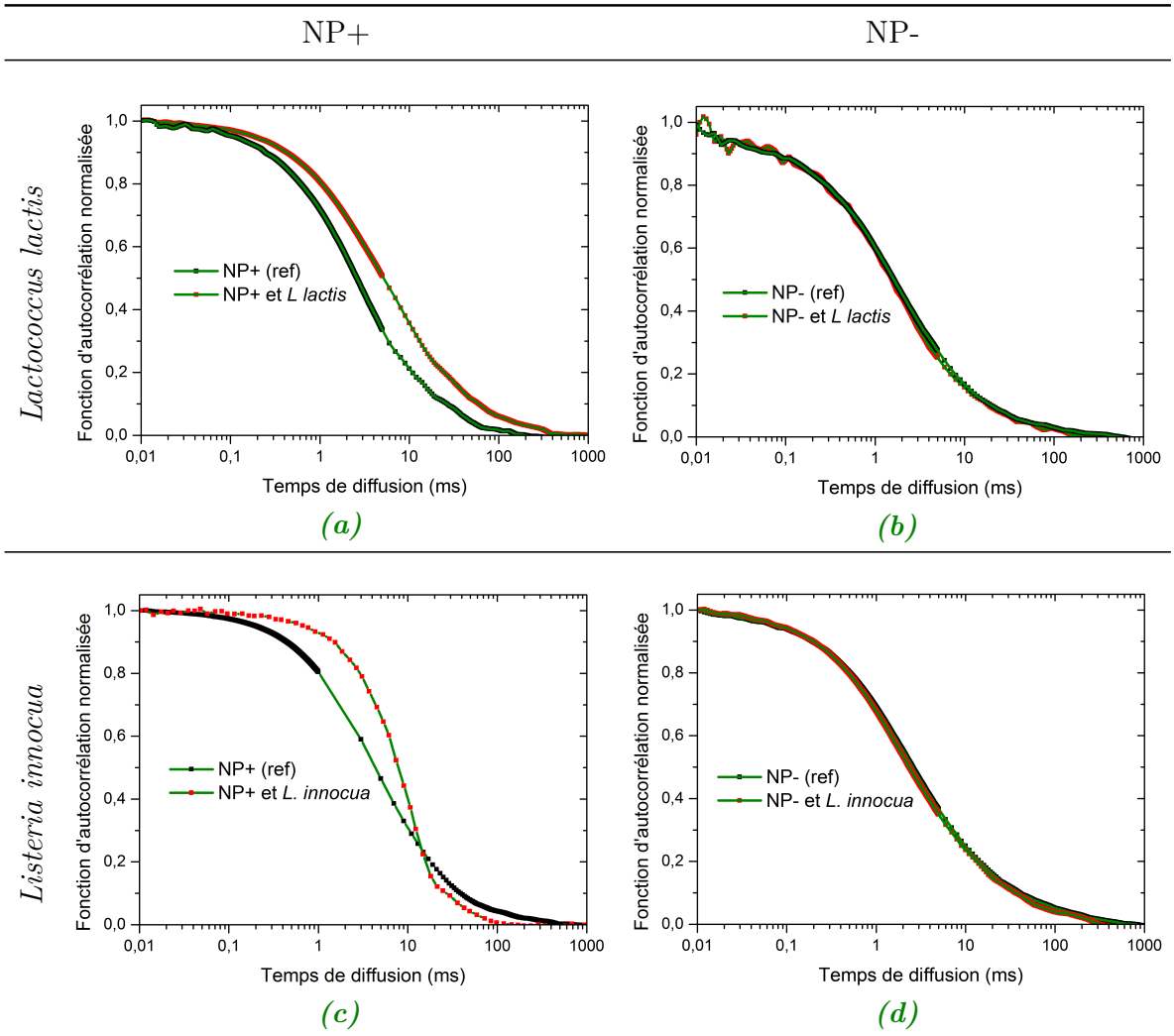


Figure 3.5. – *Courbes d'autocorrélation de fluorescence des NP+ et NP- en présence ou non de bactéries L. lactis (a et b) et L. innocua (c et d). Excitation monophotonique avec un laser Argon à la longueur d'onde $\lambda_{exc} = 488\,\text{nm}$. Chaque courbe est une moyenne d'au moins 10 acquisitions.*

nanoparticules diffusent librement ($\tau_{d,1} = 3{,}0 \pm 0{,}2\,\text{ms}$) et que l'autre moitié de la population diffuse avec un temps de diffusion caractéristique de la formation d'un complexe nanoparticules-bactérie ($\tau_{d,2} = 20{,}0 \pm 0{,}2\,\text{ms}$). On notera que cette composante longue de diffusion peut aussi intégrer la fraction d'agrégats de particules NP+ présents en solution (cf. chapitre 2, section 2.4.2).

Ces résultats confortent ceux obtenus en zêtamétrie révélant une complexation des NP+ aux bactéries mais aussi leur large excès par rapport à celles interagissant avec

les parois bactériennes.

3.5. Visualisation de l'interaction nanoparticules-bactéries

3.5.1. Par imagerie de fluorescence

Afin d'imager par fluorescence l'interaction nanoparticules-bactéries, nous avons préparé, comme pour les mesures de FCS, des suspensions bactériennes à la concentration de 10^7 UFC/mL auxquelles on a ajouté les nanoparticules positives et négatives correspondant à un ratio de 5000 NP/bactérie ($N_{NP} = 5 \times 10^{10}$ NP/mL). La suspension a ensuite été déposée sur une lamelle de verre et observée immédiatement en intensité de fluorescence par microscopie confocale (figure 3.6).

Le dispositif et les conditions d'observation des échantillons sont décrits dans les annexes 3.F et 4.D. Dans le cas des NP+, on observe un signal de fluorescence intense et uniforme des nanoparticules sur toute la surface de la paroi bactérienne (figures 3.6a et 3.6c). Ce résultat est tout à fait cohérent avec une interaction électrostatique très favorable entre des nanoparticules chargées positivement et des bactéries globalement chargées négativement.
De façon intéressante, on peut observer sur les figures 3.6b et 3.6d que des NP- interagissent aussi avec la surface de la paroi des bactéries *L. lactis* et *L. innocua*. Il faut noter que chaque point de fluorescence correspond à la taille d'un pixel (∼0,1 µm) et est donc du même ordre de grandeur que celle d'une nanoparticule. Il s'ensuit que la micro-hétérogénéité de charges positives sur la surface de chacune des deux souches bactériennes étudiées est sans doute plus confinée qu'elle n'apparaît sur les images de la figure 3.6. Par ailleurs la luminosité d'une bactérie en interaction avec les NP- reste faible, révélant une faible concentration de charges positives à la surface des cellules ce qui explique que ces complexes n'aient pu être détectés par les mesures de FCS précédentes (section 3.4).

Des expériences de microscopie électronique ont ensuite été réalisées pour venir compléter et confirmer ces observations.

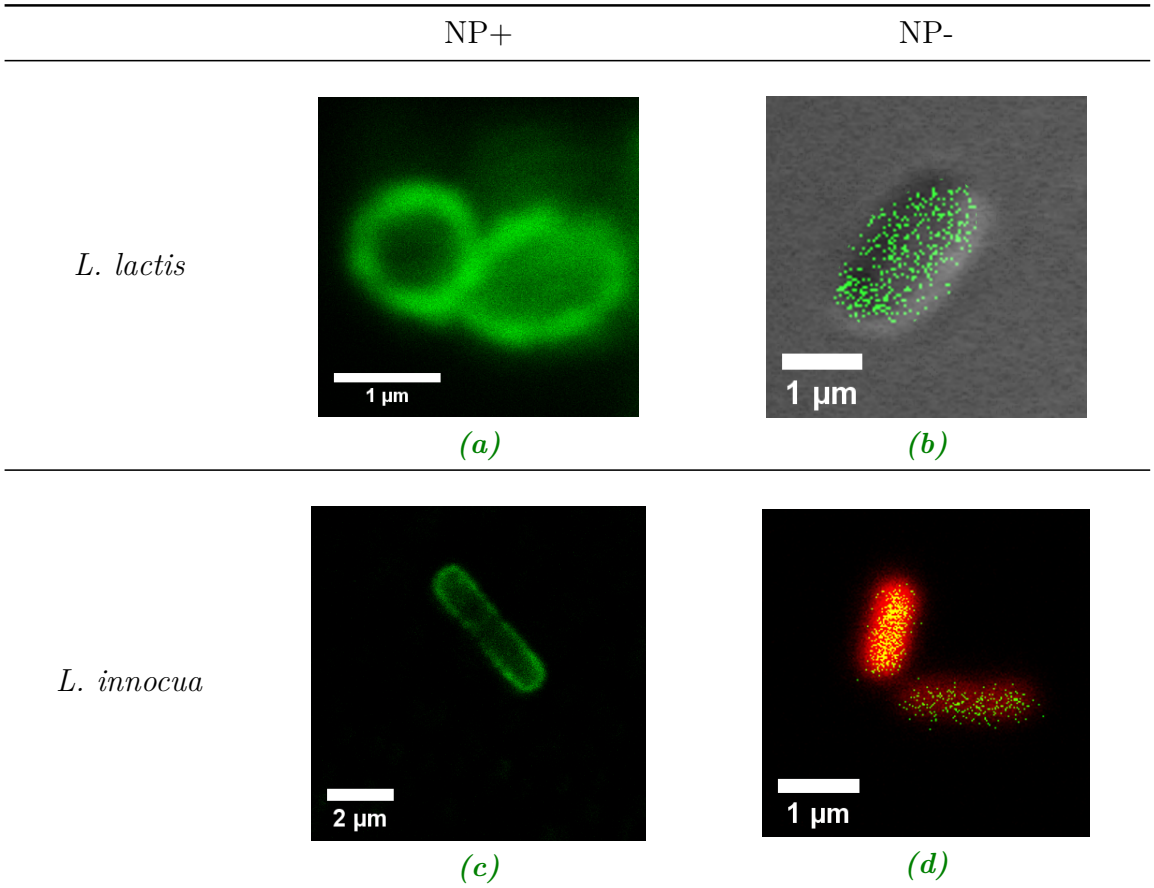


Figure 3.6. – *Imagerie d'intensité de fluorescence des NP+ (a et c) et NP- (b et d) en interaction avec les bactéries L. lactis et L. innocua par dépôt sur une lamelle de verre d'une suspension bactéries-NP de concentrations respectives $\sim 10^7$ UFC/mL et 5×10^{10} NP/mL.*
Le signal de fluorescence des bactéries en interaction avec les NP+ étant très intense, les images sont présentées telles quelles. En présence de NP-, la luminosité des bactéries marquées est nettement plus faible et afin de les localiser, l'image d'intensité de fluorescence a été superposée à l'image en transmission de la cellule (b) ou au signal de fluorescence intracellulaire de la bactérie marquée au Syto61 (d).

3.5.2. Par microscopie électronique

Le MEB permet d'atteindre une résolution de l'ordre de quelques nanomètres et donc de visualiser plus précisément l'interaction bactéries-nanoparticules (le principe de la méthode est rappelé dans l'annexe 2.C). Les expériences de MEB ont été réalisées en utilisant un ratio de 20 000 NP/bactérie, et la concentration en bactéries a été augmentée à 10^8 bactéries/mL pour avoir de bonnes conditions d'observation

(annexe 3.F).

Les résultats de MEB obtenus avec les NP+ sont présentés Figure 3.7. Ils confirment ceux obtenus par les mesures de mobilité électrophorétique et par imagerie de fluorescence : les NP+ recouvrent complètement la surface des bactéries *L. lactis* et *L. innocua*. On remarquera également le recouvrement uniforme de la surface de verre (chargée négativement) par les nanoparticules positives confirmant leur large excès. La présence d'un espace interstitiel entre chaque nanoparticule est probablement due à la déshydratation des échantillons.

Comme déjà montré par imagerie de fluorescence, des NP- interagissent avec les sites chargés positivement de la surface des bactéries et recouvrent également les quelques sites d'hétérogénéité (chargés positivement) de la surface de la lame de verre (figures 3.8a et 3.8b). Néanmoins, le faible nombre de particules en interaction avec les bactéries interpelle si l'on se réfère au résultat obtenu par imagerie de fluorescence. Le protocole de préparation des échantillons requis pour le MEB (plusieurs étapes de rinçage et séchage au point critique du CO_2, cf. annexe 3.F) pourrait favoriser la dissociation des NP- de la surface des bactéries. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons donc réalisé des observations par MET, méthode qui nécessite un protocole de préparation des échantillons moins drastique (annexe 3.F).

Les résultats de MET sont rassemblés figures 3.8c et 3.8d. On observe une différence notoire du nombre de NP- en interaction avec les bactéries, un résultat conforme aux images de fluorescence. Les nanoparticules sont régulièrement réparties sur la surface de la paroi des bactéries *L. lactis* alors que pour les bactéries *L. innocua*, les NP- semblent préférentiellement localisées aux pôles de la cellule. Ces résultats demandent à être confirmés par la répétition de plusieurs expériences.

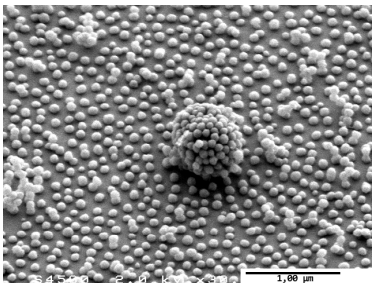
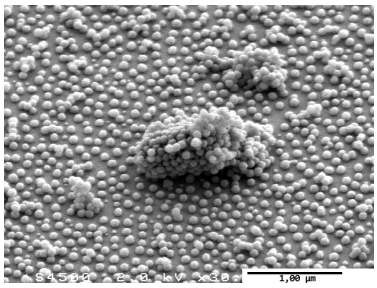
	L. lactis	*L. innocua*
NP+		
	(a)	***(b)***

Figure 3.7. – *Observations par MEB de mélanges (a) bactéries L. lactis-NP+ et (b) bactéries L. innocua-NP+.*

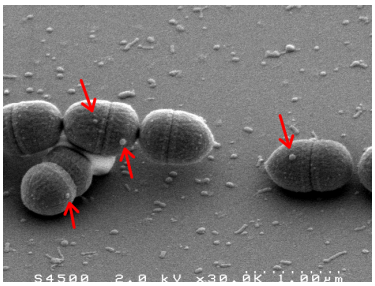
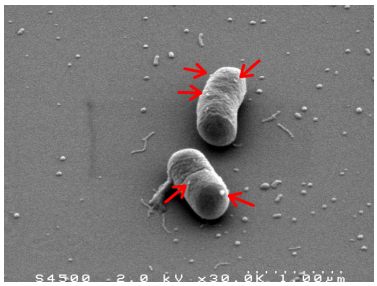
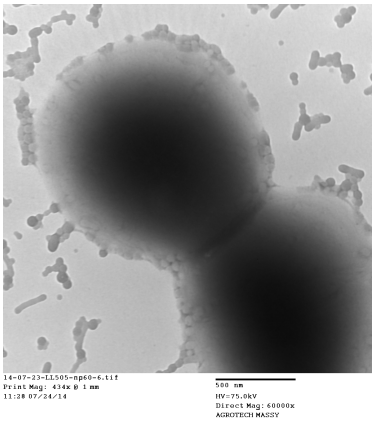
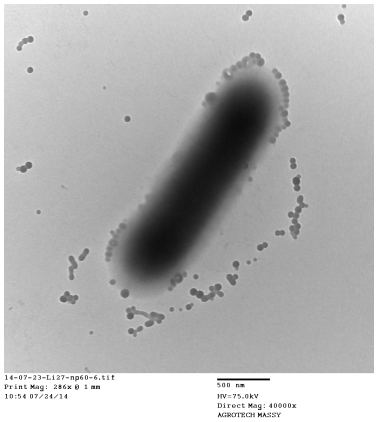
	L. lactis	*L. innocua*
MEB		
	(a)	***(b)***
MET		
	(c)	***(d)***

Figure 3.8. – *Imagerie par microscopie électronique à balayage et à transmission de mélanges (a et c) bactéries L. lactis/NP-, (b et d) bactéries L. innocua/NP-.*

Les données majeures obtenues dans cette partie du travail concernent :

- **L'absence de toxicité des NP+ et NP- sur la croissance et la survie des bactéries pour les temps d'observation de nos expériences ($\sim$ 3 heures) ;**
- **La possibilité de saturer la surface des bactéries avec des NP+, ce qui a pour effet d'une part de masquer les entités de surface des cellules qui pourraient conditionner l'adhésion et d'autre part d'obtenir une charge totalement positive par saturation des charges ;**
- **La mise en évidence d'une micro-hétérogénéité de charges positives à la surface des bactéries qui peuvent être saturées par les NP- rendant ainsi la charge de surface de la bactérie totalement négative.**

Souches bactériennes - présentation et protocoles expérimentaux

3.A. Souches bactériennes utilisées

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à 2 espèces bactériennes différentes en terme de taille, de forme et de propriétés physico-chimiques.

Nous avons ainsi étudié 2 souches de *Lactococcus lactis* (figure 1.5, chapitre 1) bactéries non-pathogènes (classe I) à caractère Gram positif, utilisées pour la fermentation de produits laitiers, de forme ovococcoïde d'environ 1 µm de diamètre : l'une plutôt hydrophile (*L. lactis* ssp. cremoris MG1363, identifiée *L. lactis* 505) et l'autre hydrophobe (*L. lactis* ssp. cremoris MG1363 PrtP+, identifiée *L. lactis* 507). Cette dernière est obtenue par activation des protéases PrtP (« PrtP+ ») ancrées dans les parois cellulaires de la souche sauvage.
Les bactéries de *L. lactis* sont cultivées dans le milieu M17 (M17B) (BD Difco, USA) dont la composition est la suivante (pour 950 mL d'eau purifiée) :

- Hydrolysat pancréatique de caséine ..... 5,0 g
- Peptone de soja ..... 5,0 g
- Extrait de bœuf ..... 5,0 g
- Extrait de levure ..... 2,5 g
- Acide ascorbique ..... 0,5 g
- Sulfate de magnésium ..... 0,25 g
- β-glycérophosphate disodique ..... 19,0 g

À ce milieu, on rajoute, après stérilisation à l'autoclave, 1 % (v/v) d'une solution de glucose à 50 % (m/v) (de sorte que le milieu final contienne 0,5 % de glucose). Dans ces conditions le pH du milieu est donné à $7{,}1 \pm 0{,}2$.
Lorsque les bactéries sont cultivées en milieu nutritif solide, le milieu utilisé est alors la gélose M17 (M17A) dont la composition est identique à celle décrite ci-dessus et contenant en plus 11,0 g d'agar.

Nous nous sommes également intéressés à 2 souches de *Listeria innocua* (figure 1.6, chapitre 1), bactéries non-pathogènes à caractère Gram positif, en forme de bacille (bâtonnet) d'environ 1,5 µm de longueur, rencontrées dans le domaine agroalimentaire : la souche identifiée 2.7 (moyennement hydrophobe) et la souche dite 2.12 (hydrophile).
Les bactéries de *L. innocua* sont cultivées dans le milieu TSB (Tryptic Soy Broth) dont la composition est la suivante (pour 1 L d'eau purifiée) :

— Peptone de caséine (bovin) ..... 17,0 g
— Peptone de soja ..... 3,0 g
— Chlorure de sodium ..... 5,0 g
— Phosphate bipotassique ..... 2,5 g
— Glucose ..... 2,5 g

Dans ces conditions le pH du milieu est donné à $7{,}3 \pm 0{,}2$.
Lorsqu'elles sont cultivées en milieu nutritif solide, le milieu utilisé est alors le TSA (Tryptic Soy Agar) dont la composition est identique à celle décrite ci-dessus auquel est ajouté 11,0 g d'agar.

3.B. Obtention des suspensions bactériennes

Les souches bactériennes sont stockées à −20 °C dans des cryotubes de 1 mL de glycérol à 20 %.
Les suspensions bactériennes de travail ont été obtenues en procédant auparavant à plusieurs sous-cultures (appelées « repiquages ») (figure 3.B.1). Le premier repiquage (R1) est obtenu en diluant le contenu d'un cryotube dans 9 mL de milieu de culture frais (respectivement du M17B pour les souches de *L. lactis* et du TSB pour les souches de *L. innocua*), et placé à l'incubateur à la température optimale de croissance des bactéries (30 °C pour *L. lactis* ; 37 °C pour *L. innocua*) pendant ∼ 16 h.
Un deuxième repiquage (R2) est effectué en prélevant 1 mL de R1 que l'on ajoute à 9 mL de milieu de culture frais. Le mélange est ensuite placé à l'incubateur pendant ∼ 8 h, toujours à la température optimale de croissance des cellules.
Enfin, le troisième repiquage (R3) est effectué en prélevant 1 mL de R2 que l'on ajoute à 49 mL de milieu de culture frais. Le mélange est placé à l'incubateur pendant ∼

16 h.

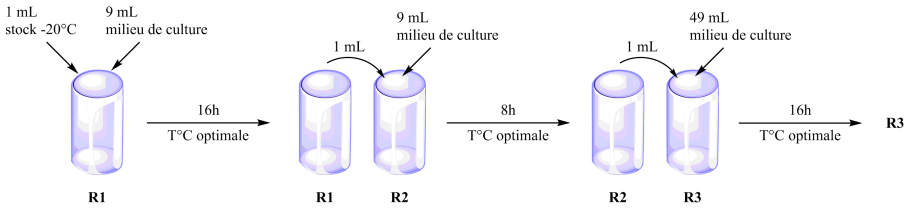


Figure 3.B.1. *– Schéma du processus de culture des souches bactériennes pour nos études. Le milieu de culture et la température optimale dépendent de la souche utilisée.*

Au début de chaque expérience, 20 mL de la suspension R3 sont centrifugés pendant 10 minutes à une vitesse de 7000 g, et à une température de 4 °C dans une centrifugeuse préalablement refroidie. Le surnageant est prélevé précautionneusement et le culot cellulaire est re-suspendu dans 20 mL d'eau distillée stérile.
Trois centrifugations successives sont ainsi réalisées. La turbidimétrie (mesure de la densité optique ou DO) de la suspension bactérienne finale est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (modèle *Heλios ϵ*, ThermoSpectronic). Un étalonnage préalable permet de corréler pour une souche donnée, la mesure de DO avec la concentration cellulaire. La lecture se fait à 600 nm afin de s'affranchir de tout effet d'absorption de la lumière par les bactéries.
On notera qu'à la température de 37 °C les bactéries *L. innocua* ne sont pas pourvues de flagelles comme observé à température ambiante [10].

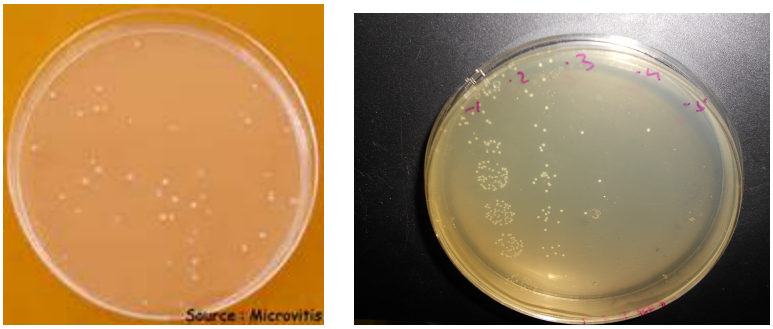
3.C. Dénombrement des bactéries viables-cultivables

Le dénombrement des bactéries viables-cultivables est une technique permettant de déterminer visuellement le nombre d'unités bactériennes formant colonies (UFC), i.e. le nombre de bactéries capables de se multiplier dans le milieu. Ce nombre peut être rapporté à une unité de volume (UFC/mL) ou de surface (UFC/cm^2).

On distingue 2 méthodes pour effectuer ces dénombrements.
La première consiste à effectuer des dilutions successives (typiquement 5 dilutions) au 1/10 dans l'eau distillée ou l'eau physiologique (selon l'expérience considérée) de la suspension bactérienne initiale. On dépose ensuite 1 mL de chaque dilution dans une

10. Bouttier et al. 1995.

boîte de Pétri contenant la gélose nutritive adaptée à la souche bactérienne (milieu de culture de la bactérie auquel on a ajouté de l'agar) en surfusion (afin d'obtenir une bonne répartition des bactéries dans toute la gélose). L'ensemble se solidifie après refroidissement. La boîte de Pétri est alors fermée, retournée pour minimiser la condensation d'eau sur la gélose et placée à l'incubateur pendant 24 h à la température de croissance optimale de la souche bactérienne considérée. On compte alors visuellement le nombre de colonies contenues dans chaque boîte définissant la concentration bactérienne en UFC (Unités Formant Colonie ; figure 3.C.1a). Cette technique est facile à mettre en œuvre, sensible car les colonies sont bien différentiées sur la boîte de Pétri (on peut dénombrer jusqu'à 300 colonies par boîte) et on ne considère qu'une dilution par boîte, mais présente l'inconvénient d'être consommatrice en matériel microbiologique (gélose, boîtes de Pétri, ...), et de sous-estimer la concentration bactérienne dans le cas où les bactéries ne sont pas initialement séparées.



(a) *Dénombrement "classique"* ***(b)*** *Dénombrement par micro-spots*

Figure 3.C.1. *– Dénombrements de colonies bactériennes sur une gélose. Une colonie est obtenue à partir d'une bactérie. Le nombre de colonies nous permet de déterminer la concentration bactérienne en terme d'unités formant colonie (UFC).*

La seconde méthode, plus couramment utilisée dans notre équipe, est appelée dénombrement par micro-spots. Seuls 10 µL de chaque dilution bactérienne (spot) sont déposés sur la gélose déjà solidifiée. Chaque spot est reproduit 6 fois pour une même dilution. On peut ainsi disposer dans une seule boîte jusqu'à 4 dilutions d'une même suspension bactérienne. Après séchage des dépôts, la boîte est fermée, retournée puis placée à l'incubateur pendant 24 h à la température de croissance de la souche bactérienne. On dénombre alors les bactéries dans chaque microspot (typiquement moins de 10 bactéries pour la plus forte dilution et 50 – 100 bactéries pour la plus faible

dilution) (figure 3.C.1b).
Cette méthode permet d'obtenir une meilleure statistique de dénombrement des colonies bactériennes mais requiert une grande acuité visuelle du fait du nombre important de micro-spots à dénombrer sur chaque boîte, pas toujours bien différenciés.

3.D. Cinétiques de croissance et courbes de survie des bactéries

Les bactéries se multiplient par scissiparité, ce qui se traduit par une croissance exponentielle des populations qui obéit à l'équation :

$$N_t = N_0 \times 2^{\mu \cdot t} \tag{3.1}$$

où N_t représente le nombre de bactéries à l'instant t, N_0 le nombre initial de bactéries, et μ le taux de croissance, c'est-à-dire le nombre de doublement de la population par unité de temps.

Expérimentalement, les courbes de croissance des cellules bactériennes sont obtenues à partir de mesures à intervalles de temps réguliers, soit de la DO des suspensions bactériennes, soit du dénombrement des cellules viables-cultivables. Cette dernière méthode est précise mais chronophage et dans le cadre de ce travail les mesures n'ont pu être réalisées que sur 6 heures. Les mesures de DO sont au contraire rapides et permettent l'acquisition de plus de points de mesure et sur des temps plus longs. Les courbes de croissance ont ainsi pu être analysées en utilisant un modèle analytique (équation 3.2) appelé modèle de Gompertz (figure 3.D.1), permettant d'avoir accès au taux de croissance maximum μ_{max} et au temps de latence lag de la bactérie :

$$f(t, \theta_1) = \ln(DO_0) + \ln\left(\frac{DO_{max}}{DO_0}\right) \times \exp\left[-\exp\left(1 + \frac{\mu_{max} e^1}{\ln\left(\frac{DO_{max}}{DO_0}\right)} \times (lag - t)\right)\right] \tag{3.2}$$

avec

- t le temps,
- $\theta_1 = (DO_{max}, DO_0, lag, \mu_{max})$,
- DO_{max} la DO maximale mesurée,
- DO_0 la DO minimale appelée DO témoin.

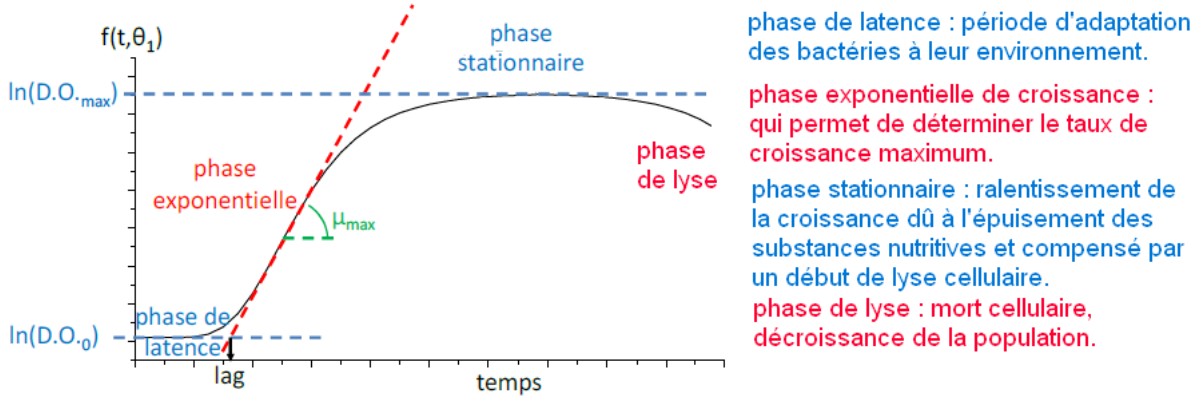


Figure 3.D.1. – *Modèle de Gompertz appliqué aux courbes de croissance. Adapté de : (*Bulard *2012).*

Les courbes de croissance ont été obtenues à partir de suspensions bactériennes (bactéries seules, ou en présence de NP+/NP-) dans leur milieu de culture respectif, à la concentration initiale de 10^5 UFC/mL (volume total de la suspension 50 mL). Pour les dénombrements des bactéries viables-cultivables et les mesures de DO, on prélève respectivement 100 µL et 1 mL de la suspension.
Les mesures de DO sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre (*Heλios ϵ*, ThermoSpectronic) à la longueur d'onde 600 nm (longueur d'onde pour laquelle la lumière est diffusée par la biomasse bactérienne mais pas absorbée et correspond donc bien à une mesure de turbidimétrie du milieu). Pour chaque point on réalise une mesure de référence sur une cuve contenant du milieu de culture seul. La DO mesurée sera soustraite de celle obtenue avec une suspension cellulaire dans la cuve. Un problème s'est posé avec le milieu M17 requis pour la croissance des bactéries *L. lactis*. Ce milieu présente lui-même une certaine turbidité qui augmente avec la concentration en cellules. Il s'ensuit une moindre lumière transmise et donc une mesure de DO (différence entre le signal incident et le signal transmis) sur-évaluée. Les conséquences sont :

— une phase de latence qui peut apparaître plus courte,
— une phase exponentielle de croissance qui peut apparaître plus longue,
— l'impossibilité dans notre cas de déterminer la concentration bactérienne à partir de la DO, la courbe de référence ayant été obtenue dans l'eau (milieu non turbide).

Il apparaît ainsi que la détermination des concentrations cellulaires à partir de mesures de DO peut comporter des artefacts de mesures inexistants lors des mesures de populations viables-cultivables.

Les courbes de survie des différentes populations bactériennes sont réalisées à partir des suspensions cellulaires ajustées à 10^7 UFC/mL auxquelles on ajoute ou pas (contrôle) les NP+ et NP- à la concentration de 2×10^{11} NP/mL. Le suivi de la survie bactérienne se fait ensuite par dénombrement des bactéries viables-cultivables à intervalle de temps régulier.

3.E. Détermination du caractère hydrophobe/hydrophile et acide-base de Lewis des bactéries par MATS

Le caractère hydrophile/hydrophobe et acide-base de Lewis de la paroi bactérienne est liée à sa composition chimique élémentaire. Plusieurs méthodes ont été proposées pour estimer ces propriétés physico-chimiques des microorganismes [11]. La méthode utilisée dans le cadre de ce travail repose sur la distribution de phase, la MATS (*Microbial Adhesion to Solvents*) [12] : elle consiste à quantifier la répartition des cellules entre une phase aqueuse et une phase organique.

Le caractère hydrophobe/hydrophile d'une bactérie sera déterminé en utilisant l'eau et un solvant apolaire. De la même façon, le caractère acidobasique au sens de Lewis de la bactérie sera déterminé en utilisant deux solvants ayant des caractéristiques accepteur/donneur d'électrons différentes mais possédant les même tensions de surface de Lifshitz-van der Waals.

Nous avons utilisé les couples de solvants suivant :

— l'eau et l'hexadécane (apolaire) et l'eau et le décane (apolaire) afin de déterminer le caractère plutôt hydrophobe ou plutôt hydrophile de la souche bactérienne.

— le chloroforme (accepteur d'électron, acide de Lewis) et l'hexadécane,

— l'acétate d'éthyle (donneur d'électron, base de Lewis) et le décane,

11. Mozes et Rouxhet 1987.
12. Bellon-Fontaine, Rault et Van Oss 1996.

Tableau 3.E.1. *– Caractéristiques énergétiques en mJ/m^2 des solvants de la MATS. γ_L^{LW} représente la composante de Lifshitz-van der Waals, γ_L^+ la composante accepteur d'électron et γ_L^- la composante donneur d'électron.*

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

Les propriétés des différents solvants sont répertoriées dans le tableau 3.E.1.

Les mesures de MATS sont réalisées en mélangeant 1,5 mL de la suspension bactérienne préalablement ajustée à une DO initiale de 0,8 à 400 nm, à 0,25 mL de chacun des solvants énumérés ci-dessus (figure 3.E.1). Une première homogénéisation du mélange est réalisée manuellement avant de le maintenir sous agitation au vortex pendant 2 minutes. Le mélange est ensuite laissé au repos pendant 15 minutes, le temps que la séparation entre la phase organique et la phase aqueuse soit complète. On mesure alors l'affinité de la souche bactérienne pour chaque solvant de la manière suivante :

$$\%_{affinité} = \frac{DO_i - DO_f}{DO_i} \times 100 \tag{3.3}$$

où DO_i et DO_f sont respectivement la DO de la suspension bactérienne dans l'eau distillée AVANT et APRÈS interaction avec le solvant organique.

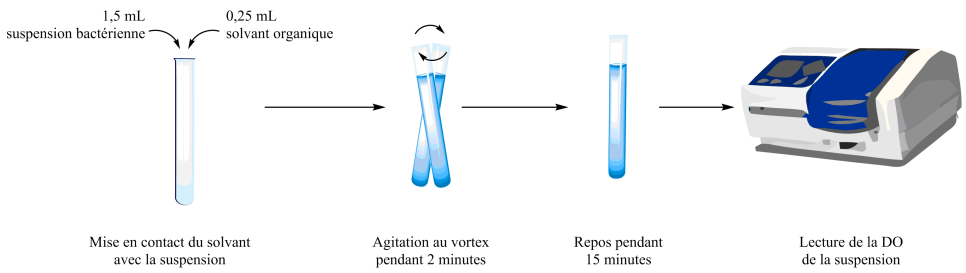


Figure 3.E.1. *– Principe expérimental de la MATS*

Lorsque $\%_{affinité} \to 0$ alors on a $DO_i = DO_f$: les bactéries n'ont pas d'affinité pour le solvant étudié. Au contraire, lorsque $\%_{affinité} \to 100$, alors les bactéries ont une grande affinité pour le solvant. Chaque mesure est répétée 3 fois dans un même solvant.

3.F. Imagerie de l'interaction nanoparticule-bactérie

Les principes des microscopies électroniques à balayage (MEB) et à transmission (MET) sont décrits dans l'annexe 2.C du chapitre 2. Nous ne détaillerons ici que la préparation des échantillons et les dispositifs utilisés pour visualiser l'interaction nanoparticule-bactérie.

Pour les observations par MEB, 20 µL de suspension de bactéries seules (à la concentration $\sim 10^8$ UFC/mL) ou en présence de nanoparticules (concentration en NPs 2×10^{12} NP/mL) sont déposées pendant 3 h sur des surfaces de verre préalablement nettoyées à l'éthanol et séchées à l'air. L'échantillon est ensuite fixé en ajoutant une solution à 2,5 % de glutaraldéhyde tamponnée dans 0,1 M de cacodylate de sodium à pH = 7,4 pendant 1 h à température ambiante. Il est alors rincé 3 fois durant 10 minutes à température ambiante avec un tampon de cacodylate de sodium. Puis, la préparation est déshydratée par rinçages successifs dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (50 %, 70 %, 90 % puis 2 fois 100 %) pendant 10 minutes à chaque fois. Le dispositif Quorum Technologies K850 permet de soumettre les échantillons au point critique du CO_2 pendant 3 heures (Pc = 75 bar et Tc = 37 °C). Enfin, l'échantillon est fixé sur un support en aluminium, que l'on place dans le dispositif Polaron SC7640 (réglé à 10 mA et 0,8 kV) pendant 200 secondes afin d'assurer un revêtement Au-Pd. Les observations sont réalisées grâce au microscope Hitachi S4500 de la plateforme MIMA2 [13] de l'unité MICALIS [14]. L'échantillon est incliné à 45° afin d'observer les électrons secondaires et obtenir un meilleur contraste lors de l'observation.

Pour l'imagerie MET, 50 µL de suspension bactérienne de population $\sim 10^8$ UFC/mL sont dilués dans un volume équivalent de PBS pH = 7,4 (tampon phosphate 10^{-2} M et chlorure de sodium 0,154 M, pH = 7,4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Les échantillons sont ensuite déposés durant 3 minutes sur des grilles de cuivre enduites de carbone (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) permettant l'adsorption des bactéries. Une solution d'agent contrastant, l'acide phosphotungstique (1 %m/v,

13. Microscopie et Imagerie des Micro-organismes, Animaux et Aliments (http ://mima2.jouy.inra.fr/)
14. MIcrobiologie de l'ALImentation au service de la Santé (http ://www.micalis.fr/), UMR 1319 INRA-AgroParisTech

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), est déposée pendant 20 secondes puis l'excédent est absorbé par un papier filtre Whatman.
L'échantillon est finalement observé à l'aide d'un microscope Hitachi H-600 de la plateforme MIMA2, doté d'une tension de 75 kV, et équipé d'une caméra CCD 1024×1024 pixels^2 (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) pilotée par le logiciel de contrôle et de capture d'image AMT (version 5.42).

Le dispositif de microscopie de fluorescence utilisé pour visualiser l'interaction NP-bactérie mais aussi l'adhésion bactérienne et la formation des biofilms est décrit dans l'annexe 4.D du chapitre 4. Les échantillons ont été excités à une longueur d'onde $\lambda_{exc} = 488$ nm et l'émission collectée entre $500 - 700$ nm. Ils ont été observés pour des concentrations bactériennes de 10^7 bactérie/mL et des concentrations en NP de 5×10^{10} NP/mL (ce qui correspond à un ratio de 5000 NP/bactérie).

4. Adhésion bactérienne et croissance d'un biofilm : rôle des interactions physico-chimiques

L'adhésion de bactéries à des surfaces solides dans un système aqueux est une interaction complexe mettant en jeu tout à la fois les propriétés de la bactérie, du substrat solide et du milieu de suspension. A l'approche d'une surface, une barrière de potentiel s'établit : elle résulte de la compétition entre forces adhésives et répulsives dont va dépendre le processus d'adhésion, s'il se produit. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 1 plusieurs modèles théoriques, initialement proposés pour l'étude des colloïdes, tels que la théorie DLVO ou la théorie DLVO étendue ont été utilisés pour décrire ces processus. Cependant les prédictions sur ces interactions bactérie-surface ont un succès et une fiabilité limités. Une des raisons pourrait être que ces prédictions ne prennent pas en compte l'hétérogénéité physico-chimique spatiale des bactéries et/ou du substrat qui pourrait être un facteur important dans la réactivité des biointerfaces (bactérie-support, bactérie-bactérie, bactérie-matrice extra-cellulaire des biofilms).

Cette (micro)-hétérogénéité de la paroi de surface d'une bactérie et de la surface du substrat joue-t-elle un rôle important dans le processus d'adhésion puis dans la croissance d'un biofilm ? Quelles sont les propriétés physico-chimiques (de type électrostatique, Van der Waals, acide-base de Lewis) et physiologiques des cellules qui jouent un rôle prépondérant dans ces processus ? Telles sont les questions auxquelles nous essaierons d'apporter des réponses dans le cadre de ce chapitre avec une approche originale utilisant les nanoparticules cationiques et anioniques décrites au chapitre 2.

L'adhésion sur une surface modèle de verre de chacune des souches de bactérie *L. lactis* et *L. innocua* sous leur forme hydrophile et hydrophobe, en absence et en présence de NP+ et NP- sera décrite. La bioadhésion étant un processus qui dépend aussi des propriétés du milieu environnant, nos expériences ont été réalisées dans l'eau distillée mais aussi dans l'eau physiologique (9 g/L de NaCl, correspondant à une force ionique $I = 0{,}15\,\mathrm{mol/L}$) : dans ce dernier cas, les ions du milieu vont

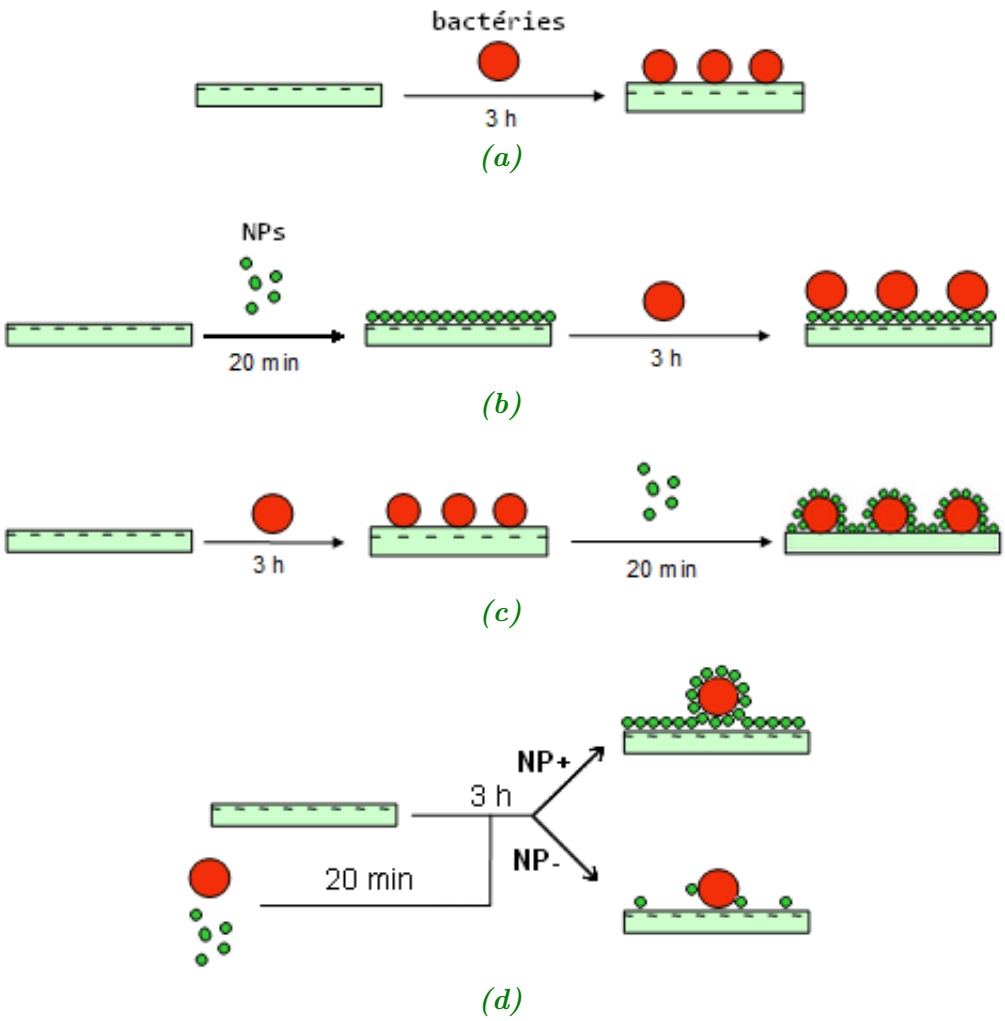


Figure 4.1. – *Schéma représentant les expériences d'adhésion réalisées : (a) adhésion de bactéries sur le verre nu, (b) adhésion de bactéries sur une surface préalablement recouverte de nanoparticules cationiques, (c) interaction de nanoparticules cationiques sur des bactéries adhérentes, (d) adhésion de bactéries en interaction avec les nanoparticules cationiques ou anioniques*

« écranter » fortement les charges de surface des différentes entités, substrat, cellules, nanoparticules, et ainsi réduire le rôle des interactions électrostatiques.

Cette description à l'échelle moléculaire des processus régissant la réactivité de la bio-interface bactéries-support sera poursuivie par une étude du rôle de l'interface bactérie-bactérie au cours de la formation d'un biofilm. Dans le cadre de ce travail de thèse, seule la souche hydrophobe de *L. innocua* a été sondée.

Les différents modèles d'adhésion étudiés sont schématisés figure 4.1. Leurs protocoles de mise en œuvre sont détaillés dans l'annexe de ce chapitre. Les méthodes utilisées pour caractériser l'adhésion bactérienne sont la microscopie de fluorescence (annexe 4.D) et les méthodes classiques microbiologiques de dénombrement des bactéries (annexe 3.C).

4.1. La surface d'adhésion

L'adhésion bactérienne a été réalisée sur des lamelles de microscope en verre, substrat hydrophile. Le caractère hydrophobe/hydrophile de cette surface a été contrôlé par des mesures d'angle de contact (figure 4.2). Les résultats montrent que le verre après nettoyage possède une hydrophilie de surface attendue (angles de contact $< 5°$), en comparaison avec les lamelles non nettoyées pour lesquelles on obtient un caractère beaucoup moins hydrophile (angle mesuré $\sim 60°$).
On notera également que le recouvrement de la surface par les nanoparticules cationiques ne modifie pas de manière importante le caractère hydrophile de la lamelle : l'angle de contact de gouttelettes d'eau sur cette surface modifiée vaut $\sim 15°$. Les lamelles nettoyées sont conservées dans de l'eau distillée, pour éviter toute contamination par l'air ambiant. Leur hydrophilie est vérifiée avant chaque utilisation par l'observation de l'étalement complet d'un film d'eau.
Cette hydrophilie de la surface est corrélée à un caractère donneur d'électrons (base de Lewis) tel que déjà rapporté dans la littérature (tableau 4.1) [1].

Tableau 4.1. *– Angle de contact avec l'eau et composantes donneur (γ^-) et accepteur (γ^+) d'électron (exprimées en mJ·m^{-2})du verre. Données issues de la littérature (* Habimana *et al. 2007)*

	Angle de contact	γ^-	γ^+
Verre	10°	55	4

Nous avons contrôlé par microscopie de fluorescence le recouvrement de la surface de verre par les NP+ et NP-. Pour ce faire, les lamelles de verre ont été

1. Barberousse et al. 2007 ; Habimana et al. 2007 ; Van Oss 1996.

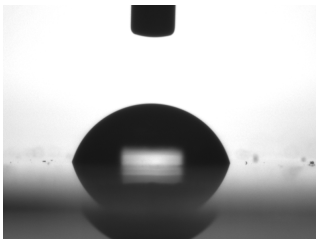
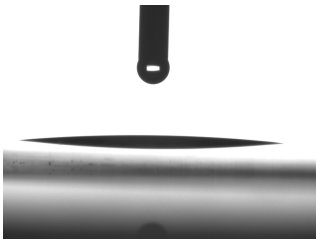
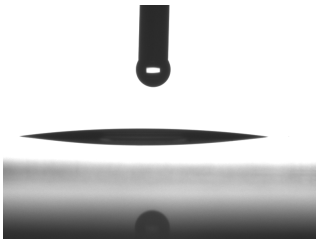
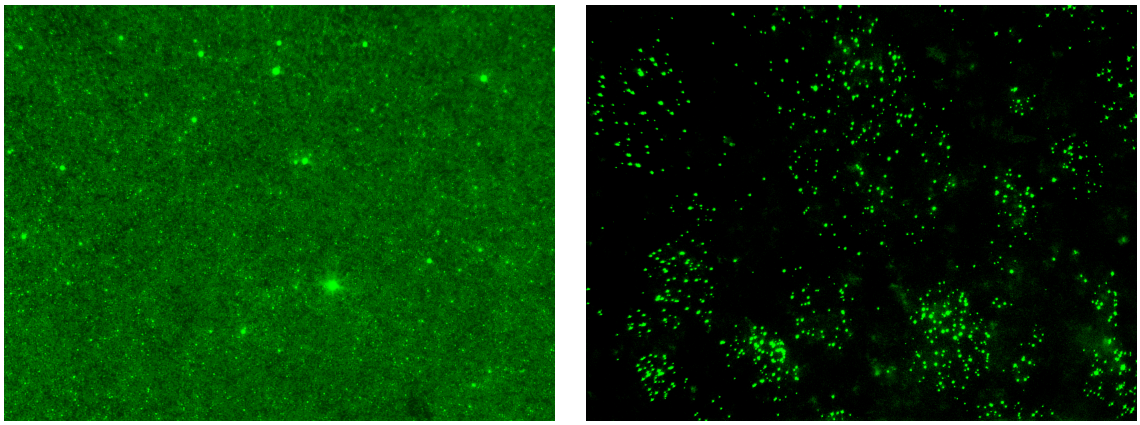
	Lamelle de verre non nettoyée	Lamelle de verre nettoyée	Lamelle de verre nettoyée recouverte de NP+
Angle de contact			
	$62{,}7 \pm 2{,}4°$	$< 5°$	$14{,}0 \pm 2{,}3°$

Figure 4.2. – *Caractérisation du caractère hydrophobe/hydrophile des lamelles de verre utilisées pour les expériences d'adhésion par mesure d'angle de contact.*



(a) ***(b)***

Figure 4.3. – *Observation par microscopie d'épifluorescence du recouvrement d'une surface de verre nettoyée par des NP+ (a) et NP- (b). Concentration des solutions $\sim 2 \times 10^{11}$ NP/mL. Les nanoparticules sont mises en contact avec le verre pendant 15 minutes. Les images ont été acquises à l'aide d'un objectif de grossissement $\times$ 40 (dimensions : $222 \times 167 \mu m^2$). Les conditions d'analyse et d'excitation de la fluorescence sont celles utilisées pour le BODIPY.*

mises en contact avec 3 mL d'une solution de nanoparticules à la concentration de 2×10^{11} NP/mL (la concentration utilisée la plus élevée) pendant 15 minutes.

L'intensité de fluorescence observée sur toute la lamelle (figure 4.3a) caractérise un fort recouvrement du support par les NP+ et confirme la charge de surface globalement négative du verre. On remarquera cependant que cette charge n'est pas homogène. En effet, lorsque l'on expose la surface de verre avec des NP- on peut visualiser un nombre non négligeable de microspots fluorescents caractérisant des défauts de charges positives de la lamelle de verre (figure 4.3b). Ces données sont à rapprocher des observations similaires obtenues en microscopie électronique (chapitre 3, figures 3.7 et 3.8).
On peut par ailleurs estimer, en considérant une surface de verre de $\sim 5\,\mathrm{cm}^2$ et celle d'une NP+ ($\sim 10^{-10}\,\mathrm{cm}^2$), que le recouvrement total de la lamelle par les NP+ est atteint avec $\sim 5 \times 10^{10}$ NP+, ce qui conforte les observations expérimentales de la figure 4.3.

4.2. Adhésion bactérienne

4.2.1. Quelles interactions conditionnent l'adhésion de nos bactéries sur une surface de verre ?

Nous avons quantifié l'adhésion de chaque souche bactérienne, dans l'eau distillée et l'eau physiologique, sur une surface de verre nue ou recouverte de NP+, afin de contrôler l'importance des différentes interactions (électrostatiques, Van der Waals) et des propriétés physico-chimiques de surface des bactéries, du verre et des nanoparticules (caractère acide-base de Lewis, hydrophobie) dans l'adhésion (figure 4.4). L'étude des surfaces de verre recouvertes de NP- a aussi été initiée mais pas poursuivie car les inhomogénéités de charges positives des lamelles restent des événements trop rares et non reproductibles pour que les résultats d'adhésion se distinguent de ceux obtenus sur du verre nu.

Pour chaque expérience, l'adhésion a été observée (figure 4.5) et quantifiée par imagerie de fluorescence qui permet le dénombrement de la flore bactérienne totale ayant adhéré. Ces mesures ont été complétées par le dénombrement des bactéries viables-cultivables après adhésion (figure 4.6).
On notera d'ores et déjà que, compte tenu de la précision des mesures, la quantifi-

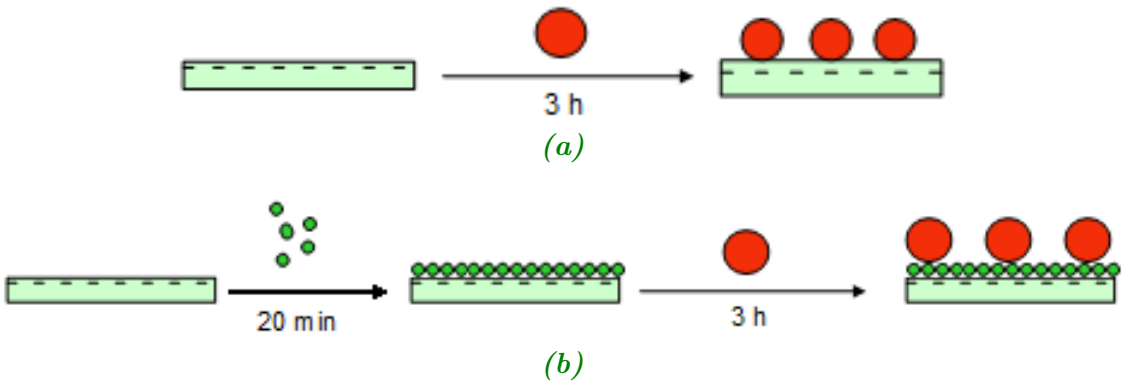
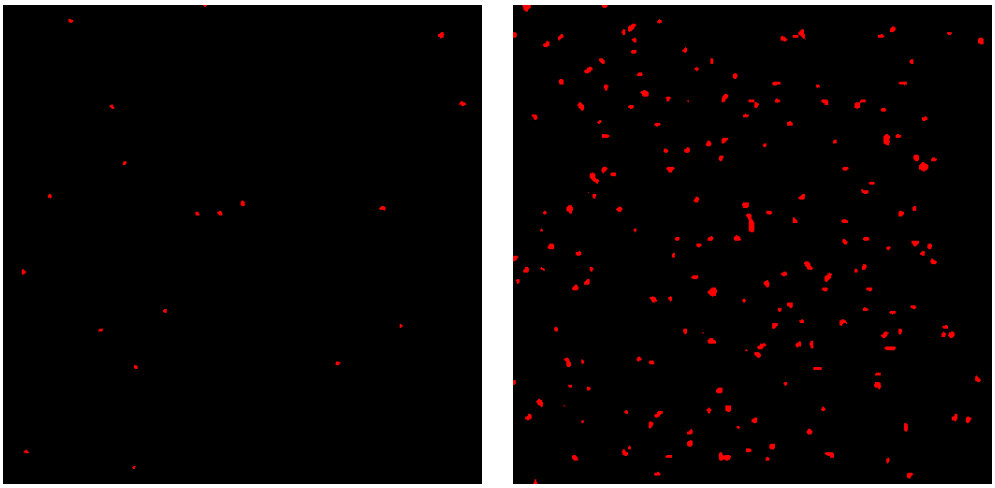


Figure 4.4. – *Schémas représentant les expériences d'adhésion : (a) adhésion de bactéries sur le verre, (b) adhésion de bactéries sur une surface de verre préalablement recouverte de NP+.*

cation de l'adhésion par ces deux méthodes donne pour toutes les expériences des résultats comparables (figures 4.6, 4.9, 4.12 et 4.16).

De nombreuses données de la littérature montrent que les propriétés de surface (hydrophobie, caractère donneur/accepteur d'électrons) des bactéries et des supports peuvent jouer un rôle important dans le processus d'adhésion. En particulier, il est courant d'observer que les souches hydrophiles préfèrent les surfaces hydrophiles et les souches hydrophobes les surfaces hydrophobes [2]. Cependant d'autres travaux révèlent que c'est plutôt l'hydrophobie du substrat plutôt que celle de la surface de la bactérie qui jouerait le rôle le plus important dans le processus d'adhésion [3].
Ces diverses observations rapportées dans la littérature peuvent apparaître divergentes. Elles révèlent surtout que l'adhésion bactérienne est complexe et dépend de nombreux facteurs (nature des souches bactériennes et du substrat, mais aussi les protocoles expérimentaux utilisés (temps d'adhésion, rinçage des échantillons après adhésion ...)).
Que les expériences aient été réalisées dans l'eau distillée ou l'eau physiologique, le caractère hydrophobe (*L. lactis* 507 et *L. innocua* 2.7) ou hydrophile (*L. lactis* 505 et *L. innocua* 2.12) de la souche bactérienne n'engendre aucune différence significative dans le nombre de cellules adhérentes (figures 4.6a et 4.6b). Il faut donc considérer que notre modèle d'étude (surface de verre hydrophile, 3 h d'adhésion et rinçage des lamelles) ne révèle aucun rôle des propriétés d'hydrophilie/phobie des surfaces

2. Habimana, Legoff et al. 2007.
3. Katsikogianni et Missirlis 2004 ; Vacheethasanee et al. 1998.



(a) ***(b)***

Figure 4.5. – *Illustration de l'adhésion de bactéries L. innocua dans l'eau distillée (a) sur une surface de verre nue, (b) sur une surface de verre préalablement recouverte de NP+. Les bactéries ont été marquées par le fluorophore Syto®61 dilué au 1/1000 qui s'intercale dans leur ADN. Observation au microscope confocal équipé d'un objectif à immersion à huile de grossissement ×63 (dimensions : 123 × 123 µm², zoom de facteur 2) ; le signal est obtenu par excitation du Syto®61 à la longueur d'onde λ_{exc} = 633 nm et sa fluorescence collectée entre 650 – 750 nm.*

(bactérie, substrat). De tels effets ont déjà été rapportés pour d'autres souches bactériennes sur des temps d'adhésion de 3 h [4].
Au contraire il a été mis en évidence une différence d'adhésion entre souches hydrophobe et hydrophile de *L. lactis* mais pour des temps d'adhésion de 1 h [5] ou sur une surface brosse [6].

Dans l'eau distillée, les interactions répulsives mises en jeu entre les bactéries et le substrat jouent un rôle important puisque l'adhésion bactérienne décroît d'un facteur 10 ($\sim 10^5$ UFC/cm^2 sur le verre nu) (figure 4.6a) par rapport à celle mesurée dans l'eau physiologique ($\sim 10^6$ UFC/cm^2) (figure 4.6b) où les interactions électrostatiques sont minimisées du fait d'un fort « écrantage » des charges par les ions du milieu. Des travaux de Bellon-Fontaine et al. ont rapporté de tels résultats pour la souche

4. Allion 2004.
5. Habimana et al. 2007.
6. Bulard 2012.

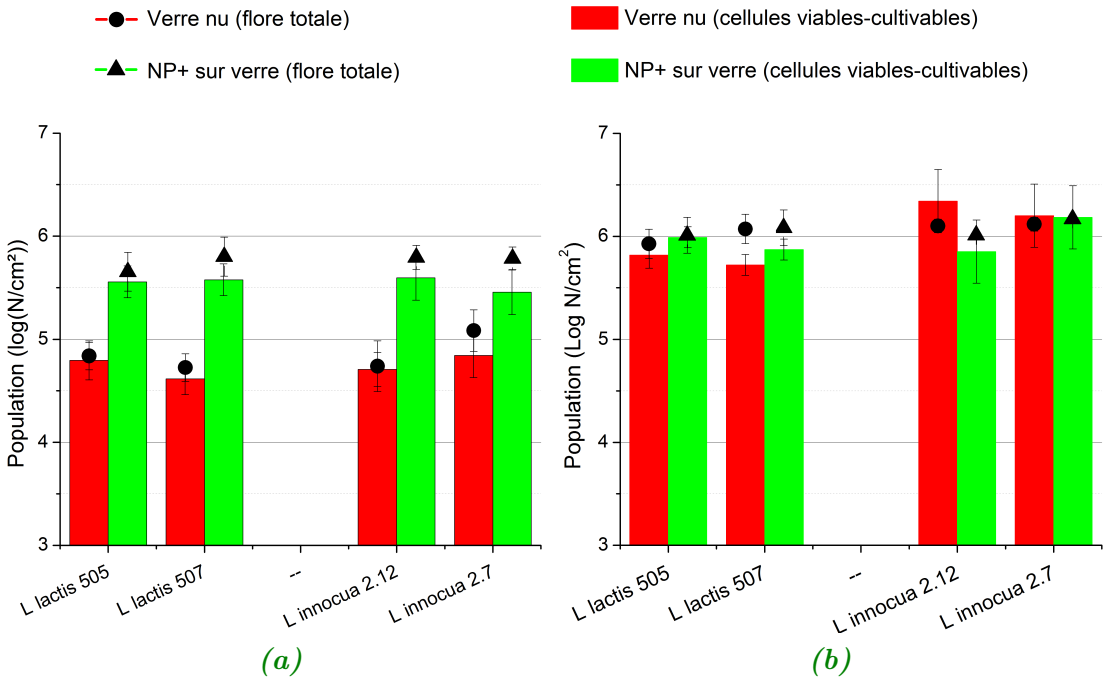


Figure 4.6. – *Dénombrements des bactéries adhérentes (a) dans l'eau distillée et (b) dans l'eau physiologique après 3 h d'adhésion. Les symboles indiquent le dénombrement de la flore totale adhérente par fluorescence, les histogrammes indiquent le dénombrement de la flore viable-cultivable après décrochage des bactéries adhérentes.*

hydrophile de *L. innocua*[7]. Ces résultats mettent en exergue que l'adhésion au verre nu des souches bactériennes étudiées est essentiellement contrôlée par les interactions Van der Waals et les interactions électrostatiques.

On notera qu'au bout de 3 heures, seules $\sim 1\,\%$ des bactéries en suspension adhèrent à la surface de verre nue dans l'eau distillée et 10 % dans l'eau physiologique. On peut s'interroger sur les propriétés physiologiques de ces quelques bactéries adhérentes : ont-elles le même métabolisme que l'inoculum initial et en premier lieu la même cinétique de croissance ?
Pour ce faire les bactéries ayant adhéré à la surface de verre nue ont été décrochées aux ultrasons et remises en suspension dans 10 mL de leur milieu de culture (M17B pour *L. lactis*, TSB pour *L. innocua*), et mises à incuber à leur température de croissance (30 °C pour *L. lactis*, 37 °C pour *L. innocua*). On obtient une population adhérente de $\sim 10^5$ UFC/cm^2 qui correspond à une population remise en suspension

7. Bouttier et al. 1995.

de $\sim 5 \times 10^4$ UFC/mL compte tenu de la surface de la lamelle de verre de $5\,\mathrm{cm}^2$. Les résultats sont présentés figure 4.7.
On constate qu'après adhésion, la cinétique de croissance des bactéries est plus rapide que celle obtenue pour les bactéries planctoniques n'ayant pas subi de phase d'adhésion (figure 3.1). Il se pourrait donc que la physiologie des bactéries qui adhèrent soit quelque peu modifiée par rapport à celle de la population globale initiale. De tels résultats ont été rapportés pour d'autres souches bactériennes que *L. lactis* et *L. innocua*[8]. Cependant, ces expériences n'ont été réalisées que deux fois et mériteraient d'être reconduites pour assurer ce résultat. Par ailleurs il n'est pas à exclure que la concentration inférieure de bactéries au temps $t = 0$ ait une influence sur la pente de la courbe, la souche se situant à une phase différente de la courbe de croissance.

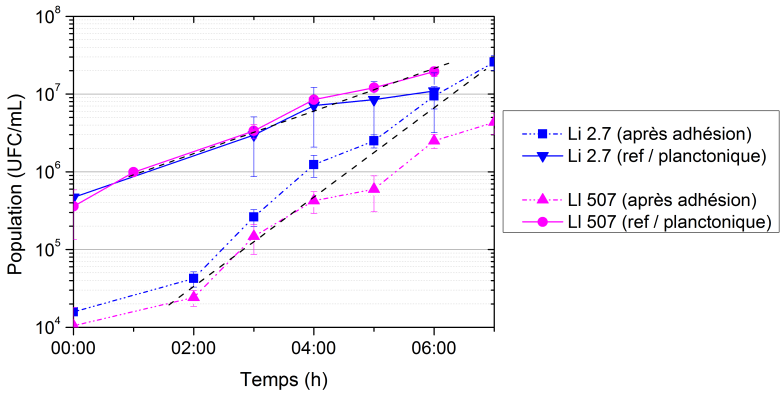


Figure 4.7. – *Courbes de croissance bactérienne des souches L. lactis et L. innocua après 3h d'adhésion sur une surface de verre (l'origine des temps correspond au décrochage des bactéries de la surface de verre) par comparaison aux courbes obtenues pour les souches bactériennes correspondantes en phase exponentielle de croissance n'ayant pas subi d'adhésion.*

Lorsque la surface de verre est recouverte de NP+, les courbes de dénombrements obtenues dans l'eau physiologique (figure 4.6b) montrent que chacune des souches a un comportement bioadhésif comparable à celui observé sur le verre nu. Les différences de propriétés acide-base de Lewis des NP+ par rapport au verre ne semblent pas non plus jouer de rôle dans le processus d'adhésion. Dans l'eau physiologique, celui-ci reste contrôlé par les interactions de van der Waals qui par ailleurs restent comparables qu'il s'agisse du complexe bactérie-verre ou bactérie-NP+.

8. Bruzaud 2015.

Si l'on s'intéresse aux résultats obtenus dans l'eau distillée, on s'attendrait à une bioadhésion plus importante du fait des forces électrostatiques attractives bactérie-substrat qui viendraient s'ajouter aux interactions de van der Waals (mesurées dans l'eau physiologique). On recouvre effectivement une adhésion plus importante que celle mesurée pour une surface de verre nue (figure 4.6a) mais inférieure à celle mesurée dans l'eau physiologique (figure 4.6b). Cet effet peut s'interpréter en considérant la micro-hétérogénéité de charges positives à la surface des bactéries mise en évidence par imageries électronique et de fluorescence (chapitre 3, figures 3.7 et 3.8) : les interactions répulsives entre les NP+ recouvrant la surface de verre et les charges positives des bactéries limitent la bioadhésion surfacique.
On remarquera pour l'ensemble de ces expériences que les résultats sont indépendants de la forme de la bactérie (ovococcoïde pour *L. lactis* et en bâtonnet pour *L. innocua*, figures 1.5 et 1.6, chapitre 1) : celle-ci n'est donc pas un paramètre important dans les processus d'adhésion considérés dans ce travail (figure 4.6).

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ces premières expériences d'adhésion montre que pour les souches étudiées et le protocole expérimental mis en place,

- *la bioadhésion à une surface de verre nue ou recouverte de NP+ est essentiellement contrôlée par les interactions de type van der Waals bactérie-verre ou bactérie-NP+. Ces interactions sont équivalentes dans chaque cas ;*
- *les interactions électrostatiques répulsives et attractives bactérie-substrat jouent aussi un rôle important dans l'eau distillée, limitant l'adhésion sur le verre nu ou l'augmentant sur une surface recouverte de NP+ ;*
- *la micro-hétérogénéité de charge positive de la surface des bactéries joue un rôle dans le processus d'adhésion.*

4.2.2. Les nanoparticules « perturbent-elles » les bactéries adhérentes ?

Les modèles d'adhésion bactérienne sur verre nu décrits précédemment ont été reproduits en ajoutant après la phase d'adhésion des solutions de nanoparticules cationiques selon le protocole décrit dans l'annexe 4.A et schématisé figure 4.8.

L'objectif de ces expériences était de contrôler d'une part, si les nanoparticules pouvaient désorber les bactéries adhérentes et d'autre part, si la saturation des charges de surface des bactéries adhérentes par les NP+ influait ou non sur leur viabilité et/ou leur potentiel viable-cultivable.

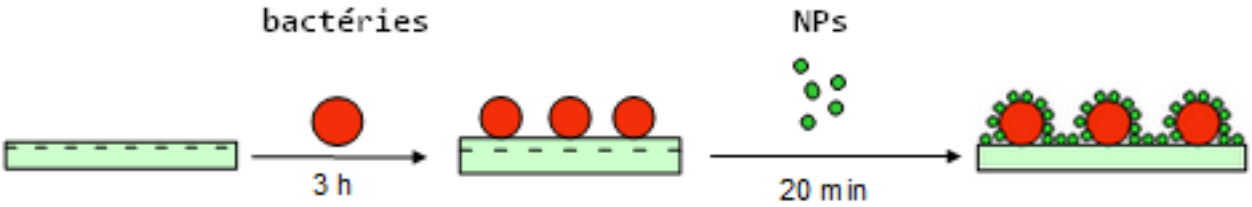


Figure 4.8. *– Schéma représentant l'adhésion de bactéries sur le verre suivie de leur recouvrement par une solution de NP+ de concentration* $\sim 2 \times 10^{11}$ *NP/mL.*

La figure 4.9 illustre à titre d'exemple l'interaction des NP+ ($\sim 2 \times 10^{11}$ NP/mL) avec la surface de la paroi de bactéries *L. innocua* adhérentes aussi bien dans l'eau distillée que dans l'eau physiologique. Des observations similaires sont obtenues pour toutes les bactéries étudiées.

Le recouvrement de la bactérie par les nanoparticules apparaît total, ce qui confirme les données de mobilités électrophorétiques précédemment décrites (cf. chapitre 3 section 3.3). La figure 4.9b.3 met en évidence la colocalisation de la fluorescence des bactéries (rouge, 4.9b.1) et des NP+ (vert, 4.9b.2).

Dans l'eau physiologique (figure 4.9d), les dénombrements des bactéries adhérées, avec ou sans ajout de NP+, par les deux méthodes utilisées (fluorescence et populations viables-cultivables) donnent des résultats comparables. Les NP+ ne désorbent donc pas les bactéries adhérentes et n'influent pas sur la viabilité et les propriétés de croissance des cellules.

Dans l'eau distillée et après ajout de NP+, il faut distinguer les résultats obtenus avec chacune des souches *L. lactis* et *L. innocua*. Concernant *L. lactis*, les deux méthodes de dénombrements, la méthode par ensemencement en gélose nutritive et celle basée sur la fluorescence, donnent des résultats similaires (figure 4.9), correspondant à des populations bactériennes significativement plus faibles que celles obtenues sans ajout de NP+ (diminution de 0,5-0,8 log de bactéries adhérées). Pour interpréter ce résultat, il faut admettre que les NP+ ont une forte affinité pour la surface de verre et vont être capables de désorber une fraction des bactéries adhérées.
Un tout autre résultat est obtenu avec *L. innocua*. Dans ce cas, les deux méthodes de dénombrements des cellules donnent des résultats différents (figure 4.9) pour les deux souches de *L. innocua* ($\sim 0{,}5 - 1$ log d'écart), suggérant l'existence d'une population

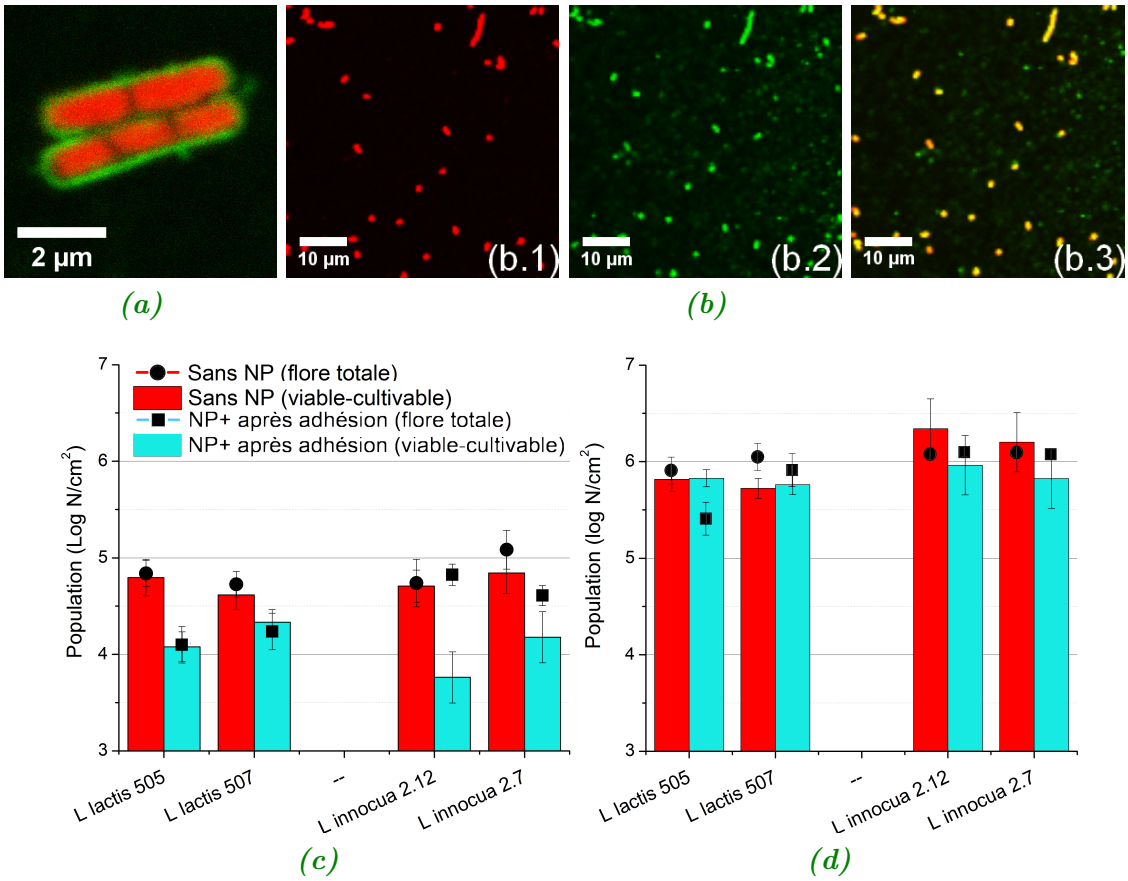


Figure 4.9. – *(a) et (b) Images d'intensité de fluorescence obtenues par microscopie de fluorescence confocale de bactéries L. innocua adhérentes exposées à une solution de NP+ (2×10^{11} NP/mL). En vert on observe la fluorescence du BODIPY des NP+ et en rouge la fluorescence du Syto®61 intracellulaire. (a) Dans l'eau distillée (b) Dans l'eau physiologique (b.1 Bactéries seules, b.2 NP+ seules et b.3 Colocalisation en jaune des nanoparticules et des bactéries).*
(c) Populations adhérentes dans l'eau distillée et (d) dans l'eau physiologique obtenues par fluorescence et par dénombrement de la flore viable-cultivable.

de bactéries viables mais non cultivables. Les NP+ modifieraient donc rapidement (20 minutes de contact avec les bactéries) le métabolisme des cellules *L. innocua*. Ce résultat est à rapprocher de celui rapporté précédemment (chapitre 3 figure 3.3) mettant en évidence la plus grande toxicité des NP+ vis-à-vis de *L. innocua* par rapport à *L. lactis*. Nous verrons dans la suite des résultats que cette hypothèse se confirmera.
Si l'on considère maintenant la population de bactéries de *L. innocua* adhérée basée sur la fluorescence, les résultats sont comparables en absence et après ajout de NP+, montrant que pour ces bactéries il n'y a pas de désorption comme observé pour *L. lactis*. Des forces d'adhésion différentes bactérie-substrat selon la structure de la bactérie pourraient expliquer cette observation.

Par ailleurs, nous avons, comme décrit précédemment, décroché aux ultrasons et remis en suspension dans leur milieu de culture les bactéries adhérentes en présence de NP+. On peut observer, sur la figure 4.10, que les bactéries croissent de façon identique à celles n'ayant « pas vu » de nanoparticules (figure 4.7) et toujours plus rapidement que les cellules n'ayant pas adhéré.

En résumé de cette partie du travail, nous avons pu montrer que :
- *dans l'eau physiologique, l'ajout de NP+ n'affecte ni l'adhésion des bactéries au substrat, ni le métabolisme des cellules adhérentes,*
- *dans l'eau distillée, les NP+ sont capables de désorber en partie les bactéries L. lactis adhérées au verre mais pas les bactéries L. innocua, suggérant des forces d'adhésion bactérie-substrat différentes selon la structure de la bactérie.*

4.2.3. Quels effets sur l'adhésion des modifications des propriétés de surface des bactéries ?

Nous avons vérifié qu'il était possible de saturer les charges de surface négatives/positives des bactéries avec des nanoparticules respectivement cationiques et anioniques conférant ainsi aux cellules une charge de surface homogène positive ou négative. De plus, les NP+, en recouvrant quasi-totalement la surface des bactéries, masquent largement la paroi cellulaire vis-à-vis du milieu environnant et du substrat, ce qui n'est pas le cas en présence de NP-. Nous avons ainsi la possibilité de sonder l'influence de la micro-hétérogénéité de charge de la surface des bactéries et des pro-

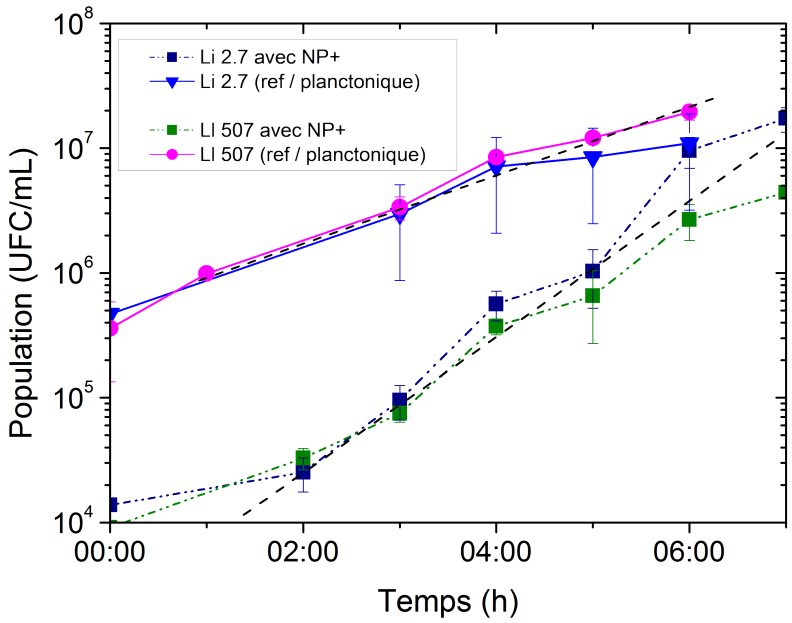


Figure 4.10. – *Courbes de croissance des bactéries après 3 h d'adhésion sur une surface de verre et exposition à une solution de NP+ (concentration 2×10^{11} NP/mL) durant 15 minutes par comparaison aux courbes obtenues pour les mêmes souches bactériennes n'ayant pas subi d'adhésion. L'origine des temps correspond au décrochage des bactéries de la surface de verre.*

priétés de leur paroi sur l'adhésion à une surface de verre.
La figure 4.11 schématise les expériences réalisées.

4.2.3.1. Bactéries en interaction avec les NP+

Différents rapports NP+/bactéries ont été étudiés : 3000 et 5000 NP+ par bactérie (concentrations en NP correspondantes : $\sim 3 \times 10^{10}$ et 5×10^{10} NP/mL), des valeurs pour lesquelles la saturation des charges de surface de la cellule n'est pas atteinte ou tout juste atteinte (cf. résultats de mobilité électrophorétique chapitre 3) de même que la surface de verre ne sera pas totalement recouverte (cf. calcul théorique en section 4.1). Les rapports 10000 et 20000 NP+ par bactérie ($\sim 1 \times 10^{11}$ et 2×10^{11} NP/mL), ont aussi été étudiés pour être dans des conditions de recouvrement maximal de la surface des bactéries. Pour chacune de ces conditions, on sera en présence de NP+ qui n'interagiront pas avec les bactéries et qui diffuseront plus vite vers la surface, la colonisant avant que les bactéries n'adhèrent. Il s'ensuit que pour la concentration 2×10^{11} NP/mL, en très large excès pour recouvrir à la fois la surface

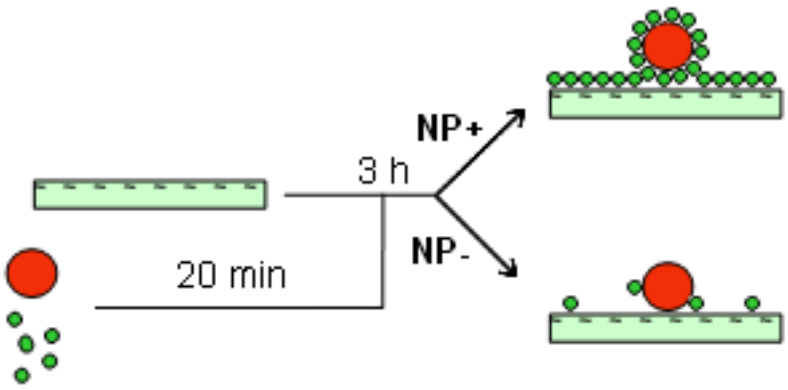


Figure 4.11. *– Schéma illustrant l'adhésion de bactéries initialement en suspension avec des NP+ et NP-). Il faut noter que les NP+ en excès vont s'adsorber sur la surface du verre.*

de verre et celle des bactéries, ce sont davantage les interactions nanoparticules (de la surface de verre) - nanoparticules (de la surface des bactéries) qui seront à considérer, alors que pour les autres concentrations en NP+ , tous les autres types d'interactions (verre nu/recouvert de NP+ - bactéries nues/recouvertes de NP+) seront à prendre en compte.

Considérons dans un premier temps les résultats obtenus dans l'eau distillée (figures 4.12a et 4.12c). Un même comportement est observé pour toutes les souches bactériennes, si l'on s'intéresse au dénombrement de la flore totale, des données imagées sur la figure 4.13 : pour des rapports NP+/bactérie jusqu'à 10 000, l'adhésion bactérienne est augmentée de $\sim$ 1 log par rapport à la référence (absence de NP+). Pour expliquer ces résultats, il faut considérer qu'à ces concentrations en NP+, ni la surface de verre ni celle des bactéries ne sont totalement recouvertes par les nanoparticules, et que des interactions électrostatiques attractives entre la surface des bactéries (nues ou recouvertes de NP+) et la surface de verre (nue ou recouverte de NP+) sont à envisager. On observe aussi figure 4.13 que les bactéries restent essentiellement monodisperses.

Lorsque la concentration en nanoparticules est maximale (rapports NP+/bactérie de 20 000), on mesure une diminution de la flore totale adhérée. Dans ce cas, la surface de verre et de la paroi de la bactérie sont recouvertes de NP+ et l'on est en présence d'interactions répulsives bactérie–substrat qui limitent l'adhésion comme observé pour la référence (bactérie nue - verre nu).

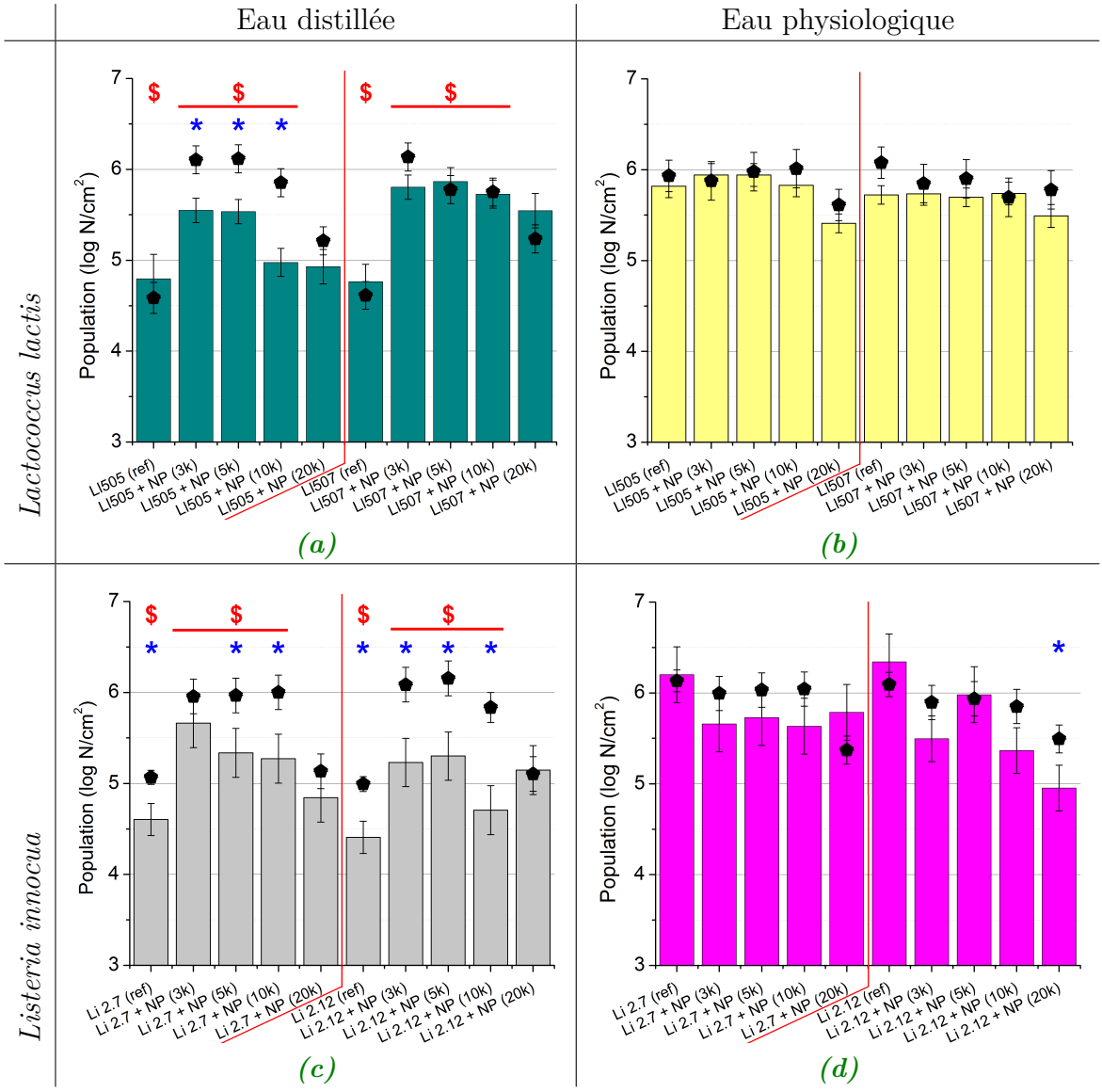


Figure 4.12. – *Dénombrements des bactéries adhérentes en absence (réf.) et en présence de NP+ dans la suspension cellulaire initiale et pour différents ratios NP+/bactérie. Suspensions bactériennes initiales : 10^7 cellules/mL. La flore totale (symboles) est obtenue par dénombrement en imagerie de fluorescence de bactéries marquées au Syto®61 dilué au 1/1000 et excité à λ_{exc} =633 nm. La flore viable-cultivable (histogrammes) est obtenue par décrochage aux ultrasons des bactéries adhérentes puis ensemencement sur gélose.*
Les astérisques (*) bleus indiquent les données montrant une différence significative (ANOVA ; $P < 0{,}25$) entre les dénombrements de la flore totale et de la flore viable-cultivable ($N \geqslant 3$ pour chaque condition étudiée sauf pour les témoins où $8 \leqslant N \leqslant 18$).
Pour chaque souche, dans l'eau distillée, on observe également une différence significative (symboles $ rouges) des dénombrements des bactéries totales (ANOVA ; $P < 0{,}05$) entre l'échantillon de référence et les échantillons NP+/bactéries pour différentes valeurs de ratios.

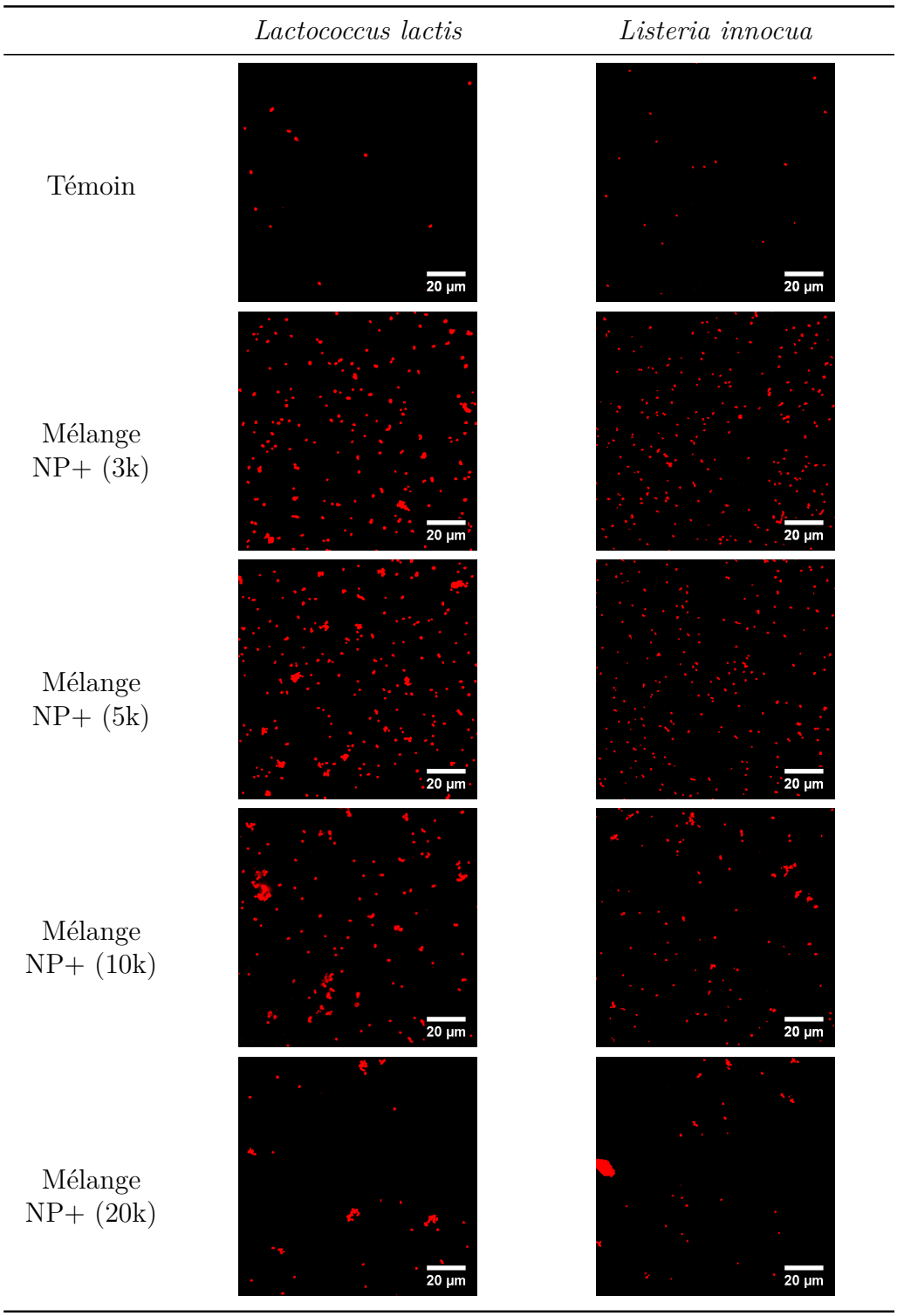


Figure 4.13. – *Images d'intensité de fluorescence caractéristiques de bactéries adhérées dans l'eau distillée en absence et en présence de différentes concentrations de NP+.*
Observation au microscope confocal équipé d'un objectif à immersion à huile de grossissement ×63 ; le signal de fluorescence provient du marquage des bactéries par le Syto®61 excité à λ_{exc} = 633 nm.

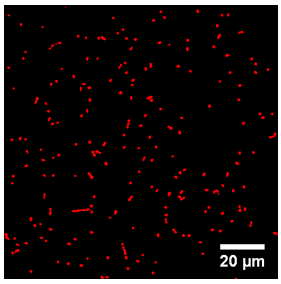
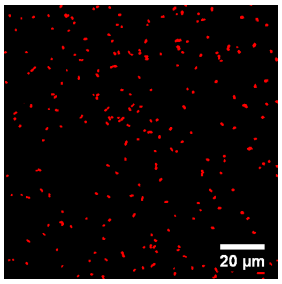
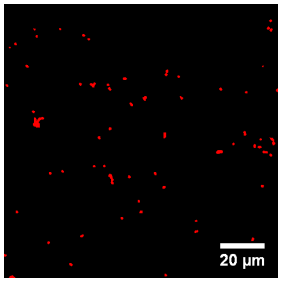
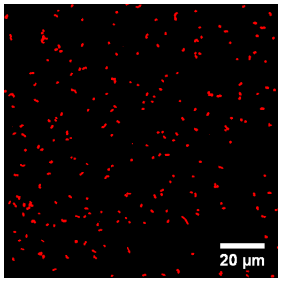
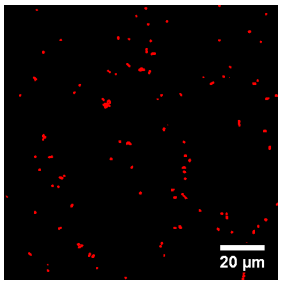
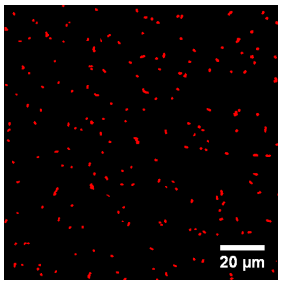
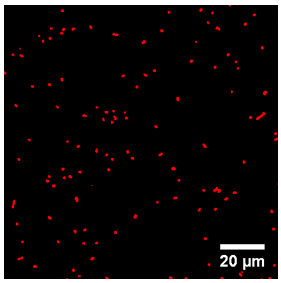
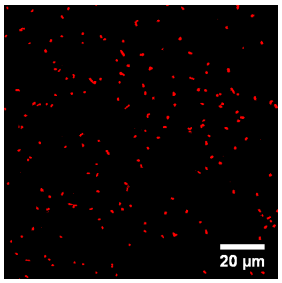
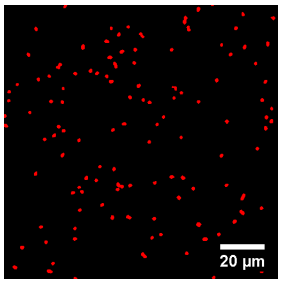
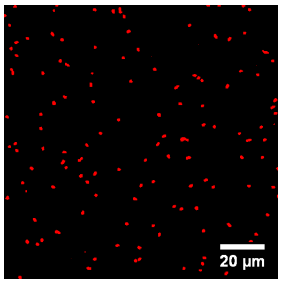
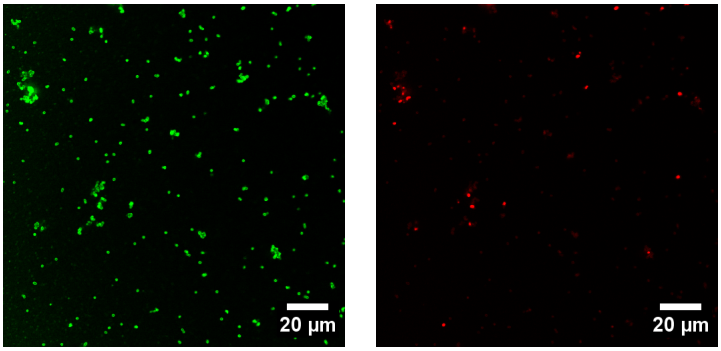
	Lactococcus lactis	*Listeria innocua*
Témoin		
Mélange NP+ (3k)		
Mélange NP+ (5k)		
Mélange NP+ (10k)		
Mélange NP+ (20k)		

Figure 4.14. – *Images d'intensité de fluorescence caractéristiques de bactéries adhérées dans l'eau physiologique en absence et en présence de différentes concentrations de NP+.*
Observation au microscope confocal équipé d'un objectif à immersion à huile de grossissement ×63 ; le signal de fluorescence provient du marquage des bactéries par le Syto®61 excité à λ_{exc} = 633 nm.

On remarquera dans ces conditions expérimentales que la formation d'agrégats augmente avec la concentration en nanoparticules sans toutefois dépasser 20 % de la population totale. Un agrégat étant dénombré comme une bactérie par la méthode basée sur la fluorescence, les dénombrements des populations adhérentes peuvent être alors quelque peu minimisés sans atteindre toutefois 1 log de différence tel qu'observé pour le ratio NP+/bactérie de 20 000 (figure 4.12).



(a) *(b)*

Figure 4.15. – *Mise en évidence de la mortalité de bactéries de L. lactis adhérées en présence de NP+ pour un ratio NP+/bactérie de 10 000. Les bactéries ont été marquées (a) au Syto®9 (excitation λ_{exc} = 488 nm, fluorescence collectée entre 500 – 600 nm) et (b) à l'iodure de propidium (IP) (excitation λ_{exc} = 543 nm et fluorescence collectée entre 650 – 750 nm). Le nombre de bactéries mortes est faible (∼ 10 %) par rapport au nombre de bactéries total et ne correspond pas à la différence observée sur les dénombrements de bactéries viables-cultivables.*

Tableau 4.2. – *Quantification des dénombrements des bactéries marquées au Syto®9 et à l'IP.*

	Syto9	IP	Rapport mortes/vivantes
Population (nb/cm^2)	$7{,}1 \times 10^5$	$6{,}32 \times 10^4$	8,9 %

Le résultat le plus surprenant obtenu dans l'eau distillée repose sur la différence entre les dénombrements de la flore totale et de la flore viable-cultivable dès lors que les suspensions bactériennes ont été mises en contact avec des NP+ (sauf quelques cas isolés, mais il faut tenir compte que le nombre d'expériences reste limité, cf. figure 4.12). De plus, ces différences sont plus ou moins marquées selon la nature de

la souche bactérienne, l'effet étant plus important pour les 2 souches hydrophiles *L. lactis* 505 et *L. innocua* 2.12. Par ailleurs on observe que les dénombrements de la flore viable-cultivable tendent à diminuer quand la concentration en NP+ augmente. Pour expliquer ces résultats on peut émettre l'hypothèse que la présence de nanoparticules sur la surface des bactéries altère leur viabilité. Pour le vérifier, nous avons contrôlé par fluorescence la mortalité cellulaire lors de l'adhésion des bactéries en présence de NP+ pour un ratio de 10 000 NP+/bactérie (cas pour lequel la différence des dénombrements de la flore totale et de la flore viable-cultivable est la plus marquée). Les bactéries ont été marquées à la fois au Syto®9 (qui marque l'ensemble des bactéries vivantes comme mortes, figure 4.15a) et à l'iodure de propidium (IP) (qui ne marque que les bactéries mortes, figure 4.15b). On observe une mortalité cellulaire $< 10\,\%$ (tableau 4.2) des bactéries adhérentes montrant que les NP+ n'entament pas leur viabilité.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette différence des dénombrements de la flore bactérienne par les deux méthodes utilisées est que l'on est en présence de bactéries viables non cultivables. Ce phénomène observé dans l'eau distillée peut s'expliquer par les conditions de stress qui se cumulent pour les cellules (présence de nanoparticules, et absence d'ions et d'éléments nutritifs) et qui les mettent dans un état de « dormance ». Un résultat intéressant est celui mesuré en présence de la plus forte concentration de NP+, cas où les bactéries sont complètement recouvertes de nanoparticules : les dénombrements par les deux méthodes sont comparables même si l'on tient compte de la présence d'agrégats, excluant la présence de bactéries viables-non cultivables. Dans ce contexte les NP+ semblent agir comme un bouclier vis-à-vis des stress environnants pour les cellules.

Dans l'eau physiologique qu'il s'agisse de l'expérience contrôle (bactérie nue - verre nu) ou des mesures en présence de NP+, le dénombrement des populations adhérentes total est similaire quelle que soit la souche bactérienne considérée ($\sim 6\,\log/\mathrm{cm}^2$). Ces résultats nous permettent de conclure que dans ce milieu suspendant, ce sont les interactions de type van der Waals qui contrôlent l'adhésion, des interactions non différenciées entre bactéries et substrat d'une part (référence) et entre nanoparticules d'autre part.
Les dénombrements de la flore totale sont confirmés par les données d'imagerie de fluorescence (figure 4.14) : on observe une population bactérienne comparable dans chaque plan focal et une monodispersité des cellules adhérées quelles que soient les

concentrations en NP+ utilisées.
Contrairement à ce qui a été décrit précédemment dans l'eau distillée, on ne mesure pas de différence statistiquement significative des populations bactériennes adhérées dénombrées par les deux méthodes d'imagerie de fluorescence et de la flore viable-cultivable, que les suspensions cellulaires soient initialement en présence ou non de NP+ et ce quel que soit le rapport NP+/bactérie. On notera toutefois deux cas un peu différents qui concernent les deux souches hydrophiles *L. lactis* 505 et *L. innocua* 2.12 pour lesquelles il apparaît que le dénombrement de la flore viable-cultivable est plus faible que celui déterminé par fluorescence. On peut interpréter ces résultats comme précédemment par la présence d'une population bactérienne viable mais non cultivable montrant que pour une concentration de NP+ élevée, le métabolisme des bactéries peut être affecté aussi en présence d'ions.

Rappelons que l'un des objectifs des expériences qui viennent d'être décrites était de sonder si les propriétés biologiques de la paroi des bactéries (exemple la production d'EPS, de protéines d'adhésion, modification structurale de la couche de peptidoglycanes etc...) jouaient aussi un rôle sur leur adhésion à une surface de verre. Selon cet objectif on a utilisé des concentrations en NP+ élevées de sorte à masquer les entités de surface de la paroi des bactéries. Nos résultats montrent que la bioadhésion n'est pas affectée que ce soit dans l'eau distillée ou l'eau physiologique, et que donc les composants de la surface des cellules ne jouent pas de rôle prépondérant dans ce modèle d'étude.

4.2.3.2. Bactéries en interaction avec par les NP-

Dans cette partie de l'étude nous avons mis en suspension les bactéries avec des NP- puis étudié les processus de bioadhésion dans l'eau distillée et l'eau physiologique par comparaison avec ceux observés en absence de NP-. Étant donné le faible taux de charges positives à la surface des bactéries, la concentration la plus élevée de NP- (2×10^{11} NP−/mL) a été utilisée afin d'assurer la saturation de l'ensemble des charges positives malgré les interactions électrostatiques répulsives bactérie/NP-.
Les résultats sont répertoriés figure 4.16.

L'adhésion bactérienne n'est statistiquement pas modifiée dans l'eau physiologique lorsque les bactéries ont été pré-incubées avec des NP-. On est de nouveau face à un processus d'adhésion essentiellement contrôlé par des interactions de van der Waals

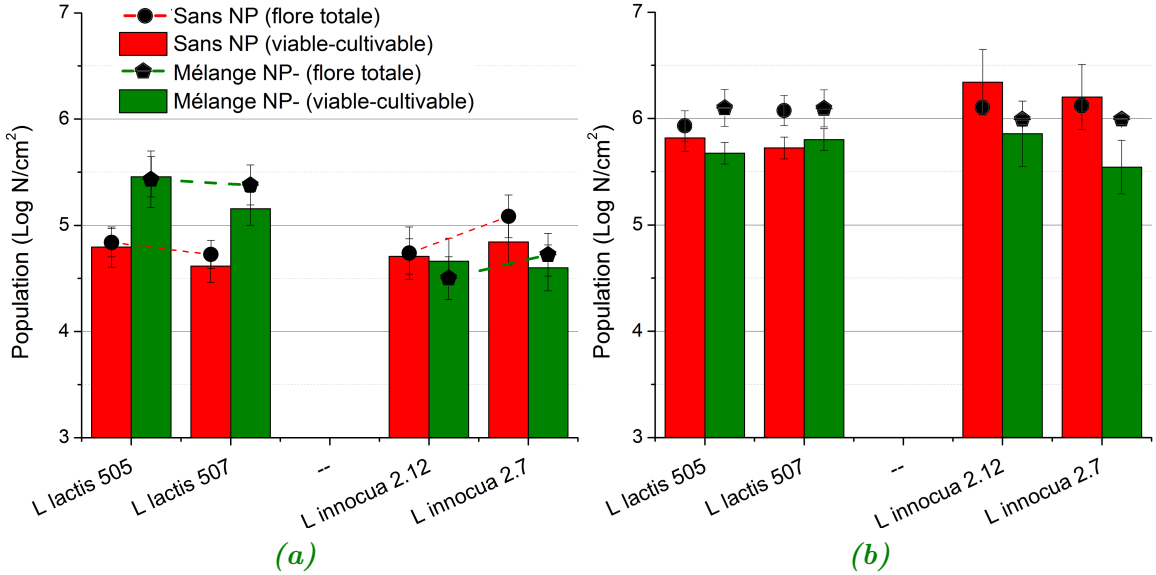


Figure 4.16. – *Dénombrements des bactéries adhérentes en absence et en présence de NP- dans la suspension cellulaire initiale (a) dans l'eau distillée, (b) dans l'eau physiologique.*
Suspensions bactériennes initiales : 10^7 cellules/mL, concentration en NP- 2×10^{11} NP/mL. La flore totale (symboles) est obtenue par dénombrement en imagerie de fluorescence de bactéries marquées au Syto®61 dilué au 1/1000 et excité à $\lambda_{exc} = 633\,nm$. La flore viable-cultivable (histogrammes) est obtenue par décrochage aux ultrasons des bactéries adhérentes puis ensemencement sur gélose.

comme décrit précédemment.
Dans l'eau distillée, la présence de NP- n'engendre aucun effet sur l'adhésion de *L. innocua* (figures 4.16a, 4.16b, **??**). En revanche on observe une augmentation significative de l'adhésion des mélanges bactéries *L. lactis*/NP- par rapport aux bactéries nues (figures 4.16a et **??**). Rappelons que dans ce contexte d'étude, la charge de surface des cellules est totalement négative de même que la surface de verre (les NP- en excès vont venir saturer les défauts de surface chargés positivement). Les interactions électrostatiques répulsives sont donc maximales et l'on aurait pu s'attendre au contraire à une moindre adhésion. Il faut alors rechercher dans cette augmentation de l'adhésion de chacune des souches *L. lactis* un rôle des interactions de type van der Waals et/ou des propriétés hydrophiles de surface des NP- présentes à la surface des cellules. Il est possible que les interactions de type van der Waals entre les NP- et le verre soient plus fortes que celles entre les bactéries et le verre. On peut aussi émettre l'hypothèse que le très fort caractère hydrophile des NP- favorise l'interaction avec le verre hydrophile. Dans tous les cas, cette différence significative d'adhésion au verre des bactéries *L. lactis* en présence de NP- par rapport aux bactéries nues, met en évidence que les charges positives de surface joue un rôle dans le processus d'adhésion. Ce résultat, uniquement observé pour *L. lactis*, est à rapprocher des observations de microscopie électronique (figure 3.8, chapitre 3) qui suggéraient que les charges positives de surface sont plus nombreuses pour ces bactéries que pour *L. innocua*, et surtout que leur répartition est très différente : sur toute la surface de la bactérie pour *L. lactis* et principalement aux pôles pour *L. innocua*.

Les résultats majeurs qui caractérisent l'adhésion des bactéries en interaction avec des NP+ ou des NP- sont :

- *dans l'eau physiologique, l'adhésion bactérienne n'est pas modifiée aussi bien en présence de NP+ et de NP- ;*
- *au contraire, dans l'eau distillée l'ajout de NP- a permis de révéler que la microhétérogénéité de charge positives de la surface des bactéries joue un rôle dans l'adhésion des cellules au substrat.*

4.3. Croissance de biofilms et impact de la microhétérogénéité de charges de surface

Dans le début de ce chapitre nous avons étudié les processus physico-chimiques mis en œuvre dans l'adhésion de souches bactériennes à une surface de verre et montré, grâce à l'utilisation de nanoparticules, le rôle des propriétés de surface des corps en présence (substrat, bactéries) et du milieu environnant dans ce processus d'adhésion.

Dans certaines conditions favorables, les cellules adhérentes peuvent coloniser la surface et former un biofilm. Dans la dernière partie de ce chapitre, nous nous proposons de détailler la dynamique d'installation des biofilms de *L. innocua* 2.7 et d'identifier les principaux paramètres qui contrôlent leur croissance et leur structure. Pour ce faire nous avons utilisé la méthode non invasive de microscopie confocale en mode timelapse tel que décrit dans l'annexe 4.D. Les données d'imagerie 3D ont permis la détermination des cinétiques de croissance, la quantification des biovolumes et des épaisseurs des biofilms formés au cours du temps. Les expériences concernent quatre types d'échantillons différents : bactéries nues adhérentes sur une surface de verre nue, bactéries nues adhérentes sur une surface de verre recouverte de NP+, bactéries en interaction avec des NP+ adhérentes sur une surface de verre nue, bactéries en interaction avec des NP- adhérentes sur une surface de verre nue. Les protocoles expérimentaux de préparation des échantillons sont également décrits dans la section 4.B de l'annexe.

4.3.1. Aspects expérimentaux

L'étude de la croissance des biofilms a été initiée à partir d'une première étape d'adhésion des bactéries dans l'eau distillée tel que décrit précédemment (3 h d'adhésion, concentration de cellules adhérées $5 \times 10^4 - 10^5$ cellules/cm^2, cf. section 4.2, figure 4.6). Dans ces conditions, nous avons pu constater qu'il était difficile de générer la formation d'un biofilm de bonne épaisseur dans un temps d'expérience raisonnable tel qu'illustré sur la figure 4.17 (au bout de 13 h, le recouvrement de la surface n'est toujours pas atteint), et de manière reproductible. On peut émettre l'hypothèse pour expliquer ce résultat que l'adhésion bactérienne dans ces conditions de milieu « pauvre » pour les cellules leur génèrent un stress qui perturbe leur multiplication même dans du milieu de culture.
Ainsi l'étude a été poursuivie en réalisant l'étape d'adhésion bactérienne dans du

milieu de culture TSB. Pour que le nombre total de bactéries adhérentes soit proche de celui obtenu dans l'eau distillée, la phase d'adhésion a été limitée à 1,5 h au lieu de 3 h. Sur la figure 4.25 ($t = 0$) il est indiqué le recouvrement de surface initial pour chaque cas d'étude considéré. Pour l'expérience contrôle (sans NPs) et pour le cas où les bactéries ont été mises en contact avec les NP-, on retrouve un nombre total de cellules adhérentes $\sim 5 \times 10^4$ UFC/cm^2 comparable à celui obtenu dans l'eau distillée. En présence de NP+ (sur la surface de verre et/ou sur les bactéries), le nombre de cellules adhérentes est de $\sim 1 \times 10^6$ UFC/cm^2.

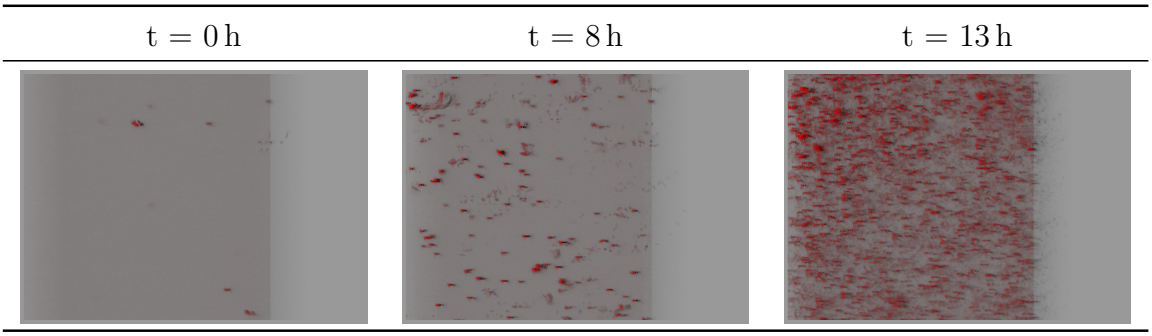


Figure 4.17. – *Suivi de la colonisation de la surface de verre nue par les bactéries L. innocua nues après une phase d'adhésion dans l'eau distillée. Dimensions du plan d'acquisition : 123 × 123 µm^2*

4.3.2. Colonisation de la surface par les bactéries de *Listeria innocua* 2.7

La colonisation des surfaces par les bactéries de *L. innocua* 2.7 pour les quatre conditions expérimentales étudiées et la formation des biofilms ont été suivies en enregistrant des images toutes les 30 minutes durant 16 h. Les figures 4.18-4.21 illustrent quelques temps caractéristiques de ces enregistrements.
On peut discerner deux types de colonisation du substrat.

— Un premier cas, où le substrat est la lame de verre nue sur laquelle ont adhéré des bactéries nues ou en interaction avec des NP- : la colonisation de la surface ne se produit pas à partir des premières bactéries adhérées mais d'un dépôt aléatoire de bactéries planctoniques isolées (figure 4.18) ou d'agrégats bactéries-NP- (figure 4.21). En effet on note ici une différence notoire du processus d'adhésion dans du milieu de culture avec la formation d'agrégats de bactéries préalablement en interaction avec les NP-, un phénomène non observé dans l'eau distillée

ou l'eau physiologique.

— Au contraire, lorsque le verre est recouvert de NP+ (figure 4.19), l'installation du biofilm de *L. innocua* 2.7 se fait à partir de la multiplication des bactéries sur la surface ce qui peut s'interpréter par la persistance des interactions attractives entre les charges positives des nanoparticules et les charges négatives de surface des bactéries. Lorsque les bactéries sont en interaction avec des NP+ (les nanoparticules recouvrent aussi la surface de verre), le processus de biocolonisation surfacique apparaît plus complexe (figure 4.20) : l'adhésion se produit essentiellement sous forme d'agrégats cellulaires de façon encore plus marquée qu'en présence de NP-. Il s'ensuit une colonisation de la surface à partir de ces agrégats mais on ne peut exclure la sédimentation d'autres agrégats planctoniques qui se déposeraient sur la surface au voisinage des macrostructures déjà adhérées.

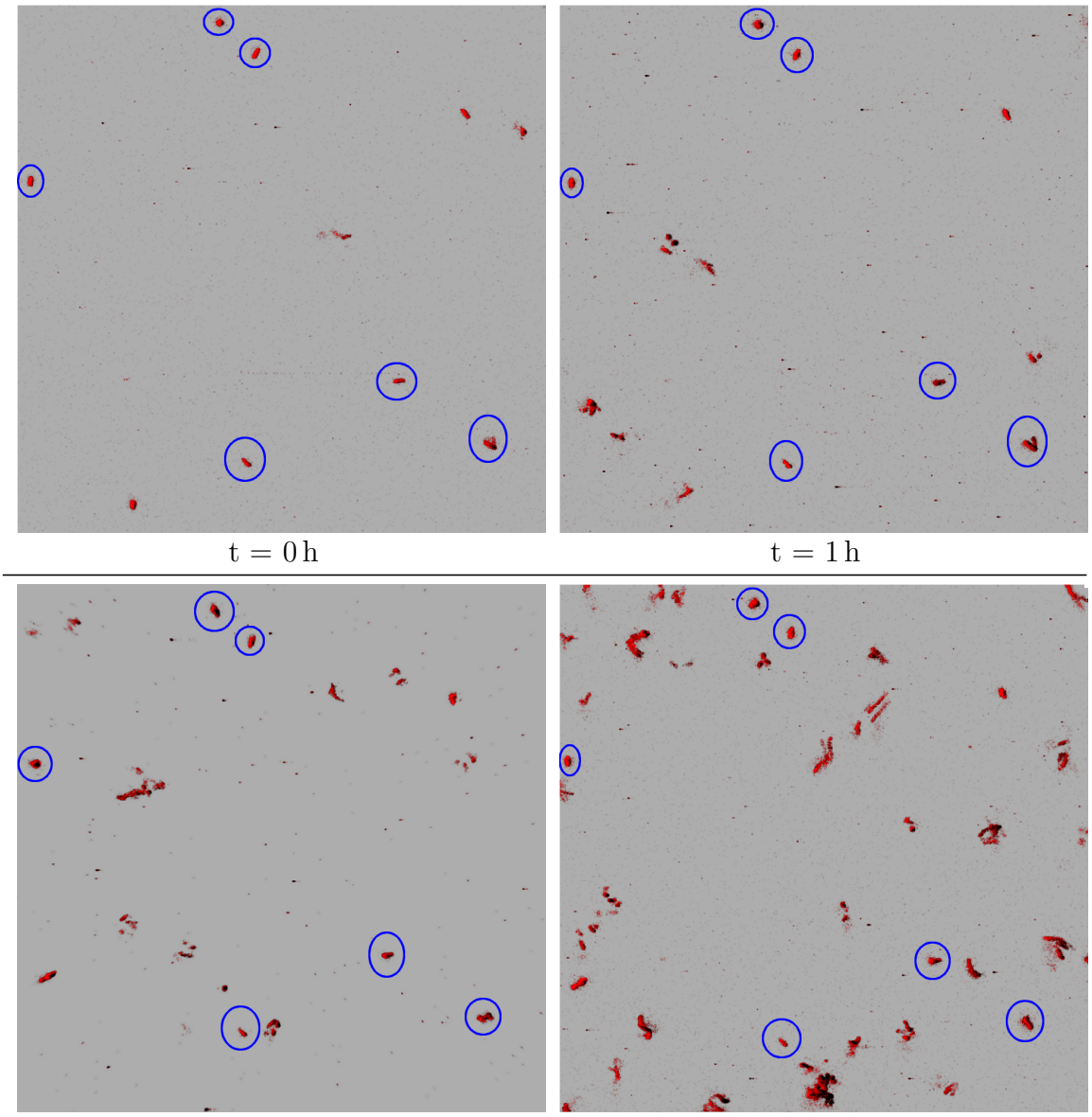


Figure 4.18. – *Suivi de la colonisation de la surface de verre nue par les bactéries L. innocua nues : celle-ci ne provient pas de la multiplication des bactéries initialement adhérentes sur la surface (quelques cellules entourées en bleu) mais de la sédimentation des bactéries planctoniques. Dimensions des images : 123 × 123 µm²*

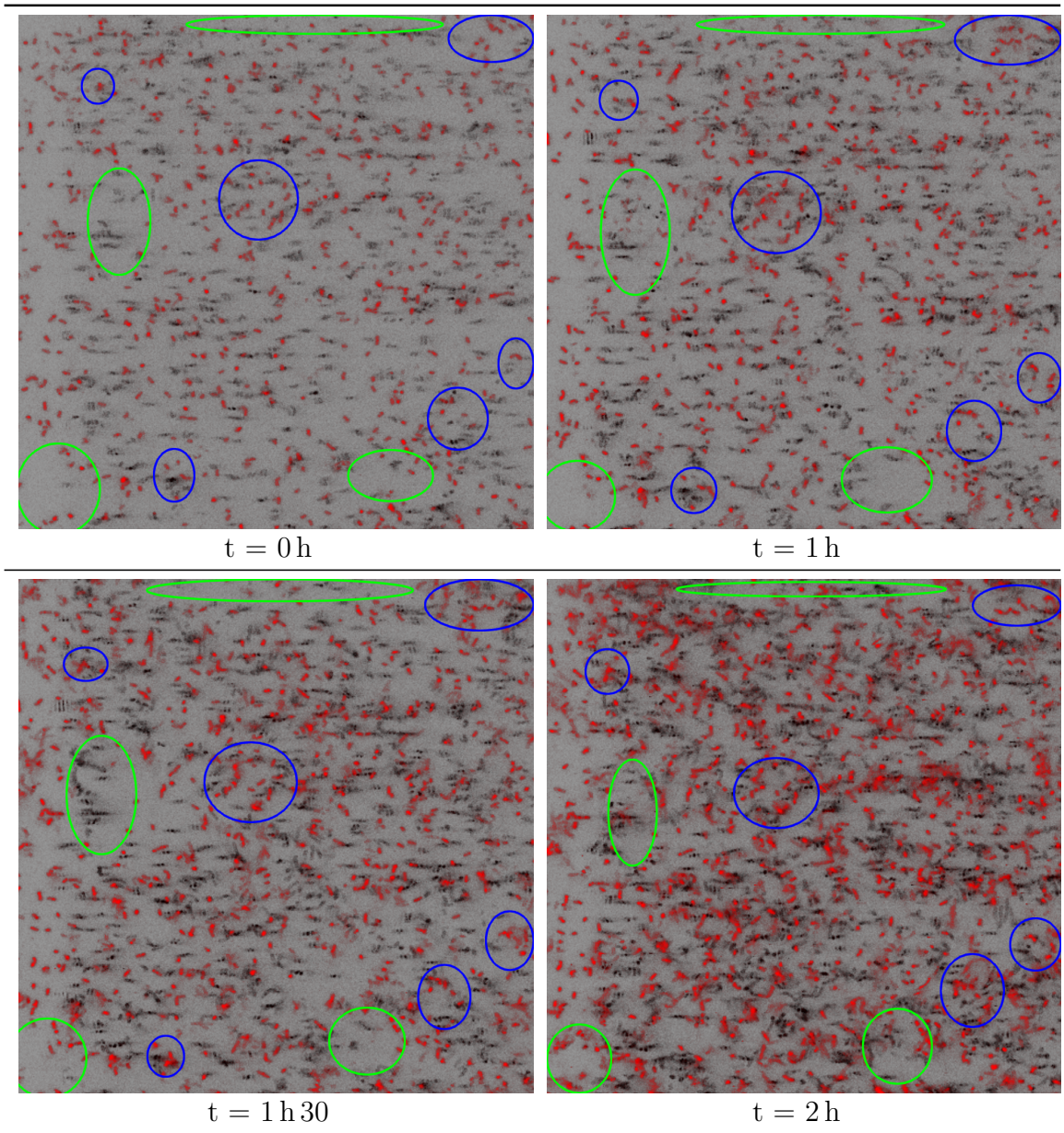


Figure 4.19. – *Suivi de la colonisation de la surface de verre recouverte de NP+ par les bactéries L. innocua nues : celle-ci se produit essentiellement sur la surface à partir des bactéries initialement adhérentes (quelques zones d'intérêt entourées en bleu. Dans les zones cerclées en vert, il n'y a pas de bactéries adhérées initialement ni au cours des premières heures). Dimensions des images : 123 × 123 μm^2*

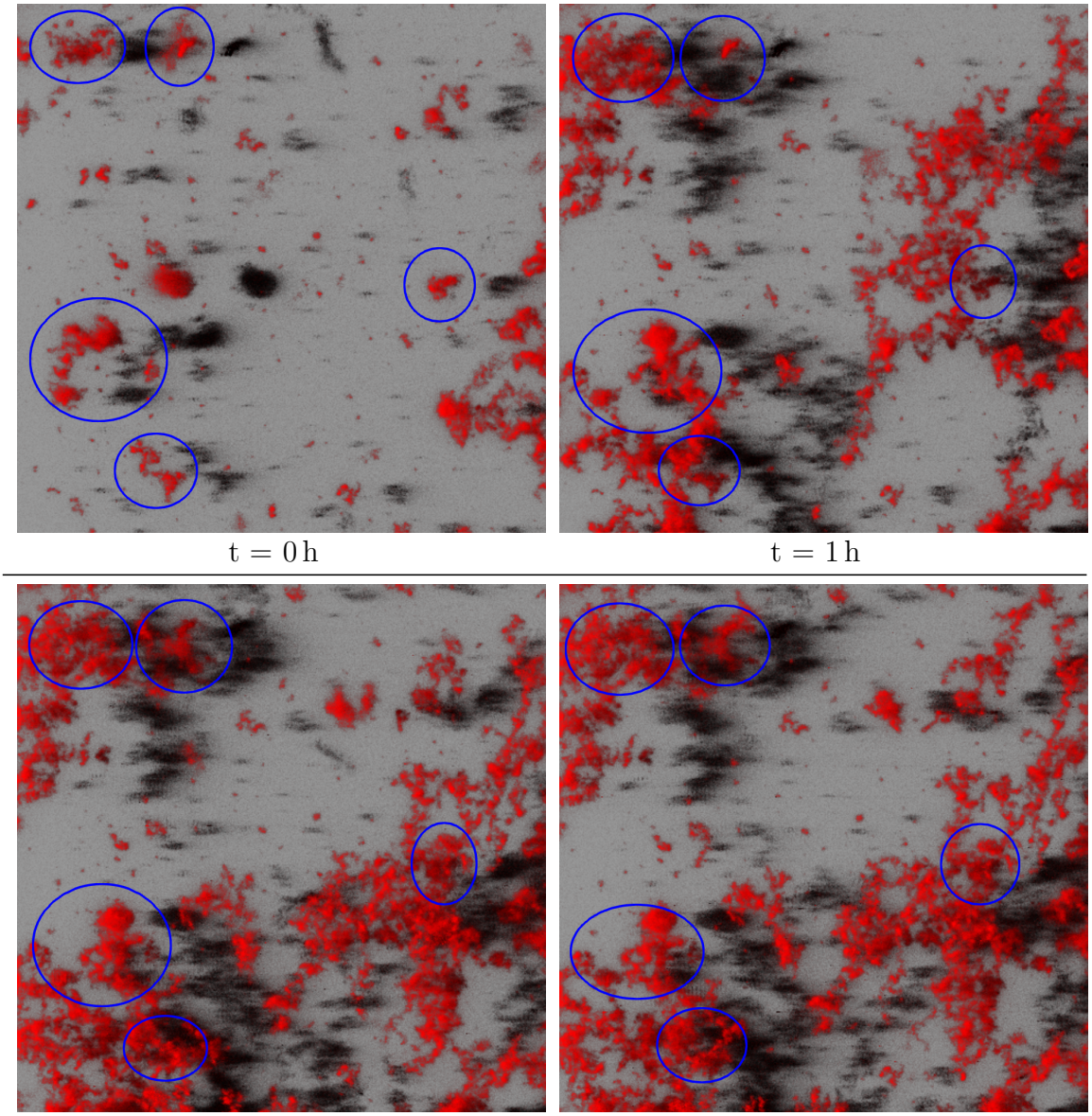


Figure 4.20. – *Suivi de la colonisation de la surface de verre recouverte de NP+ en excès par les bactéries L. innocua initialement en interaction avec les NP+. Très peu de bactéries isolées ont adhéré à la surface mais plutôt des agrégats cellulaires. La multiplication cellulaire se fait au sein de ces agrégats (quelques exemples caractéristiques cerclés en bleu) et/ou par sédimentation d'agrégats planctoniques dans le voisinage des premiers agrégats adhérés. Dimensions des images : 123 × 123 µm²*

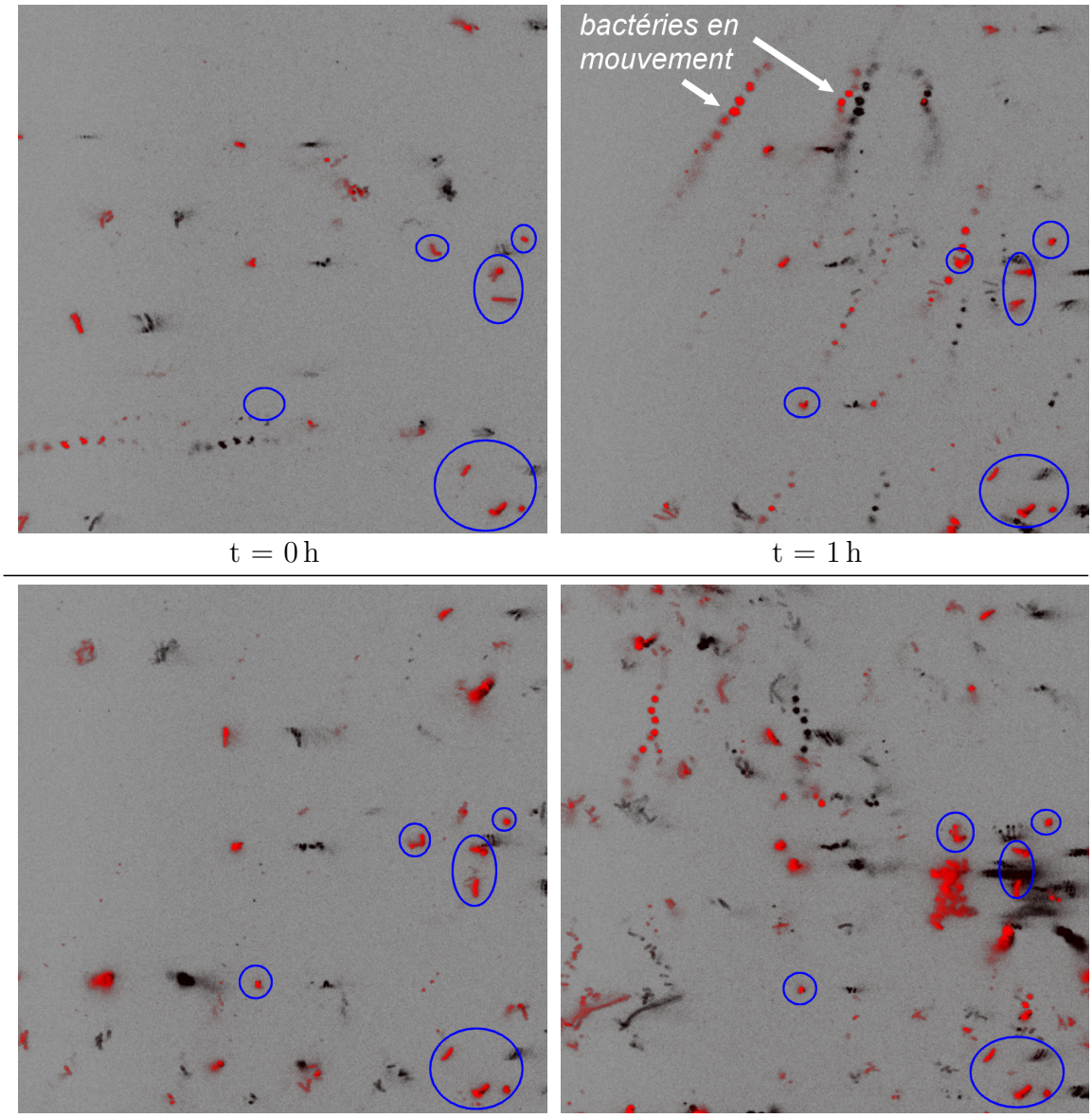


Figure 4.21. – *Suivi de la colonisation de la surface de verre nue par les bactéries L. innocua initialement en interaction avec les NP- : celle-ci ne provient pas de la multiplication des bactéries initialement adhérentes sur la surface (cellules entourées en bleu) mais de la sédimentation des bactéries planctoniques. Dimensions des images : 123 × 123 µm²*

4.3.3. Cinétique de croissance des biofilms de *L. innocua* 2.7

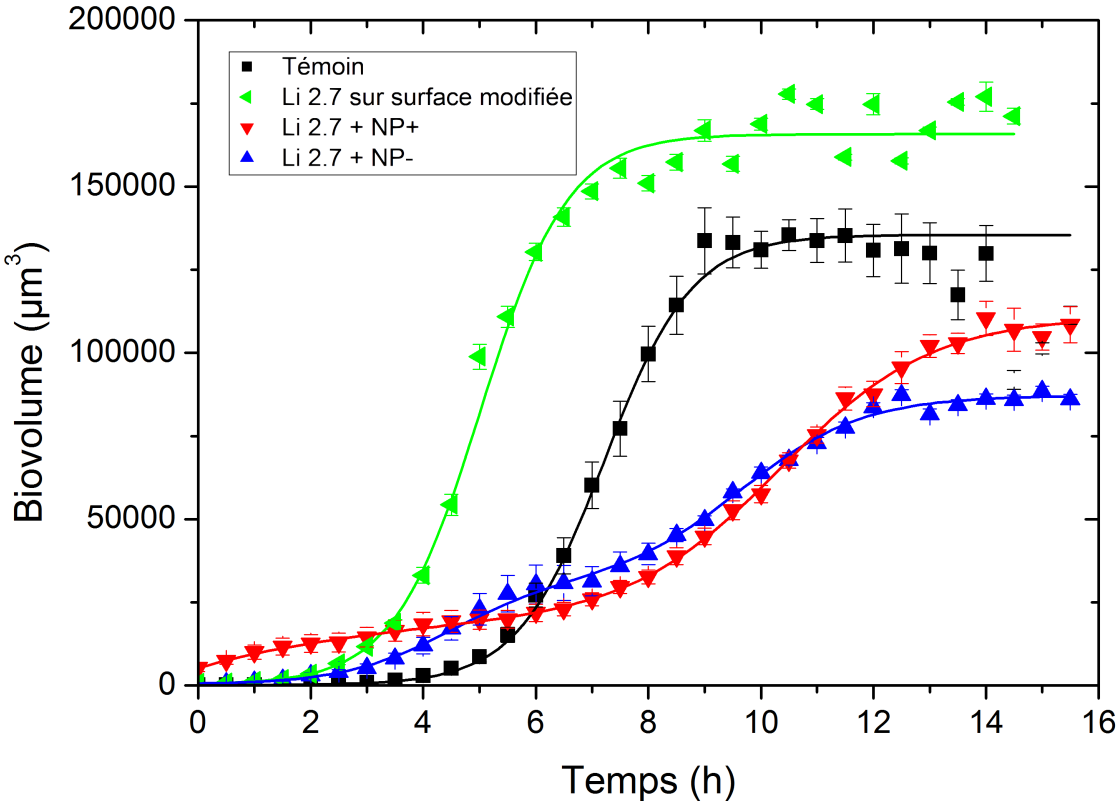
Les cinétiques de croissance des biofilms de *L. innocua* 2.7 pour les différents cas d'étude, obtenues à partir de la quantification des biovolumes sur les 16 heures d'enregistrement des images, sont illustrées figure 4.22. La visualisation des biostructures est représentée selon 3 modes différents :

1. les images de la figure 4.23 correspondent à des reconstructions tridimensionnelles (établies à l'aide du logiciel IMARIS) obtenues à partir des piles d'images x-y-z acquises en microscopie confocale de fluorescence. Elles incluent sur la droite la projection de l'ombre virtuelle du biofilm permettant d'estimer son épaisseur et sa structure de surface ;
2. les images de la figure 4.24 illustrent des vues en perspective de ces mêmes biofilms permettant d'avoir une autre vision de leur structure tridimensionnelle globale, tandis que...
3. ... les images de la figure 4.25 illustrent des coupes x-y des biofilms au milieu de leur épaisseur ainsi que des coupes en x-z et y-z pour une description plus détaillée de leur structure en tout point de leur épaisseur.

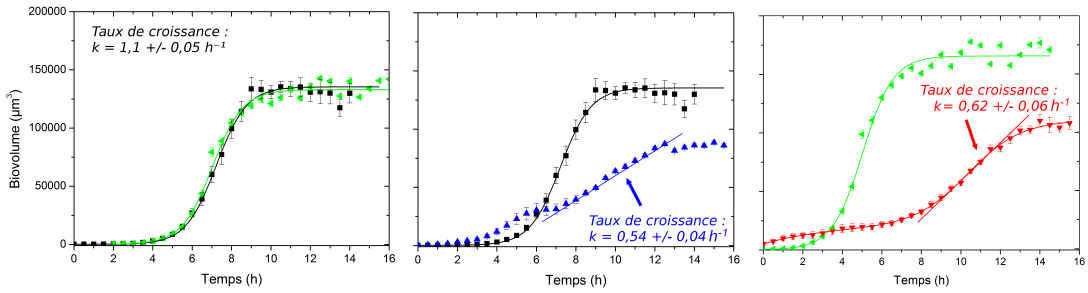
Cas de l'adhésion des bactéries nues

La figure 4.22a illustre les courbes de croissance des biofilms pour des bactéries *L.innocua* 2.7 ayant adhéré à une surface de verre nue ou recouverte de NP+ ; l'allure de ces courbes est similaire mais le nombre de bactéries adhérées étant plus important pour l'expérience où la surface de verre est recouverte de NP+, il s'ensuit une phase de latence avant le développement du biofilm raccourcie par rapport au cas où les bactéries adhèrent sur le verre nu (2 h au lieu de 4 h). La normalisation et le phasage temporel de ces deux courbes (figure 4.22b) montrent cependant un taux de croissance du biofilm identique dans les deux cas, une valeur comparable ($k = 1{,}10 \pm 0{,}05\,h^{-1}$) à celle déterminée pour la croissance des bactéries planctoniques (cf. tableau 3.1, chapitre 3).

Que ce soit sur le verre nu ou recouvert de NP+, le biofilm formé présente une structure plate et régulière de sa base à sa surface (figures 4.23 - 4.25). Le maximum d'épaisseur ($\sim 30 - 35\,\mu m$ selon le nombre de bactéries initialement adhérées) est atteint en $\sim 6\,h$ (figure 4.22a).



(a)



(b) *(c)* *(d)*

Figure 4.22. – *(a) Courbes de croissance des biofilms de L. innocua pour les différentes conditions expérimentales étudiées. (b)(c)(d) Calculs cinétiques associés. (b) Phasage temporel et normalisation à la même quantité de bactéries adhérées initialement de la courbe témoin et de celle obtenue pour la surface de verre recouverte de NP+. (c) Superposition de la courbe témoin et de celle obtenue après adhésion des bactéries en interaction avec des NP-. (d) Superposition de la courbe obtenue pour une surface recouverte de NP+ et de celle obtenue après adhésion des bactéries en interaction avec des NP+.*

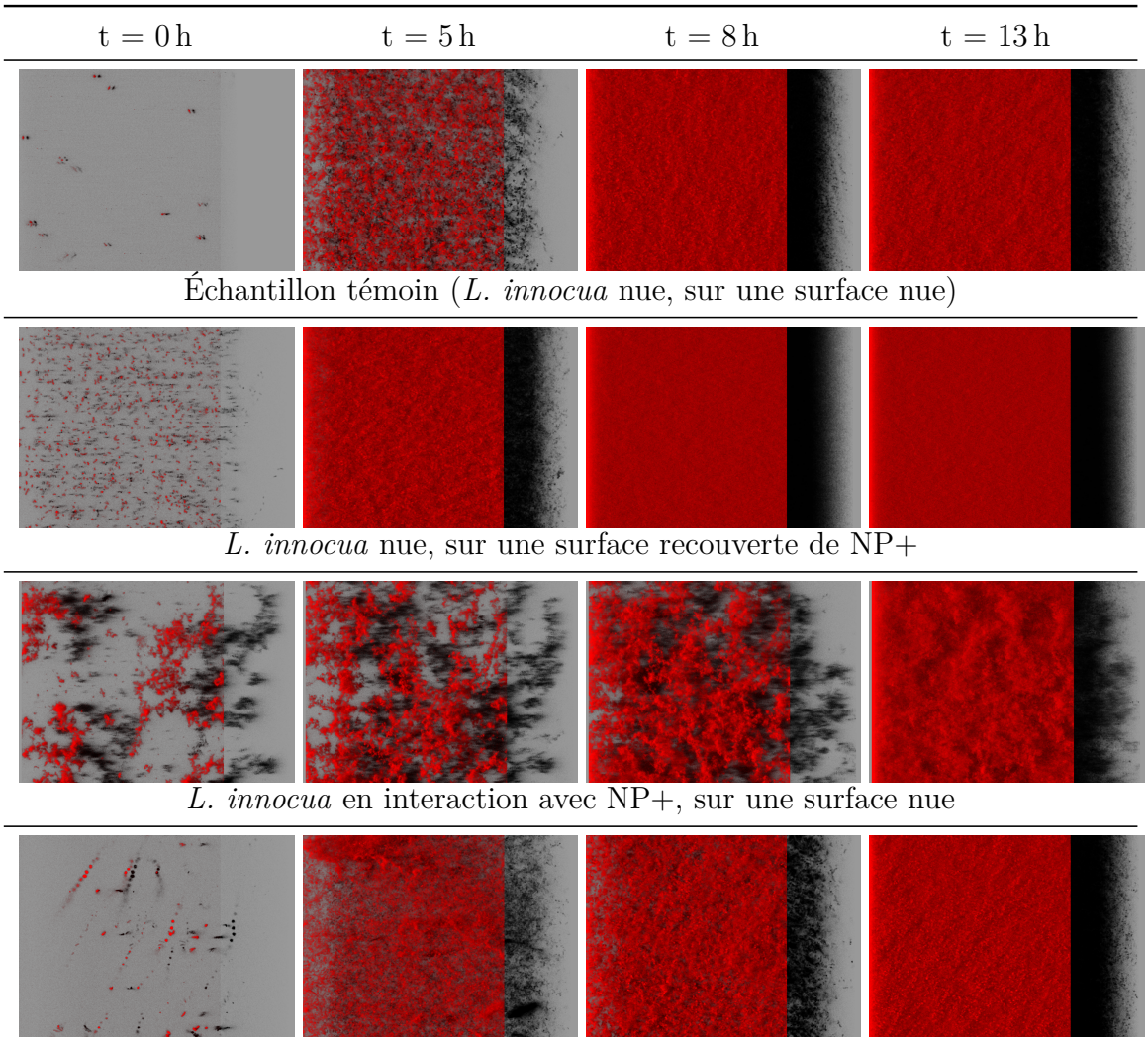


Figure 4.23. – *Représentations tridimensionnelles de la croissance de biofilms de L. innocua 2.7 obtenues à partir des piles d'images x-y-z acquises en microscopie confocale de fluorescence. Sur la droite la projection de l'ombre virtuelle du biofilm permettant d'estimer son épaisseur et sa structure de surface. Dimensions des plans d'acquisition : 123 × 123 µm²*

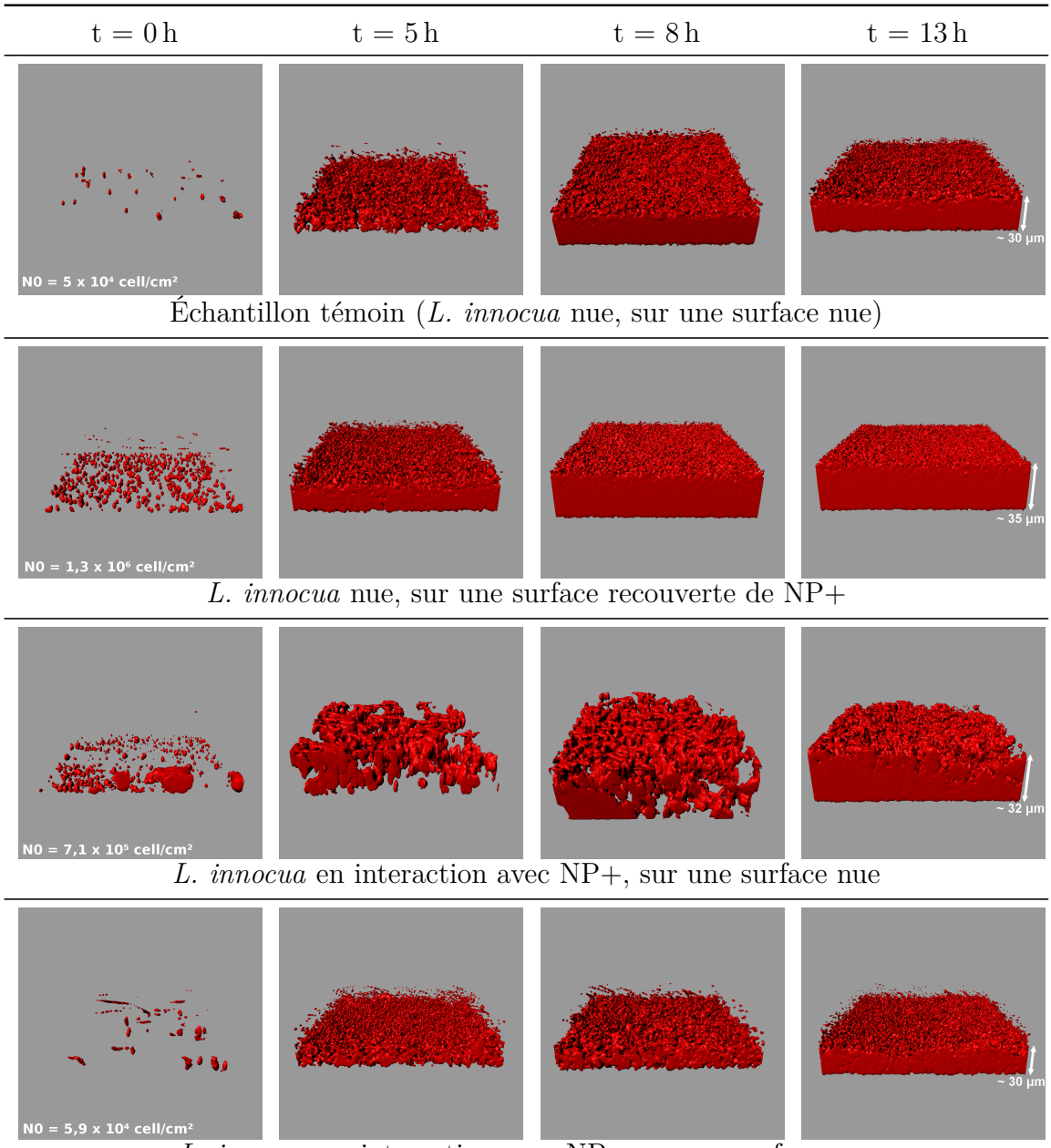


Figure 4.24. – *Vue en perspective au cours du temps de la croissance de biofilms de Listeria innocua 2.7. Le nombre moyen de bactéries adhérées et les épaisseurs moyennes des différents biofilms sont aussi rapportés. Dimensions des plans d'acquisition : $123 \times 123\,\mu m^2$*

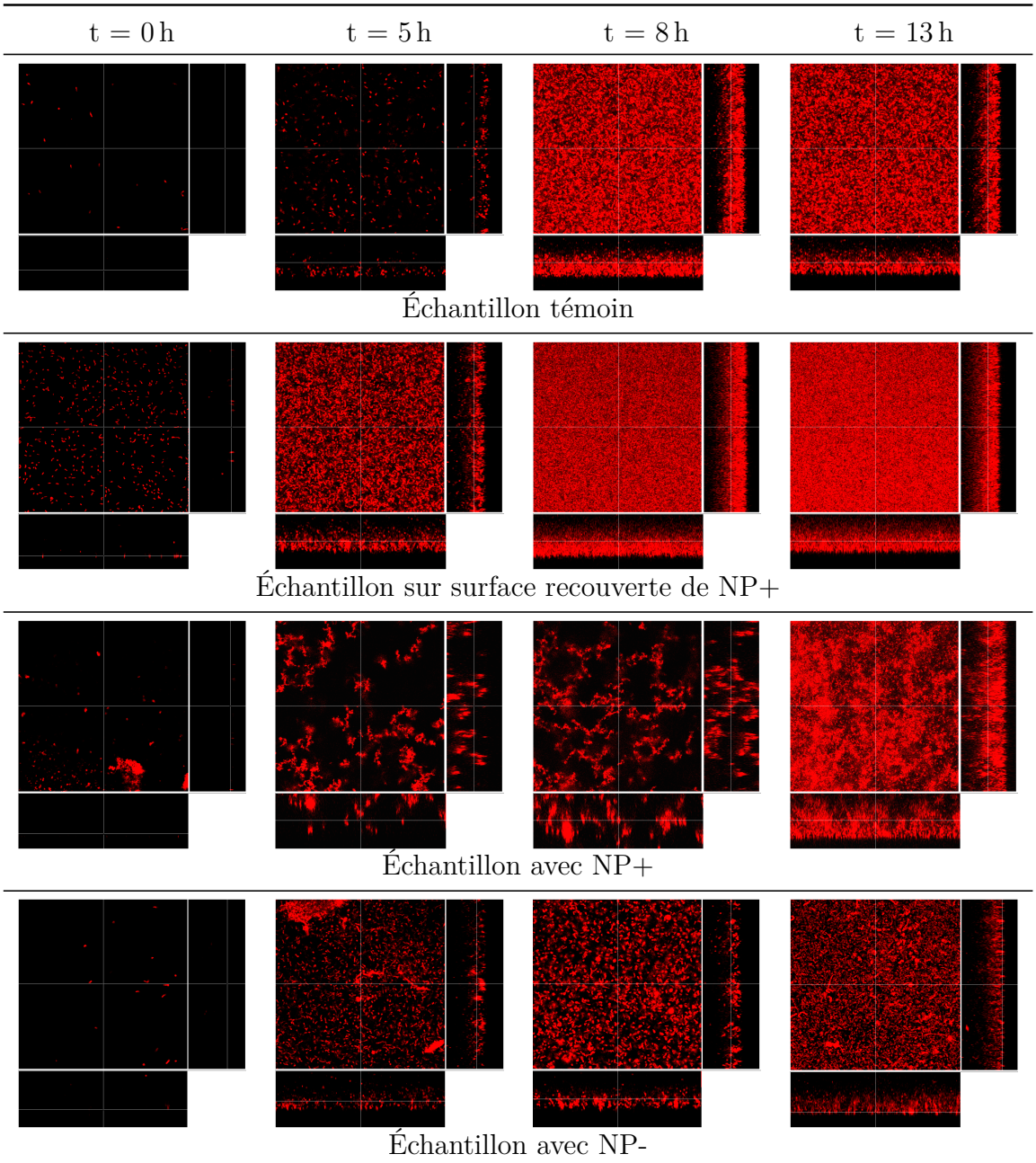


Figure 4.25. – *Vue en sections x-y des biofilms de Listeria innocua 2.7. À t = 0 h, surface du verre sur laquelle se produit l'adhésion permettant de dénombrer le nombre total de bactéries adhérentes initialement. Pour les autres temps, les sections sont choisies au milieu de leur épaisseur (∼ 10 – 15 µm depuis la surface du verre). Des coupes en x-z et y-z sont aussi rapportées pour une description plus détaillée des bio-structures en tout point de leur épaisseur. Dimensions des plans d'acquisition : 123 × 123 µm²*

Que se passe-t-il lorsque les bactéries ont adhéré en présence de NPs ?

Les images à t = 0 h des figures 4.23, 4.24, 4.25 illustrent que la mise en suspension des bactéries avec les NPs dans le milieu de culture engendre la formation d'agrégats, un processus encore plus important avec les NP+ qu'avec les NP-. Cette topographie de surface est corrélée à la détermination de biovolumes au cours des premières heures surévalués comparativement à ceux des autres échantillons correspondant à l'adhésion des bactéries nues (figures 4.22c et 4.22d). La notion de temps de latence n'a plus alors vraiment de sens. Mais le résultat le plus marquant est que le taux de croissance des biofilms est nettement plus lent en présence des NPs sur les bactéries que celui obtenu en leur absence. Par ailleurs cette croissance est identique que l'on soit en présence de NP+ ou de NP- ($k \sim 0{,}6\,h^{-1}$, figures 4.22c et 4.22d). Il apparaît ainsi que la saturation de l'hétérogénéité de charges à la surface des bactéries par les NPs, en inhibant les interactions électrostatiques attractives bactérie-bactérie qui peuvent avoir lieu normalement, ralentit et limite le développement du biofilm tel qu'observé figure 4.22a.

Lorsque les bactéries sont initialement mises en présence de NPs, la structure tridimensionnelle des biofilms apparaît surtout modifiée en présence de NP+. Au début de la croissance du biofilm, les bactéries qui se multiplient peuvent continuer à être en interaction avec des NP+ du milieu : on observe une structure fractale de biofilm (figures 4.23 - 4.25). Au fil du temps, le biofilm « se lisse » et s'homogénéise sur sa surface comme observé pour les autres cas d'expérience (figures 4.23 - 4.25), un résultat qui peut être mis en relation avec l'épuisement des NPs dans le milieu suspendant (rappelons que l'on ne rajoute pas de NPs au cours du temps).

Cette étude préliminaire sur l'impact de la microhétérogénéité de charge de surface des bactéries sur la croissance des biofilms a permis d'apporter comme premiers résultats d'intérêt l'importance des interactions électrostatiques attractives bactérie-bactérie.

Adhésion bactérienne et formation de biofilms : matériel et méthodes

4.A. Protocole d'adhésion bactérienne

L'adhésion bactérienne a toujours été réalisée sur une surface modèle de verre. Nous avons utilisé des lamelles de verre borosilicate (0,2 mm d'épaisseur, 25 mm de diamètre) pouvant être directement placées sur une platine de microscope. Elles sont vendues commercialement avec un revêtement hydrophobe permettant de les manipuler séparément ce qui a nécessité de les nettoyer préalablement avec une solution de RBS35 à 2% puis de les rincer abondamment à l'eau distillée pour qu'elles recouvrent leur propriété de surface hydrophile.

L'adhésion bactérienne sur ces lamelles de verre est réalisée selon le protocole suivant : on laisse sédimenter durant 3 heures, 3 mL d'une suspension bactérienne de concentration $\sim 10^7$ UFC/mL sur ces surfaces de verre. À l'issue de cette étape d'adhésion, les bactéries n'ayant pas adhéré sont éliminées par trempages successifs des lamelles de verre dans 6 flacons stériles contenant le milieu dans lequel est réalisée l'adhésion bactérienne (eau distillée, eau physiologique, ou milieu de culture pour la croissance des biofilms). Il faut noter qu'un soin particulier a été apporté pour que les lamelles ne sèchent pas entre les différents trempages.

Différentes conditions d'adhésion cellulaire ont été étudiées comme schématisé figure 4.1 (chapitre 4), chacune nécessitant d'ajuster/compléter le protocole d'adhésion décrit précédemment :

— l'étape d'adhésion bactérienne peut être précédée d'un recouvrement de la surface de verre par des NP+. Pour ce faire on dépose une solution de nanoparticules à la concentration de 2×10^{11} NP/mL (concentration pour laquelle on obtient un recouvrement total de la lamelle) pendant 15 minutes sur la lamelle de verre. Celle-ci est ensuite soigneusement rincée par trempage dans l'eau distillée afin d'éliminer l'excès de nanoparticules n'ayant pas interagi avec la surface de verre, puis on dépose la suspension bactérienne comme décrit

précédemment (figure 4.1b).

— l'étape d'adhésion bactérienne peut être suivie de l'observation de l'effet des NP+ sur les bactéries adhérées. Dans ce cas, une solution de NP+ de concentration 2×10^{11} NP/mL est déposée pendant 15 minutes sur le substrat verre-bactéries adhérées. L'excès de nanoparticules est ensuite éliminé par trempage de la lamelle de verre dans le milieu approprié (eau distillée, ou eau physiologique) (figure 4.1c).

— enfin lorsque l'on souhaite réaliser l'adhésion de bactéries en interaction avec les nanoparticules (positives ou négatives), les deux entités sont laissées en contact en suspension durant 15 minutes puis le mélange est déposé sur la lamelle de verre afin de contrôler l'adhésion bactérienne (figure 4.1d). On notera qu'il n'a pas été possible d'éliminer l'excès de nanoparticules, qu'elles soient positives ou négatives, n'ayant pas interagi avec les bactéries avant dépôt sur la surface. Nous avons pratiqué des centrifugations des mélanges bactéries-nanoparticules dans les conditions adaptées pour précipiter les bactéries et éliminer les nanoparticules libres en solution : dans l'eau distillée, avec les nanoparticules cationiques, nous avons alors observé une importante formation d'agrégats qu'il n'a pas été possible de re-dissoudre ; dans le cas des nanoparticules anioniques nous n'avons pas observé de culot bactérien après centrifugation.

Après l'adhésion de bactéries sur une surface, il est intéressant de pouvoir dénombrer d'une part la flore totale ayant adhéré à la surface qui comprend les cellules viables-cultivables, viables non-cultivables et mortes, et d'autre part les seules populations cellulaires viables-cultivables c'est-à-dire les bactéries qui recouvrent leurs propriétés de croissance après adhésion.

Les dénombrements de la flore totale ont été obtenus par imagerie de fluorescence tel que décrit dans le paragraphe 4.D ci-après.

Afin de dénombrer les bactéries viables-cultivables, la lamelle de verre sur laquelle ont adhéré les cellules est placée dans un tube contenant 10 mL d'eau distillée ou d'eau physiologique, puis l'échantillon est soumis aux ultrasons pendant 2 minutes. Le tube est ensuite agité avec un vortex pendant 30 secondes afin de maximiser le décrochage des bactéries de la surface du verre. La suspension ainsi obtenue est finalement dénombrée par la méthode décrite dans l'annexe 3.C.
Nous avons pu vérifier par microscopie de fluorescence à plusieurs reprises que selon

notre mode opératoire, la concentration de bactéries adhérentes restante sur la surface était négligeable.

4.B. Croissance de biofilms

Dans le cadre de ce travail, nous avons suivi la formation des biofilms bactériens de *L. innocua* en présence ou non de nanoparticules par microscopie confocale d'imagerie de fluorescence en mode time-lapse tel que décrit dans le paragraphe d'imagerie de fluorescence ci-après. Pour ces mesures, le protocole d'adhésion des bactéries a dû être adapté. En effet, nous avons pu constater que suite à l'adhésion des bactéries sur la surface de verre dans l'eau distillée ou l'eau physiologique il était difficile de générer la formation d'un biofilm de bonne épaisseur dans un temps d'expérience raisonnable (16h) et de façon reproductible.

Nous avons ainsi utilisé une méthode classique pour la croissance des biofilms : l'étape d'adhésion bactérienne telle que décrite précédemment est réalisée dans le milieu de culture TSB adapté à la souche *L. innocua* 2.7 (milieu enrichi en protéines et sucre par rapport à l'eau physiologique). 3 mL de la suspension cellulaire initiale ($\sim 10^7$ UFC/mL) réalisée dans le milieu de culture enrichi ou non en nanoparticules (ratio de 20 000 NP/bactérie) sont déposés sur une lamelle de verre nue ou, le cas échéant, préalablement recouverte de NP+. On a laissé sédimenter les cellules pendant 1,5 heures avant de rincer la lamelle de verre, comme décrit précédemment, par trempages successifs dans le milieu de culture pour éliminer les bactéries n'ayant pas adhéré. Le nombre de bactéries adhérées a atteint ainsi jusqu'à $\sim 10^6$ UFC/mL. On recouvre ensuite l'échantillon de 3 mL de milieu de culture frais auxquels on ajoute un marqueur des bactéries fluorescent (voir ci-après) pour leur observation en imagerie.

4.C. Marquage des bactéries pour leur observation en microscopie de fluorescence

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail ne sont pas autofluorescentes dans les conditions expérimentales utilisées (excitation dans le visible $\lambda > 450$ nm). Ainsi l'observation des bactéries par imagerie de fluorescence a nécessité un marquage spécifique des cellules selon l'expérience considérée (figure 4.C.1).

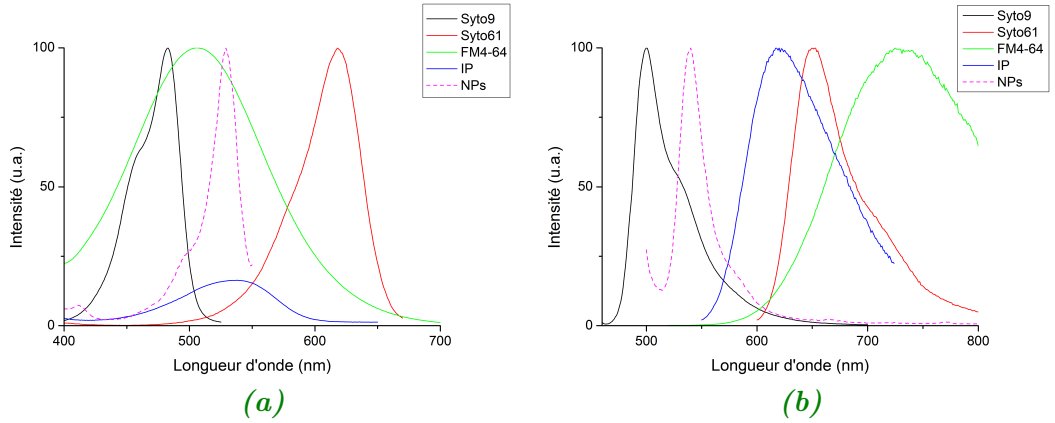


Figure 4.C.1. – *Spectres d'absorption (a) et d'émission de fluorescence (b) des marqueurs bactériens utilisés dans ce travail. (D'après Life Technologies)*
Les spectres sont comparés à ceux des nanoparticules fluorescentes (fluorescence du BODIPY, traits pointillés en rose).

— **L'ADN intracellulaire des bactéries vivantes ou mortes** peut être marqué avec le Syto®9 ou le Syto®61 (Molecular Probes, Life Technologies), chacun de ces deux fluorophores diffusant à travers la membrane plasmique des cellules. Cependant ils possèdent des propriétés photophysiques différentes comme illustré sur la figure 4.C.1 : pour des mesures d'imagerie de fluorescence en l'absence de nanoparticules, on utilisera le Syto®9 tandis qu'en présence de nanoparticules marquées au BODIPY (maximum d'absorption centré à 529 nm et émission à 540 nm), on utilisera le Syto®61 (maximum d'absorption à 620 nm, maximum d'émission à 650 nm) pour pouvoir bien différencier la fluorescence des bactéries de celle des nanoparticules. Les marqueurs Syto®9 et Syto®61 sont disponibles sous forme d'échantillons liquides dans le DMSO (concentration du fluorophore 5 mM) conservés à −20 °C. Une solution de travail de ces marqueurs diluée au 1/1000 dans l'eau distillée ou l'eau physiologique est préparée à partir de ces solutions-stocks. Le marquage cellulaire est ainsi réalisé juste avant l'observation des lames par microscopie de fluorescence par dépôt de 500 µL de la solution de travail du marqueur au-dessus de la lamelle (ce qui permet de réaliser le dénombrement de la flore bactérienne totale).

— **Pour le marquage spécifique de l'ADN des cellules mortes**, on utilisera l'iodure de propidium (IP, Molecular Probes, Life Technologies) dont les propriétés photophysiques sont illustrées figure 4.C.1 (maximum d'absorption

à 532 nm et d'émission à 620 nm). Ce marqueur peut être associé au Syto®9 pour différencier, sur un même échantillon, les cellules vivantes des cellules mortes. L'IP est disponible sous forme lyophilisée et est conservé à température ambiante. On prépare une solution stock du marqueur en le diluant dans l'eau distillée pour obtenir une solution de concentration 1 mg/mL. Pour le marquage des bactéries mortes, on l'utilise à une concentration de 1 µg/mL (dilution au 1/1000 de la solution-stock).

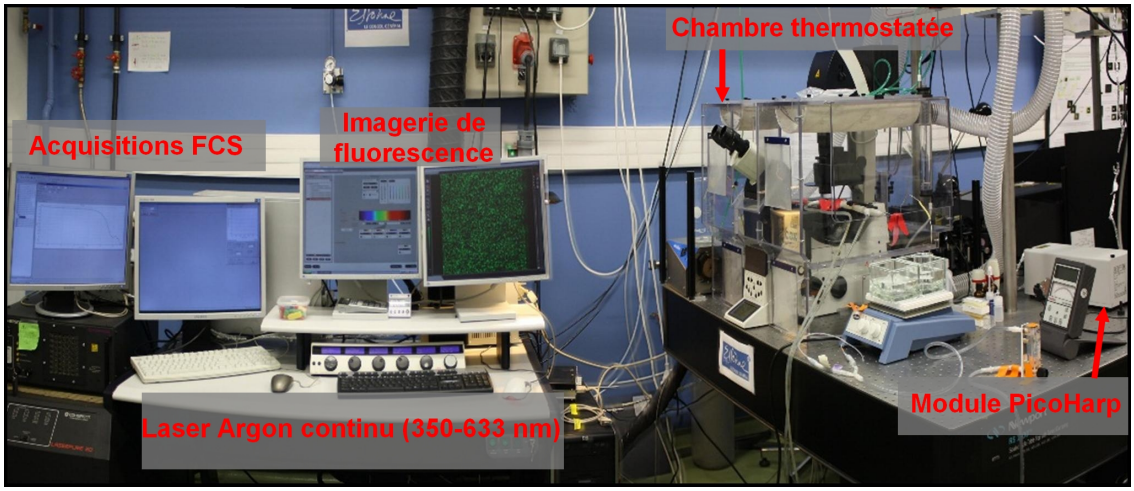
— Étant donné que nous avons suivi la croissance du biofilm durant 16 h, il nous fallait utiliser un marqueur non ou peu toxique pour les cellules. Ainsi étaient à exclure les marqueurs de l'ADN tel le Syto®61 décrit ci-dessus. Il fallait aussi utiliser un marqueur bactérien dont la fluorescence pouvait être distinguée de celle du BODIPY des nanoparticules. Compte tenu de ces contraintes, nous avons utilisé le FM®4-64 (Molecular Probes, Life Technologies). Le FM®4-64 est commercialisé sous forme lyophilisée et conservé à température ambiante. Il est dissout dans l'eau distillée afin d'obtenir une solution-stock de concentration 1 mg/mL et ensuite dilué à la concentration de 3,3 µg/mL pour le marquage des échantillons (ajout de 10 µL aux 3 mL de milieu de culture).

4.D. Imagerie de fluorescence

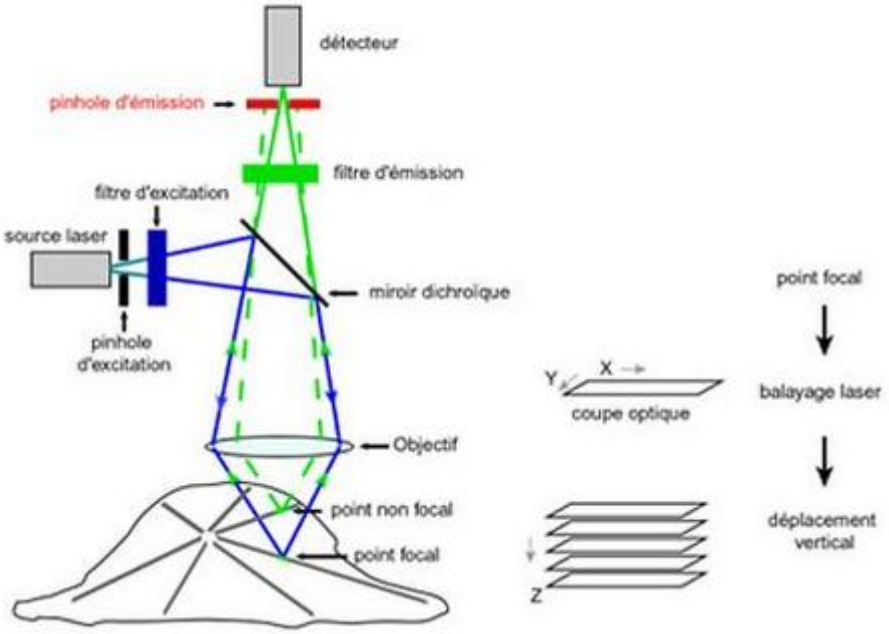
Les expériences d'imagerie de fluorescence de l'adhésion bactérienne à la surface de verre ont été réalisées sur un microscope confocal inversé Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Allemagne) implanté au Centre de Photonique BioMédicale [9] (figure 4.D.1a). Il est équipé d'un laser Argon continu disposant de plusieurs raies d'émission dans le domaine du visible, notamment des raies de longueur d'onde 488 nm et 514 nm utilisées dans ce travail, et d'un laser He-Ne permettant une excitation à 633 nm. Le faisceau laser excitateur est focalisé sur l'échantillon au moyen d'un objectif plan apochromatique à immersion à huile de grossissement ×63 d'ouverture numérique 1,4. La fluorescence émise par l'échantillon est collectée via le même objectif (épifluorescence) (figure 4.D.1b).

L'acquisition d'images de fluorescence se fait par un balayage du faisceau laser sur l'échantillon au moyen de miroirs galvanométriques. On parle ainsi de micro-

9. CPBM, Centre Laser de l'Université Paris-Sud, Orsay



(a)



(b)

Figure 4.D.1. – *(a) Microscope confocal Leica TCS SP5 utilisé pour nos observations au CPBM d'Orsay. Il est équipé d'une chambre thermostatée pour réguler la température, afin notamment de maintenir les échantillons à la température de croissance optimale pour le suivi cinétique de la formation de biofilms. (b) Schéma de principe du microscope confocal.(*Futura-Sciences *2006)*

scopie confocale à balayage laser (MCBL, ou également CLSM - Confocal Laser Scanning Microscopy). Typiquement nos images ont été acquises avec une résolution de $512 \times 512\,(\text{pixels})^2$ à une fréquence de balayage de 400 Hz, soit en 1,28 s. Dans ces conditions, en utilisant un objectif ×63, chaque plan focal a une taille de $246 \times 246\,\mu\text{m}^2$ pour un zoom de facteur 1, et $123 \times 123\,\mu\text{m}^2$ pour un zoom de 2.

Le BODIPY des nanoparticules et le Syto®9 ont été excités à 488 nm, le FM®4-64 à 514 nm et le Syto®61 à 633 nm. Le signal de fluorescence provenant des nanoparticules fluorescentes (BODIPY) ou du Syto®9 est collecté entre 500 – 600 nm. Le signal provenant du FM®4-64 ou du Syto®61 est quant à lui collecté entre 650 – 750 nm.

Parmi les avantages de ce type de microscope, il y a :
— l'élimination du bruit de fond par l'utilisation d'un offset,
— la possibilité de moyenner des images afin d'améliorer le rapport signal/bruit,
— la possibilité de réaliser automatiquement des images 3D par déplacement du plan focal selon l'axe z. Cette possibilité peut être utilisée pour l'étude de la structure des biofilms.

Le traitement des images a été fait à partir du logiciel libre ImageJ incluant le plugin LociTools qui permet une lecture directe des fichiers enregistrés avec le logiciel d'acquisition du dispositif SP5 de Leica.
Pour réaliser le dénombrement de la flore totale adhérée à la lamelle de verre, nous avons imagé en moyenne une dizaine de plans focaux répartis sur l'ensemble de la surface de verre.
Sur chaque plan focal, les cellules ont été dénombrées automatiquement en utilisant la fonction de comptage de particules du logiciel ImageJ [10]. Elle consiste à appliquer dans un premier temps un seuillage de l'intensité de fluorescence afin d'éliminer le bruit de fond de la surface de verre : ainsi seules les bactéries marquées apparaissent fluorescentes. Le logiciel va permettre une analyse de l'intensité de fluorescence pixel par pixel : une bactérie est identifiée par un ensemble de pixels fluorescents adjacents entourés de pixels éteints. C'est une méthode qui permet d'estimer rapidement les populations adhérentes. Nous avons vérifié la validité de cette méthode numérique de dénombrement par une sélection d'une dizaine de plans sur lesquels un comptage à l'œil nu du nombre de bactéries adhérées par plan focal a été réalisé. Cette méthode est fiable lorsque les cellules sont bien isolées. En revanche, en cas de présence

10. Schneider, Rasband et Eliceiri 2012.

d'agrégats de bactéries, la flore totale adhérente est sous-estimée : en effet, ces agrégats sont alors considérés comme un seul et unique objet. Dans toutes nos études, la proportion d'agrégats par plan focal n'a jamais excédé 10 %.
La population bactérienne adhérente (exprimée en bactérie/cm^2) est alors obtenue par moyennage des dénombrements des 10 plans focaux.

Nous avons pu aussi utiliser un modèle plus performant de microscope confocal, le microscope Leica TCS SP8 (LEICA Microsystems, France) implanté sur la plateforme de microscopie MIMA2 [11] qui nous a permis d'imager en 3D au cours du temps (jusqu'à 16 h) la formation de biofilms sans dérive axiale et latérale de la mise au point du plan focal. Les acquisitions ont été faites à l'aide d'un objectif à immersion à eau de grossissement $\times 63$ et d'ouverture numérique 1,5. Il est possible, sur ce dispositif, de programmer l'acquisition d'images x-y-z sur 9 zones différentes de la surface d'une lamelle (chaque zone ayant une surface de $123 \times 123\,\mu m^2$) séparées les unes des autres de 250 µm. Pour chaque zone on réalise une piles d'images (de résolution 512×512 (pixels)^2) sur une profondeur de 40 µm par pas de ~ 1 µm. L'intervalle de temps entre chaque acquisition (piles d'images en x-y-z soit 40 images par zone réalisées dans 9 zones différentes) est de 30 minutes.
Le traitement des données est effectué à l'aide du logiciel de traitement d'images Icy [12] et les calculs de recouvrements de surface et de biovolumes sont obtenus grâce à un algorithme utilisant la méthode des k-moyennes (*K-means*). La courbe moyenne de croissance de biofilm en terme de biovolume tracée finalement correspond à la moyenne des 9 courbes de croissance de biofilms acquises dans chacune des 9 zones d'observation.
Les reconstructions tri-dimensionnelles des biofilms et les vues en coupe ont quant à elles été obtenues grâce au logiciel Imaris (Bitplane AG, Zürich, Suisse).

— le mode *Easy 3D* pour la reconstruction tridimensionnelle d'un biofilm à partir d'une pile d'images en X-Y-Z. L'éclairage par une source de lumière virtuelle génère une ombre portée à partir de laquelle on peut déduire l'épaisseur du biofilm.
— le mode *Surpass* qui à partir du calcul des surfaces permet une visualisation en perspective d'un biofilm.

11. Microscopie et Imagerie des Micro-organismes, Animaux et Aliments (http ://mima2.jouy.inra.fr/)
12. Chaumont et al. 2012.

— le mode *Section* qui permet des vues des plans X-Y des biofilms et donc de s'intéresser à l'organisation interne du biofilm, peu visible depuis les visualisations 3D.

Ces différentes représentations sont exportées sous forme d'images au format TIF grâce à l'outil de capture intégré au logiciel Imaris.

Les cinétiques de croissance des biofilms ont été estimées à partir du plugin Gina-Fit (complément gratuit pour Microsoft Excel) [13] à partir d'un modèle log-linéaire [14].

13. Geeraerd, Valdramidis et Van Impe 2005.
14. Geeraerd, Herremans et Van Impe 2000.

Troisième partie .

Synthèse et perspectives

5. Synthèse et perspectives

L'adhésion bactérienne à un support est la première étape conduisant à la formation d'un biofilm. Elle met en jeu un certain nombre de mécanismes physico-chimiques et biologiques complexes. C'est pourtant la phase charnière sur laquelle doivent se concentrer les efforts de compréhension lorsque l'on met en perspective le contrôle de la formation, de la prévention ou encore de l'éradication des biofilms pour des applications industrielles.

Il y a un point qui n'a été que peu abordé dans la littérature et qui concerne l'hétérogénéité physico-chimique spatiale de la surface des bactéries et du substrat : pourrait-elle être un facteur régissant la réactivité des bio-interfaces (bactéries-support, bactérie-bactérie, bactérie-matrice extracellulaire des biofilms) ? C'est le cœur de ce projet de recherche fondamentale où nous avons combiné l'utilisation de l'imagerie (optique et électronique) et de nanoparticules chargées fluorescentes pour répondre aux questions suivantes :

— existe-t-il une hétérogénéité de charges à la surface des bactéries ?
— a-t-elle une influence sur les processus d'adhésion et de croissance des biofilms ?

Existe-t-il une hétérogénéité de charges à la surface des bactéries ?

La démarche expérimentale pour apporter une réponse à cette question a requis de synthétiser des nanoparticules organiques originales, anioniques et cationiques, rendues fluorescentes par l'incorporation de BODIPY en leurs cœurs et respectant les conditions suivantes :

— une taille suffisamment petite devant celle des bactéries ($\sim$ 100 nm vs 1 µm) afin de pouvoir envelopper la surface cellulaire ;
— une non (ou très faible) toxicité vis-à-vis des bactéries.

À l'aide de ces nanosondes et grâce à l'utilisation couplée de la zétamétrie, de la FCS, des microscopies optique et électronique, il a été possible de mettre en évidence et de localiser une hétérogénéité de charges à la surface des bactéries *L. lactis* et

L. innocua. S'il est confirmé que pour chacune des souches bactériennes, la charge globale de surface est négative, **il existe aussi des sites chargés positivement** répartis sur toute la surface de la paroi des bactéries *L. lactis* mais qui semblent préférentiellement localisés aux pôles des bactéries *L. innocua*. Néanmoins la quantité de ces charges positives n'a pu être déterminée eu égard à la taille des NP- et à la résolution de la microscopie confocale. L'utilisation de méthodes d'imagerie de fluorescence super résolue comme le *STORM* pourrait permettre la détermination du nombre de sites chargés positivement sur les bactéries, et ce d'autant plus finement qu'elle pourrait être couplée à l'utilisation de nano-objets de plus petite taille tels les quantum dots.

L'hétérogénéité de charges à la surface des bactéries a-t-elle une influence sur les processus d'adhésion et de croissance des biofilms ?

Pour cette partie de l'étude, nous avons mis en place un protocole d'adhésion reproductible et limitant le plus possible les paramètres à considérer :

— les deux souches bactériennes sélectionnées ne présentent pas d'appendices de surface (pilis, flagelles) qui peuvent intervenir dans l'adhésion ;
— le substrat est homogène en termes de structure de surface (sans rugosité), et de charge (négative) ;
— la durée d'adhésion est fixée à 3 heures, durée couramment rapportée pour que les bactéries atteignent un plateau d'adsorption.

Dans ces conditions, les expériences « contrôle » portant sur l'adhésion des bactéries « nues » au verre nu ou recouvert de NP+ ont révélé que le processus n'était influencé ni par le caractère hydrophobe/hydrophile de la paroi bactérienne, ni par les propriétés acide-base de Lewis des cellules et du substrat et qu'il n'était contrôlé que par les interactions Lifshitz – van der Waals et électrostatiques. Ce résultat peut surprendre si l'on considère les propriétés physico-chimiques des souches hydrophiles de *L. lactis* et *L. innocua* : on aurait pu s'attendre à une adhésion renforcée à la surface de verre par l'intermédiaire de réactions acido-basiques. Tout se passe comme si au bout de 3 h d'adhésion, certaines propriétés physico-chimiques tant du substrat que des bactéries étaient masquées. Les réactions acido-basiques sont peut-être de moindre intensité et/ou ont une cinétique plus rapide : on peut regretter de n'avoir

pas réalisé de cinétiques d'adsorption des bactéries au substrat qui aurait peut-être pu permettre une meilleure discrimination de l'ensemble des réactions physico-chimiques d'interaction.

Dans la suite de ce travail nous avons mesuré le processus d'adhésion pour des bactéries ayant une charge de surface uniforme, positive ou négative en présence de NP+ ou NP- et ainsi contrôlé si l'hétérogénéité de charges de surface des bactéries influençait leur adhésion au substrat. Nous avons ainsi mis en évidence que lorsque la microhétérogénéité de charges positives de la surface des bactéries *L. lactis* est masquée par des NP-, l'adhésion des cellules à la surface de verre augmente dans l'eau distillée. Ce résultat met en exergue que **les interactions bactérie *L. lactis*–substrat mettent en jeu autant les charges négatives que positives de la surface des bactéries**. Il n'a par ailleurs été observé que pour les bactéries *L. lactis*, ce qui pourrait s'expliquer par une densité des charges positives plus importante que pour *L. innocua* et/ou à cause de leur répartition régulière sur la surface de *L. lactis* et alors que ces charges positives sont plutôt localisées aux pôles des bactéries *L. innocua*.

Malheureusement, le contrôle du processus d'adhésion en présence de NP+ n'a pas répondu à nos attentes en raison d'un verrou expérimental : il n'a pas été possible d'éliminer de la suspension bactéries-NP+ l'excès de nanoparticules non fixées. Ainsi, la saturation des charges négatives de surface a concerné autant les bactéries que la surface de verre et nous avons été confrontés à des conditions d'adhésion NP+/NP+ (pour un ratio NP+/bactérie de 200 000), non significativement différentes des interactions bactéries/substrat. Néanmoins il serait intéressant de renouveler ces expériences avec des nanoparticules de plus petites tailles. En effet il est fort probable qu'eu égard de la taille des NP+ utilisées dans ce travail, les charges positives de la surface de la bactérie aient été masquées.

Dans la séquence d'expériences avec les NP+, on notera néanmoins un résultat inattendu : les NP+ sont capables de désorber des bactéries *L. lactis* de la surface de verre mais pas les bactéries *L. innocua*, ce qui suggère que pour les deux types de bactéries les forces d'adhésion au verre ne sont pas les mêmes. Des expériences de mesures de force par AFM seraient bien adaptées pour vérifier cette hypothèse.

Le dernier objectif visé dans ce travail était de suivre la formation d'un biofilm et de contrôler si la microhétérogénéité de la surface des bactéries jouait aussi un rôle dans la construction de la structure 3D. Dans ce cas aussi nous avons obtenu un résultat probant concernant **le rôle des interactions attractives bactérie-bactérie dans le développement des biofilms** : en inhibant ces interactions par des NP+ ou NP- à la surface des bactéries, la croissance et le développement du biofilm sont ralentis.

Comme on aura pu le constater, ce travail a constitué une démarche scientifique exploratoire qui a nécessité de mettre en place un protocole permettant des mesures reproductibles pour sonder l'hétérogénéité des propriétés physico-chimiques des bactéries et du substrat. Comme pour toute nouvelle approche, l'interprétation et la discussion des résultats souffrent d'un manque de support bibliographique et de références, mais après trois années d'expériences, on a aussi la satisfaction d'apporter des résultats originaux qui permettent de mettre en perspective plusieurs autres thèses !

Nous venons de pointer différents points de cette étude qui mériteraient d'être améliorés comme :

— l'utilisation de nanoparticules de plus petite taille, pour mieux révéler la microhétérogénéité de charges de la surface des bactéries et du substrat,
— la réalisation de cinétiques d'adhésion pour une meilleure discrimination des différentes interactions physico-chimiques qui contrôlent l'adhésion cellulaire,
— l'utilisation de méthodes d'imagerie toujours plus résolues pour une meilleure localisation et pourquoi pas une quantification des charges de surface.

Nous avons montré ici l'existence et le rôle de la microhétérogénéité de charges à la surface des bactéries. Il serait intéressant de prolonger cette étude en s'intéressant à d'autres propriétés physico-chimiques de la surface des bactéries mais aussi de la matrice des biofilms comme l'hétérogénéité des zones d'hydrophobicité/hydrophilie, de pH ou d'oxydo-réduction. Ces travaux peuvent être raisonnablement mis en perspective grâce à la performance de la chimie actuelle qui permet presque sans limite le développement de nano-objets adaptés.

Comme nous l'avons mentionné, l'adhésion est un processus complexe et nous nous sommes limités ici à un système simple en termes de substrat, propriétés de surface des bactéries et milieu environnant. Il y aurait bien sûr un grand intérêt à utiliser

notre modèle d'étude combinant les outils de la chimie et de l'imagerie en considérant des systèmes plus près « de la vraie vie » faisant par exemple intervenir des protéines dans le milieu, la rugosité du support, la présence d'appendices de surface sur les bactéries...

Comme on peut le constater, les perspectives d'études dans ce domaine de recherche restent très larges et diversifiées et mériteraient d'être poursuivies dans l'objectif de mieux servir les applications industrielles et médicales dépendantes des processus de bioadhésion (la promouvoir ou l'inhiber) et de formation de biofilms.

Liste d'abréviations

L. innocua	*Listeria innocua*
L. lactis	*Lactococcus lactis*
L. monocytogenes	*Listeria monocytogenes*
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*)
DO	Densité optique
FCS	Spectroscopie de corrélation de fluorescence (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*)
M.E.	Mobilité électrophorétique
M17A	M17 Agar (gélose M17)
M17B	M17 Broth (bouillon M17)
MATS	Microbial Adhesion To Solvents
NP+	Nanoparticules cationiques
NP-	Nanoparticules anioniques
TSA	Tryptic Soy Agar (gélose tryptone-soja)
TSB	Tryptic Soy Broth (bouillon tryptone-soja)
UFC	Unités Formant Colonie

Bibliographie

Absolom, Lamberti, Policova, Zingg, Oss et Neumann (1983). « Surface thermodynamics of bacterial adhesion. » In : *Applied and Environmental Microbiology* 46.1, p. 90–97. eprint : http://aem.asm.org/content/46/1/90.full.pdf+html. URL : http://aem.asm.org/content/46/1/90.abstract (cf. p. 28).

Allion, (2004). « Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides : mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens. » Thèses. ENSIA (AgroParisTech). URL : https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00003703 (cf. p. 97).

An, et Friedman (1998). « Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. » In : *Journal of Biomedical Materials Research* 43, p. 338–348 (cf. p. 19).

Barberousse, Brayner, Do Rego, Castaing, Beurdeley-Saudou et Colombet (2007). « Adhesion of facade coating colonisers, as mediated by physicochemical properties ». In : *Biofouling* 23.1. PMID : 17453725, p. 15–24. DOI : 10.1080/08927010601093026. eprint : http://dx.doi.org/10.1080/08927010601093026. URL : http://dx.doi.org/10.1080/08927010601093026 (cf. p. 93).

Bellon-Fontaine, Rault et Van Oss (1996). « Microbial adhesion to solvents : a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acide-base properties of microbial cells. » In : *Colloids and Surfaces, B : Biointerfaces* 7, p. 47–53 (cf. p. 65, 87).

Boonaert, et Rouxhet (2000). « Surface of Lactic Acid Bacteria : Relationships between Chemical Composition and Physicochemical Properties ». In : *Applied and Environmental Microbiology* 66.6, p. 2548–2554. ISSN : 0099-2240. DOI : 10.1128/aem.66.6.2548-2554.2000. URL : http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.6.2548-2554.2000 (cf. p. 16).

Bos, Mei et Busscher (1999). « Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study ». In : *FEMS Microbiology Reviews* 23.2, p. 179–230. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x. URL : http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x (cf. p. 25).

Bouttier, Ntsama, Bellon-Fontaine et Fourniat (1995). « Rôle des interactions physico-chimiques dans l'adhésion initiale de *Listeria innocua*. » In : *Adhésion des micro-organismes aux surfaces*. Sous la dir. de Bellon-Fontaine et Fourniat. Lavoisier Tec&Doc (cf. p. 18, 25, 68, 83, 98).

Briandet, Fechner, Naïtali et Dreanno (2012). *Biofilms, quand les microbes s'organisent*. Carnets de sciences. Quae. isbn : 9782759217649. url : https://books.google.fr/books?id=r-5WbAdN8ckC (cf. p. 31).

Briandet, Meylheuc, Maher et Bellon-Fontaine (1999). « *Listeria monocytogenes* Scott A : cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions ». In : *Applied and Environmental Microbiology* 65, p. 5328–5333 (cf. p. 18).

Briandet, Herry et Bellon-Fontaine (2001). « Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. » In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 21, p. 299–310 (cf. p. 44, 45, 71).

Bruzaud, (2015). « Approches mécanistiques interdisciplinaires et multi-échelles de l'adhésion bactérienne et de la formation de biofilms sur matériaux innovants. » Thèse de doct. AgroParisTech (cf. p. 99).

Bruzaud, Tarrade, Coudreuse, Canette, Herry, Taffin de Givenchy, Darmanin, Guittard, Guilbaud et Bellon-Fontaine (2015). « Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of Pseudomonas aeruginosa PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 131, p. 59–66. issn : 0927-7765. doi : 10.1016/j.colsurfb.2015.04.036. url : http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.036 (cf. p. 68).

Bulard, (2012). « L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire. » Thèse de doct. Université Paris-Sud (cf. p. 16, 30, 66, 68, 86, 97).

Busscher, Weerkamp, Mei, Pelt, Jong et Arends (1984). « Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. » In : *Applied and Environmental Microbiology* 48.5, p. 980–983. eprint : http://aem.asm.org/content/48/5/980.full.pdf+html. url : http://aem.asm.org/content/48/5/980.abstract (cf. p. 29).

Cerning, (1990). « Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria ». In : *FEMS Microbiology Letters* 87.1-2, p. 113–130. issn : 1574-6968. doi : 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04883.x. url : http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04883.x (cf. p. 17).

Chapot-Chartier, Vinogradov, Sadovskaya, Andre, Mistou, Trieu-Cuot, Furlan, Bidnenko, Courtin, Pechoux et al. (2010). « Cell Surface of *Lactococcus lactis* Is Covered by a Protective Polysaccharide Pellicle. » In : *Journal of Biological Chemistry* 285.14, p. 10464–10471. ISSN : 1083-351X. DOI : 10.1074/jbc.m109.082958. URL : http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.082958 (cf. p. 17).

Chaumont, Dallongeville, Chenouard, Herve, Pop, Provoost, Meas-Yedid, Pankajakshan, Lecomte, Le Montagner, Lagache, Dufour et Olivo-Marin (2012). « Icy : an open bioimage informatics platform for extended reproducible research ». In : *Nature Methods* 9, p. 690–696. ISSN : 1548-7091. DOI : 10.1038/nmeth.2075. URL : http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2075 (cf. p. 134).

Cleveland, Montville, Nes et Chikindas (2001). « Bacteriocins : safe, natural antimicrobials for food preservation ». In : *International Journal of Food Microbiology* 71.1, p. 1–20. ISSN : 0168-1605. DOI : 10.1016/s0168-1605(01)00560-8. URL : http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8 (cf. p. 17).

Comstock, et Kasper (2006). « Bacterial Glycans : Key Mediators of Diverse Host Immune Responses ». In : *Cell* 126.5, p. 847–850. ISSN : 0092-8674. DOI : 10.1016/j.cell.2006.08.021. URL : http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.021 (cf. p. 16).

Costerton, Geesey et Cheng (1978). « How Bacteria Stick ». In : *Scientific American* 238.1, p. 86–95. DOI : 10.1038/scientificamerican0178-86. URL : http://dx.doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86 (cf. p. 29).

Costerton, Lewandowski, Caldwell, Korber et Lappin-Scott (1995). « Microbial biofilms ». In : *Annual Review of Microbiology* 49, p. 711–745 (cf. p. 29).

CREBS (2011). *La paroi*. URL : http://www.biologiemarine.com/micro/paroi.htm (visité le 18/09/2015) (cf. p. 12).

Dejarguin, et Landau (1941). « Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes ». In : *Acta Physico Chemica URSS* 14, p. 633 (cf. p. 24).

Delaittre, (2008). « Polymérisation Radicalaire Contrôlée en Émulsion et Dispersion sans Tensioactif. Synthèse de nanoparticules Thermo- et/ou pH-sensibles. » Thèse de doct. Université Paris VI Pierre & Marie Curie (cf. p. 37).

Delcour, Ferain, Deghorain, Palumbo et Hols (1999). In : *Antonie van Leeuwenhoek* 76.1/4, p. 159–184. ISSN : 0003-6072. DOI : 10.1023/a:1002089722581. URL : http://dx.doi.org/10.1023/A:1002089722581 (cf. p. 17).

Dorobantu, Bhattacharjee, Foght et Gray (2008). « Atomic Force Microscopy Measurement of Heterogeneity in Bacterial Surface Hydrophobicity ». In : *Langmuir* 24.9, p. 4944–4951. ISSN : 1520-5827. DOI : 10.1021/la7035295. URL : http://dx.doi.org/10.1021/la7035295 (cf. p. 14).

Ferrand, (2009). URL : http://www.fresnel.fr/spip/spip.php?rubrique187 (visité le 28/07/2015) (cf. p. 58).

Fletcher, et Pringle (1985). « The effect of surface free energy and medium surface tension on bacterial attachment to solid surfaces ». In : *Journal of Colloid and Interface Science* 104.1, p. 5–14. ISSN : 0021-9797. DOI : 10.1016/0021-9797(85)90004-9. URL : http://dx.doi.org/10.1016/0021-9797(85)90004-9 (cf. p. 28).

Futura-Sciences (2006). *Principe du microscope confocal*. URL : http://fr.cdn.v5.futura-sciences.com/sources/images/actu/rte/8153_principe_confocal.jpg (visité le 28/07/2015) (cf. p. 132).

Gálvez, Abriouel, López et Omar (2007). « Bacteriocin-based strategies for food biopreservation ». In : *International Journal of Food Microbiology* 120.1-2, p. 51–70. ISSN : 0168-1605. DOI : 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001. URL : http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001 (cf. p. 17).

Geeraerd, Herremans et Van Impe (2000). « Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. » In : *International Journal of Food Microbiology* 59.3, p. 185–209 (cf. p. 135).

Geeraerd, Valdramidis et Van Impe (2005). « GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. » In : *International Journal of Food Microbiology* 102.1, p. 95–105 (cf. p. 135).

Ghuysen, et Hakenbeck (1994). *Bacterial Cell Wall*. New Comprehensive Biochemistry. Elsevier Science. ISBN : 9780080860879. URL : https://books.google.fr/books?id=RjBxBsRY-AEC (cf. p. 12).

Giaouris, Chapot-Chartier et Briandet (2009). « Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties ». In : *International Journal of Food Microbiology* 131, p. 2–9. DOI : 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.006 (cf. p. 15, 16).

Good, et Girifalco (1960). « A theory for estimation of surface and interfacial energies. III. Estimation of surface energies of solids from contact angle data. » In : *Journal of Physical Chemistry* 64, p. 561–565 (cf. p. 20).

Grazon, Rieger, Méallet-Renault, Clavier et Charleux (2011). « One-Pot Synthesis of Pegylated Fluorescent Nanoparticles by RAFT Miniemulsion Polymerization Using a Phase Inversion Process ». In : *Macromolecular Rapid Communications* 32.9-10, p. 699–705. ISSN : 1521-3927. DOI : 10.1002/marc.201100008. URL : http://dx.doi.org/10.1002/marc.201100008 (cf. p. 35, 40, 43, 46, 51, 54).

Guiot, Georges, Brun, Fontaine-Aupart, Bellon-Fontaine et Briandet (2002). « Heterogeneity of Diffusion Inside Microbial Biofilms Determined by Fluorescence Correlation Spectroscopy Under Two-photon Excitation ». In : *Photochemistry and Photobiology* 75.6, p. 570–578. ISSN : 0031-8655. DOI : 10.1562/0031-8655(2002)0750570hodimb2.0.co2. URL : http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750570HODIMB2.0.CO2 (cf. p. 45, 71).

Habimana, Legoff, Juillard, Bellon-Fontaine, Buist, Kulakauskas et Briandet (2007). « Role of cell wall proteinase PrtP in the adhesion of lactococci to solid surfaces ». In : *BMC Microbiology* 2, p. 7–36 (cf. p. 15, 96).

Habimana, Meyrand, Meylheuc, Kulakauskas et Briandet (2009). « Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes*. » In : *Applied and Environmental Microbiology* 75, p. 7814–7821 (cf. p. 18).

Habimana, Le Goff, Juillard, Bellon-Fontaine, Buist, Kulakauskas et Briandet (2007). « Positive role of cell wall anchored proteinase PrtP in adhesion of lactococci ». In : *BMC Microbiology* 7.1, p. 36. ISSN : 1471-2180. DOI : 10.1186/1471-2180-7-36. URL : http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-7-36 (cf. p. 16, 25, 66, 68, 93, 97).

Haustein, et Schwille (2007). « Fluorescence Correlation Spectroscopy : Novel Variations of an Established Technique ». In : *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 36.1. PMID : 17477838, p. 151–169. DOI : 10.1146/annurev.biophys.36.040306.132612. eprint : http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.36.040306.132612. URL : http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.36.040306.132612 (cf. p. 58).

Henrici, (1933). « Studies of Freshwater Bacteria : I. A Direct Microscopic Technique ». In : *Journal of Bacteriology* 25, p. 277–287 (cf. p. 29).

Hermansson, (1999). « The DLVO theory in microbial adhesion ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 14.1–4, p. 105–119. ISSN : 0927-7765. DOI : http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00029-6. URL : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776599000296 (cf. p. 25).

Houry, Briandet, Aymerich et Gohar (2009). « Involvement of motility and flagella in Bacillus cereus biofilm formation ». In : *Microbiology* 156.4, p. 1009–1018. ISSN : 1465-2080. DOI : 10.1099/mic.0.034827-0. URL : http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.034827-0 (cf. p. 11).

Introduction to SEM (2015). English. Hitachi High-Technologies Corporation. URL : http://www.hitachi-hightech.com/global/tm/what/intro/ (visité le 30/09/2015) (cf. p. 54).

Iseppi, Niederhäusern, Anacarso, Messi, Sabia, Pilati, Toselli, Esposti et Bondi (2011). « Anti-listerial activity of coatings entrapping living bacteria ». In : *Soft Matter* 7.18, p. 8542. ISSN : 1744-6848. DOI : 10.1039/c1sm05650f. URL : http://dx.doi.org/10.1039/C1SM05650F (cf. p. 17).

Israelachvili, (2011). *Intermolecular and surface forces.* 3è édition. Academic Press (cf. p. 19, 23, 25).

Jia, Shen et Xu (2001). « Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan ». In : *Carbohydrate Research* 333.1, p. 1–6. ISSN : 0008-6215. DOI : http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00112-4. URL : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621501001124 (cf. p. 68).

Jones, (2010). *An example of Dynamic Light Scattering.* URL : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DLS.svg (visité le 28/07/2015) (cf. p. 56).

Jucker, Harms, Hug et Zehnder (1997). « Adsorption of bacterial surface polysaccharides on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 9.6, p. 331–343. ISSN : 0927-7765. DOI : 10.1016/s0927-7765(97)00038-6. URL : http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765(97)00038-6 (cf. p. 27).

Jucker, Harms et Zehnder (1996). « Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to glass and teflon ». In : *Journal of Bacteriology* 178 (18), p. 5472–5479 (cf. p. 27).

Katsikogianni, et Missirlis (2004). « Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. » In : *European cells & materials [electronic resource]* 8, p. 37–57. URL : http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol008/vol008a05.php (cf. p. 96).

Kelly, et Ward (2002). « Genotypic vs. phenotypic biodiversity in *Lactococcus lactis* ». In : *Microbiology* 148.11, p. 3332–3333. URL : http://mic.sgmjournals.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-148-11-3332 (cf. p. 15).

Larpent, (2000). *Listeria*. Sous la dir. de Tec&Doc **Paris**. 2e éd. (cf. p. 18, 19).

Léonard, Degraeve, Gharsallaoui, Saurel et Oulahal (2014). « Design of biopolymeric matrices entrapping bioprotective lactic acid bacteria to control Listeria monocytogenes growth : Comparison of alginate and alginate-caseinate matrices entrapping Lactococcus lactis subsp. lactis cells ». In : *Food Control* 37, p. 200–209. ISSN : 0956-7135. DOI : 10.1016/j.foodcont.2013.09.041. URL : http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.041 (cf. p. 17).

Lepoittevin, Masson, Huc, Haut et Roger (2006). « Synthesis and characterization of glycosylated nanoparticles ». In : *e-Polymers* 32, p. 415–429 (cf. p. 38, 39).

Leriche, Chassaing et Carpentier (1999). « Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis* ». In : *International Journal of Food Microbiology* 51.2-3, p. 169–182. ISSN : 0168-1605. DOI : 10.1016/s0168-1605(99)00128-2. URL : http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00128-2 (cf. p. 15).

« CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005 » (2005). In : sous la dir. de Lide. CRC Press, Boca Raton (USA). Chap. Fluid Properties. URL : http://www.hbcpnetbase.com (cf. p. 22).

Lister, (1873). « A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. » In : *Quarterly Microbiological Sciences* 13, p. 380–408 (cf. p. 15).

Lohnis, (1909). « Die Benennung der Milchsaurebakterien. » In : *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II.* 22, p. 553–555 (cf. p. 15).

Marshall, et Cruickshank (1973). « Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interfaces ». In : *Archiv für Mikrobiologie* 91 (1). DOI : 10.1007/BF00409536 (cf. p. 14, 25).

MBW, (2004). « The role of the biofilm matrix in structural development. » In : *Mathematical Medicine and Biology* 21, p. 147–166 (cf. p. 30).

Mercier, Durrieu, Briandet, Domakova, Tremblay, Buist et Kulakauskas (2002). « Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation ». In : *Molecular Microbiology* 46.1, p. 235–243. ISSN : 1365-2958. DOI : 10.1046/j.1365-2958.2002.03160.x. URL : http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03160.x (cf. p. 15).

Meyrand, Guillot, Goin, Furlan, Armalyte, Kulakauskas, Cortes-Perez, Thomas, Chat, Péchoux, Dupres, Hols, Dufrêne, Trugnan et Chapot-

Chartier (2013). « Surface Proteome Analysis of a Natural Isolate of Lactococcus lactis Reveals the Presence of Pili Able to Bind Human Intestinal Epithelial Cells ». In : *Molecular & Cellular Proteomics* 12.12, p. 3935–3947. ISSN : 1535-9484. DOI : 10.1074/mcp.m113.029066. URL : http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M113.029066 (cf. p. 16).

Mozes, et Rouxhet (1987). « Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. » In : *Journal of Microbiological Methods* 6, p. 99–112 (cf. p. 87).

– (1990). « Microbial hydrophobicity and fermentation technology. » In : *Microbial Cell Surface Hydrophobicity.* Sous la dir. de Doyle et Rosenberg. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA, p. 75–105 (cf. p. 60).

Orla-Jensen, (1919). *The Lactic Acid Bacteria.* Sous la dir. d'Host et Son **Copenhagen** (cf. p. 15).

Oxaran, Ledue-Clier, Dieye, Herry, Péchoux, Meylheuc, Briandet, Juillard et Piard (2012). « Pilus Biogenesis in Lactococcus lactis : Molecular Characterization and Role in Aggregation and Biofilm Formation ». In : *PLoS ONE* 7.12. Sous la dir. d' Biswas, e50989. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0050989. URL : http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0050989 (cf. p. 9, 16).

Peel, Donachie et Shaw (1988). « Temperature-dependent Expression of Flagella of *Listeria manocytogenes* Studied by Electron Microscopy, SDS-PAGE and Western Blotting ». In : *Microbiology* 134.8, p. 2171–2178. ISSN : 1465-2080. DOI : 10.1099/00221287-134-8-2171. URL : http://dx.doi.org/10.1099/00221287-134-8-2171 (cf. p. 19).

Piard, et Briandet (2015). « Lactic Acid Bacteria Biofilms ». In : *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria.* John Wiley & Sons, Ltd, p. 341–361. ISBN : 9781118868386. DOI : 10.1002/9781118868386.ch20. URL : http://dx.doi.org/10.1002/9781118868386.ch20 (cf. p. 10).

Pratt-Terpstra, Weerkamp et Busscher (1987). « Adhesion of Oral Streptococci from a Flowing Suspension to Uncoated and Albumin-coated Surfaces ». In : *Microbiology* 133.11, p. 3199–3206. ISSN : 1465-2080. DOI : 10.1099/00221287-133-11-3199. URL : http://dx.doi.org/10.1099/00221287-133-11-3199 (cf. p. 28).

Rijnaarts, Norde, Bouwer, Lyklema et Zehnder (1995). « Reversibility and mechanism of bacterial adhesion ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 4.1, p. 5–22. ISSN : 0927-7765. DOI : http://dx.doi.org/10.1016/0927-7765(94)01146-V. URL : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/092777659401146V (cf. p. 25).

Roberts, (1996). « THE BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF CAPSULAR POLYSACCHARIDE PRODUCTION IN BACTERIA ». In : *Annu. Rev. Microbiol.* 50.1, p. 285–315. ISSN : 1545-3251. DOI : 10.1146/annurev.micro.50.1.285. URL : http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.285 (cf. p. 16).

Ruiz Villarreal, (2008). *Average prokaryote cell.* URL : https://en.wikipedia.org/wiki/File:Average_prokaryote_cell-_en.svg (visité le 18/09/2015) (cf. p. 10).

Rutter, et Vincent (1980). « Adhesion of microorganisms to surfaces : physicochemical aspects. » In : *Microbial Adhesion to surfaces.* Ellis Horwood, London (UK) (cf. p. 21).

Schleifer, Kraus, Dvorak, Kilpper-Balz, Collins et Fischer (1985). « Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen.nov ». In : *Systematic and Applied Microbiology* 6, p. 183–195 (cf. p. 15).

Schneider, Rasband et Eliceiri (2012). « NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis ». In : *Nature Methods* 9.7, p. 671–675. ISSN : 1548-7105. DOI : 10.1038/nmeth.2089. URL : http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089 (cf. p. 133).

Seeliger, et Jones (1986). *Genus Listeria.* T. 2. Williams et Wilkins Baltimore, p. 1235–1245 (cf. p. 19).

Uyen, Busscher, Weerkamp et Arends (1985). « Surface free energies of oral streptococci and their adhesion to solids ». In : *FEMS Microbiology Letters* 30.1-2, p. 103–106. ISSN : 1574-6968. DOI : 10.1111/j.1574-6968.1985.tb00993.x. URL : http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb00993.x (cf. p. 28).

Vacheethasanee, Temenoff, Higashi, Gary, Anderson, Bayston et Marchant (1998). « Bacterial surface properties of clinically isolated Staphylococcus epidermidis strains determine adhesion on polyethylene ». In : *J. Biomed. Mater. Res.* 42.3, p. 425–432. ISSN : 1097-4636. DOI : 10.1002/(sici)1097-4636(19981205)42:3<425::aid-jbm12>3.0.co;2-f. URL : http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19981205)42:3%3C425::AID-JBM12%3E3.0.CO;2-F (cf. p. 96).

Vadillo-Rodríguez, Busscher, Norde, Vries et Mei (2003). « On Relations between Microscopic and Macroscopic Physicochemical Properties of Bacterial Cell Surfaces : An AFM Study on Streptococcus mitis Strains ». In : *Langmuir* 19.6, p. 2372–2377. ISSN : 1520-5827. DOI : 10.1021/la0206581. URL : http://dx.doi.org/10.1021/la0206581 (cf. p. 14).

Van Oss, (1996). *Forces interfaciales en milieux aqueux.* Sous la dir. de Masson (cf. p. 19, 22, 23, 25, 93).

Van Oss, Chaudhury et Good (1988). « Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems ». In : *Chemical Reviews* 88, p. 927–941 (cf. p. 19, 28).

Verwey, et Overbeek (1948). *Theory of the stability of lyophobic colloids.* Elsevier (cf. p. 24).

Visser, (1976). « Adhesion of colloidal particles. » In : *Journal of Colloid and Interface Science* 3, p. 714 (cf. p. 22).

Wahl, (2013). « Vers l'élaboration de nouveaux matériaux biodégradables anti-adhésion bactérienne : caractérisation structurale et physico-chimique des surfaces. » Mém.de mast. Université Lille 1 (cf. p. 66, 67).

Weigmann, (1899). « Versuch einer Einteilung der Milchsaurebakterien des Molkereigewerbes. » In : *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, lnfektionskrankheiten und Hygiene* 5, p. 825–831, 859–870 (cf. p. 15).

Zobell, (1943). « The Effect of Solid Surface upon Bacterial Activity ». In : *Journal of Bacteriology* 45, p. 555–564 (cf. p. 29).

Valorisation scientifique

Posters

1. B. Chappaz, K. Steenkeste, R. Meallet–Renault, G. Clavier, B. Lepoittevin, P. Roger, J.-M. Herry, R. Briandet, M.-N. Bellon Fontaine, M.-P. Fontaine-Aupart. Imagerie moléculaire de nanosondes fonctionnalisées pour l'étude de l'hétérogénéité physico-chimique spatiale de bactéries. Journées Françaises des Jeunes Physico-Chimistes 13, 15-19 Octobre 2012, Dinard.
2. B. Chappaz, K. Steenkeste, R. Meallet–Renault, G. Clavier, B. Lepoittevin, P. Roger, J.-M. Herry, R. Briandet, M.-N. Bellon Fontaine, M.-P. Fontaine-Aupart. A molecular view of charge surface microheterogenity effect on bacterial adhesion and biofilm formation using organic nanoprobes. ASM Biofilms 2015, 24-29 Octobre 2015, Chicago, USA.

Communications orales

3. B. Chappaz, K. Steenkeste, R. Meallet–Renault, G. Clavier, B. Lepoittevin, P. Roger, J.-M. Herry, R. Briandet, M.-N. Bellon Fontaine, M.-P. Fontaine-Aupart. Influence de nanoparticules cationiques sur la biocontamination d'un matériau modèle : exemple sur des souches de *Bacillus subtilis* et *Listeria innocua*. Journée Thématique Junior InterBio 13, 19 Juin 2013, Paris.
4. B. Chappaz, K. Steenkeste, R. Meallet–Renault, G. Clavier, B. Lepoittevin, P. Roger, J.-M. Herry, R. Briandet, M.-N. Bellon Fontaine, M.-P. Fontaine-Aupart. Influence de la micro-hétérogénéité physico-chimique de la paroi bactérienne sur la biocontamination d'une surface de verre. 6èmes Journées thématiques du Réseau National Biofilms, 19-21 Novembre 2013, Pau.

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Titre : Imagerie moléculaire corrélative de nanosondes fonctionnalisées pour l'étude de l'hétérogénéité physico- chimique spatiale de microorganismes associés aux surfaces.

Mots clés : Imagerie moléculaire, Nanoparticules, Bactéries, Hétérogénéité

Résumé : Toutes les interfaces solide-liquide sont potentiellement propices à l'adhésion bactérienne et à la formation de biofilms. Comprendre les mécanismes d'organisation de cette vie sur les surfaces (bioadhésion) constitue un défi scientifique passionnant ; c'est aussi un impératif pour apporter des réponses pertinentes aux questionnements de la société et des industries sur la manière de minimiser les effets délétères des biofilms mais aussi exploiter leurs nombreuses potentialités pour différentes applications. Etudier la bioadhésion, c'est disséquer à l'échelle moléculaire l'ensemble des paramètres physico-chimiques et biologiques qui vont contrôler l'adhésion des cellules aux surfaces, leur prolifération, les interactions entre elles jusqu'à former une structure 3D.
C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse où nous avons combiné des outils de la physique (imagerie de fluorescence, imageries électroniques) et de la chimie (nanoparticules fluorescentes de polystyrène fonctionnalisées avec des ammoniums quaternaires ou des groupements carboxylates leur conférant respectivement un caractère cationique ou anionique) pour visualiser et quantifier l'adhésion de deux souches bactériennes d'intérêt dans l'industrie alimentaire, *Lactococcus lactis* et *Listeria innocua*, un modèle non pathogène de *Listeria monocytogenes*. Nous avons pu mettre en évidence une microhétérogénéité de charge positive à la surface des bactéries qui joue un rôle significatif aussi bien dans l'adhésion des cellules au substrat que dans la formation des biofilms.

Title : Correlative molecular imaging of functionnalized nanoparticles for the study of spatial physico-chemical heterogeneity of surface-associated microorganisms.

Keywords : Molecular imaging, Nanoparticles, Bacteria, Heterogeneity

Abstract : All solid-liquid interfaces are potentially conducive to bacterial adhesion and biofilm formation. Understanding the mechanisms of this life organization on surfaces (bioadhesion) is an exciting scientific challenge; it is also imperative to provide relevant answers to questions of society and industry on how to minimize the deleterious effects of biofilms but also exploit their potential for different applications. Studying bioadhesion requires to dissect all the physico-chemical and biological parameters, at the molecular level, that control cell adhesion to surfaces, their proliferation, the interactions between them to form a 3D structure.
It is the purpose of this thesis: physical (fluorescence imaging, electronic imaging) and chemical tools (polystyrene fluorescent nanoparticles functionalized with quaternary ammonium or carboxylate groups, conferring a cationic or anionic character respectively) were combined to visualize and quantify the adhesion of two bacterial strains of interest in the food industry, *Lactococcus lactis* and *Listeria innocua*, a non-pathogenic model of *Listeria monocytogenes*. The results highlight a positive charge microheterogeneity on the bacteria surface that plays a significant role both in cell adhesion to the substrate as in the biofilm formation.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France