HAL
open science

Etude des mécanismes de transfert de bactéries déformables en microfiltration frontale

Arthur Gaveau

To cite this version:

Arthur Gaveau. Etude des mécanismes de transfert de bactéries déformables en microfiltration frontale. Environnement et Société. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30046 . tel-01523275

HAL Id: tel-01523275

https://theses.hal.science/tel-01523275v1

Submitted on 16 May 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.

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : *l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)*

Présentée et soutenue le *01/04/2016* **par :**

ARTHUR GAVEAU

Étude des mécanismes de transfert de bactéries déformables en microfiltration frontale

JURY

ROQUES CHRISTINE	Professeur, Université de Toulouse	Président du jury
WISNIEWSKI CHRISTELLE	Professeur, Université de Montpellier 1	Rapporteur
CRESPO JOÃO G.	Professeur, Universidade Nova de Lisboa	Rapporteur
LAFFORGUE CHRISTINE	Maître de Conférences, INSA Toulouse	Examinateur
LORAIN OLIVIER	Responsable R&D, POLYMEM	Examinateur
DAGUE ETIENNE	Chargé de Recherche, LAAS-CNRS	Invité
COETSIER CLEMENCE	Maître de Conférences, Université de Toulouse	Invité
CAUSSERAND CHRISTEL	Professeur, Université de Toulouse	Directrice de thèse

École doctorale et spécialité :
MEGEP : Génie des procédés et de l'Environnement
Unité de Recherche :
Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse (UMR 5503)
Directeur de Thèse :
Professeur Christel CAUSSERAND
Rapporteurs :
Christelle WISNIEWSKI et *João G. CRESPO*

A mon père

Avant-propos

Avant toute chose, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'immense honneur de participer à l'évaluation de mes premiers travaux de recherche. Un grand merci à Mme Roques, présidente du jury, pour son enthousiasme sans égal. Un immense merci aux deux rapporteurs Mme Wisniewski et Mr Crespo qui ont contribué à la finalisation de mon projet et pour les échanges très enrichissants qui en ont suivi ma soutenance. Sincères remerciements, également, à Mme Lafforgue et Mr Lorrain pour vos commentaires, questions et mises en perspectives de mes travaux.

Je remercie ensuite l'ensemble des personnes qui ont rendu ce travail possible. Tout d'abord, la direction du Laboratoire de Génie Chimique : Mr Bacchin et Mr Aimar – je vous remercie pour votre accueil et pour votre expertise précieuse. Un grand merci à Mme Causserand qui m'a permis de réaliser ce doctorat et qui m'a permis de dépasser les difficultés rencontrées pendant ces années. Toujours au sein du LGC, merci à Mme Coetsier pour son intérêt porté à ma problématique et enfin merci à l'ensemble des membres du LGC-Rangueil pour votre soutien quotidien. Je remercie également Mr Dague de l'équipe Nano-Bio-Systèmes du LAAS pour son investissement dans mes travaux et pour m'avoir fait découvrir la technologie AFM.

Je souhaite également adresser de vifs remerciements à toutes les personnes qui m'ont accompagné dans mes démarches scientifiques et qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Merci à Sophie Pecastaings et Cathy Feuillolay de la Faculté de Pharmacie pour leur aide dans le développement des technique de microbiologie ; merci à Aurélie Le Ru de l'INRA d'Auzeville, à Elisabeth Neuhauser du LBAE de Auch, à Véronique et Cécile de l'ITAV pour leurs aides si précieuses et leurs conseils avisés ; enfin merci à mes trois stagiaires Maëlle, Alexandre et Marie qui m'ont aidé à valider certains points et pour les dilutions par centaines que je leur ai imposé.

Enfin, un grand merci à mes proches, ma famille, mes amis pour leur soutient : ils ont fini par admettre que tout était possible.

Table des matières

Introduction *17*

Chapitre I Contexte et problématique *21*

Partie A. Elimination de microorganismes par filtration membranaire 23

A.1. Applications des procédés membranaires à des fluides contenant des microorganismes 23

A.2. Filtration membranaire : principe et terminologie 25

A.2.1. Classification des procédés de séparation par filtration membranaire 27

A.2.2. Modes de filtration 27

A.2.3. Design et matériaux 27

A.3. Phénomènes de transport en filtration membranaire 28

A.3.1. La polarisation de concentration 29

A.3.2. Le colmatage 29

A.4. Sélectivité des procédés membranaires 34

A.4.1. Efficacité de la rétention 34

A.4.2. Mécanismes de sélectivité spécifiques aux microorganismes 34

Transfert et type de gram 36

Transfert et volume cellulaire 38

Transfert et chimiotactisme 38

Partie B. Le cas spécifique d'une particule vivante : la cellule bactérienne 40

B.1. Généralités 40

B.2. Caractéristiques morphologiques et structurales 40

B.3. Formation de biofilms 42

B.4. Adaptation à l'environnement 43

B.5. Techniques d'observation et de caractérisation à l'échelle individuelle 45

B.5.1. Microscopie à Force atomique 45

Fonctionnement de l'AFM et modes d'observations 45

Immobilisation des bactéries 51

Etude de la morphologie et des propriétés nanomécaniques des bactéries 53

B.5.2. Microscopie optique à fluorescence 55

B.5.3. Microscopie électronique à balayage (SEM) 55

B.5.4. Microscopie à transmission (TEM) 55

B.5.5. Cytométrie en flux 56

B.5.6. Techniques d'observation d'un dépôt bactérien par microscopie 56

Microscopie optique 56

Microscopie confocale à balayage laser 56
Microscopie électronique à balayage 57

Problématique 58

Chapitre II Matériel et Méthodes 61

Introduction 63

Partie A. Fluide filtré - microorganismes modèles et mise en suspension 64

A.1. Discussion sur le choix des particules filtrées 64
A.2. Conservation et identification des souches 66
A.3. Préparation des suspensions destinées à la filtration 66
A.4. Préparation des suspensions destinées à l'étude microscopique 66
A.5. Impact d'un agent chimique : présence d'un antibiotique 67
A.5.1. Choix des antibiotiques 67
A.5.2. Evaluation des CMI/CMB 68

Partie B. Essais de filtration membranaire 70

B.1. Choix des conditions opératoires 70
B.2. Membrane sélectionnée 71
B.3. Dispositif et protocole 73
B.3.1. Cellule de filtration frontale 73
B.3.2. Montage expérimental 73
B.3.3. Stérilisation de l'ensemble des compartiments 73
B.3.4. Filtration 74

Partie C. Méthodes analytiques 75

C.1. Pour la caractérisation des membranes modèles 75
C.1.1. Porométrie et distribution de tailles de pore 75
C.1.2. Porosité par analyse d'image 75
C.2. Pour la caractérisation de la suspension filtrée 75
C.2.1. Evaluation de la concentration en bactéries : dénombrement en milieu solide 75
C.2.2. Diffraction dynamique de la lumière 76
C.3. Pour la caractérisation morphologique et nanomécanique des cellules bactériennes 77
C.3.1. Observation par Microscopie Electronique à Transmission 77
C.3.2. Observation par Microscopie à Force Atomique 77
C.4. Pour la caractérisation du dépôt de particules à la surface de la membrane 81
C.4.1. Observation par Microscopie Electronique à Balayage 81
C.4.2. Observation par Microscopie Confocale à Balayage Laser 81
C.4.3. Dosage des composés extracellulaires 82

Conclusion 84

Chapitre III Caractérisation des membranes modèles et des suspensions bactériennes..... 85

Introduction 87

Partie A. Etude des membranes isopores 88

A.1. Contrôle de l'intégrité des membranes modèles (point de bulle et perméabilité)..... 88

A.2. Porosité et distribution de tailles de pore des membranes modèles 91

Partie B. Caractérisation des suspensions de bactéries modèles 93

B.1. Formes et dimensions des particules vivantes..... 93

B.1.1. Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) 93

B.1.2. Microscopie Electronique à Transmission (TEM) 95

B.1.3. Microscopie à Force Atomique (AFM)..... 99

B.2. Elasticité des particules biologiques vivantes 103

B.3. Conséquences d'une exposition courte à un antibiotique..... 106

Conclusion 112

Chapitre IV Etude paramétrique du transfert de bactéries déformables au temps initial d'une filtration.....115

Introduction 117

Partie A. Etude paramétrique du transfert sur membrane isopore neuve.....118

A.1. Protocole expérimental spécifique à ce chapitre..... 118

A.2. Résultats expérimentaux..... 121

A.2.1. Effet de la taille des pores 121

A.2.2. Etude de l'effet de la souche bactérienne..... 121

A.2.3. Etude de l'effet de la concentration bactérienne de l'alimentation 123

A.2.4. Etude de l'effet de la pression transmembranaire..... 124

A.2.5. Etude de l'effet d'un antibiotique 124

A.3. Discussion..... 125

Partie B. Description du mécanisme de sélectivité spécifique aux bactéries déformables 131

B.1. Approche théorique 132

B.2. Résultats numériques..... 137

Conclusion 144

Chapitre V Etude du transfert de bactéries déformables et du colmatage sur des temps longs de filtration 147

Introduction 149

Partie A. Influence des paramètres opératoires sur l'évolution du transfert de bactéries déformables 150

A.1. Suivi du transfert pour les trois souches modèles 150
A.1.1. Evolution du transfert au cours d'une filtration à forte concentration dans l'alimentation 150
A.1.2. Evolution du transfert au cours d'une filtration à différentes concentrations dans l'alimentation 153
A.1.3. Effet d'un antibiotique 155
A.2. Discussion 156

Partie B. Analyse des flux de filtration 162

B.1. Effets des paramètres opératoires 163
B.1.1. Agitation de la cellule de filtration 163
B.1.2. Taille de pore 163
B.2. Description du mécanisme de colmatage 165
B.3. Calcul des caractéristiques des dépôts bactériens 169
B.3.1. Mesure de alpha 169
Effet de la concentration de la suspension 171
Effet de la présence d'un antibiotique 173
B.3.2. Compressibilité 177

Partie C. Caractérisation des dépôts bactériens 183

C.1. Observation de la morphologie du dépôt par microscopie 183
C.2. Analyse de la composition en EPS des dépôts bactériens 189
C.3. Discussion 191
Conclusion 193

Conclusion générale et perspectives 195

Annexes 203

Détermination de la concentration massique des suspensions (*Cs*) 205
Annexe 2: Liste des abréviations 207

Références bibliographiques 209

Table des figures

FIGURE I.1 CLASSIFICATION DES PROCEDES MEMBRANAIRES EN FONCTION DE LA TAILLE NOMINALE DES PORES (AIMAR ET AL., 2010). 26
FIGURE I.2 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PRINCIPE D'UNE FILTRATION FRONTALE ET TANGENTIELLE. 26
FIGURE I.3 SCHEMA DES MECANISMES DE COLMATAGE. 30
FIGURE I.4: PARAMETRES DES LOIS DE FILTRATIONS A PRESSION CONSTANTE (GRENIER ET AL., 2008). 30
FIGURE I.5. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DEUX TYPES COMMUNS DE PAROI BACTERIENNE. 42
FIGURE I.6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (ADAPTE DE LIU AND WANG, 2010). 46
FIGURE I.7: LES PRINCIPAUX MODES D'ACQUISITION EMPLOYES EN MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE. 46
FIGURE I.8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE COURBE DE FORCE OBTENUE EN MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE AVEC LE MODE SPECTROSCOPIE DE FORCE. 48
FIGURE I.9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE DIFFERENTES STRATEGIES EMPLOYEES EN MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE AFIN D'IMMOBILISER LES CELLULES VIVANTES. 50
FIGURE I.10: EXEMPLES DE RESULTATS OBTENUS PAR AFM. 52
FIGURE II.1 : CARACTERISTIQUES DES TROIS MICROORGANISMES MODELES SELECTIONNES. 65
FIGURE II.2 : VALEURS DES CMI/CMB MESUREES POUR LES TROIS SOUCHES MODELES EN PRESENCE D'UN ANTIBIOTIQUE DE LA FAMILLE DES BETA-LACTAMINES. 69
FIGURE II.3 : SCHEMA DE LA CELLULE DE FILTRATION AMICON 8050. 72
FIGURE II.4 : SCHEMA DU MONTAGE EXPERIMENTAL DE FILTRATION FRONTALE. 72
FIGURE II.5: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DEUX METHODES D'IMMOBILISATION DES CELLULES VIVANTES EMPLOYEES POUR L'OBSERVATION AFM (ADAPTE DE FORMOSA ET AL., 2015). 79
FIGURE II.6: PROTEINES ETALONS UTILISEES POUR LA CALIBRATION DE DEUX COLONNES EN SERIE SUPERDEX 75 ET SUPERDEX 200. . 83
FIGURE III.1: MESURE DE LA PERMEABILITE DES MEMBRANES ISOPORES DE 0,22 µM (SYMBOLES GRIS) ET DE 0,4 µM (SYMBOLES BLANC). 90
FIGURE III.2: OBSERVATION PAR MEB DE LA SURFACE D'UNE MEMBRANE ISOPORE NEUVE DE TAILLE DE PORE 0,4 µM (X 85 000). 90
FIGURE III.3: DISTRIBUTION DE TAILLES DE PORE DE MEMBRANES ISOPORES DE 0,22 ET 0,4 µM. 92
FIGURE III.4 : SYNTHESE DES MESURES DE TAILLES DE PORE EFFECTUEES PAR POROMETRIE. 92
FIGURE III.5: COURBES, MESUREES PAR DLS, DE DISTRIBUTION DES DIMENSIONS DES CELLULES BACTERIENNES EN SUSPENSION DANS DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE (COURBES EN NOIR) ET APRES UNE PHASE D'EXPOSITION (T : 90 MIN) A UN ANTIBIOTIQUE A LA CONCENTRATION CMI/2 (COURBES EN ROUGE). 94
FIGURE III.6: IMAGES, OBTENUES PAR TEM, DES CELLULES BACTERIENNES EN CONDITION TEMOIN (EAU PHYSIOLOGIQUE) ET APRES COLORATION NEGATIVE (GROSSISSEMENT 8000 X ET 3000 X). 94
FIGURE III.7: DIMENSIONS MOYENNES (H HAUTEUR ET L LONGUEUR) DES TROIS SOUCHES MODELES, MESUREES PAR TEM (N= 30 CELLULES PAR ECHANTILLON), EN SUSPENSION DANS DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE OU APRES UN TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE. 96

FIGURE III.8: DISTRIBUTION DES DIMENSIONS CELLULAIRES DE LA SOUCHE *E. COLI*, MESUREES PAR TEM (N= 30 CELLULES PAR ECHANTILLON), EN SUSPENSION DANS DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE OU APRES UNE PHASE D'EXPOSITION (T : 90 MIN) A UN ANTIBIOTIQUE (AMOXICILLINE A LA CONCENTRATION CMI/2). 96
FIGURE III.9: DISTRIBUTION DES DIMENSIONS CELLULAIRES DE LA SOUCHE *P. AERUGINOSA*, MESUREES PAR TEM (N= 30 CELLULES PAR ECHANTILLON), EN SUSPENSION DANS DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE OU APRES UNE PHASE D'EXPOSITION (T : 90 MIN) A UN ANTIBIOTIQUE (TICARCILINE A LA CONCENTRATION CMI/2). 98
FIGURE III.10: DISTRIBUTION DES DIMENSIONS CELLULAIRES DE LA SOUCHE *S. AUREUS* OBTENUES PAR TEM (N= 30 CELLULES PAR ECHANTILLON), EN SUSPENSION DANS DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE OU APRES UNE PHASE D'EXPOSITION (T : 90 MIN) A UN ANTIBIOTIQUE (AMOXICILLINE A LA CONCENTRATION CMI/2). 98
FIGURE III.11 : IMAGES DE HAUTEUR OBTENUES PAR AFM (GAUCHE) ET PROFILS TOPOGRAPHIQUES (DROITE) DES CELLULES BACTERIENNES MODELES. 100
FIGURE III.12 : ETUDE PAR AFM DE LA TOPOGRAPHIE ET DE LA RIGIDITE DES CELLULES DE *E.COLI* EN CONDITION TEMOIN ET APRES UN TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE. 102
FIGURE III.13 : ETUDE PAR AFM DE LA TOPOGRAPHIE ET DE LA RIGIDITE DES CELLULES DE *P. AERUGINOSA* EN CONDITION TEMOIN ET APRES UN TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE. 104
FIGURE III.14 : ETUDE PAR AFM DE LA TOPOGRAPHIE ET DE LA RIGIDITE DES CELLULES DE *S. AUREUS* EN CONDITION TEMOIN ET APRES UN TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE. 105
FIGURE III.15 : CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET NANOMECANIQUES DES CELLULES MODELES. 107
FIGURE III.16 : OBSERVATION PAR TEM DE L'AGREGATION DES CELLULES DE *S. AUREUS* APRES UNE EXPOSITION AVEC UN ANTIBIOTIQUE (AMOXICILLINE A LA CONCENTRATION CMI/2). 108
FIGURE III.17: TABLEAU RECAPITULATIF DES CARACTERISTIQUES DES MEMBRANES MODELES. 112
FIGURE III.18 : EFFET DE L'EXPOSITION A UN ANTIBIOTIQUE SUR LA VALEUR DES MODULES DE YOUNG DES PAROIS CELLULAIRES DES BACTERIES MODELES. 114
FIGURE IV.1 : RAPPEL DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET NANOMECANIQUES DES SOUCHES MODELES SELECTIONNEES. 120
FIGURE IV.2 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE DANS LE PERMEAT (CP) EN FONCTION DE LA PRESSION TRANSMEMBRANAIRE APPLIQUEE (PTM) LORS DE FILTRATION DE SUSPENSIONS BACTERIENNES DE CONCENTRATION CROISSANTE (VOISINE DE 10^4, 10^6 ET 10^7 UFC/ML) SUR MEMBRANES NEUVES. LES RESULTATS POUR LES TROIS SOUCHES SONT PRESENTES POUR DES SUSPENSIONS NON TRAITEES OU TRAITEES PAR AJOUT DE L'ANTIBIOTIQUE SELECTIONNE A LA CONCENTRATION CMI/2. 122
FIGURE IV.3 : SCHEMA DU TRANSFERT PAR DEFORMATION D'UNE CELLULE BACTERIENNE DE FORME BACILLE A TRAVERS UN PORE MEMBRANAIRE SOUS L'ACTION DU FLUX DE FILTRATION IMPOSE PAR LA DIFFERENCE DE PRESSION TRANSMEMBRANAIRE. 132
FIGURE IV.4 : SCHEMA ILLUSTRANT L'EFFET D'UNE EXPOSITION A UN ANTIBIOTIQUE DE TYPE B-LACTAMINE SUR LE MODULE DE SURFACE (K) DES MICROORGANISMES ETUDIES. 136
FIGURE IV.5 : VALEURS CALCULEES POUR LES PARAMETRES LD, T ET LE RAPPORT SD/S0. 137
FIGURE IV.6 : EVOLUTION DE L'ABATTEMENT EXPERIMENTAL POUR LES DIFFERENTES PRESSIONS TRANSMEMBRANAIRES ET CONCENTRATIONS D'ALIMENTATION TESTEES EN FONCTION DE LA TENSION DE SURFACE CALCULEE DES PAROIS BACTERIENNES. 138

FIGURE IV.7 : EVOLUTION DE L'ABATTEMENT EXPERIMENTAL EN FONCTION DU RAPPORT FT/FP. 139
FIGURE IV.8 : EVOLUTION (EN HAUT) DES LRV EXPERIMENTAUX EN FONCTION DE FT/FP (ZOOM DE LA FIGURE IV.7) ET COMPARAISON (EN BAS) DES LRV EXPERIMENTAUX ET CALCULES D'APRES L'EQUATION IV.16. 140
FIGURE IV.9 : SCHEMA DU MECANISME DE TRANSFERT DES CELLULES BACTERIENNES A GRAM NEGATIF ET DE RETENTION DES SOUCHES A GRAM POSITIF. 142
FIGURE V.1 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE DE LA PHASE PERMEAT AU COURS D'UNE FILTRATION SUR MEMBRANE ISOPORE DE 0,4 µM A UNE PRESSION TRANSMEMBRANAIRE APPLIQUEE DE 0,5 BAR ET POUR UNE SUSPENSION DE *E. COLI*, DE *P. AERUGINOSA* ET DE *S. AUREUS* A UNE CONCENTRATION VOISINE DE 10^7 UFC/ML DANS DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE. 151
FIGURE V.2 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE DE LA PHASE PERMEAT (CP) AU COURS D'UNE FILTRATION SUR MEMBRANE ISOPORE DE 0,4 µM POUR DES SUSPENSIONS DE *E. COLI* OU DE *P. AERUGINOSA* A DES CONCENTRATIONS VOISINES DE 10^4, 10^6 ET 10^7 UFC/ML, DANS DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE, A UNE PRESSION TRANSMEMBRANAIRE APPLIQUEE DE 0,5 BAR. 153
FIGURE V.3 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE DE LA PHASE PERMEAT (CP), PENDANT UNE FILTRATION SUR MEMBRANE ISOPORE DE 0,4 µM, DES SUSPENSIONS DE BACTERIES MODELES A UNE CONCENTRATION VOISINE DE 10^7 UFC/ML EN CONDITION TEMOIN OU MODIFIEE PAR UN ANTIBIOTIQUE A UNE PRESSION TRANSMEMBRANAIRE DE 0,5 BAR. 154
FIGURE V.4 : CONTAMINATION MAXIMALE MESUREE DANS LES PRELEVEMENTS DE PERMEAT REALISES AU COURS D'UNE FILTRATION SUR MEMBRANE ISOPORE DE 0,22 µM POUR DES SUSPENSIONS DE *E. COLI*, *P. AERUGINOSA* ET *S. AUREUS* DANS DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE (AVEC CA : 10^7 UFC/ML, PTM : 0,5 BAR). ND : AUCUNE CELLULE N'EST DETECTEE, NM : NON MESURE . 157
FIGURE V.5 : CLASSEMENT DES SOUCHES MODELES EN FONCTION DES VOLUMES FILTRES CARACTERISTIQUES DE LA PREMIERE CONTAMINATION DE LA PHASE PERMEAT ET DE LA CONCENTRATION MAXIMALE CP_{MAX} DETECTEE PENDANT LA FILTRATION. ... 159
FIGURE V.6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'EVOLUTION DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE DANS LE PERMEAT AU COURS D'UNE FILTRATION MEMBRANAIRE FRONTALE A PRESSION CONSTANTE. 160
FIGURE V.7 EVOLUTION DU VOLUME FILTRE EN FONCTION DU TEMPS POUR DES FILTRATIONS DE SUSPENSION DE E. COLI REALISEES AVEC OU SANS AGITATION DE LA CELLULE AMICON SUR MEMBRANE ISOPORE DE 0,4 µM (AVEC CA 10^7 UFC/ML ET PTM: 0,5 BAR). 162
FIGURE V.8: EVOLUTION DES FLUX DE PERMEAT NORMALISES (J/J_0) EN FONCTION DU TEMPS MESURES LORS DES FILTRATIONS DE SUSPENSIONS BACTERIENNES SUR MEMBRANE ISOPORE DE (A) 0,40 µM ET (B) 0,22 µM (AVEC CA : 10^7 UFC/ML, PTM: 0,5 BAR). 164
FIGURE V.9 COMPARAISON DES RC MESUREES LORS DES FILTRATIONS (A) SUR DEUX TAILLES DE PORE EN FONCTION DU VOLUME FILTRE ET (B) SUR UNE TAILLE EN FONCTION DU TEMPS. 166
FIGURE V.10: EXEMPLE DE DETERMINATION DE LA PENTE N POUR L'IDENTIFICATION DU MECANISME DE COLMATAGE (DONNEES EXPERIMENTALES POUR UNE FILTRATION DE *E. COLI* SUR MEMBRANE ISOPORE DE 0,4 µM (AVEC CA: 10^7 UFC/ML ET PTM: 0,5 BAR). 168
FIGURE V.11 : VALEURS DE PENTE N DEDUITES DES FILTRATIONS REALISEES POUR LES TROIS SOUCHES MODELES EN CONDITION TEMOIN (EAU PHYSIOLOGIQUE) OU APRES UNE PHASE D'EXPOSITION A L'ANTIBIOTIQUE. 168
FIGURE V.12 REPRESENTATION DES FLUX DE FILTRATION SOUS LA FORME T/V EN FONCTION DU VOLUME FILTRE POUR DES SUSPENSIONS DE BACTERIES MODELES SUR MEMBRANE ISOPORE (A) DE 0,40 µM ET (B) DE 0,22 µM (AVEC CA : 10^7 UFC/ML, PTM: 0,5 BAR). 170

FIGURE V.13 REPRESENTATION DES FLUX DE FILTRATION SOUS LA FORME T/V EN FONCTION DU VOLUME FILTRE POUR DES SUSPENSIONS DE *E. COLI* A DIFFERENTES CONCENTRATIONS ,SUR MEMBRANE ISOPORE DE 0,40 µM (PTM: 0,5 BAR). 172

FIGURE V.14 REPRESENTATION DES FLUX DE FILTRATION SOUS LA FORME T/V EN FONCTION DU VOLUME FILTRE POUR DES SUSPENSIONS DE BACTERIES MODELES EN CONDITION TEMOIN OU MODIFIEES PAR UN ANTIBIOTIQUE SUR MEMBRANE ISOPORE DE 0,40 µM (CA: 10^7 UFC/ML, PTM: 0,5 BAR). 172

FIGURE V.15 : VALEURS DES RESISTANCES SPECIFIQUES DES DEPOTS BACTERIENS DEDUITES DES FILTRATIONS DE SUSPENSIONS DE BACTERIES MODELES EN CONDITION TEMOIN OU MODIFIEES PAR UN ANTIBIOTIQUE..... 174

FIGURE V.16 : EVOLUTION DES FLUX MESURES EN FONCTION DES INCREMENTS DE PRESSION LORS DE FILTRATION A L'EAU PURE SUR MEMBRANE COLMATEE. 179

FIGURE V.17 EVOLUTION DES RESISTANCES SPECIFIQUES DES DEPOTS BACTERIENS EN FONCTION DE LA PRESSION TRANSMEMBRANAIRE APPLIQUEE. 180

FIGURE V.18: INDICE DE COMPRESSIBILITE MESURE (N) POUR DES DEPOTS DE BACTERIES MODELES EN CONDITION TEMOIN OU APRES EXPOSITION A UN ANTIBIOTIQUE ET ECARTS RELATIFS DE COMPRESSIBILITE ET DE MODULE DE YOUNG ENTRE LES DEUX CONDITIONS TESTEES. 180

FIGURE V.19: EVOLUTION DE L'INDICE DE COMPRESSIBILITE EN FONCTION DU RAPPORT KCELL/LCELL DES CELLULES BACTERIENNES. 181

FIGURE V.20 : OBSERVATION SEM DES DEPOTS BACTERIENS FORMES A DIFFERENTS VOLUMES FILTRES APRES DES FILTRATIONS REALISEES SUR MEMBRANE ISOPORE 0,4 µM (AVEC CA : 10^7 UCF/ML ; PTM : 0,5 BAR - BARRE D'ECHELLE : 10 µM). 184

FIGURE V.21 : OBSERVATION DES PROJECTIONS MAXIMALES D'INTENSITES MESUREES PAR CLSM SUR DES DEPOTS BACTERIENS FORMES A DIFFERENTS VOLUMES FILTRES LORS DE FILTRATIONS REALISEES SUR MEMBRANE ISOPORE 0,4 µM, CA : 10^7 UCF/ML ; PTM : 0,5 BAR (BARRE D'ECHELLE : 10 µM) 185

FIGURE V.22 : RECONSTRUCTION 3D A PARTIR DES MESURES CLSM DE DEPOTS BACTERIENS FORMES A DIFFERENTS VOLUMES FILTRES LORS DE FILTRATIONS REALISEES SUR MEMBRANE ISOPORE 0,4 µM, (AVEC CA : 10^7 UCF/ML ; PTM : 0,5 BAR). LA SURFACE OBSERVEE EN X-Y = 93,5 X 93,5 µM. 186

FIGURE V.23 : OBSERVATION SEM DE LA FORMATION DES PREMIERS COUCHES DE CELLULES A LA SURFACE DE LA MEMBRANE ISOPORE A VF = 100 ML (BARRE D'ECHELLE : 10 µM). 188

FIGURE V.24: COUPES TRANSVERSALES, OBTENUES A PARTIR DES IMAGES CLSM A VF = 50 ML, DES DEPOTS BACTERIENS DE *E. COLI* ET *P. AERUGINOSA*..... 188

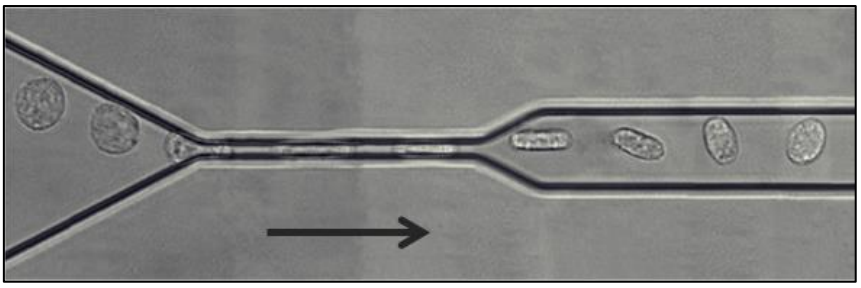
FIGURE V.25 : PROFILS DE LA COMPOSITION DES EPS PRESENTS DANS LES DEPOTS DE *E. COLI* ET *P. AERUGINOSA* REVELES EN SORTIE DE COLONNES PAR UV (A ET B) ET PAR FLUORESCENCE (C). 190

Introduction

Le concept de filtration, appliqué notamment à l'amélioration de la qualité de l'eau, est utilisé par l'Homme depuis des millénaires. Les premiers éléments qui attestent de la purification de l'eau par filtration sur charbon datent de plus de 4000 ans avant J.-C. Il a cependant fallu attendre le XVIIIème siècle pour que les notions de barrière permsélective commencent à se développer avec les observations de Philippe de la Hire (1640-1718) puis avec les travaux de Louis Pasteur (1822-1895) et de Charles Chamberland (1851- 1908) qui sont à l'origine du premier filtre destiné à la production d'un liquide stérile dans lequel tous les microorganismes ont été éliminés. Depuis, le déploiement des filtres dans les applications industrielles et médicales a permis le développement de membranes aux propriétés variées qui sont utilisées aujourd'hui pour soustraire les particules présentes dans un fluide, qu'elles soient de nature biologique ou autre.

De par leur sélectivité élevée, les procédés membranaires sont utilisés comme étape de désinfection pour la production d'eau potable ou pour la stérilisation de solutions thermosensibles. Dans ce cas, l'élimination des microorganismes ou de la biomasse présents dans le fluide filtré est assurée par les capacités de rétention de la barrière physique sélective que forme la membrane. Néanmoins, de nombreux travaux font état d'une propriété rhéologique spécifique aux cellules vivantes : elles sont capables de se déformer sous l'action d'une contrainte physique et alors de mettre en défaut le principal mécanisme de sélectivité des procédés membranaires basé sur l'exclusion par la taille des particules. La déformabilité des cellules biologiques est donc une caractéristique du vivant qui reçoit une attention particulière depuis plusieurs années.

L'étude des globules rouges du sang a démontré que leur capacité à se déformer était nécessaire à l'accomplissement de leur fonction biologique (transport 0_2 et $C0_2$ dans le système sanguin) (Kim et al., 2015). Dans le cas des microorganismes (levures ou bactéries), la déformation des cellules, analysée grâce aux essais de compression cellulaire (Smith et al., 2000) ou par microscopie à force atomique (Chen et al., 2012) leur confère des capacités de résistance élevée aux stress environnementaux.



Déformation d'une cellule (monocyte) de 14 µm de diamètre à travers une constriction de 4 µm. La flèche indique le sens de l'écoulement (Gabriele et al., 2010)

Afin d'illustrer la capacité des cellules d'origine biologique à se déformer, l'image ci-contre présente un monocyte (globule blanc) d'un diamètre de 14 µm qui se déforme pour traverser un canal de 4 µm de largeur sous l'action d'une pression constante.

Dans de nombreuses techniques de séparation physique confrontées à l'élimination des microorganismes tels que les bactéries, l'aptitude à la déformation des cellules apparait donc comme un frein majeur au contrôle de la qualité microbiologique du produit final. Dans ce cadre, des travaux de recherche sont effectués afin de relier les propriétés des particules biologiques à leur capacité à traverser la structure poreuse des membranes de filtration (Nnadozie et al., 2015) : la taille, la morphologie et la structure des cellules sont des paramètres déterminant la capacité des microorganismes à traverser un filtre mais les propriétés du fluide filtré peuvent également engendrer une altération de ces paramètres et ainsi perturber d'avantage la rétention des cellules (Lebleu et al., 2009). Ce projet s'inscrit donc dans la thématique de recherché lié à l'étude des comportements spécifiques des cellules vivantes pendant leur filtration (virus, bactériophages, bactéries et levures) développée depuis de nombreuses années au sein du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse. Ce projet a été financé par une bourse de thèse MESR ainsi que par la participation de la Région Midi-Pyrénées.

Le but de ce projet doctoral est d'améliorer la connaissance des mécanismes de rétention appliqués aux bactéries déformables qui sont impactés par les caractéristiques morphologiques et structurales des cellules bactériennes, ainsi que d'évaluer les effets des paramètres opératoires sur la contamination du perméat produit.

Ce manuscrit est organisé en cinq parties. Le premier chapitre présente le contexte général de notre étude ainsi que les différents outils nécessaires à l'analyse du comportement spécifique des microorganismes en suspension ou pendant une filtration membranaire.

Le second chapitre présente, en détail, les matériels utilisés et les méthodes expérimentales mises en œuvre pour répondre à notre problématique. Dans cette partie, les choix réalisés pour l'étude tels que ceux concernant les souches bactériennes ou la membrane de filtration seront justifiés.

Le chapitre III s'intéresse d'une part à la caractérisation des membranes modèles et d'autre part, à une analyse fine des souches bactériennes sélectionnées, à différentes échelles afin d'acquérir des informations quantitatives fiables sur la forme, la taille et la rigidité des cellules en suspension.

Le chapitre IV rassemble les résultats relatifs aux transferts de bactéries à travers une membrane vierge de toute contamination. Réalisées sur des volumes filtrés faibles, les expériences nous permettront d'évaluer quels sont les paramètres biologiques qui conditionnent le transfert des bactéries, par déformation, à travers les pores d'une membrane.

Enfin, le chapitre V présente les résultats obtenus en termes de sélectivité et de productivité lors de la filtration frontale d'une suspension de bactéries déformables sur des volumes filtrés importants. L'évolution du transfert sera mise en regard des caractéristiques du colmatage mis en jeu pendant la filtration.

Enfin, la conclusion de ce travail synthétise les résultats majeurs obtenus et présente quelques pistes d'amélioration ainsi que les perspectives de nos travaux de recherche.

Chapitre I Contexte et problématique

Partie A. Elimination de microorganismes par filtration membranaire

Dans de nombreux domaines industriels, la biomasse présente dans un fluide doit être séparée ou éliminée. L'utilisation de procédés séparatifs basés sur la filtration membranaire présente de nombreux avantages en comparaison des techniques conventionnelles de désinfection (traitement physique : chaleur ou rayonnement ultraviolet, traitement chimique avec : oxyde de calcium ou hypochlorite de sodium, ozone, etc…). D'une part, la filtration est une opération adaptée au traitement de composés thermosensibles car elle est réalisée à température ambiante. D'autre part, elle ne requiert pas l'ajout de réactifs chimiques. Enfin, les procédés membranaires se distinguent de par leur grande compacité et par le fait qu'ils peuvent fonctionner en continu sur une chaine de production.

A.1. Applications des procédés membranaires à des fluides contenant des microorganismes

L'utilisation des membranes est largement répandue dans de nombreux domaines: alimentaire, pharmaceutique, biotechnologique, médical, mais aussi dans le traitement des eaux (potabilisation et épuration). La filtration peut être conduite à des températures et à des pressions relativement basses, ce qui rend son utilisation possible avec des composés biologiques fragiles. En effet dans ces conditions d'utilisation, les procédés membranaires n'impliquent pas de changement de phase ou d'addition de produits chimiques et permettent de limiter les phénomènes de dénaturation, de désactivation, et/ou de dégradation de la biomasse filtrée.

Pour la production d'eau potable, la filtration membranaire offre, depuis plusieurs années, une alternative intéressante à la filtration classique en substituant en une seule étape, les opérations unitaires que sont la floculation, la décantation et la filtration sur sable. Même si les étapes de filtration ont permis d'augmenter la qualité de l'eau traitée, elles demeurent majoritairement couplées à des étapes de désinfection (traitement UV, ozone ou chloration). Par ailleurs, leur utilisation dans le traitement des eaux usées s'étend significativement grâce aux avancées technologiques et à la diminution des coûts de fabrication et d'exploitation.

Les industries biotechnologiques qui s'intéressent à la production de substances actives à faibles poids moléculaires comme les antibiotiques, les acides aminés, les protéines et les acides organiques sont confrontées à la problématique de la

purification tout en respectant les propriétés physiques et chimiques des molécules d'intérêt produites. Dans ce cas, l'objectif de la filtration est la concentration des molécules à haute valeur ajoutée ainsi que la récolte de la biomasse productrice. La mise en œuvre des bioréacteurs à membranes est possible dorénavant grâce au développement des membranes synthétiques semi-perméables, qui sont transformées en dispositifs d'immobilisation de biomasse. Ainsi, les microorganismes, les biocatalyseurs (comme les enzymes) et les anticorps peuvent être compartimentés par une membrane dans le réacteur ou encore immobilisés sur ou à l'intérieur de la membrane. L'immobilisation permet d'augmenter la stabilité du réacteur et contribue à l'amélioration de la pureté et la qualité du produit.

Dans le domaine agro-alimentaire, les applications majeures des opérations de séparation par membranes concernent la production des boissons et plus particulièrement l'industrie laitière. Dans ce cas, par exemple, la microfiltration est employée pour réduire la quantité de bactéries et spores en suspension sans affecter la saveur du lait et lui donner une durée longue de conservation.

Dès lors que l'on a pour objectif de réaliser une filtration stérilisante (afin d'éliminer les microorganismes présents dans une suspension), le procédé fait l'objet de nombreuses réglementations tout particulièrement dans les domaines médicaux et pharmaceutiques. Les organismes tels que la FDA (Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux), l'EMEA (Agence européenne des médicaments) ont publié des documents d'orientation traitant de la problématique de la filtration stérilisante.

La norme ASTM F838 décrit la procédure pour valider l'efficacité d'une membrane stérilisante. Dans ce cas, le test est effectué en utilisant la souche *Brevundimonas diminuta* (anciennement *Pseudomonas diminuta*) à une charge minimum de 10^7 microorganismes par cm^2 de surface utile de membrane. Le microorganisme doit être placé en suspension dans un bouillon de lactose ou dans une solution saline; des méthodes spécifiques pour la culture des bactéries et la mise en œuvre de la filtration sont définies. Néanmoins, ce protocole normalisé ne tient pas compte du potentiel effet des composants du fluide (présence d'un agent chimique ou d'un produit pharmaceutique) sur la structure du filtre, sur les interactions mises en jeu à l'interface entre le fluide et la membrane ou sur les microorganismes présents en suspension. Le test de stérilité devrait alors être réalisé en utilisant le matériel et les

solutions utilisés en condition réelle, c'est pourquoi définir des conditions universelles de qualification des filtres reste très compliqué.

Du fait de la variété des microorganismes potentiellement rencontrés dans une filtration stérilisante, il est préconisé de réaliser cette étape à travers un filtre stérile de taille de pore nominale de 0,22 µm au minimum (Jornitz, 2006). Ainsi, la plupart des microorganismes seront éliminés du produit final, mais d'autres entités vivantes pourraient persister (virus et mycoplasmes). Sachant que les microorganismes cibles sont d'une taille de l'ordre du micromètre et souvent davantage (par exemple, la souche *E. coli* a des dimensions de 1x2 µm), on peut se demander quelle est la nécessité de descendre à des tailles de pore aussi faible. Pour répondre à cette question, il est nécessaire d'étudier les procédés membranaires plus en détails, et plus particulièrement la capacité de rétention des membranes vis-à-vis des microorganismes et des cellules vivantes.

A.2. Filtration membranaire : principe et terminologie

La filtration membranaire est une technique de séparation physique en phase liquide (ou gaz) dans laquelle un matériau poreux constitue une barrière semi-perméable au transfert d'un fluide. Ce transfert s'effectue sous l'action d'une force motrice qui peut être un différentiel de pression (procédé baromembranaire), un gradient de potentiel électrique (électrodialyse) ou un gradient de concentration (pervaporation, dialyse).

A l'issue d'une opération de filtration membranaire, deux phases sont produites à partir d'une solution d'alimentation : le rétentat qui est enrichi en composés retenus par la membrane et le perméat qui est constitué du solvant et des éléments capables de traverser la membrane. Les performances d'un procédé de filtration sont déterminées par la productivité (perméabilité) et l'efficacité (sélectivité), points qui seront présentés en détails dans les paragraphes suivants.

Dans notre cas d'étude, seuls les systèmes mettant en œuvre un différentiel de pression transmembranaire seront considérés.

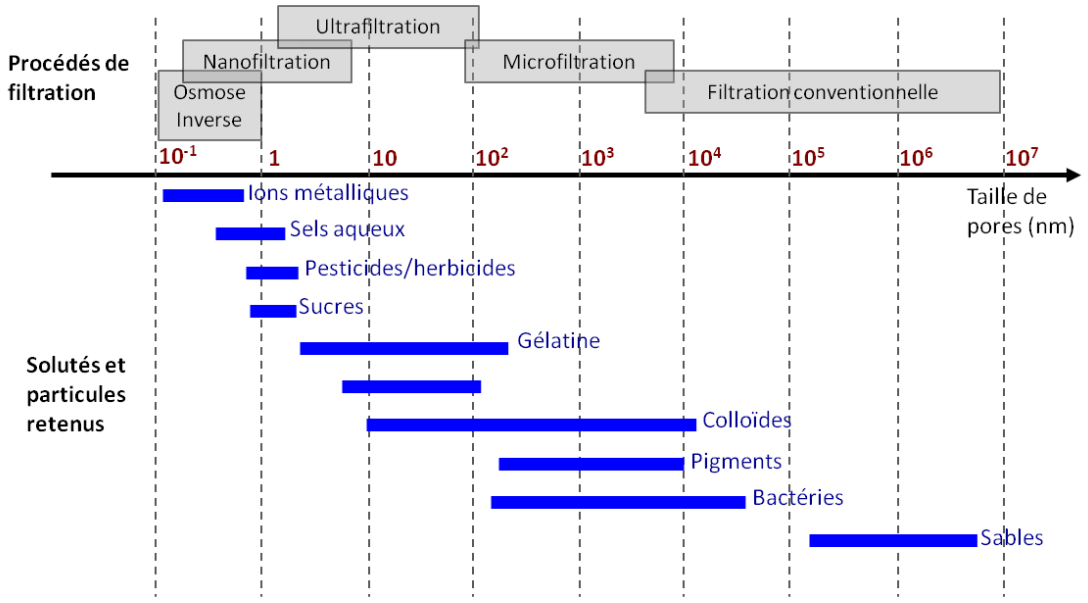


Figure I.1 Classification des procédés membranaires en fonction de la taille nominale des pores (Aimar et al., 2010).

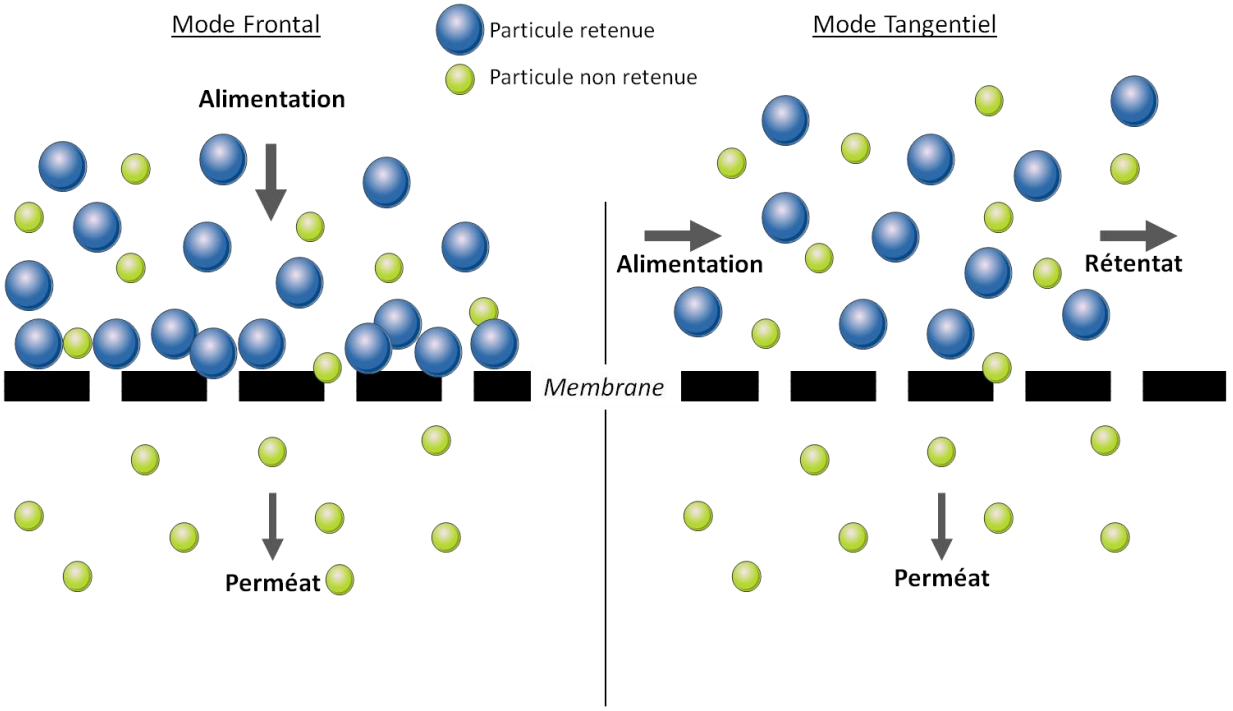


Figure I.2 Représentation schématique du principe d'une filtration frontale et tangentielle.

A.2.1. Classification des procédés de séparation par filtration membranaire

Les procédés membranaires sont communément classés selon leur seuil de coupure corrélé à leur capacité de rétention. La Figure I.1 présente la comparaison des quatre domaines de filtration en fonction de la taille de pore des différentes membranes ainsi que la correspondance avec les composés retenus.

A titre informatif, la filtration conventionnelle (sur lit granulaire) est également représentée. Les pores sont d'une taille de l'ordre de 0,1 à 10 µm en microfiltration (MF), de 0,01 µm en ultrafiltration (UF). Ces deux procédés sont généralement utilisés pour éliminer les particules et les colloïdes présents en suspension dans un fluide. Dans le cas de la nanofiltration (NF), la gamme de tailles de pore est de l'ordre de 0,001 µm et permet la rétention des ions multivalents et des composés organiques. Enfin, l'osmose inverse (OI) est utilisée pour retenir la quasi-totalité des solutés, y compris les sels et ions métalliques. Dans ce cas particulier, la membrane n'est pas poreuse mais possède une surface sélective dense.

A.2.2. Modes de filtration

Une opération de filtration membranaire peut être réalisée selon deux configurations (frontale ou tangentielle) qui diffèrent en fonction du mode de circulation du fluide par rapport au média filtrant (cf. Figure I.2).

Dans la configuration frontale, la suspension d'alimentation circule perpendiculairement à la surface de la membrane. Ce fonctionnement entraine une accumulation importante de composés en amont de la membrane pendant son utilisation ce qui n'est pas sans effet sur la productivité de la membrane (phénomènes de colmatage, cf. paragraphe A.3). Dans la configuration tangentielle, le fluide circule parallèlement à la surface de la membrane, alors la vitesse de circulation du fluide impose des contraintes de cisaillement qui limite l'accumulation de composés à la surface de la membrane.

A.2.3. Design et matériaux

Les membranes sont commercialisées sous différentes formes. On retrouve principalement des membranes planes, des membranes spiralées, des membranes à géométrie tubulaire qui sont utilisées en fonction des applications industrielles. Par exemple, les membranes tubulaires et, plus précisément, les membranes fibres creuses sont préférées pour la production d'eau potable du fait de leur compacité élevée.

La structure de la membrane est décrite selon son organisation interne : on distingue les membranes symétriques et les membranes asymétriques. Les membranes symétriques sont caractérisées par une structure uniforme. A l'inverse, les membranes asymétriques ont une structure qui évolue dans l'épaisseur du matériau. Sous divisées en deux groupes, les membranes asymétriques peuvent être anisotropes (un seul matériau est utilisé pour produire les couches poreuses) ou composites (le support macroporeux et la peau sélective sont constitués de matériaux différents).

De nombreux matériaux sont utilisés pour la fabrication des membranes afin de leur conférer des propriétés spécifiques (physiques et chimiques). Le matériau utilisé, d'origine organique ou inorganique, est sélectionné en fonction des résistances thermiques, chimiques et mécaniques nécessaires à l'opération. On trouve, ainsi, des membranes produites à partir de matériau minéral (céramique) ou composées de polymères organiques (acétate de cellulose, polyethersulfone, polymère fluoré, etc…).

A.3. Phénomènes de transport en filtration membranaire

Dans cette partie, les différents facteurs qui déterminent le flux de perméat lors d'une filtration et qui affectent donc la productivité du procédé sont présentés.

Lors de la filtration d'un solvant pur à travers une membrane de filtration, le flux peut être décrit grâce à l'équation de Darcy (Eq I.1). Dans ce cas, on assimile le média filtrant à un milieu poreux idéal et la variation du flux en fonction de la pression transmembranaire appliquée s'exprime selon la relation suivante :

$$J = \frac{\Delta P}{\mu . Rm} = Lp . \Delta P \qquad \text{Eq I.1}$$

avec J le flux de perméat (m/s), μ la viscosité dynamique de l'eau (Pa.s), Rm la résistance hydraulique de la membrane (m^{-1}), ΔP la pression transmembranaire (PTM en Pa) et Lp la perméabilité de la membrane ($m^3/m^2.Pa.s$). La perméabilité au solvant pur de la membrane caractérise le volume de fluide filtré par unité de pression, temps et surface utile de la membrane, cet indicateur symbolise l'état d'une membrane en termes de productivité. Elle est déterminée par les caractéristiques intrinsèques de la membrane de filtration : la dimension, la tortuosité et le nombre des pores par unité de surface et l'épaisseur du matériau.

Dans le cas de fluides complexes, les solutés et particules en suspension peuvent colmater la membrane sous l'action du flux convectif de perméation. L'accumulation de ces entités à la surface de la membrane modifie alors les propriétés de l'interface membrane/fluide entrainant l'apparition de phénomènes caractéristiques : la polarisation de concentration et le colmatage de la membrane.

A.3.1. La polarisation de concentration

L'accumulation de solutés à la surface de la membrane entraine la formation d'un gradient de concentration, appelé polarisation de concentration. Dans ce cas, la concentration de solutés à la membrane est très supérieure à la concentration initiale de l'alimentation, ce qui engendre la formation d'un flux de rétro-diffusion des solutés opposé au flux convectif résultant de la pression transmembranaire appliquée. Une fois l'équilibre atteint entre le flux convectif et le flux diffusif, un profil de concentration -appelé couche de polarisation - est établi. Ce phénomène est réversible car il disparaît lorsque le gradient de pression imposé est annulé. Dans notre cas d'étude, les particules étudiées - les bactéries - sont d'une taille importante et possèdent un pouvoir diffusif faible. Les autres solutés (en particulier les sels tels que NaCl) présents dans la suspension bactérienne ne seront pas retenus par la membrane de microfiltration utilisée. Le phénomène de polarisation de concentration sera donc négligé par la suite.

A.3.2. Le colmatage

Le colmatage de la membrane résulte des interactions entre les constituants du fluide et la membrane attribuées aux mécanismes suivants : formation d'un dépôt, blocage des pores et adsorption (cf. Figure I.3).

La prépondérance de chacun de ces phénomènes dépend des caractéristiques de la membrane (matériau, seuil de coupure), de la nature des composés, des caractéristiques du milieu filtré (pH, température, force ionique, etc.) ou encore des conditions opératoires. L'adsorption, résultant d'interactions chimiques, sera dans le cas de la filtration de microorganismes négligeable devant les deux autres mécanismes physiques que sont la formation d'un dépôt et le blocage des pores.

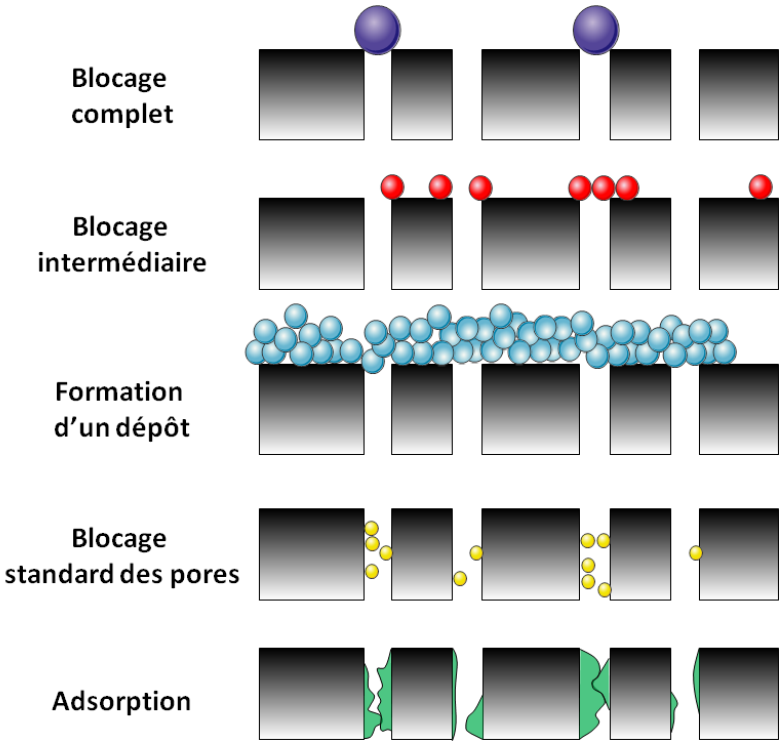


Figure I.3 Schéma des mécanismes de colmatage.

Mécanisme	n
Blocage complet	2
Blocage standard	1,5
Blocage intermédiaire	1
Formation de dépôt	0

Figure I.4: Paramètres des lois de filtrations à pression constante (Grenier et al., 2008).

Le blocage des pores membranaires par les particules filtrées a pour effet de diminuer la porosité de la membrane (taille et nombre de pores efficaces pendant la filtration). Dans ce cas on distingue le blocage complet (obstruction des pores), le blocage standard (recouvrement progressif et uniforme des pores par le dépôt de particules qui sont plus petites que les pores) et le blocage intermédiaire (les particules ont une probabilité inférieure à l'unité de bloquer un pore - blocage de pore complet, elles peuvent aussi se déposer dans une zone déjà colmatée - filtration sur dépôt).

Dans le cas d'expériences réalisées en filtration frontale à pression constante, l'impact sur le flux des différents mécanismes de colmatage présentés peut être décrit grâce à une forme caractéristique commune développé par Hermans et Bredée (1935) qui est basée sur la dérivation du flux de perméat en fonction du temps :

$$\frac{dt}{dV} = \frac{1}{J \cdot A} \qquad \text{Eq I.2}$$

$$\frac{d^2t}{dV^2} = -\frac{1}{J^3 \cdot A^2}\frac{dJ}{dt} \qquad \text{Eq I.3}$$

A partir de ces équations, les mécanismes de colmatage peuvent être décrits dans un système de coordonnées unique à l'aide de la forme mathématique suivante:

$$\frac{d^2t}{dV^2} = k \cdot \left(\frac{dt}{dV}\right)^n \qquad \text{Eq I.4}$$

Grace à ce mode de représentation, en échelle logarithmique, la pente obtenue permet de déterminer la valeur de n qui est caractéristique d'un mécanisme de colmatage (cf. Figure I.4), et la valeur de k qui correspond aux paramètres du modèle de colmatage. Ce modèle permet donc d'identifier le mécanisme de colmatage dominant pendant une filtration membranaire.

Dans le cas d'un colmatage lié à la formation d'un dépôt avec n égal à 0 selon la représentation $\frac{d^2t}{dV^2} = f\left(\frac{dt}{dV}\right)$, cas qui semble le plus pertinent lorsque les particules filtrées sont de dimensions supérieures à la taille de pore de la membrane, le processus peut être décrit à l'aide du modèle des résistances en série.

La formation d'un dépôt résulte de l'accumulation de particules retenues en surface de la membrane. Dans ce cas, il y a passage d'une phase dispersée des particules en

suspension à une phase condensée. Cette couche poreuse entraîne ainsi l'apparition d'une résistance additionnelle au transfert de matière. Dans le cas d'une filtration à pression constance, cela se traduit par une chute du flux de perméation au cours du temps que l'on peut exprimer par l'ajout d'une résistance à celle de la membrane en se basant sur le principe des résistances en série :

$$J = \frac{\Delta P}{\mu(Rm + Rd)} \qquad \text{Eq I.5}$$

avec la résistance du dépôt colmatant notée Rd (m^{-1}). L'épaisseur du dépôt étant corrélée au nombre de particules déposées, la résistance du dépôt Rd est donc exprimée en fonction de la masse totale de particules M présentes à la surface de la membrane (kg/m^2), telle que:

$$Rd = \alpha . M \qquad \text{Eq I.6}$$

avec α est la résistance spécifique du dépôt. Dans le cas d'une filtration frontale, la masse du dépôt va augmenter tout au long de l'opération et est proportionnelle au volume de perméat produit. L'équation I.5 peut être intégrée par rapport au temps pour donner la forme linéaire suivante :

$$\frac{t}{V} = \frac{\alpha \mu Cs}{2A^2 \Delta P} \mathrm{V} + \frac{\mu Rm}{A \Delta P} \qquad \text{Eq I.7}$$

avec Cs la concentration des particules dans la suspension d'alimentation (kg/m^3), et A la surface utile de la membrane (m^2). Pour une filtration réalisée à pression constante, l'équation I.7 permet de représenter le rapport t/V en fonction de V sous une forme linéaire. Le paramètre α est ainsi, par cette méthode, extrait des résultats expérimentaux à l'aide de la relation suivante :

$$\alpha = \frac{\frac{\Delta P}{\mu \cdot J} - Rm}{Cs \cdot V} \qquad \text{Eq I.8}$$

La conduite d'opérations de filtration en présence de microorganismes engendre nécessairement des phénomènes de colmatage principalement dominés par la formation d'un dépôt à la surface de la membrane (cas rencontrés quand les particules sont d'une taille supérieure à celle des pores de la membrane).

Dans ce cas, la résistance du dépôt formé à la surface du filtre est souvent plus importante que la résistance hydraulique de la membrane, alors le dépôt colmatant

devient le paramètre qui domine la productivité du procédé de filtration. La résistance spécifique du dépôt est dépendante de nombreux facteurs comme la taille, la forme, les propriétés de surface des microorganismes, ou encore les caractéristiques physico-chimiques du fluide filtré (Foley, 2006). Un dépôt est défini comme compressible quand sa résistance spécifique augmente avec la pression transmembranaire appliquée. Ce phénomène est expliqué dans la littérature par la restructuration interne du dépôt ou par la déformation des cellules qui le composent. L'évolution de la résistance spécifique engendre alors une diminution de la porosité et de l'épaisseur du dépôt.

De nombreux travaux, disponibles dans la littérature, s'intéressent à la description des mécanismes de colmatage spécifiques aux microorganismes, et cela pour une grande variété de conditions opératoires appliquées en filtration membranaire (Beaufort et al., 2011; Foley, 2011; Grenier et al., 2008; McCarthy et al., 1998; Tanaka et al., 1996)

La plupart des travaux réalisés sur la filtration de bactéries conduit à un mécanisme de colmatage par dépôt (Foley, 2006; Graves et al., 2006; Rosas et al., 2014; Tanaka et al., 1996; Xu and Chellam, 2005). Les résistances spécifiques obtenues par les auteurs dépendent du mode de filtration (frontal ou tangentiel), de la pression appliquée et bien d'autre paramètres comme la disparité des tailles de particules de l'âge de la suspension (Okamoto, 2001)... et sont toujours comprises entre 10^{11} et 10^{14} m/kg. Les résistances peuvent être modifiées par la physico-chimie de la suspension filtrée. Par exemple, des auteurs ont démontré que les résistances spécifiques des dépôts formés par la souche *E. coli* étaient supérieures à celles des solutions de force ionique plus faible (Fane, 1984). Ces phénomènes est attribué à la force ionique élevée du milieu qui écrante les forces répulsives des cellules bactériennes présentes. Concernant l'ajout d'un agent chimique dans la suspension, quand les cellules de levures sont exposées à un traitement au glutaraldéhyde, les flux de filtrations frontales sont plus rapides que dans le cas témoin en absence de traitement ; cet effet étant attribué à une rigidité accrue des microorganismes traités (Tung et al., 2010).

A.4. Sélectivité des procédés membranaires

A.4.1. Efficacité de la rétention

Pour déterminer les performances de séparation d'un procédé membranaire dans le cas de suspensions complexes, des indicateurs spécifiques sont employés. Premièrement, le taux de rétention TR peut être utilisé afin de comparer la concentration en composé de part et d'autre de la membrane, il est défini par la relation suivante :

$$TR = (1 - \frac{C_p^i}{C_r^i}) \cdot 100 \qquad \text{Eq I.9}$$

avec C_p^i et C_r^i qui sont, respectivement, la concentration en particules i dans le perméat produit et dans la phase rétentat.

Dans le cas où la rétention du procédé est élevée (TR > 99,9 %), il est plus pertinent d'utiliser le LRV (Log Reduction Value) qui caractérise l'abattement de l'opération. En effet, les fabricants de membrane emploient généralement un test de rétention bactérien pour évaluer l'efficacité des filtres vis-à-vis de l'élimination des microorganismes présents dans une suspension (Griffiths et al. 2000), qui est exprimé en LRV tel que:

$$LRV = log \frac{C_a^i}{C_p^i} \qquad \text{Eq I.10}$$

avec C_a^i et C_p^i les concentrations en particules mesurées respectivement dans le compartiment d'alimentation et dans la phase perméat.

A.4.2. Mécanismes de sélectivité spécifiques aux microorganismes

La rétention des particules d'origine biologique par la membrane est attribuée à plusieurs facteurs. En plus de la taille nominale des pores, le transfert de cellules à travers les pores peut être modifié par divers types d'interactions. Les propriétés physico-chimiques de la membrane (charge de surface, degré d'hydrophobie) ainsi que celles de l'échantillon à filtrer en plus de la morphologie des cellules bactériennes, forment alors un ensemble de paramètres qui influence la sélectivité du procédé. Des fuites en bactéries ont cependant été observées alors que la taille des pores membranaires était plus petite que la plus petite dimension du microorganisme filtré.

La rétention de communautés microbiennes présentes dans les eaux de surface lors des filtrations sur des cartouches industrielles de taille de pore de 0,22 µm a été mesurée par Wang et al. (2008). Les données présentées dans cette étude démontrent que les cartouches de filtration utilisées industriellement ne garantissent pas une rétention totale pour une communauté complexe. Plus de 10% du total des cellules bactériennes présentes dans la suspension filtrée parviennent à traverser la cartouche filtrante d'après des résultats obtenus par cytométrie en flux. De plus, les auteurs indiquent que si l'eau filtrée est mise en bouteille et stockée à 25°C, les microorganismes ont la capacité de croître sur un milieu nutritif. Ainsi, si la stérilisation totale est envisagée, il apparait nécessaire d'ajouter une étape de désinfection (membranaire ou autre) au procédé de traitement par microfiltration.

Ce transfert inattendu de bactéries à travers une membrane peut-être expliqué par la présence de défauts dans la structure de la membrane (Stockner et al., 1990). Il existe différentes origines à ces défauts. Des imperfections peuvent être générées lors de la fabrication ou des dégradations de la structure peuvent apparaitre au cours du vieillissement. De nombreux cycles de nettoyages mécaniques et chimiques sont effectués dans les procédés membranaires afin de limiter le colmatage entrainant l'altération de la structure poreuse de la membrane qui se traduit par une modification de ses propriétés structurales (S. Rouaix, 2005): apparition de pores anormalement gros qui modifient la distribution de la taille des pores au détriment du taux de rétention.

Les auteurs Kobayashi et al. (1998) étudient l'abattement de la souche *E. coli* (bactérie à Gram négatif) par différentes membranes asymétriques d'ultrafiltration en polyacrylonitrile (PAN) de structure variable. Pour des membranes en homopolymère de PAN des transferts de *E. coli* ont été observés, alors que pour des membranes complexes en copolymères, aucun transfert n'est détecté. Les auteurs discutent de l'impact sur le transfert de la structure interne de la membrane obtenue lors de la polymérisation (au cours de la fabrication) pouvant conduire à la formation de macro-vides débouchant à travers la peau sélective de la membrane, générant ainsi des pores hors distribution principale. Toutefois, ces défauts (de l'ordre de 10 à 30 nm) sont toujours plus petits que la plus petite dimension de la bactérie (environ 1µm).

Transfert et type de gram

Ces observations qui n'ont pu être expliquées par les mécanismes communs d'exclusion stérique ou de charge, sont la conséquence d'une aptitude à la déformation du microorganisme gouvernée par les caractéristiques structurales de la paroi bactérienne. En conséquence, il a pu être démontré que les bactéries à Gram positif sont moins déformables et sont alors mieux retenues que les bactéries à Gram négatif, toutes conditions étant identiques par ailleurs (Lebleu et al., 2009).

La taille des microorganismes n'est donc pas le seul paramètre qui détermine le transfert de cellules à travers la membrane. Tanaka et al. (1996) ont réalisé des filtrations de six souches bactériennes différentes dans des conditions opératoires identiques (PTM fixée à 0,5 bar et concentration de l'alimentation voisine de 10^4 UFC/mL). Ils ont constaté un transfert de la souche *E. coli* à travers des membranes isopores en polycarbonate alors que la taille moyenne des pores (0,4 µm) était plus petite que les dimensions de la bactérie (2x1 µm). Cependant, la souche à Gram positif *Corynebacterium xerosis* avec une taille similaire (1 µm) et la même forme que *E. coli* (bacille) ne traverse pas la membrane. Ces différences peuvent s'expliquer par la capacité de certains microorganismes à changer de forme, volume, et/ou de taille sous l'effet d'une contrainte mécanique appliquée sur la cellule, phénomènes plus prononcés chez les souches à Gram négatif du fait des caractéristiques de la paroi cellulaire de ce type de cellule (Lebleu et al., 2009). Ainsi, la sélectivité de la membrane ne semble pas être uniquement gouvernée par des mécanismes physiques d'exclusion stérique.

Chandler et Clark (1970) présentent des résultats obtenus lors de la filtration d'une suspension de *Treponema pallidum* (bactérie à Gram négatif, sous forme spiralée, responsable de la syphilis de dimension 5x15µm) à travers un filtre seringue, et pour différentes taille de pores. Bien que la filtration d'un faible volume (environ 1mL) soit analysée, et que les différents échantillons soient observés par microscopie optique, les auteurs mettent en évidence le transfert de la bactérie à travers des filtres de taille de pore 0,45µm. La rétention totale est observée pour une taille de pore de 0,22 µm. De plus, les auteurs démontrent qu'une souche motile de *Treponema pallidum* présente un taux de transfert plus grand que la souche non-motile. Ici, aucun mécanisme n'est proposé, les auteurs expliquent les résultats uniquement par le fait que les microorganismes en suspension peuvent avoir une taille variable.

Ghayeni et al. (1999) étudient le transfert de microorganismes pendant des expériences de microfiltration. En utilisant une culture de souche marine (SW8, bactérie à Gram négatif) ou une culture complexe issue d'un effluent de station d'épuration, les auteurs mettent en évidence qu'après filtration sur un filtre de 0,2 µm aucun microorganisme n'est cultivable dans le perméat pour ces deux échantillons. Cependant, ils observent par microscopie optique à fluorescence une très grande concentration de bactéries dans le perméat, mais aussi un nombre important de bactéries présentes dans la matrice de la membrane. Pour expliquer ces résultats, les auteurs supposent que les bactéries présentes dans le perméat ont subi des dommages morphologiques lors du transfert à travers la membrane. Bien qu'il existe des pores anormalement larges à la surface de la membrane filtrante, les auteurs suggèrent que la présence d'ultramicrobactéries[1] mais aussi de bactéries déformables (Gram négatif) dans la suspension filtrée soient responsables du transfert à travers les membranes. Enfin, l'impact des forces agissantes lors de la filtration membranaire (PTM et pression osmotique de la solution filtrée) pourrait favoriser ce transfert par modification de la taille des cellules bactériennes.

Wang et al. (2008) ont démontré l'effet d'une exposition au glutaraldéhyde sur le transfert de la souche *Hylemonella gracilis* (souche de forme spiralée à Gram négatif de taille à la plus petite dimension de l'ordre de 0,2 µm). En présence d'une faible dose de l'agent fixateur (1% du volume filtré), les auteurs observent une réduction du transfert des cellules de *H. gracilis* traitées à travers des pores de diamètre 0,45 et 0,22 µm présents dans des filtres seringues. La mise en évidence des effets du glutaraldéhyde sur les propriétés mécaniques des parois bactériennes n'est pas détaillée dans cette étude, mais les auteurs s'appuient sur des travaux qui démontrent, par mesure AFM, l'augmentation de la rigidité des parois des cellules vivantes au contact de l'agent fixateur (Hutter et al., 2005). Ainsi, grâce à leurs observations, Wang et al. proposent d'utiliser la souche *H. gracilis* comme une alternative pour les tests standards des filtres stérilisants et recommandent l'usage de filtres de taille de pore de 0,1 µm lorsque une rétention totale est souhaitée.

---

[1] *Ultramicrobactérie : catégorie de bactéries découvertes en 1974 et décrites comme issues de souches marines de taille significativement inferieure à la normale. En 1981,* (Torrella and Morita, 1981) *utilisent pour la première fois le terme d'ultramicrobactérie. Elles sont maintenant définies comme possédant: un volume inférieur à 0,1µm^3, une largeur inférieure à 0,3µm, une variation de volume quasi nulle en situation de croissance ou de carence nutritive, elles sont hautement résistantes aux stress et ont la capacité à traverser les filtres de 0.22 µm de taille de pore* (Velimirov, 2001).

La notion de déformabilité des cellules vivantes couplée à l'étude des propriétés mécaniques de la paroi cellulaire sont donc utilisées par plusieurs auteurs afin d'expliciter l'importance de la structure pariétale des cellules sur leur transfert à travers des membranes de filtration (Lebleu et al., 2009; Suchecka et al., 2003; Szwast et al., 2012).

Transfert et volume cellulaire

Suchecka et al. (2003) ont également mis en évidence le transfert de microorganismes vers le perméat à travers des membranes de microfiltration. Différentes tailles de pore et différentes membranes commerciales sont alors testées, vis-à-vis notamment de la souche *B. diminuta*. Bien que les auteurs précisent qu'il est possible de trouver des pores anormalement gros à la surface des membranes utilisées, au regard de leur taille potentielle, le transfert des microorganismes requiert tout de même une déformation importante de la cellule biologique. D'après ces auteurs, le transfert des microorganismes ne s'explique pas par l'élongation de la membrane des cellules bactériennes mais par une réduction du volume cytoplasmique, la force à l'origine de cette réduction de volume est la pression transmembranaire appliquée lors de la filtration. Le mécanisme de déformation qu'ils proposent est le suivant : lorsqu'une cellule est située à l'entrée d'un pore membranaire elle est écrasée contre celui-ci par la surpression appliquée coté rétentat et aspirée par la dépression coté perméat. Ce phénomène conduit la cellule à se déformer tout en se vidant d'une partie de son liquide intracellulaire permettant son passage à travers le pore membranaire.

Transfert et chimiotactisme

Différents travaux s'intéressent aux transferts de microorganismes à travers la structure membranaire dans le cas de tests en conditions statiques, c'est-à-dire sans pression transmembranaire (Hasegawa et al., 2003; Nakazawa et al., 2005; Wainwright et al., 2002). Ces études démontrent que de nombreuses souches bactériennes ont la capacité à traverser un filtre de microfiltration (jusqu'à 0,22 µm de taille de pore) par chimiotactisme, alors qu'elles sont totalement retenues lors de leur filtration. En effet, lorsqu'une suspension bactérienne est déposée à la surface d'une membrane, elle-même placée sur un milieu nutritif solide, les microorganismes parviennent à se déplacer vers la phase perméat où se trouve la réserve de nutriments. Dans ce cas, le transfert des microorganismes à travers la membrane est dépendant du temps de contact bactéries/membrane (supérieur à 24h) puisque la

migration nécessite un déplacement de la cellule et/ou une multiplication cellulaire à travers le pore membranaire. Ces observations démontrent également que les flagelles permettent aux bactéries de se déplacer à l'intérieur de la matrice membranaire et d'autre part que les souches étudiées ont la capacité à croitre dans des espaces confinés (inférieur à 0,2µm). Ce dernier aspect a pu être visualisé grâce à un système microfluidique couplé à une observation par fluorescence du développement cellulaire (Mannik et al., 2009). Les auteurs démontrent que par simple phénomène de multiplication cellulaire, les cellules filles peuvent progressivement coloniser et traverser un canal d'une dimension inférieure au micromètre.

L'ensemble de ces travaux souligne les capacités des microorganismes comme les bactéries à traverser des membranes de filtration dont les pores sont plus petits que les dimensions de la cellule. Nombreux d'entre eux identifient l'aptitude à la déformation comme paramètre majeur influençant ce transfert. Cependant très peu d'études ont été dédiées à la mise en regard des caractéristiques nanomécaniques des bactéries et de leur aptitude au transfert pendant une filtration. Si un lien quantitatif pouvait être établi, il serait alors envisageable de développer un modèle de transfert simple permettant d'anticiper les fuites en microorganismes.

Partie B. Le cas spécifique d'une particule vivante : la cellule bactérienne

Cette seconde partie du chapitre introductif présente succinctement les propriétés des cellules bactériennes, souligne leur capacité à s'adapter à leur environnement et développe les outils expérimentaux pertinents pour leur caractérisation.

B.1. Généralités

Les bactéries sont des microorganismes vivants unicellulaires appartenant au taxon des procaryotes. Pour cela la cellule bactérienne répond, sauf exception, à différentes caractéristiques : une absence de noyau, un ADN circulaire, une quasi absence d'organites cellulaires, une paroi cellulaire (recouvrant sa membrane plasmique, composée de polypeptides et polysaccharides). Il est possible de trouver des bactéries pouvant vivre dans des conditions extrêmes telles que des températures de plus de 100°C, à des salinités de 5 M ou encore à des taux de radiation létale pour un être humain. Les souches bactériennes peuvent aussi posséder divers métabolismes que les procédés utilisent aujourd'hui dans de nombreuses applications industrielles. Malgré le fait qu'elles soient apparues il y a plus de 3600 millions d'années, les études sur les bactéries se sont développées avec Louis Pasteur et nous ne sommes encore qu'au début de la recherche et l'utilisation de ces organismes unicellulaires.

B.2. Caractéristiques morphologiques et structurales

Les bactéries, par leurs différentes particularités physiologiques, présentent une grande diversité de morphologie, avec des formes sphère (coque), bâtonnet (bacille), incurvée (vibrion), spiralée (spirochètes), filamenteuse (Actiomycète) etc... ainsi que des dimensions de l'ordre de 0,2 à 10 µm pouvant aller jusqu'à 250 µm chez certaines Spirochètes (de forme hélicoïdale).

Au sein de la cellule bactérienne, il est possible de distinguer des structures présentent de façon obligatoire et d'autres qui sont facultatives dans le but de déterminer certains groupes bactériens. Dans les structures permanentes, on trouve le cytoplasme contenant un grand nombre de ribosomes ainsi que l'appareil nucléaire diffus dans ce dernier. La présence d'une membrane cytoplasmique est aussi impérative chez toutes les cellules bactériennes. Elle est composée de deux feuillets phospholipidiques, et possède différentes fonctions : un centre de fabrication d'énergie (ATP) et une interface d'échange de substances par diffusion ou transport actif. Les structures facultatives, quant à elles, peuvent être des polymères de

surface comme la capsule, des appendices comme les flagelles et les pili ou même des structures génétiques comme les plasmides.

La membrane cytoplasmique du microorganisme constitue une interface perméable entre la cellule vivante et son environnement. Elle est impliquée dans les échanges de liquide entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, dans l'assimilation des nutriments indispensables au fonctionnement du métabolisme ou encore elle permet le rejet des composés toxiques accumulés dans le cytoplasme. Au-delà de cette membrane on trouve une couche de peptidoglycane. L'ensemble de cette structure pariétale (membrane cytoplasmique + couches supérieures) présente plusieurs propriétés essentielles vis-à-vis de la croissance bactérienne et du maintien de la viabilité cellulaire. En effet, la couche de peptidoglycane est responsable de la rigidité des cellules, ce qui assure leur résistance aux contraintes mécaniques environnementales. Ainsi, les cellules bactériennes peuvent être divisées en deux grandes classes : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Cette distinction s'effectue sur la base de leur aptitude à retenir ou non la coloration au cristal violet fixée au lugol (solution d'iodure de potassium iodée).

Les bactéries à Gram positif possèdent à l'extérieur de la membrane cytoplasmique une paroi constituée d'une épaisse couche de peptidoglycane associée à des acides teichoïques, alors que les bactéries à Gram négatif présentent une fine couche de peptidoglycane localisée dans le périplasme entre la membrane cytoplasmique et la membrane cellulaire externe (cf. Figure I.5 – à droite). Plus précisément, l'architecture des membranes des bactéries à Gram négatif s'organise en trois parties : la membrane externe en contact direct avec le milieu extérieur, l'espace périplasmique qui comporte la paroi, et la membrane plasmique. La membrane externe est principalement composée de phospholipides organisés en bicouche (partie hydrophile à l'extérieur et partie lipophile à l'intérieur) mais contient aussi de nombreuses protéines intrinsèques, notamment les protéines de transport. Dans la majorité des bactéries à Gram négative on retrouve des lipopolysaccharide (LPS) qui s'activent lors des processus de lyse cellulaire. Cette membrane externe est reliée à une fine couche de peptidoglycane présent dans l'espace périplasmique (en comparaison des cellules à Gram positif). La membrane plasmique est semblable à la membrane externe et contient de nombreux complexes protéiques ayant des rôles primordiaux dans le métabolisme cellulaire (ATP synthase).

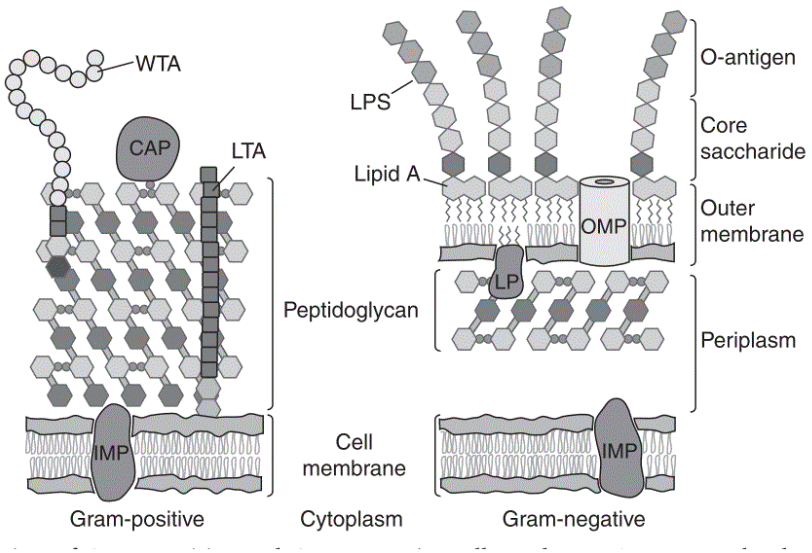


Figure I.5. Représentation schématique des deux types communs de paroi bactérienne.
Légende : CAP = protéine attachée par liaisons covalentes ; IMP = protéine membranaire intégrée; LPS = lipoprotéine ; LPS = lipopolysaccharides ; LTA = acide lipotéichoïque ; OMP = protéine de la membrane externe ; WTA = acide téichoïque de la paroi (adaptée de Silhavy et al., 2010).

Les bactéries à Gram positif possèdent une couche de peptidoglycane très épaisse (cf. Figure I.5 – à gauche). Elle est composée principalement de plusieurs couches de polymère de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétylmuramique en série alternée associées à des acides teichoïques. L'espace périplasmique, quant à lui est beaucoup plus étroit et présente le même rôle de stockage d'enzymes, de nutriments, de protéines, d'ions... Enfin, la membrane plasmique est similaire chez les deux classes de bactéries.

B.3. Formation de biofilms

En plus des caractéristiques membranaires permettant de résister aux contraintes environnementales, les bactéries adhérées entre elles et/ou sur une surface forment des communautés appelées biofilm. Le développement en biofilm est, pour les microorganismes, un moyen d'augmenter leur survie dans un environnement hostile. En effet, cette organisation présente de nombreux avantages. Premièrement, elle offre une protection contre l'environnement. La population bactérienne est enrobée d'une matrice extracellulaire qui réduit la diffusion de composés depuis le milieu extérieur vers l'intérieur du biofilm (Teitzel and Parsek, 2003) et protège les cellules des stress environnementaux tels que des variations de pH (McNeill and Hamilton,

2003), des chocs osmotiques (Le Magrex-Debar et al., 2000), des expositions à des agents antimicrobiens (Mah and O'Toole, 2001; Stewart and William Costerton, 2001). Un des autres avantages de cette organisation peut être la coopération métabolique et la mise en place de relations syntrophiques (Davey and O'toole, 2000). Les différentes espèces présentes au sein du biofilm peuvent alors échanger des substrats et organiser l'évacuation ou la distribution des produits métaboliques. Les cellules bactériennes sont maintenues ensemble par une matrice polymérique composée d'exopolysaccharides (EPS), de protéines et d'acides nucléiques.

Les EPS sont des composés de haut poids moléculaire sécrétés par les microorganismes dans leur environnement et qui permettent de maintenir l'intégrité fonctionnelle et structurelle des biofilms. Les EPS sont considérés comme la composante fondamentale des propriétés physico-chimiques d'un biofilm. Ces macromolécules ont donc un rôle prépondérant dans l'adaptation à leur environnement des communautés bactériennes (Davey and O'toole, 2000).

B.4. Adaptation à l'environnement

Les propriétés physico-chimiques du fluide filtré ne sont pas sans effet sur les caractéristiques morphologiques et structurales des cellules bactériennes, en effet ces dernières sont capables de s'adapter à l'environnement afin, notamment, de survivre en cas de stress (carence nutritive par exemple). Ce paragraphe souligne à travers quelques exemples comment les bactéries peuvent être impactées par des conditions physico-chimiques proches de celles rencontrés dans notre problématique.

L'adaptation est définie en biologie, comme l'ajustement fonctionnel d'un organisme ou d'une population à son environnement. Cela désigne à la fois le résultat et le processus qui mène au résultat.

En condition défavorable (phase stationnaire en l'absence de nutriment), la quantité de LPS (cf. Figure I.5) présent dans la membrane exposée augmente ce qui permettrait d'accroître la résistance des cellules à des agents néfastes (Nikaido, 1996). Dans ces mêmes conditions, d'autres voix métaboliques sont également amplifiées telles que, par exemple, la production de protéines constituant les curlis : facteurs d'adhérence permettant l'attachement des cellules à la surface d'un solide, et impliqués dans la formation des biofilms (Prigent-Combaret et al., 2001). Un autre exemple de modification en réponse à un changement environnemental est la synthèse de flagellines qui est induite par une phase stationnaire puis rapidement

réprimée (Amsler et al., 1993). Cette protéine permet l'amélioration de la motilité grâce aux flagelles et peut permettre aux bactéries d'atteindre des sources de carbone alternatives et/ou de s'éloigner d'un environnement néfaste. Un des mécanismes de défense développé par les cellules bactériennes consiste à modifier leurs capacités d'échanges en modifiant la concentration des protéines membranaires de transport, les porines (Nikaido and Vaara, 1985)

La présence et la quantité de nutriment dans le milieu de culture jouent un rôle important sur ce paramètre. En phase de croissance, une faible concentration continue en glucose dans le milieu entraine une hétérogénéité de taille chez la souche *S. aureus* ainsi qu'une réduction du diamètre moyen de la cellule d'environ 40%. De même, pour une culture de *E. coli* dans un milieu riche, les cellules sont plus longues et plus larges que les cellules cultivées dans un milieu nutritif pauvre. L'ensemble de ces processus conduisant à la multiplication cellulaire et à la modification de la taille des cellules est gouverné par l'expression des gènes qui régulent et coordonnent la croissance des microorganismes. En l'absence de contraintes, les bactéries en phase de croissance exponentielle sont cultivées dans des conditions stables et présentent une large diversité de taille (Chien et al., 2012). En effet, chez les bactéries la forme la plus courante de la multiplication cellulaire est la fission binaire : la cellule va doubler en masse et ensuite se diviser en son centre en deux cellules filles de taille équivalente.

Le phénomène de modification du volume des bactéries a été mis en évidence par de nombreux auteurs ayant étudié la régulation de l'équilibre osmotique entre la cellule bactérienne et le milieu extérieur (Martinez de Maranon et al., 1996). Une augmentation de la pression osmotique dans l'environnement est directement reliée à une chute de la pression de turgescence (pression interne de la cellule) et entraîne dans un premier temps une réponse passive qui consiste en une sortie d'eau de la cellule conduisant à une diminution rapide du volume cellulaire (Baldwin et al., 1988) et l'encombrement protéique augmente dans le cytoplasme de la cellule. La seconde phase correspond à une réponse biologique active et s'établit ensuite si la première phase n'a pas trop endommagé la cellule : l'échange actif d'eau et de solutés avec l'environnement va permettre de restaurer le volume initial de la cellule (Wood, 1999). Si la cellule est trop fortement comprimée, l'encombrement protéique réduit les capacités d'adaptation de la cellule et la mise en place de la réponse métabolique, la cellule entre en phase de dormance (Miermont et al., 2011)

Enfin, les cellules bactériennes peuvent être exposées à des molécules organiques telles que des antibiotiques, des polluants ou des détergents, ce qui n'est pas sans effet sur leur viabilité. Des modifications de la morphologie des cellules bactériennes et de leurs propriétés nanomécaniques ont été observées après une exposition à des antibiotiques à des doses non létales (cf. paragraphe suivant).

B.5. Techniques d'observation et de caractérisation à l'échelle individuelle

Plusieurs techniques d'observation permettent de mesurer la taille des microorganismes, de déterminer les propriétés pariétales des cellules et d'observer des changements de structure tridimensionnelle en fonction des contraintes environnementales.

B.5.1. Microscopie à Force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) est un outil de choix pour l'étude des caractéristiques morphologiques et structurales des microorganismes (Pillet et al., 2014a). Cette technologie offre de nombreuses possibilités puisqu'elle permet de déterminer les propriétés nanomécaniques des cellules vivantes et cela à l'échelle individuelle. Cette technique d'observation permet d'obtenir des images en trois dimensions de la topographie d'une surface avec une résolution nanométrique, en conditions physiologiques, et avec relativement peu d'étapes de préparation de l'échantillon. Cependant, l'étape préliminaire d'immobilisation de la cellule est l'un des points déterminants de l'expérimentation, le résultat obtenu en dépend directement.

Fonctionnement de l'AFM et modes d'observations

La microscopie à force atomique est basée sur la mesure physique des forces d'interactions entre une sonde nanométrique et un échantillon à analyser, et non sur l'observation d'un faisceau de photons ou d'électrons comme la plupart des microscopies dites traditionnelles. L'AFM est donc un mode de visualisation de l'échantillon relativement novateur (1986), puisque cet outil dérive de la microscopie à effet tunnel mise au point en 1981 (Binnig and Quate, 1986; Binnig et al., 1982). L'observation par AFM n'est pas basée sur la vision mais sur le toucher de la surface de l'échantillon biologique. La Figure I.6 décrit schématiquement l'architecture et le fonctionnement d'un AFM. Le microscope est constitué d'une céramique piézo-électrique déplaçable dans les trois dimensions de l'espace (x, y et z). Un levier portant une pointe est placé sur la céramique piézo-électrique.

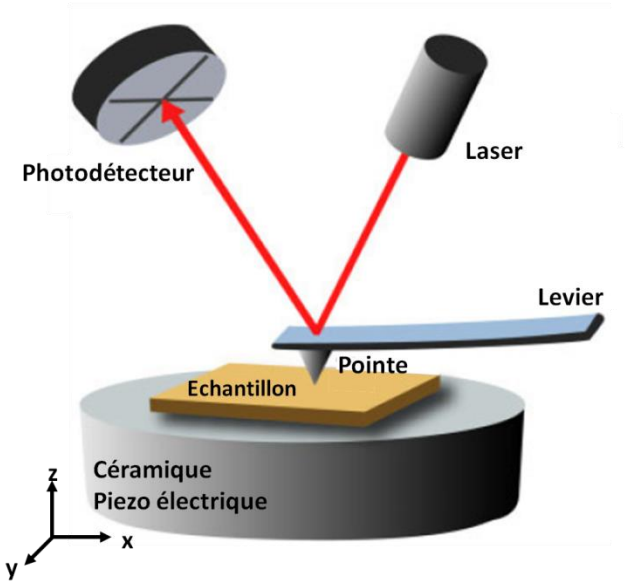


Figure I.6 : Représentation schématique du principe de fonctionnement de la microscopie à force atomique (adapté de Liu and Wang, 2010).

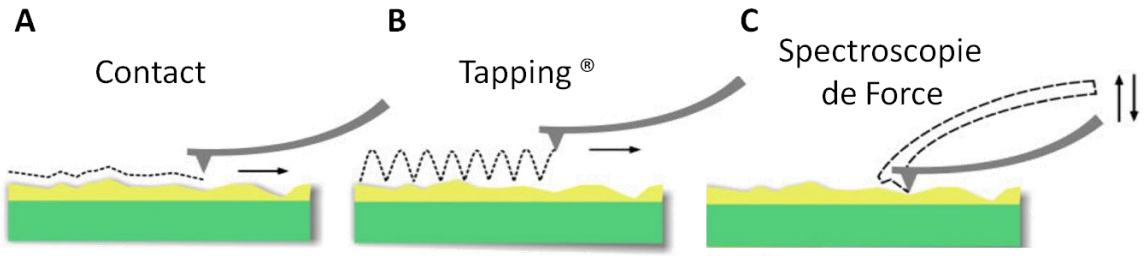


Figure I.7: Les principaux modes d'acquisition employés en microscopie à force atomique.
A) Principe du mode contact : la pointe reste au contact de l'échantillon et balaye sa surface. B) Principe du mode Tapping aussi appelé mode oscillant: la pointe touche la surface de l'échantillon par intermittence, les différences d'amplitude détectées permettent la reconstruction de la topographie. C) Principe du mode de spectroscopie de force : la mesure de courbes de forces suivant une matrice spatiale permet la reconstruction de l'image et l'extraction des données nanomécaniques de la surface analysée (adapté de Liu and Wang, 2010).

Cette pointe est ensuite mise en contact avec l'échantillon. La déformation subie par le levier lors du balayage de la surface par la pointe est alors mesurée par la déviation de la réflexion d'un faisceau laser sur un photodétecteur.

Mise au point par Binnig, Quate et Gerber en 1986 (Binnig et al., 1986), l'utilisation de la technique d'observation par AFM est en croissance constante, et notamment en science du vivant pour l'étude des propriétés morphologiques des cellules telles que les bactéries, les levures ou encore les cellules eucaryotes. Un des intérêts particuliers de l'AFM est le fait qu'il est possible de travailler sur des cellules vivantes et en milieu liquide, c'est-à-dire observer les organismes dans leur environnement ou dans leur milieu de culture. Pour cela, les cellules vivantes doivent être immobilisées (et non fixées) sur un matériau ce qui constitue un des véritables challenges de l'application de l'AFM à la microbiologie. Différentes techniques d'immobilisation sont présentées dans le paragraphe suivant. Enfin, l'AFM est un puissant outil de microscopie qui permet de suivre de manière dynamique l'évolution des caractéristiques cellulaires au cours, par exemple, d'une phase de croissance (Kailas et al., 2009; Touhami et al., 2004) ou encore lors d'une adaptation morphologique de la cellule en réponse à un stress environnemental (Francius et al., 2008; Pillet et al., 2014b).

Plusieurs modes d'observations par AFM sont disponibles et consistent à mettre en contact la pointe et l'échantillon de différentes manières. Nous nous intéresserons, dans cette introduction, à la description des modes d'acquisition communément appliqués à l'étude des cellules bactériennes.

Le mode contact (Figure I.7.A), premier mode découvert, consiste à approcher la pointe de l'échantillon afin de balayer la surface à analyser avec une force d'appui constante. Cette force est contrôlée grâce à la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle qui permet de maintenir la même distance, et donc la force appliquée, entre la pointe et l'échantillon malgré les aspérités de la surface étudiée. Ce mode permet de réaliser des images à haute résolution pouvant aller, dans certaines conditions, jusqu'à une résolution atomique mais cela reste difficilement applicable pendant l'observation des cellules vivantes. Dans ce mode, la force d'appui appliquée par la pointe est maintenue constante pour toute la surface à analyser. Ainsi, le levier qui supporte la pointe subit une déflexion qui induit un déplacement du laser sur le photodétecteur.

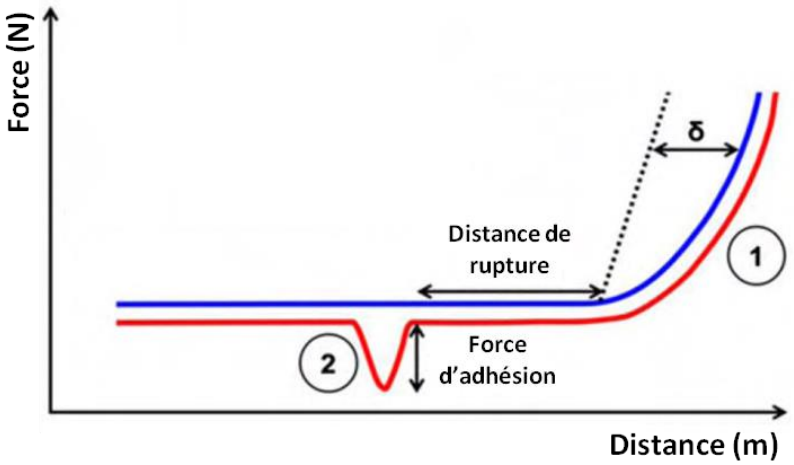


Figure I.8 : Représentation schématique d'une courbe de force obtenue en microscopie à force atomique avec le mode spectroscopie de force.
Ces courbes de force peuvent être analysées selon deux possibilités: (1) l'indentation (δ) est déterminée d'après la courbe d'approche (courbe en bleu) et représente les propriétés nanomécaniques de la paroi des cellules bactériennes. (2) La courbe de retrait (courbe en rouge) est obtenue lorsque la pointe se retire de la surface analysée, l'interaction entre la pointe AFM et la surface de l'échantillon biologique peut être mesurée (adapté de Francois et al., 2013).

Les variations de la position du laser sont ensuite traitées en temps réel afin de reconstruire la topographie de la cellule, permettant de mettre en évidence des variations de hauteur inférieures au nanomètre à la surface de l'échantillon (Bhushan and Marti, 2010).

Le mode Tapping (Figure I.7.B) est également utilisé pour la production d'images à haute résolution d'une surface mais il est basé sur l'oscillation de la pointe à la surface de l'échantillon. Ce mode permet de réduire les phénomènes de frictions latérales imposées par le déplacement de la pointe. Avec ce mode d'acquisition, ce sont les variations de l'amplitude d'oscillation de la pointe qui sont mesurées. En effet, lorsque la pointe oscille à la surface haute d'un échantillon, l'amplitude de son oscillation va réduire ou augmenter selon son relief. Cette mesure peut être réalisée sur toute la surface d'un échantillon afin de reconstruire la topographie de la surface analysée.

Enfin, avec le mode spectroscopie de force (Figure I.7.C) la pointe n'est pas en contact constant avec une surface mais elle est approchée puis retirée d'un point de la surface de l'échantillon ce qui permet d'obtenir des courbes de force (Chopinet et al., 2013; Müller and Dufrêne, 2011). Lorsque cette méthodologie est appliquée sur une matrice à la surface de l'échantillon (mode Force Volume), à chaque point de la matrice spatiale une courbe de force va être obtenue. Ces courbes, une fois collectées, sont analysées individuellement afin de reconstruire la topographie de la surface étudiée, mais pas seulement. En effet, ce mode d'acquisition permet d'extraire de nombreuses informations sur les caractéristiques nanomécaniques de l'échantillon telles que, par exemple, son élasticité, sa rugosité, ses propriétés d'adhésion. La Figure I.7.C représente l'AFM utilisé dans son mode de spectroscopie de force et la Figure I.8 schématise les courbes de force obtenues lors de l'acquisition. L'indentation, qui représente la déformation subie par l'échantillon, peut être analysée afin de mesurer les propriétés nanomécaniques des parois cellulaires. La courbe de retrait permet d'obtenir des informations sur les forces d'adhésion entre la pointe et la surface de l'échantillon.

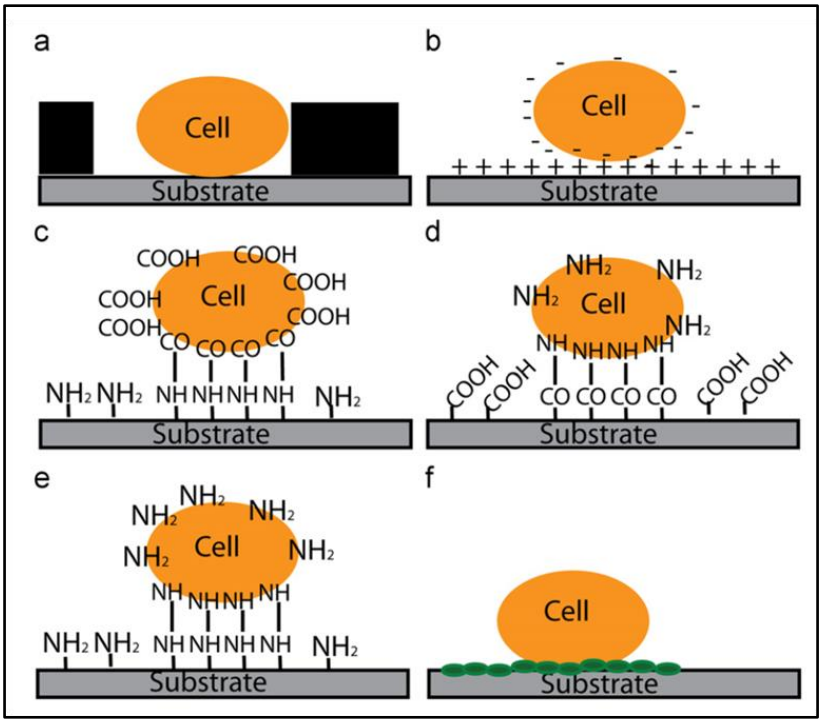


Figure I.9 : Représentation schématique de différentes stratégies employées en microscopie à force atomique afin d'immobiliser les cellules vivantes.
a) confinement physique dans un puits, b) interactions électrostatiques, c) liaisons covalentes avec une surface recouverte de groupements amines, d) liaisons covalentes avec une surface recouverte de groupements carboxyles, e) liaisons covalentes avec une surface recouverte de groupements amines issus du glutaraldéhyde, f) adhésion avec des protéines polyphénoliques issues de *Mytilus edulis* (source: Meyer et al., 2010).

Immobilisation des bactéries

Au cours de l'acquisition par AFM, la cellule bactérienne immobilisée doit résister aux forces de friction latérales imposées par le balayage de sa surface par la pointe et cela sans induire une modification ou une dénaturation de la cellule. Cette partie du protocole expérimental est donc un point sensible de l'étude par AFM des surfaces de cellules vivantes. De nombreuses techniques d'immobilisation sont disponibles dans la littérature (cf. Figure I.9) et permettent d'observer chaque cellule de manière individuelle : séchage, fixation chimique, immobilisation dans un gel et emprisonnement physique (Meyer et al., 2010). Cependant, ces différentes méthodes peuvent conduire à des modifications de la structure de l'échantillon (Chao and Zhang, 2011; El Kirat et al., 2005; Vadillo-Rodríguez et al., 2004). A ce jour, les microorganismes sont immobilisés et analysés après une phase de séchage d'une goutte de suspension cellulaire sur une lame de verre suivie d'une phase de réhydratation de l'échantillon dans de l'eau (Bolshakova et al., 2001). Cette méthode d'immobilisation par séchage peut affecter la viabilité des cellules ou encore déclencher une adaptation biologique qui altère les propriétés de surface des parois cellulaires.

Deux techniques d'immobilisation douce (sans séchage de l'échantillon biologique) sont dorénavant utilisées pour l'étude des cellules vivantes: l'immobilisation par liaisons chimiques sur une surface solide ou le blocage physique dans des cavités de taille adaptée.

L'immobilisation des cellules par des interactions électrostatiques avec une surface préalablement recouverte par un agent chargé positivement peut être envisagée. Des molécules chargées telles que la polyethyleneimine (PEI) (Formosa et al., 2012a) la poly-L-lysine (Colville et al., 2010) ou encore la gélatine (Doktycz et al., 2003) peuvent être déposées sur une lame de verre afin de permettre l'attachement, au support, de cellules chargées négativement. Enfin, une dernière méthode utilise les propriétés d'adhésion de protéines polyphénoliques pour immobiliser les cellules vivantes (Meyer et al., 2010).

Ensuite, les cellules peuvent être immobilisées par des techniques physiques qui emprisonnent les cellules. Par exemple, les cellules sphériques de type coque ou levure peuvent être piégées dans des pores de membranes en polycarbonate après une filtration (Dufrêne, 2002, 2004; Kasas and Ikai, 1995).

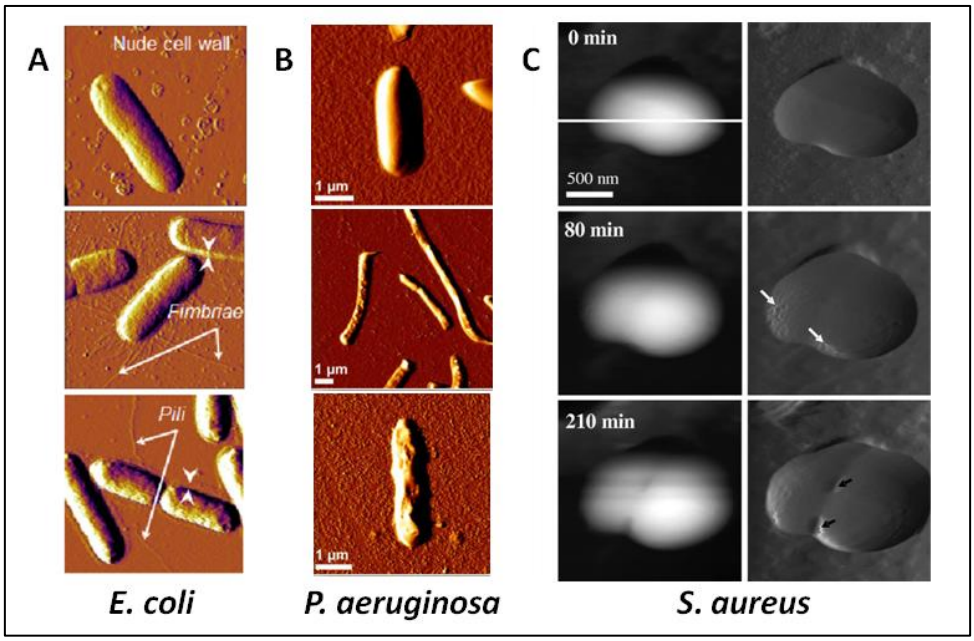


Figure I.10: Exemples de résultats obtenus par AFM.
Observation de cellules de *E. coli* et de structures extracellulaires ; (B) Altération de la morphologie des cellules de *P. aeruginosa* traitées avec un antibiotique : haut – sans traitement, milieu – élongation des cellules après traitement à la Ticarcilline, bas – altération de la paroi après traitement à la Tobramycine ; (C) Observation séquencée (de haut en bas) de la lyse de la paroi d'une cellule de *S. aureus* par une enzyme. (Sources: Formosa et al., 2012a; Francius et al., 2008, 2011)

Cependant, cette technique intéressante vis-à-vis de notre problématique est décrite comme chronophage, à très faible rendement et pouvant entrainer une déformation de la cellule piégée (Méndez-Vilas et al., 2007). Une autre technique d'immobilisation physique consiste à piéger les cellules sphériques dans des puits imprimés dans une microstructure en polydimethylsiloxane (PDMS) (Whitesides et al., 2001). Ce polymère possède de nombreuses caractéristiques qui en font un matériau de choix pour l'immobilisation des cellules vivantes : il est biocompatible (aucune modification chimique de la cellule en contact) et transparent (permet le couplage avec de la microscopie optique ou à fluorescence). Cette approche a été mise au point par Dague et al. (Dague et al., 2011) et est dorénavant employée pour l'immobilisation de nombreuses souches de levures et de spores (Formosa et al., 2015).

Etude de la morphologie et des propriétés nanomécaniques des bactéries

L'une des applications de l'AFM en microbiologie est l'observation de la topographie des microorganismes grâce notamment au mode contact décrit précédemment. De plus, les propriétés nanomécaniques des parois des cellules bactériennes peuvent être évaluées grâce au mode Force Volume. Ces deux modes d'acquisition ont la particularité de pouvoir être mis en œuvre sur des cellules vivantes et en suspension dans leur milieu. Avec l'utilisation du mode contact, la technologie AFM permet d'observer la structure de cellules à l'échelle individuelle ou de plusieurs cellules dans le cas de la formation de biofilm (Beech et al., 2002). Elle est si puissante qu'elle offre la possibilité d'analyser les structures extracellulaires des microorganismes, comme illustré Figure I.10.A avec la présentation de structures extracellulaires présentes à la surface d'une cellule de *E. coli* (Francius et al., 2011). De plus, lorsque l'acquisition AFM est réalisée sur des cellules après une exposition à un stress physique ou chimique, il est possible de visualiser des modifications ou des altérations de la structure de la paroi des cellules bactériennes.

Concernant plus spécifiquement l'étude des propriétés nanomécaniques des cellules bactériennes, lorsque l'AFM est employée comme un outil de comparaison entre deux états physiologiques (entre un état témoin et après un traitement physique ou chimique) dans des conditions d'acquisition identiques par ailleurs (force d'appui, caractéristique de la pointe AFM, protocole d'immobilisation, milieu de culture), le mode Force Volume permet de révéler les modifications des propriétés mécaniques des parois cellulaires. Les propriétés nanomécaniques des cellules bactériennes, tels

que son élasticité ou sa rugosité, peuvent ainsi être déduites de la relation entre la force appliquée au levier et la profondeur d'indentation de la pointe dans l'échantillon souple. Même si de nombreuses données sont disponibles dans la littérature, les paramètres d'acquisition utilisés lors de l'expérience par AFM ainsi que les conditions d'immobilisation employées en amont de la phase d'acquisition varient très souvent d'une étude à l'autre, limitant ainsi l'intérêt des comparaisons entre tous ces travaux.

La Figure I.10.B présente les travaux de Formosa et al. (Formosa et al., 2012a) qui ont mis en évidence la modification de la morphologie d'une souche de *P. aeruginosa* après une exposition à différents antibiotiques : la Ticarcilline (bêta-lactamine) et la Tobramycine (aminoside). Les effets de chacune de ces deux molécules sont alors observés: la Ticarcilline induit une élongation des cellules, alors que la Tobramycine altère l'architecture de la surface de la paroi du microorganisme. Les modifications structurales observées, grâce au mode contact offert par l'AFM, sont également analysées avec le mode de spectroscopie de force qui démontre une diminution significative de la rigidité des parois cellulaires une fois altérées par l'action de l'antibiotique présent dans le milieu de culture. Les travaux de (Francius et al., 2008) sur la souche *S. aureus* (cf. Figure I.10.C) exposent l'évolution, au cours du temps, de la lyse d'une paroi de cellule vivante au contact de lysostaphine. Le mode d'action de cette enzyme lytique, qui coupe de manière spécifique les liaisons penta-glycines du peptidoglycane de la paroi bactérienne, est alors observé en temps réel. Cette étude démontre également que l'exposition sur des temps courts d'une cellule bactérienne avec cette enzyme entraine une diminution progressive de la rigidité des parois cellulaires lysées. La technologie AFM est donc devenue un outil de choix pour l'étude, à l'échelle nanométrique, des effets d'une exposition à un antibiotique sur une multitude de souches bactériennes (Braga and Ricci, 1998; Ouberai et al., 2011; Wu and Zhou, 2009). Cette technologie sera donc envisagée dans nos travaux afin d'observer les propriétés mécaniques des cellules bactériennes dans les conditions physico-chimiques propres à nos conditions opératoires (condition de croissance, solution tampon, agent chimique).

B.5.2. Microscopie optique à fluorescence

La Microscopie à Fluorescence permet de visualiser simplement en une dimension les cellules vivantes en suspension. En effet, après le marquage d'une molécule cible à l'aide d'un anticorps couplé à un fluorochrome ou grâce à l'expression par le micro-organisme étudié d'une protéine fluorescente (type GFP), différents protocoles permettent de suivre en temps réel la croissance et la mobilité des microorganismes. Cette technique est notamment utilisée pour suivre et analyser le passage de cellules bactériennes dans des micro-canaux d'une hauteur proche de 1 µm (Männik et al., 2012)

B.5.3. Microscopie électronique à balayage (SEM)

La Microscopie Electronique à Balayage (SEM pour Scanning Electron Microscopy) offre, après un protocole de fixation lourd (les processus biologiques sont stoppés par action du glutaraldéhyde, la cellule biologique est ensuite déshydratée), la possibilité d'observer à très fort grossissement chaque cellule vivante individuellement. Cet outil permet, après traitement d'image de mesurer la hauteur et la longueur de chacune des cellules (Lee et al., 2010). Cependant, l'utilisation de la SEM ne permet pas de visualiser les microorganismes en suspension, c'est-à-dire dans leur environnement.

B.5.4. Microscopie à transmission (TEM)

La Microscopie Electronique à Transmission (TEM) permet de visualiser l'organisation interne d'une cellule biologique grâce au principe de transmission d'un faisceau d'électrons à travers une fine couche d'échantillon. Les photographies obtenues peuvent permettent de mesurer la taille occupée par différents compartiments cellulaires. Grâce à cet outil, une étude a démontré que les bactéries sont susceptibles de réduire leur volume de façon non négligeable tout en maintenant la viabilité cellulaire après un stress osmotique (Mille et al., 2002). Des travaux ont également visualisé les effets d'une solution aqueuse désinfectante (eau électrolysée et acide hypochloreux) sur la structure et l'organisation intracellulaire d'une cellule bactérienne (Feliciano et al., 2012).

B.5.5. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux offre la possibilité de dénombrer les microorganismes présents en suspension mais aussi de classer chaque cellule biologique en fonction de sa taille et de l'expression d'un marqueur biologique spécifique révélé par fluorescence (Kell et al., 1991; Wang et al., 2008, 2010).

B.5.6. Techniques d'observation d'un dépôt bactérien par microscopie

Dans cette partie nous allons brièvement décrire les méthodes de caractérisation du colmatage bactérien formé pendant une filtration sur membrane. Ces méthodes ont pour objectif d'observer les propriétés du dépôt particulaire, au cours de la filtration, si possible sans perturber sa formation et son organisation du dépôt (techniques non destructives). Pour l'étude des dépôts biologiques, elles reposent majoritairement sur les techniques de microscopies décrites dans le paragraphe précédent. A noter que d'autres méthodes sont utilisées pour étudier les caractéristiques des dépôts colmatants (Hassan, 2014) comme par exemple la réflectométrie ultrasonique ou l'imagerie par résonnance nucléaire magnétique mais celles-ci ne permettent pas la révélation, à l'échelle individuelle, des particules biologiques présentes à la surface d'une membrane de filtration.

Microscopie optique

Les méthodes optiques classiques permettent l'observation en temps réel de la formation d'un dépôt à la surface d'une membrane. Par exemple, l'équipe de Li et al., (1998) a utilisé un microscope dont l'objectif est placé du côte permeat de la membrane qui est transparente afin de relier la chute du flux de permeat au pourcentage de surface membranaire recouvert par le dépôt. Selon le même principe, il est possible d'observer la formation et le décrochement d'un dépôt de particules sur la face perméat de la membrane (Mores and Davis, 2001).

Microscopie confocale à balayage laser

La microscopie confocale à balayage laser (CLSM pour Confocal Laser Scanning Microscopie) permet de réaliser des images avec une très faible profondeur de champ (environ 600 nm) appelées sections optiques. En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur, il est possible de réaliser une série d'images et ainsi d'obtenir une reconstruction tridimensionnelle du dépôt. Le principe général de la CLSM est de faire pénétrer un faisceau laser dans l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes, ce qui provoquera

l'émission d'un rayon lumineux détecté par les photomultiplicateurs. Le signal reçu, dont l'intensité est dépendante du nombre de photons excités, est converti en signal numérique et permet la reconstruction d'une image. L'avantage de cette technique est l'élimination du bruit de fond du fait de la focalisation sur la zone analysée. Cette technique a été utilisée pour l'étude de l'adsorption de protéines (Ferrando et al., 2005) et l'organisation des dépôts particulaires complexes (Beaufort et al., 2011; Hassan et al., 2013a; Vanysacker et al., 2013).

Microscopie électronique à balayage

Cette technique d'observation est destructive, elle ne permet pas l'observation *in situ* du dépôt bactérien puisqu'elle requiert des étapes de fixation de l'échantillon vivant. Néanmoins, la microscopie SEM demeure employée pour comparer la morphologie de la surface d'un dépôt bactérien présent sur une membrane de filtration (Hassan et al., 2013a, 2013b; Hwang et al., 2012; Lee et al., 2013; Rosas et al., 2014; Vanysacker et al., 2013) mais elle représente surtout une technique de choix pour observer les structures des matériaux membranaires à l'état vierge.

Problématique

La production d'eau potable ou de fluide stérile emploie les procédés membranaires pour éliminer l'intégralité des microorganismes potentiellement pathogènes présents en suspension. Néanmoins, les capacités d'adaptation et de déformation des cellules vivantes sous l'action de contraintes environnementales semblent mettre en défaut les mécanismes de sélectivité basés sur la taille des particules puisque de nombreux travaux font état d'un transfert de bactéries à travers des filtres qui présentent des pores de dimensions inférieures à la plus petite dimension des cellules. Ce point particulièrement sensible amène les opérateurs à diminuer la taille de pore utilisée pour réaliser une filtration qui garantira l'absence de contamination dans la phase de perméat. C'est pourquoi, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes qui permettent et favorisent le transfert des bactéries par déformation à travers les pores d'une membrane filtrante afin d'apporter les connaissances scientifiques suffisantes qui permettront de limiter ce phénomène afin de garantir et sécuriser la sélectivité des procédés membranaires.

Afin d'observer le transfert de bactéries à travers une membrane, nous nous placerons dans le cas de la microfiltration à des tailles de pore similaire à celles préconisées pour la production d'un fluide stérile (0,22 µm), tailles de pore qui devront être inférieures aux dimensions des bactéries modèles sélectionnées. Il sera nécessaire de réaliser l'étape de filtration en condition stérile afin de pouvoir mesurer les concentrations bactériennes dans les différents compartiments (phase rétentat et phase perméat). Le dispositif de filtration devra également résister à des étapes de stérilisation en amont des expériences de filtration. La membrane sélectionnée devra posséder des caractéristiques intrinsèques spécifiques - reproductibles d'un échantillon à l'autre - afin d'assurer la pertinence de ce projet (taille de pore et géométrie calibrée, surface plane).

Ce projet ayant pour objectif premier d'évaluer l'influence de différentes variables opératoires appliquées aux procédés de filtration sur leur sélectivité, nous avons donc mis en place une démarche expérimentale pour répondre aux questions suivantes :

- Comment le transfert de bactéries déformables évolue t'il pendant une filtration membranaire ? Quels sont les effets des paramètres opératoires tels

que la pression transmembranaire ou la concentration de l'alimentation sur l'amplitude de ce transfert ?

- En présence de bactéries déformables, existe-t-il une corrélation entre sélectivité et productivité ? Quel est le rôle du colmatage sur le transfert ?
- Est-il possible de traduire le comportement collectif des cellules déformables à partir d'informations mesurées à l'échelle individuelle?
- Quel est l'effet d'une altération des propriétés pariétales des cellules bactériennes induites par une exposition à un agent chimique dans le fluide filtré sur l'amplitude et la dynamique du transfert par déformation ?

Concernant le dernier point, la présence dans l'eau de polluants organiques sous forme dissoute n'est plus à démontrer et constitue une problématique nouvelle pour les producteurs d'eau potable. Il apparait comme essentiel de chercher à déterminer si ces polluants (résidus pharmaceutiques, perturbateurs endocriniens, tensioactifs, dérivés chlorés, pesticides, HAP…) qui peuvent altérer la structure pariétale des microorganismes favorisent ou non leur rétention par une membrane filtrante, diminuant ainsi les capacités épuratrices des procédés de filtration.

Cette étude cherche à apporter des réponses aux questions posées dans le cadre de la filtration frontale de suspensions bactériennes, pour cela la démarche suivante a été envisagée :

- ✓ dans un premier temps, les caractéristiques des membranes sélectionnées ont été déterminées et les propriétés morphologiques des trois souches bactériennes modèles ont été mesurées,
- ✓ dans une seconde étape, le transfert de bactéries a été évalué au premier instant d'une filtration frontale – en l'absence de colmatage,
- ✓ enfin, dans une troisième partie, la sélectivité et la productivité de la filtration ont été suivies afin d'observer leurs évolutions sur des temps longs.

La gamme couverte pour les différents paramètres opératoires testés a été sélectionnée au regard des conditions rencontrées dans les applications industrielles et les variables seront étudiées une à une afin de quantifier leur influence respective.

Chapitre II Matériel et Méthodes

Introduction

Ce chapitre développe les outils scientifiques et les différentes méthodes expérimentales mis en œuvre pour évaluer le transfert de bactéries pendant une étape de microfiltration. Il sera segmenté en trois parties.

Premièrement, les microorganismes sélectionnés ainsi que les étapes de préparation des suspensions bactériennes destinées aux essais de caractérisation ou de filtration seront présentés. Ensuite, l'expérience de microfiltration frontale réalisée en condition stérile sera détaillée : les différents paramètres opératoires étudiés seront discutés et l'ensemble du montage expérimental de filtration sera exposé. Enfin, les différents outils analytiques utilisés dans ce projet feront l'objet d'une troisième partie. Les observations réalisées permettront d'une part de caractériser les membranes sélectionnées et d'autre part de déterminer les propriétés des cellules bactériennes sur une large gamme d'échelles d'observation (allant de l'observation des propriétés de cellules vivantes isolées jusqu'aux dépôts bactériens structurés colmatants).

Partie A. Fluide filtré - microorganismes modèles et mise en suspension

Les multiples choix effectués pour réaliser nos travaux se basent en partie sur la recommandation normalisée ASTM F838 pour le contrôle des filtres stérilisants. Le principe expérimental et les caractéristiques du pilote de filtration frontale utilisé rentrent dans le cadre défini par cette procédure internationale. L'une des principales différences appliquées à notre étude est le choix de la souche de référence sélectionnée qui ne sera pas *Brevundimonas diminuta* du fait de la très forte tendance de ce germe à traverser les pores de membranes isopores à cause ses très petites dimensions. En effet, cette souche possède un volume cellulaire proche de 0,08 μm^3 et est considérée de nos jours comme une ultramicrobactérie (cf. Chapitre I.A.4), limitant grandement la déformation qu'elle subit pour traverser une membrane de microfiltration et donc l'intérêt à lui porté dans le cadre de notre étude.

A.1. Discussion sur le choix des particules filtrées

Les microorganismes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ont été sélectionnés selon différents critères qui permettent d'assurer la pertinence du projet scientifique mais également en fonction des contraintes liées à l'utilisation de particules biologiques vivantes susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme. Premièrement, d'un point de vue expérimental, les souches doivent être facilement cultivables au laboratoire et dans des conditions de croissance peu exigeantes (organismes aérobies, hétérotrophes, mésophiles). Deuxièmement, les souches doivent présenter un risque infectieux relativement faible (classes 1 à 2), permettant leurs manipulations en conditions stériles sous des contraintes matérielles classiques (hôte à flux laminaire, gestion des déchets, protections individuelles). Ensuite, les trois modèles bactériens ont été choisis pour leurs différentes caractéristiques morphologiques qui présentent ainsi une variété relative de forme, de taille et de structure (Gram positif et négatif). Enfin, notre dernier critère de sélection s'appuie sur le choix de souches modèles utilisées comme indicateurs ou comme agents pathogènes étroitement surveillés lors de la production d'eau potable ou de fluides stériles par filtration membranaire. Les principales caractéristiques des trois souches modèles sont résumées dans la Figure II.1. Les souches sélectionnées proviennent de la Collection de l'Institut Pasteur et possèdent un numéro d'identification CIP.

La souche *Escherichia coli* est un microorganisme utilisé comme indicateur de contamination fécale et est impérativement recherché dans les eaux destinées à la

consommation humaine. Cette bactérie, de la famille des entérobactéries, est un modèle privilégié au laboratoire de par sa rapidité de culture (temps de génération 20-30 min) et un génome connu.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* est un agent pathogène qui joue un rôle important dans l'apparition d'infections dues à sa très haute résistance aux antiseptiques classiquement utilisés. Ce germe ubiquitaire privilégie les milieux humides ou aqueux (sols, plantes, végétaux) et peut se retrouver aisément dans les systèmes de ventilation et divers points d'eau.

La dernière souche *Staphylococcus aureus*, connue sous le nom de staphylocoque doré, est responsable d'infections de la peau et des muqueuses ou d'intoxications alimentaires. De la famille des bactéries à Gram positif, les cellules de *S. aureus* possèdent une forme sphérique en coque.

Caractéristiques	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
Référence CIP	54 127	103 467	53 154
Forme	bacille	bacille	coque
Gram	négatif	négatif	positif
Taille (µm)	2 x 1	1,6 x 0,8	0,8
Respiration	AAF	aérobie strict	AAF
Classe	1	1	2

Figure II.1 : Caractéristiques des trois microorganismes modèles sélectionnés.
Les bactéries aérobies strictes ne peuvent croitre qu'en présence de dioxygène alors que les bactéries aéro-anaérobies facultatives (AAF) peuvent vivre en absence ou en présence de dioxygène. (Source : Bergey's manual of systematic bacteriology).

L'étude de ces trois souches est d'autant plus importante qu'elles sont la cause d'un fléau de santé publique. En effet, d'après un rapport de l'Institut de la Veille Sanitaire (InVS)[2], ces trois microorganismes sont les plus impliqués dans les maladies nosocomiales, c'est à dire développées lors d'un séjour hospitalier, *Escherichia coli* est responsable de 26 % des germes isolés des infections nosocomiales traitées, S*taphylococcus aureus* 15 % et *Pseudomonas aeruginosa* 8 %. D'où l'importance d'élucider le comportement spécifique de ces modèles bactériens pendant une filtration.

[2] *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements hospitalisation à domicile – Résultats 2012 publiée par l'Institut de Veille Sanitaire Français*

A.2. Conservation et identification des souches

Les souches bactériennes utilisées comme modèles pour nos expériences sont issues de la collection de l'Institut Pasteur (CIP) et sont conservées à -80°C. Afin de faciliter la culture hebdomadaire des germes, des lots de travail sont réalisés par mise en suspension de quelques colonies présentes à la surface d'une gélose nutritive dans un bouillon Mueller Hinton contenant 10% de glycérol et sont ensuite stockées à -20°C. Après décongélation à température ambiante, les germes sont ensemencés sur gélose trypcase soja (TSA, Biomérieux) et placés en croissance à l'étuve à 37°C en condition aérobiose pendant 24h. Avant toute manipulation et mise en suspension, chaque germe est repiqué deux fois selon les recommandations de la norme NF EN 12353 puis l'identification de la souche est effectuée par la validation des caractères microscopiques et macroscopiques : forme des colonies, mobilité bactérienne et coloration de Gram.

A.3. Préparation des suspensions destinées à la filtration

Après 24h de culture, plusieurs colonies présentes en surface de la gélose TSA sont prélevées à l'aide d'une anse d'inoculation et sont suspendues dans de l'eau physiologique stérile (NaCl 9g/L). La concentration en bactéries dans cette suspension mère est contrôlée par mesure de la densité optique à 640 nm à l'aide d'un spectromètre UV (UviLight XTD 5, Secoman). Une suspension bactérienne à une concentration de 1 à 3.10^8 UFC/mL présente une valeur de lumière transmise à 640 nm de 70% (DO_{640} = 0,15).

La suspension mère à 10^8 UFC/mL sera utilisée pour la préparation de suspensions spécifiques destinées aux différentes filtrations. En effet, plusieurs concentrations en bactéries seront étudiées, c'est pourquoi des dilutions de raison 1/10 à partir de la suspension mère devront être réalisées afin d'obtenir une préparation de 2 L à la concentration souhaitée. Une fois ajustée (concentration bactérienne, ajout d'un agent chimique), la suspension destinée à être filtrée est agitée pendant 90 min. Cette durée, appelée temps de contact (noté τ dans ce manuscrit), est discutée en détails dans le paragraphe conditions opératoires.

A.4. Préparation des suspensions destinées à l'étude microscopique

Les échantillons de suspensions bactériennes destinés à l'analyse par AFM et TEM ne nécessitent qu'un faible volume (10 mL). Ce dernier est donc bien inférieur comparé au volume des suspensions destinées aux expériences de filtrations (2 L). Leurs préparations sont semblables et ne diffèrent que par l'ajout d'une étape de lavage de la

suspension mère à 10^8 UFC/mL, réalisée deux fois par centrifugation (4000 g pendant 10 min à 4°C) puis rinçage dans de l'eau physiologique. Cette étape est ajoutée ici afin d'observer des cellules propres, c'est à dire sans substance associée à leur culture (agar), sans que cela n'impacte les caractéristiques des populations bactériennes. Les différentes dilutions et ajout d'agent chimique sont effectués après cette étape de lavage. Le temps de contact τ (90 min) est respecté rigoureusement avant l'immobilisation et l'observation des cellules par AFM ou la fixation pour l'observation au TEM.

A.5. Impact d'un agent chimique : présence d'un antibiotique

A.5.1. Choix des antibiotiques

L'action d'un agent chimique sur le comportement en filtration d'une souche bactérienne est l'un des points centraux de notre problématique. Pour rappel, notre objectif n'est pas d'étudier le mode d'action d'un antibiotique mais de comprendre comment les caractéristiques morphologiques de la bactérie sont potentiellement altérées par la présence, à une faible concentration, d'un principe actif pouvant induire des perturbations sur la sélectivité et la productivité d'une microfiltration.

Nous avons donc sélectionné, au regard des souches bactériennes modèles, deux antibiotiques de la famille des bêta-lactames : l'Amoxicilline (Ref. Sigma-A8523) pour les souches *E. coli* et *S. aureus*, et la Ticarcilline (Ref. Sigma-T5639) pour la souche *P. aeruginosa*. Pour nos travaux, la famille des bêta-lactames a été distinguée puisque ce groupe de principes actifs a pour effet d'altérer la synthèse, la formation et l'arrangement de la couche de peptidoglycane présent dans la paroi des bactéries en perturbant l'action des transpeptidases (Greenwood, 1986). En exposant les bactéries à une concentration inférieure à la dose létale et pendant une courte période, la modification des propriétés morphologiques des cellules pourra alors être observée et caractérisée par analyses microscopiques mais aussi évaluée en termes de comportement en filtration. Le choix d'un deuxième antibiotique, pour la souche *P. aeruginosa* cultivée au laboratoire, s'explique par le fait que cette référence a démontré une résistance à l'Amoxicilline.

Afin de déterminer la concentration la plus juste à laquelle ces trois souches pouvaient être exposées dans les conditions opératoires d'une filtration, il a fallu réaliser une étude préliminaire permettant d'évaluer deux paramètres qui caractérisent la relation dose-réponse d'un antibiotique spécifique à chaque souche bactérienne: la concentration minimale inhibitrice de croissance (CMI) qui inhibe toute culture visible d'une souche

bactérienne après 18 h de culture à 37°C et la concentration minimale bactéricide (CMB) qui détruit plus de 99 % des bactéries présentes dans l'inoculum initial après 18 h de culture à 37°C.

A.5.2. Evaluation des CMI/CMB

Pour évaluer les valeurs de CMI/CMB pour les trois souches, un protocole adapté des recommandations de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)[3] a été utilisé afin de mieux correspondre aux conditions opératoires rencontrées pendant une expérience de filtration.

Le principe de cette mesure consiste à exposer la souche bactérienne à une concentration décroissante d'un antibiotique et d'en observer les conséquences sur les développements de colonies après une phase de croissance. Pour cela, le milieu de culture Mueller-Hinton (milieu MH) est employé car il est préconisé pour la réalisation d'antibiogramme standard. La première partie du protocole consiste à déposer 100 µL de milieu MH stérile dans l'intégralité d'une microplaque 96 puits. Ensuite, dans le premier puits et sur deux lignes, 100 µL de solution aqueuse de l'antibiotique (à la concentration 1mg/mL) sont déposés. Enfin, une série de dilutions de raison 2 est réalisée sur toute la ligne jusqu'au puits n°10. Les puits des colonnes n°11 et 12 correspondent respectivement au témoin négatif (contrôle de la stérilité du milieu) et au témoin positif (contrôle de la croissance du germe sans antibiotique). Cette microplaque est ensemencée mécaniquement à l'aide d'un ensemenceur multipoint à partir d'une suspension bactérienne contenant la souche d'intérêt à la concentration de 10^6 UFC/mL. Après 18 h d'incubation à 37 ± 2 °C en condition aérobiose, la valeur de la CMI peut être déterminée par observation de la microplaque et correspond à la plus petite concentration de l'antibiotique pour laquelle aucune croissance n'est visible (premier puits clair). Cette même microplaque est utilisée pour repiquer chacun de ces puits sur une gélose MH qui permet après 18 h d'incubation à 37 ± 2 °C en condition aérobiose, la lecture des CMB. La valeur de la CMB correspond alors à la plus petite concentration de l'antibiotique pour laquelle aucune croissance n'est visible (premier point d'ensemencement avec absence de colonies en surface de la gélose). Chaque microplaque contient un duplicata pour un couple souche/antibiotique (2 fois 4 lignes) et les valeurs de CMI/CMB mesurées pour chaque souche sont issues de la moyenne obtenue avec deux microplaques provenant de deux cultures indépendantes.

[3] *Comité de l'antibiogramme - Société Française de Microbiologie - Communiqué 2014*

Valeurs des CMI/CMB mesurées

Les concentrations obtenues expérimentalement au laboratoire sont présentées pour chacune des trois souches au contact d'un antibiotique dans la Figure II.2. Pour chaque couple souche/antibiotique, les valeurs de CMI/CMB mesurées ici correspondent bien aux gammes de concentration données par la littérature (Bouchillon et al., 2005; Brooks et al., 2001; Wendell H. Hall, 1980). Les valeurs des CMB sont toujours proches des CMI ce qui atteste du caractère bactéricide des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines. Néanmoins, à la concentration CMI/2 (concentration sélectionnée pour notre étude), les nombreux tests de viabilité effectués ont démontré l'absence de mortalité des cellules sur la durée des essais de filtration (environ 3h en suspension dans de l'eau physiologique).

Souche	Molécule	CMI	CMB
		µg/mL	
E. coli	Amoxicilline	2	4
P. aeruginosa	Ticarcilline	30	60
S. aureus	Amoxicilline	0,1	0,1

Figure II.2 : Valeurs des CMI/CMB mesurées pour les trois souches modèles en présence d'un antibiotique de la famille des bêta-lactamines.

Partie B. Essais de filtration membranaire

B.1. Choix des conditions opératoires

Le choix des différents paramètres appliqués à l'expérience de filtration frontale est l'une des étapes clés de ce projet. En effet, comme nous l'avons vu en introduction, c'est un ensemble de facteurs physiques, chimiques et biologiques qui gouverne les mécanismes de sélectivité d'une membrane vis-à-vis des microorganismes et plus spécifiquement des bactéries déformables. C'est pourquoi, nous avons choisi d'étudier les effets de plusieurs paramètres opératoires tels que la pression transmembranaire (PTM), la concentration de la suspension d'alimentation (Ca), la présence d'un agent chimique, tout en essayant de préserver les cellules vivantes qui composent notre échantillon.

En effet, il est important de souligner que les conditions opératoires employées pour nos expériences de filtration ne sont pas favorables, au sens strict, au développement d'une biomasse. En effet, l'utilisation d'une solution stérile de chlorure de sodium à une concentration physiologique (9 g/L) ne permet pas aux cellules vivantes de maintenir une croissance continue, ce qui nous contraint à utiliser la suspension sur un temps limité. C'est pourquoi, la manipulation des souches a demandé la mise en place d'un protocole reproductible et analogue pour la préparation des différentes suspensions destinées aux expériences de filtration ou de caractérisation. L'un des premiers paramètres opératoires fixés est donc le *temps* pendant lequel les bactéries seront en suspension dans l'eau physiologique en l'absence de nutriment. Avant l'étape de filtration, le temps de contact τ entre les cellules bactériennes et le milieu de filtration a été fixé à 90 min (sous une agitation modérée). Une fois en suspension, les bactéries s'adaptent à leur nouvel environnement (absence de substrat carboné, présence d'un agent chimique) et nous avons estimé que ce temps de contact était suffisamment long pour atteindre un état stationnaire à l'échelle d'une population de cellules (temps de génération inférieur à 30 min). De plus, cette durée d'exposition ne doit pas être trop longue (supérieure à 6h) afin de limiter les phénomènes de carence nutritive qui vont nécessairement impacter la morphologie et la viabilité des bactéries. Lorsque τ est atteint, les suspensions sont employées pour les expériences de filtration. Enfin, nous avons également limité le temps pendant lequel les préparations bactériennes pouvaient être manipulées et avons fixé τ max à 180 min dans le but de maintenir constante la concentration bactérienne de l'échantillon. Ces contraintes nous ont permis d'optimiser la production de suspensions bactériennes pures, stables et viables (à une concentration fixée, en présence ou non d'un antibiotique) sur la durée de nos expériences.

La gamme de concentration en bactéries des suspensions destinées aux expériences de filtration a été sélectionnée au regard des valeurs guides applicables à l'évaluation des filtres stérilisant et à la qualité microbiologique des eaux brutes destinés à la production d'eau potable (cf. Chapitre I, de 10^4 à 10^7 UFC/mL). La force motrice de notre expérience de filtration étant un gradient de pression transmembranaire imposé par l'application d'une pression à l'air comprimé sur le compartiment d'alimentation, le dispositif mis en œuvre au laboratoire permet uniquement la réalisation d'expériences de filtration à pression constante. La gamme de pressions transmembranaires imposées (PTM : 0,5 à 2 bar) a été choisie en fonction des pressions utilisées en micro et ultrafiltration.

B.2. Membrane sélectionnée

Nous avons sélectionné les membranes isopores comme modèles pour nos expériences de filtration car elles présentent des propriétés idéales pour notre étude (surface plane, matériau inerte, pores uniformes et cylindriques). Les deux tailles de pore étudiées (0,22 et 0,40 µm) permettent d'envisager une filtration stérilisante dans le cas où seul le mécanisme de sélectivité gouverné par la taille des particules est envisagé (les bactéries ont des dimensions supérieures aux diamètres des pores). Ces tailles de pore correspondent également aux standards internationaux préconisés pour réaliser une opération de filtration stérilisante (cf. Chapitre I).

Ces membranes (Nuclepore – Whatman) ont la spécificité d'avoir une porosité contrôlée puisque obtenue par bombardement ionique à la surface du matériau. Elles sont planes (44,5 mm de diamètre) et discoïdales (13,4 cm² de surface utile). Concernant la présence d'artefacts à la surface de la membrane tels que des doubles pores qui sont visibles sur les différentes images obtenues par microscopie, il convient de préciser que le procédé de fabrication des membranes isopores limite l'impact de ces doubles pores car ces derniers sont obtenus par un bombardement ionique qui traverse la membrane avec un angle d'incidence toujours différent. Ainsi, même si deux pores sont en contact ou se chevauchent coté rétentat, ils sont théoriquement débouchants de manière individuelle du côté perméat. L'utilisation de ces membranes pour nos expériences permet donc de s'affranchir *a priori* de paramètres secondaires, tels que la présence de défauts ou encore de pores anormalement gros, qui pourraient influencer la fuite de micro-organismes au cours de la filtration. Nous détaillerons dans le chapitre suivant les étapes permettant de contrôler l'intégrité des coupons de membranes qui ont été réalisées en amont des expériences de filtration.

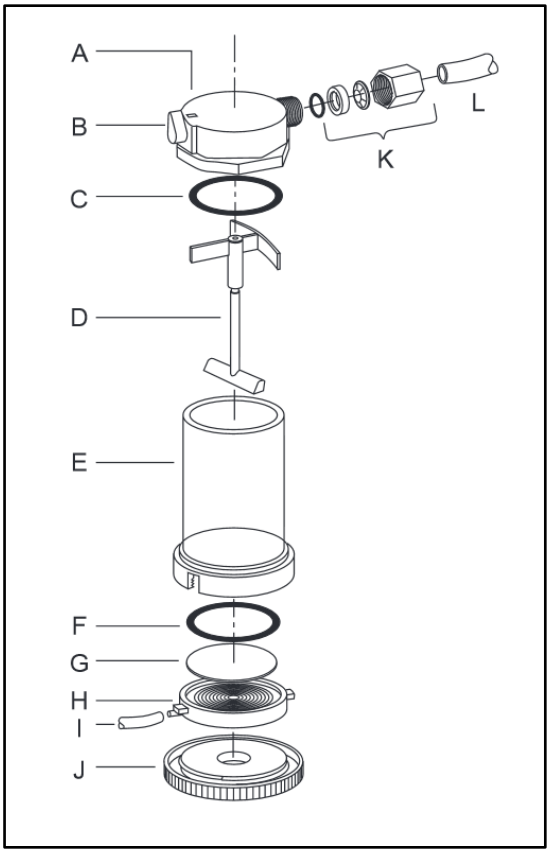


Figure II.3 : Schéma de la cellule de filtration Amicon 8050.
A : support supérieur de la cellule de filtration; B : valve de régulation de pression; C : joint torique; D : agitateur rotatif magnétique; E : corps de la cellule de filtration - *phase retentat*; F : joint torique; G : membrane de filtration; H : support à membrane; I : tube d'évacuation de la *phase perméat*; J : support inferieur de la cellule; K : raccords tubulaire; L : tube d'arrivée du fluide d'alimentation (adapté du guide d'utilisation Amicon®Millipore).

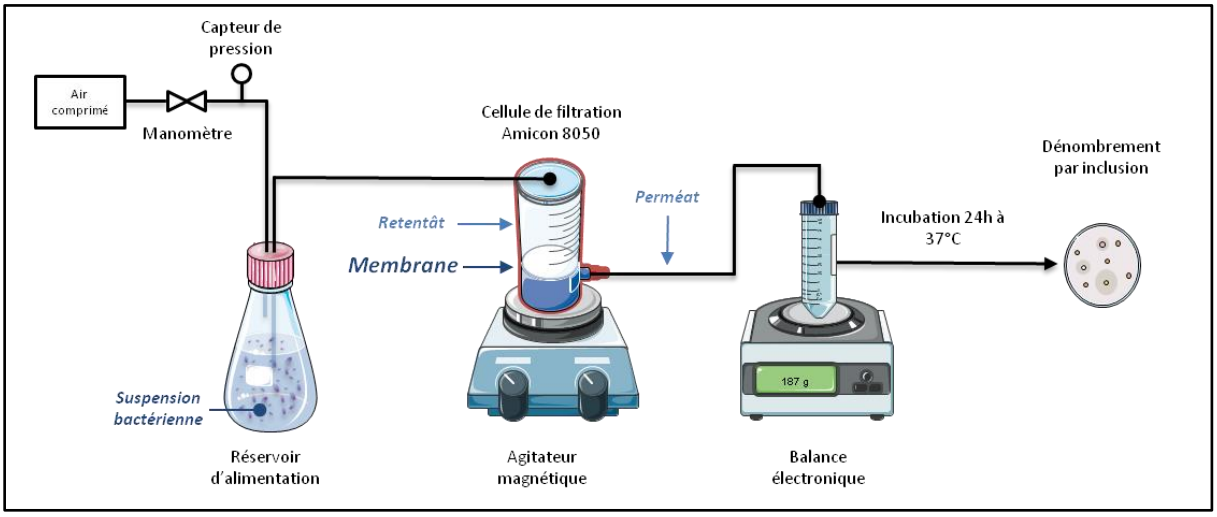


Figure II.4 : Schéma du montage expérimental de filtration frontale.

B.3. Dispositif et protocole

B.3.1. Cellule de filtration frontale

La cellule Amicon 8050 (Millipore) est utilisée pour réaliser une filtration sous pression d'une suspension bactérienne, sa structure est détaillée Figure II.3. Directement connectée au réservoir d'alimentation, elle permet une manipulation aisée grâce à sa taille réduite et résiste aux cycles de stérilisation (bain chloré et autoclavage à 120°C pendant 30 minutes). Le maintien de conditions aseptiques nous permettra d'assurer le fait que les concentrations bactériennes, même très faibles, mesurées dans les échantillons de perméat sont bien le résultat d'un transfert cellulaire à travers le matériau filtrant. Pouvant soutenir des pressions allant jusqu'à 5 bar, l'ensemble de la cellule Amicon est maintenu assemblé à l'aide d'une pièce de contrainte en métal.

B.3.2. Montage expérimental

Le dispositif expérimental de filtration (présenté Figure II.4) se divise en trois modules connectés : un réservoir d'alimentation pressurisé (Sartorius, 5L), la cellule de filtration frontale Amicon agitée (modèle 8050) et une cuve dédiée à la collecte du perméat. Ce montage présente l'avantage d'avoir une taille réduite ce qui permet une désinfection aisée de l'ensemble des compartiments avant chaque expérience mais aussi une manipulation sous un poste de sécurité microbiologique afin d'éviter la contamination du système par les microorganismes environnants. Toutes les expériences sont réalisées à température ambiante. La gamme de pression transmembranaire imposée (PTM : 0,5 à 2 bar) est régulée à l'aide d'un couple manomètre/régulateur de pression présent en entrée du système. La vitesse d'agitation dans la cellule de filtration est maintenue à 300 tr/min à l'aide d'un agitateur magnétique (Heidolph MR 3000 D). Afin de suivre l'évolution du flux de perméat au cours de la filtration, le volume de fluide filtré est évalué à pas de temps régulier par pesée à l'aide d'une balance électronique (AdventurerOhaus, ± 0,01 g).

B.3.3. Stérilisation de l'ensemble des compartiments

La cellule de filtration frontale contient la membrane (cf. Figure II.3) qui a été désinfectée au préalable par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 200 ppm de Cl_2 pendant 20 minutes puis rincée à l'eau distillée. Pour chaque essai de filtration, une membrane neuve est utilisée afin d'éviter les contaminations croisées. L'ensemble du dispositif expérimental est stérilisé par cycle d'autoclavage, la cellule de

filtration quant à elle est désinfectée par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1000 ppm de Cl_2 pendant 30 minutes avant toute manipulation.

B.3.4. Filtration

Chaque expérience de filtration est réalisée en deux étapes mais l'intégralité des manipulations autour des coupons de membranes est réalisée en conditions stériles sous une hôte à flux laminaire. Premièrement, une étape de compactage de la membrane est effectuée. Pour cela, de l'eau distillée est filtrée à travers la membrane à une pression transmembranaire de 2 bar. Cette étape de compactage a pour objectif de stabiliser la structure de la membrane et s'achève lorsque le flux d'eau pure à travers la membrane est constant. Ensuite, la perméabilité hydraulique de la membrane est évaluée. Dans un second temps, la suspension bactérienne est filtrée à la pression transmembranaire sélectionnée. Des échantillons de perméat et de rétentat sont prélevés séquentiellement au cours et en fin de filtration pour quantifier la concentration des cellules bactériennes en présence.

Partie C. Méthodes analytiques

C.1. Pour la caractérisation des membranes modèles

C.1.1. Porométrie et distribution de tailles de pore

La distribution de tailles de pore des membranes a été mesurée à l'aide du Poromètre PRM-8710 développé par l'Institut de la Filtration et des Techniques Séparatives (IFTS) présent sur le site de Foulayronnes[4]. Employé dans la configuration du poromètre gaz(air)-liquide : l'utilisation d'un liquide fluorocarboné (Réf : FC 43, Fluorinert liquid - 3M) à faible tension interfaciale (0,016 N/m) permet de mettre en évidence des pores de très petites tailles, allant jusqu'à 2 nm tout en utilisant des pressions transmembranaires inférieures à 10 bar. Tout d'abord, la membrane est introduite dans la chambre de mesure puis elle est mouillée avec le liquide fluorocarboné. La face rétentat est placée en contact avec de l'air pressurisé alors que la face perméat reste en contact avec le liquide. Puis, la pression appliquée coté gaz est augmentée graduellement. Les résultats obtenus expriment une variation du débit d'air mesurée en fonction de la pression appliquée et permettent de calculer la distribution de tailles de pore de la membrane par l'application de l'équation de Laplace-Young (cf. Chapitre III).

C.1.2. Porosité par analyse d'image

Les images des surfaces de membranes vierges, obtenues par SEM, ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ. Les nuances de gris sont alors fragmentées à l'aide de la fonction "threshold" qui est utilisée afin de séparer les pixels d'intérêts (représentant les pores) du reste de l'image (la membrane). La porosité de surface est alors déterminée par le calcul du rapport entre la surface occupée par les pores et la surface totale de l'image.

C.2. Pour la caractérisation de la suspension filtrée

C.2.1. Evaluation de la concentration en bactéries : dénombrement en milieu solide

Afin de déterminer la concentration en bactéries présentes en suspension dans les différents échantillons (suspension d'alimentation, phase rétentat et phase perméat) prélevés lors des expériences de microfiltration, la technique d'ensemencement par inclusion est adoptée : 1 mL de suspension est dispersé dans une boite de pétri, puis recouvert de milieu gélosé TSA en surfusion que l'on laisse refroidir après

[4] *Institut de la Filtration et des Techniques Séparatives (IFTS) - Rue Marcel Pagnol, 47510 Foulayronnes, France*

homogénéisation. On dénombre alors avec précision le nombre d'Unités Formant Colonie (UFC) présent dans 1 mL d'échantillon dilué ou non. En faisant l'hypothèse qu'une colonie une fois observable à l'œil nu provient d'une cellule unique présente en suspension avant la mise en culture (1 UFC = 1 bactérie avant croissance), la concentration bactérienne N en UFC/mL pour chaque suspension est obtenue d'après le calcul suivant :

$$N = \frac{\sum C}{(V \times 1{,}1d)}$$

avec ∑C la somme des colonies comptées pour les deux dilutions retenues, V le volume de l'inoculum (1mL), d la moins concentrée des deux dilutions choisies. Les dilutions retenues pour l'étape de comptage sont les boites de culture où le nombre de colonies est compris entre 30 et 300.

C.2.2. Diffraction dynamique de la lumière

Cette technique couramment appelée diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering), est une méthode permettant de déterminer la dispersion de tailles d'une population de particules en suspension grâce au principe de variations aléatoires d'intensité de la lumière diffusée. La lumière de la source lumineuse (laser HeNe) éclaire l'échantillon et le signal lumineux diffusé est collecté à l'aide d'un détecteur. Les variations d'intensité du laser engendrées par les mouvements browniens des particules, en fonction du temps sont mesurées et corrélées à leur taille par la relation de Stokes-Einstein :

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

qui relie le coefficient de diffusion mesurée par DLS et la taille des particules, avec D_h le diamètre hydrodynamique des particules, D_t le coefficient de diffusion transversal, k_B la constante de Boltzmann, T la température et η la viscosité dynamique de la dispersion. Le diamètre hydrodynamique D_h correspond au diamètre d'une sphère qui possède un coefficient de diffusion équivalent à celui de la particule analysée, en tenant compte de sa couche d'hydratation. Pour une particule non sphérique, le diamètre mesuré est alors, en fonction de sa forme, soit supérieure ou inférieure aux dimensions réelles de l'objet. Lors de nos expérimentations nous avons utilisé le modèle Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument). Après la préparation des suspensions bactériennes, les échantillons (1 mL) sont introduits dans une cuve afin d'être placés dans le Zetasizer à une température contrôlée de 22°C. La distribution de tailles obtenue résulte de la moyenne de trois mesures sur une condition expérimentale donnée.

C.3. Pour la caractérisation morphologique et nanomécanique des cellules bactériennes

C.3.1. Observation par Microscopie Electronique à Transmission

Les images TEM sont réalisées avec le microscope électronique à transmission JEM-1400 (Joel) disponible à la plateforme de Microscopie électronique intégrative (METi) de la Fédération de recherche en biologie de Toulouse (FRBT)[5].

a. Protocole de fixation de l'échantillon et de coloration

Une goutte de suspension bactérienne (20 µl) destinée à l'observation microscopique (cf. paragraphe II.A.4) de concentration 10^7 UFC/mL est absorbée sur une grille carbonée Formvar pendant 2 min. La suspension bactérienne est colorée négativement avec une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à 1% pendant 1 min. Les grilles sont ensuite observées avec un microscope électronique à transmission (Jeol JEM-1400) à une puissance de 80 kV. Les images sont réalisées à l'aide d'une caméra digitale (Gatan Orius) à des grossissements de 3000 et 8000 X.

b. Mesure des dimensions des cellules bactériennes

La mesure de la distribution des tailles des bactéries en suspension est réalisée à partir des images obtenues par TEM grâce au logiciel d'analyse ImageJ. Pour chacune des trois souches et pour les différentes conditions chimiques étudiées, un minimum de 30 cellules est mesuré par échantillon selon deux paramètres : la longueur et la largeur de la cellule observée en deux dimensions.

C.3.2. Observation par Microscopie à Force Atomique

Les images et analyses AFM sont réalisées grâce aux modes contact ou Force Volume proposés par l'AFM Nanowizard II (JPK Instruments) disponible à la plateforme BioNanoTechnologies de l'Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant (ITAV)[6].

a. Immobilisation des échantillons

L'étape d'immobilisation des bactéries est un point crucial lors des observations AFM comme détaillé dans le chapitre I. Pour cela, deux stratégies différentes d'immobilisation

[5] *Plateforme de Microscopie électronique intégrative (METi), FRBT CNRS FR3451 - Bat. IBCG, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France*
[6] *Plateforme de Microscopie à Force Atomique, ITAV USR3505 - 1 Place Pierre Potier, 31106 Toulouse, France*

de l'échantillon vivant ont été employées afin de pouvoir observer les cellules de manière individuelle. Du fait des différentes propriétés morphologiques et structurales des trois souches modèles étudiées, une immobilisation chimique a été envisagée pour les deux souches à la forme de bacille (*E. coli* et *P. aeruginosa*), alors qu'une immobilisation physique a été utilisée pour la souche en forme de coque (*S. aureus*). L'ensemble des techniques employées pour l'immobilisation des trois souches est schématisé Figure II.5.

Immobilisation électrostatique

Les cellules bactériennes des suspensions de *E. coli* et *P. aeruginosa* ont été immobilisées à l'aide de PolyEthylenImine (PEI, Fluka P3142), polymère chargé positivement. La préparation des lames de verre qui constituent le support rigide pour l'immobilisation des cellules, issue de précédents travaux (Formosa et al., 2012a; Jauvert et al., 2014), suit un protocole en plusieurs étapes. Tout d'abord, les lames de verre sont nettoyées et activées par une oxydation forte sous un flux de plasma à dioxygène, puis 500 µL de PEI 0,2% (dilué dans de l'eau déminéralisée) sont déposés au centre de la lame. Après 12h d'incubation dans une boite fermée hermétiquement, les lames de verre sont rincées avec 10 mL d'eau Milli-Q et enfin séchées à l'azote. Un volume de 1 mL de suspension bactérienne destinée à l'observation microscopique (cf. paragraphe II.A.4) est déposé sur la zone recouverte de PEI au centre de la lame. L'acquisition par AFM, en milieu liquide dans de l'eau physiologique (NaCl 9 g/L) est possible après 20 min de contact entre la suspension et le PEI garantissant une bonne immobilisation des cellules.

Immobilisation physique

L'immobilisation physique des cellules dans des cavités présentes à la surface d'un timbre en PDMS a été appliquée à notre étude expérimentale. Cette méthodologie proposée par Dague et al. (Dague et al., 2011) a été adaptée ici pour la première fois sur des cellules bactériennes à la forme de coque (la souche *S. aureus*). La préparation des timbres en PDMS se compose de trois étapes distinctes : (1) la fabrication d'un moule en silicone, (2) la préparation des timbres en PDMS, et enfin (3) l'immobilisation des cellules vivantes à l'intérieur des microstructures présentes à la surface du timbre. La première étape de design et de fabrication du moule a été réalisée en amont de ce projet doctoral par l'équipe NanoBioSystèmes du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du CNRS (Formosa et al., 2015). Dans ce chapitre, seules les étapes de préparation (2) et (3) seront décrites.

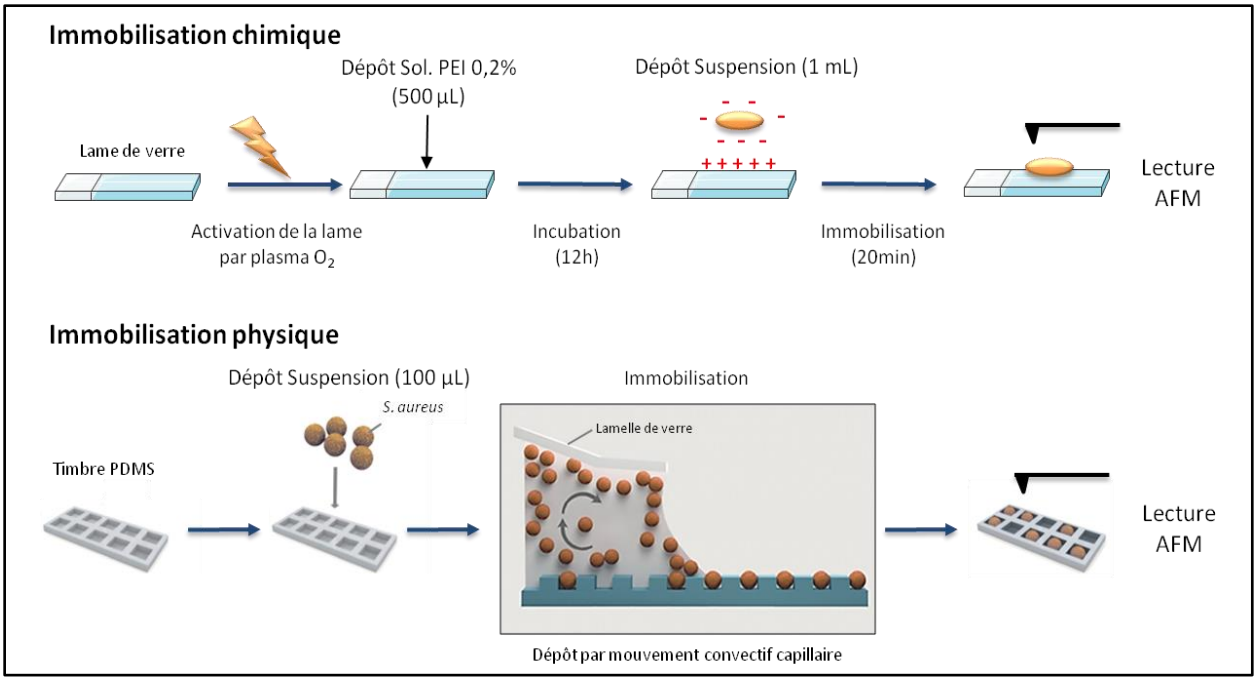


Figure II.5: Représentation schématique des deux méthodes d'immobilisation des cellules vivantes employées pour l'observation AFM (adapté de Formosa et al., 2015).

a. Préparation des timbres PDMS

La solution de PDMS est préparée selon un ratio de masse 10 :1 entre l'oligomère de PDMS et l'agent réticulant (Sylgart, kit 184). Cette préparation est dégazée à l'aide d'une cloche à vide avant d'être coulée sur le moule en silicone. Si des bulles persistent dans le gel de PDMS déposé, une nouvelle session de dégazage peut être réalisée. Enfin, l'étape de polymérisation s'effectue dans une étuve à 80°C pendant 1 h. Les timbres sont découpés individuellement avant chaque manipulation à l'aide d'un scalpel de précision.

b. Immobilisation des cellules dans les timbres PDMS

Une fois découpé, le timbre PDMS est placé sur une lame de verre propre. Un volume de 100 µL de suspension bactérienne destinée à l'observation microscopique est déposé à la surface du timbre. Les cellules vivantes sont ensuite piégées dans les microcavités présentes à la surface du timbre PDMS grâce au mouvement convectif capillaire créé manuellement à l'aide d'une lamelle de verre qui entraine la suspension bactérienne. Réitéré plusieurs fois, ce mouvement permet à un grande nombre de cellules de rencontrer une microcavité afin d'être piégé physiquement à l'intérieur d'un puits. L'acquisition par AFM, en milieu liquide dans de l'eau physiologique (NaCl 9 g/L) peut ensuite être réalisée.

c. *Acquisitions et traitement*

Les acquisitions sont réalisées sur cellules vivantes, en milieu liquide et à température ambiante avec des pointes MLCT AUHW (Bruker) qui possèdent une constante théorique de raideur faible voisine de 0,01 N/m. Avant chaque expérience, la calibration de la pointe AFM en milieu liquide (eau physiologique : NaCl 9 g/L) est réalisée par mesure de la constante de raideur et de la sensibilité. Pour le mode Force Volume, les courbes de forces sont obtenues pour une force d'appui de 0,5 nN sur des surfaces de 200 µm de côté avec une résolution de 1024 (32x32) courbes. Les acquisitions sur cellules vivantes sont systématiquement effectuées sur une durée d'un maximum de 90 minutes par préparation afin de correspondre aux temps caractéristiques des filtrations réalisées au laboratoire.

Le traitement des données est exécuté grâce au logiciel JPK Data Processing (JPK Instruments). Concernant l'extraction des données nanomécaniques des courbes obtenues avec le mode Force Volume, le modèle de Hertz est employé car il permet de déterminer la valeur de module de Young de la surface analysée. En effet, le modèle de Hertz décrit l'évolution de la force d'appui F grâce à la relation suivante :

$$F = \frac{2.E.tan\ \alpha}{\pi(1-\upsilon^2)}\delta^2$$

avec F la force d'appui (pN), E le module de Young (kPa), v le ratio de poisson (arbitrairement choisi à 0,5), α l'angle d'ouverture de la pointe (18°), δ l'indentation (en nm) mesurée expérimentalement. Ainsi, chacune des 1024 courbes de force obtenues en mode Force Volume est analysée à l'aide du modèle de Hetz afin de générer l'histogramme de distribution des modules de Young mesurés pour une surface carrée de 200 µm de côté de membrane bactérienne. Cette distribution est ensuite traduite sous la forme d'une courbe de Gauss afin d'obtenir une valeur moyenne du module de Young (E) et son écart type. Pour chacune des trois souches et pour les différentes conditions chimiques étudiées, la cartographie de l'élasticité de la membrane bactérienne est réalisée sur un total de 9 cellules provenant de trois suspensions différentes issues de trois cultures indépendantes.

C.4. Pour la caractérisation du dépôt de particules à la surface de la membrane

C.4.1. Observation par Microscopie Electronique à Balayage

Les images SEM ont été réalisées avec le microscope électronique à balayage ESEM Quanta 250 FEG (FEI) disponible à la plateforme de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie (CMEAB) de la Faculté de Toulouse[7].

Au préalable, la préparation des échantillons de membranes se déroule selon différentes étapes nécessaires à la fixation, à la déshydratation et à la métallisation des cellules bactériennes présentes à la surface du filtre.

Le coupon de membrane obtenu après une expérience de filtration (cf. paragraphe II.B.3.4.) est immergé, pendant 24 h, dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% qui induit une réticulation intermoléculaire des protéines qui composent les cellules bactériennes. L'échantillon de membrane est ensuite déshydraté par expositions successives à des bains d'alcool de concentrations croissantes (30°, 50°, 70°, 95°, 100°). L'étape de dessiccation de l'échantillon est réalisée par un passage au point critique (Emscope, CPD 750). Enfin, la dernière étape consiste à recouvrir la surface de membrane par une fine couche de métal qui rend l'échantillon conducteur. Cette étape de métallisation est accomplie avec de l'Or-Palladium pendant 3 minutes (Jeol, JFC71100). Les observations et l'acquisition des images sont effectuées directement à l'aide du logiciel constructeur (FEI).

C.4.2. Observation par Microscopie Confocale à Balayage Laser

Les images CLSM sont réalisées avec le microscope confocal à balayage laser TCS SP2 (Leica) disponible à la plateforme d'imagerie de la Fédération de Recherche Agrobiosciences, Interactions & Biodiversité (FRAIB) de l'INRA d'Auzeville[8].

Les observations par CLSM sont réalisées sur des coupons de membranes à l'état frais, c'est à dire sans aucune étape d'immobilisation ou de fixation du dépôt bactérien présent à la surface de la membrane. Un fragment de membrane (environ 1,5 cm^2) est découpé soigneusement à l'aide d'un instrument stérile pour être déposé au fond d'un puits présent dans une microplaque 6 puits. Afin de maintenir le fragment de membrane

[7] *Centre de microscopie électronique appliquée à la biologie (CMEAB) - Faculté de Médecine Rangueil, 133 route de Narbonne F-31062 Toulouse, France*
[8] *Fédération de Recherche « Agrobiosciences, Interactions & Biodiversité » (FRAIB) FR3450 - Campus INRA, 24 Chemin de borde rouge, BP 42617 Auzeville - 31326 Castanet Tolosan, France*

immobile pendant l'observation microscopique, le fond du puits est couvert au préalable de ruban adhésif double face étanche. En effet, une fois le coupon installé, il est immergé dans 5 mL d'eau physiologique afin de maintenir l'échantillon hydraté. Le marquage fluorescent des cellules bactériennes qui composent le dépôt présent à la surface du filtre est ensuite effectué à l'aide du Syto 9 (Invitrogen), fluorochrome qui colore les acides nucléiques en présence. Le Syto 9 est utilisé à une concentration de 1.10^{-7} mol.L^{-1}, chaque fragment de membrane est incubé 15 min dans l'obscurité en présence du marqueur avant d'être rincé deux fois avec de l'eau physiologique. La longueur d'onde utilisée pour l'excitation du Syto 9 est de 488 nm. La fluorescence émise est collectée entre 498 nm et 533 nm. L'ensemble des observations a été réalisé avec l'objectif X 40 (avec un zoom numérique x4) et avec des sections sur l'axe z distantes de 0,5 µm. Les images sont réalisées à la surface du filtre pour une surface carrée de 93,5 µm de côté.

Les images obtenues par CLSM ont été traitées à l'aide du logiciel d'analyse ImageJ. Les reconstructions 3D des dépôts bactériens ont été produites grâce au logiciel Volocity (Improvision).

C.4.3. Dosage des composés extracellulaires

Le dosage des EPS présents à la surface de la membrane isopore au sein du dépôt bactérien formé après une étape de microfiltration a été réalisé au sein du LBAE[9]. Le protocole utilisé est composé de deux étapes séquencées (Simon et al., 2009): une première phase d'extraction qui consiste à détacher et isoler les EPS présents dans le dépôt bactérien, suivie d'une phase d'analyse par chromatographie d'exclusion stérique qui permet de déterminer la composition relative et d'identifier les molécules en présence. Le protocole mis en œuvre est adapté depuis la littérature (Bourven et al., 2012; Ras et al., 2011).

a. Extraction

Afin de détacher le dépôt de bactéries présent à la surface de la membrane isopore, des sections sont découpées en condition stérile à l'aide d'instruments propres pour être placées ensuite dans un tube. L'échantillon de membrane est immergé dans un volume fixe de tampon PBS (2 mL). Le mélange est agité pendant 1 min à l'aide d'un vortex afin de resuspendre dans le milieu les bactéries déposées sur la membrane. La totalité du volume (2 mL) est ensuite prélevée pour être centrifugée pendant 10 min à 3000 g, le

[9] *Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE) - IUT A Paul Sabatier site d'Auch, 24, rue d'Embaquès, 32000 Auch, France*

surnageant est éliminé. Le culot de cellules est suspendu dans 1 mL de tampon PBS puis la suspension est soumise à des ultrasons (20 kHz) pour 5 cycles de 30 sec dans le but de lessiver les bactéries sans pour autant entrainer la lyse des cellules. Enfin, la suspension subit une dernière étape de centrifugation pendant 10 min à 5000 g, étape qui permet de fractionner les cellules (culot) du milieu (surnageant) qui contient les EPS. Alors, le surnageant est prélevé pour l'analyse chromatographique.

b. Analyse par Chromatographie d'exclusion stérique

L'appareillage utilisé pour réaliser la chromatographie est un Acta purifier 10 (GE Healthcare) couplé à deux détecteurs en série (UV-visible et fluorescence) afin d'affiner l'identification des molécules détectées. Sur cet appareil, la colonne du chromatographe est en réalité l'assemblage de deux colonnes de filtration sur gel Superdex 75 et Superdex 200 (GE Healthcare). La première colonne Superdex 200 permet de séparer les molécules de poids moléculaires comprises entre 5000 et 1 000 000 Da. Dans cette première colonne, la phase mobile est du tampon PBS circulant à 0,75 $mL.min^{-1}$. La seconde colonne Superdex 75 GL permet, ensuite, de séparer les molécules de poids moléculaires plus petites comprises entre 1000 et 200 000 Da. Dans cette seconde colonne, la phase mobile est du tampon PBS circulant à 0,4 $mL.min^{-1}$. En entrée, un volume de 500 µL du surnageant, obtenu grâce au protocole d'extraction, est injecté dans le système.

Protéine	Masse moléculaire (Da)
Thyroglobuline	669000
Ferritine	440000
Conalbumine	75000
Carbonic anhydrase	29000
Ribonucléase A	13700
Thyrotropine	362

Figure II.6: Protéines étalons utilisées pour la calibration de deux colonnes en série Superdex 75 et Superdex 200.

Les molécules éluées sont révélées en sortie de colonnes grâce aux UV à deux longueurs d'onde (210 et 280 nm) mais aussi par fluorescence avec le couple d'excitation/émission fixé à 221 / 350 nm utilisé pour la détection des protéines en sortie de chromatographie. La détermination des poids moléculaires des entités séparées est effectuée par comparaison avec une droite de calibration établie avec des protéines étalons de tailles connues (cf. Figure II.6). La courbe de calibration alors obtenue (log (MM) = -0,1714.Ve + 8,9857) permet de relier le poids moléculaire (en Da) au volume d'élution (en ml) pour les molécules détectées à 280 nm. Les profils de chromatographie sont enregistrés et analysés à l'aide du logiciel Unicorn 5.1 (GE Healthcare).

Conclusion

Ce chapitre décrit le matériel et les méthodes nécessaires à l'étude des mécanismes de transfert des bactéries à travers les pores d'une membrane de filtration. Ainsi, en plus des techniques classiquement employées en microbiologie et génie des procédés membranaires, cette étude a nécessité la mise en œuvre des techniques destinées à l'observation des cellules biologiques à différentes échelles afin d'analyser leurs propriétés morphologiques.

Chapitre III Caractérisation des membranes modèles et des suspensions bactériennes

Introduction

L'étude des mécanismes de transfert mis en jeu au cours d'une filtration requiert la maitrise des conditions opératoires appliquées mais, également, une caractérisation fine des différentes fractions qui composent le fluide à traiter (liquide/solide), ainsi qu'une bonne connaissance du matériau filtrant. Ce chapitre s'intéresse donc d'une part à la description des membranes sélectionnées et, d'autre part aux caractéristiques morphologiques des particules biologiques présentes en suspension.

Dans une première partie, les caractéristiques structurales des membranes isopores seront présentées, leur perméabilité et leur distribution de tailles de pore seront déterminées. Dans une deuxième partie, les trois souches de microorganismes sélectionnés seront étudiées à différentes échelles afin d'analyser la forme, la taille et la rigidité des cellules bactériennes. Puisque la composition physico-chimique du fluide à traiter est susceptible d'influencer la morphologie et la viabilité des cellules en suspension, le milieu dispersant témoin sélectionné pour nos travaux est constitué d'une solution de chlorure de sodium dans de l'eau ultra pure à une concentration de 9 g/L qui permet d'assurer le maintien des cellules vivantes en condition physiologique iso-osmotique. Les effets d'une exposition à un antibiotique sur les bactéries modèles seront également évalués à l'aide des différentes techniques d'observation mises en œuvre pour la caractérisation des suspensions bactériennes.

Partie A. Etude des membranes isopores

Afin d'étudier les mécanismes de transfert des bactéries à travers les pores d'une membrane à l'échelle submicronique, nous avons sélectionné les membranes isopores comme modèle pour nos travaux. Ces membranes possèdent de nombreuses caractéristiques qui en font un outil de choix vis-à-vis de notre problématique (Apel, 2001; Tung and Chuang, 2002):

- ✓ Taille de pore calibrée
- ✓ Pores uniformes, cylindriques et de même longueur
- ✓ Surface plane

Grâce à ces propriétés uniques, les membranes isopores sont utilisées depuis de nombreuses années pour l'étude des phénomènes de transport d'une grande variété de particules au cours d'une filtration: des bactérie (Delebecque et al., 2006; Suchecka et al., 2003; Xu and Chellam, 2005) ou de virus (Urase et al., 1996) mais aussi de particules artificielles (Long et al., 1981; Patil et al., 2013), de protéines (Tracey and Davis, 1994), d'ions (Grzywna et al., 1996)... Néanmoins, différents travaux soulignent l'impact des irrégularités comme les variances de formes des pores, l'existence de pores multiples ou encore d'une distribution de tailles de pore (répartition autour d'une valeur moyenne): ces défauts peuvent altérer la perméabilité hydraulique de la membrane mais aussi la sélectivité du procédé (Kim and Stevens, 1997; Kim et al., 1994; Pandey et al., 2001; Urase et al., 1996). La géométrie (morphologie et orientation) des pores des membranes isopores est étroitement dépendante des conditions de fabrication ("etching conditions"), notamment de la direction de l'angle d'incidence utilisée lors de la phase d'irradiation (Yamazaki et al., 1996). Afin d'éviter l'utilisation de membranes avec des défauts potentiels, deux étapes de contrôle d'intégrité non destructif ont donc été ajoutées à notre protocole en amont de l'expérience de filtration. De plus, les caractéristiques telles que la porosité et la distribution des tailles de pore des membranes sélectionnées pour notre étude ont été déterminées.

A.1. Contrôle de l'intégrité des membranes modèles (point de bulle et perméabilité)

Avant l'étape de filtration de la suspension bactérienne, l'utilisation des membranes isopores a été, pour chaque expérience, validée grâce à deux tests d'intégrité successifs.

L'écart avec la perméabilité hydraulique de référence et le test de point de bulle sont deux examens non destructifs qui ont été préférés et ajoutés au protocole expérimental de filtration car ils n'altèrent pas les propriétés morphologiques et mécaniques de la membrane.

Dans un premier temps et après une étape de compactage, un test de point de bulle est effectué sur la membrane. Ce test permet d'évaluer la taille du plus gros pore présent sur la membrane. Pour cela, la membrane est mouillée avec de l'eau ultrapure puis la face rétentat est placée en contact avec de l'air pressurisé alors que la face perméat reste en contact avec de l'eau pure. Graduellement, la pression appliquée est augmentée jusqu'à l'apparition des premières bulles dans la phase perméat déterminant alors la pression de point de bulle de la membrane. Cette valeur caractéristique correspond donc à la pression minimale nécessaire pour pousser le fluide présent à l'intérieur des pores. Afin de décrire ce phénomène, on utilise l'équation de Laplace-Young (Eq III.1) qui caractérise l'équilibre gaz-liquide confiné dans un pore cylindrique :

$$P_b = \frac{4.k.\gamma.\cos\theta}{D_{\max}} \qquad \text{Eq III.1}$$

avec P_b la pression de point de bulle (Pa), D_{max} le diamètre maximal des pores de la membrane (m), k le facteur de correction fonction de la forme des pores, γ la tension de surface du liquide (N/m, ici γ= 0,00728 N/m pour de l'eau pure à 20°C) et cos Θ l'angle de contact entre le liquide (eau) et la surface (polycarbonate) avec ici Θ= 83° (Singh et al., 2015).

Pour satisfaire ce test, la pression de point bulle mesurée sur notre coupon doit être égale ou légèrement supérieure à la valeur théorique calculée d'après l'équation III.1 à partir du diamètre de pore annoncé par le fabricant. Pour les membranes isopores en polycarbonate utilisées pour nos travaux, les pressions de point bulle à respecter sont respectivement de 1,5 bar pour les membranes de rayon de pores 0,4 µm et 2,7 bar pour les membranes de 0,22 µm. Si, pour chaque membrane utilisée, la pression de point bulle mesurée satisfait ce test d'intégrité, le coupon est jugé comme intègre et d'une qualité satisfaisante pour être utilisé dans nos expériences de filtrations bactériennes.

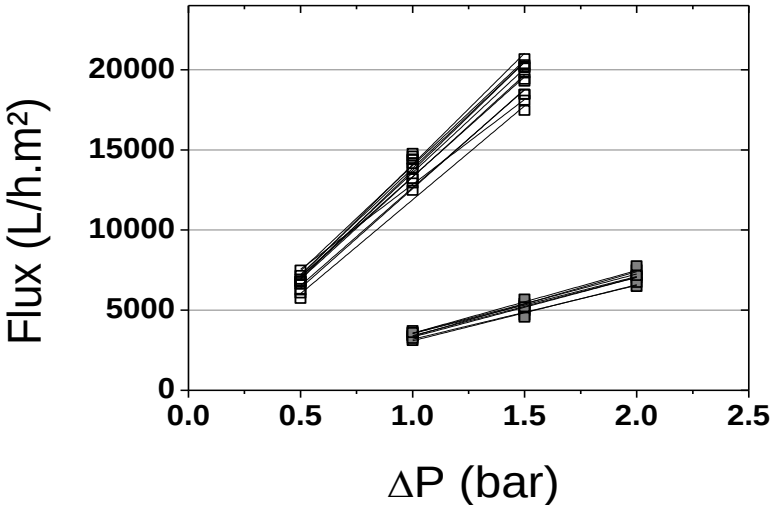


Figure III.1: Mesure de la perméabilité des membranes isopores de 0,22 µm (symboles gris) et de 0,4 µm (symboles blanc).

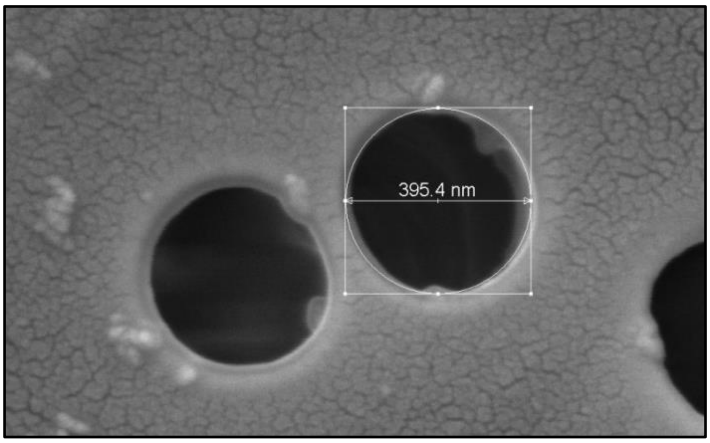


Figure III.2: Observation par SEM de la surface d'une membrane isopore neuve de taille de pore 0,4 µm (X 85 000).

A l'inverse, lorsque la pression de point bulle mesurée est inférieure à la valeur de référence sur deux mesures successives, le coupon est écarté.

La perméabilité hydraulique des membranes isopores est, dans la seconde étape de contrôle, mesurée selon une procédure classique de mesure de flux à l'eau pure sur une gamme de pressions croissantes. La Figure III.1 présente les résultats obtenus pour les membranes isopores de 0,22 et 0,4 µm, et témoigne de l'évolution des vitesses de perméation en fonction des trois pressions transmembranaires exercées. Dans ces conditions, en régime laminaire, la loi de Darcy (cf. Eq I.1) permet de décrire la pente de ces courbes qui correspond à la perméabilité hydraulique de la membrane étudiée.

Réalisée sur un grand nombre de coupons (n>30), cette mesure nous a permis de définir une perméabilité hydraulique moyenne pour chacune des tailles de pore sélectionnées qui sont : 3 300 L/h.m².bar pour les membranes isopores de 0,22 µm et 13 800 L/h.m².bar pour les membranes isopores de 0,4 µm. Bien sûr, ces mesures n'ont été réalisées que sur les coupons qui avaient validé le test de point de bulle. La valeur de l'écart toléré pour satisfaire la perméabilité moyenne d'une membrane a été fixée à 10%.

Ces différents essais préliminaires ont donc permis de vérifier l'intégrité (absence de pores anormalement gros ou de défauts) des membranes sélectionnées pour nos expériences de filtrations bactériennes. Ils ont conduit à l'élimination de plus de 40 % des coupons testés. Pour les coupons intègres, il a été possible de déterminer les valeurs moyennes des principales caractéristiques d'une membrane qui sont reportées dans la Figure III.17.

A.2. Porosité et distribution de tailles de pore des membranes modèles

La caractérisation des membranes isopores a été complétée par l'étude de leur porosité et de leur distribution de tailles de pore. Sur des coupons neufs, des observations au MEB ont été réalisées afin de confirmer la dimension et la forme des pores présents à la surface des membranes modèles. La Figure III.2 présente la géométrie de pores cylindriques d'une membrane isopore de 0,4 µm.

L'observation des caractéristiques morphologiques de surface des pores est complétée avec l'étude de la porosité des membranes par analyse d'image sur les clichés obtenus par MEB à plus faible grossissement.

Pour les membranes de tailles de pore 0,22 µm, la porosité mesurée à la surface de la membrane est comprise entre 6 et 11 % (N= 10 images de 100 µm²) alors que pour les membranes de 0,4 µm la porosité mesurée est comprise entre 17 et 21 % (N= 20 images de 100 µm²) en fonction de la localisation de la zone caractérisée.

Enfin la distribution de la taille de pore est évaluée sur un coupon entier de membrane à l'aide d'un poromètre gaz-liquide. Les résultats obtenus pour deux mesures réalisées sur des coupons de membranes distinctes de 0,22 et 0,4 µm sont présentés sur la Figure III.3 et la Figure III.4. Les différents résultats confirment la bonne homogénéité des pores des membranes modèles sélectionnées ainsi que l'absence de pore anormalement gros. L'ensemble des résultats est synthétisé dans la conclusion de chapitre (cf. Figure III.17).

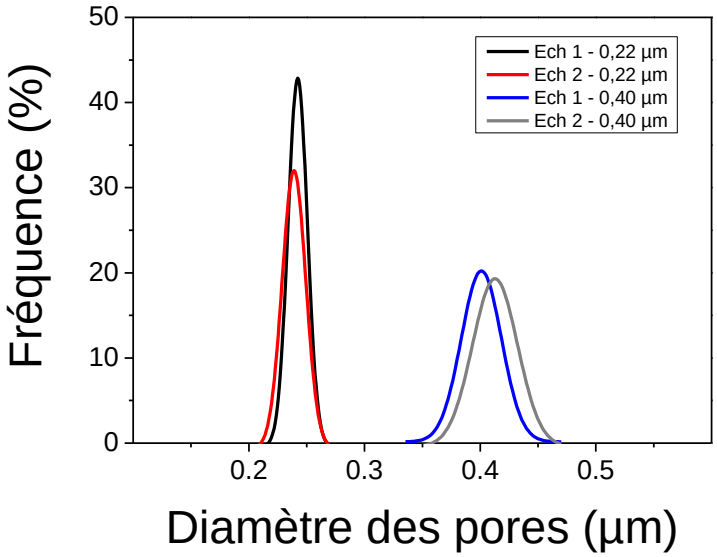


Figure III.3: Distribution de tailles de pore de membranes isopores de 0,22 et 0,4 µm.

Taille de pore théorique (µm)	Moyenne calculée (µm)	Plus gros pore mesuré (µm)
0,22	0,24 ± 0,02	0,27
0,40	0,43 ± 0,04	0,47

Figure III.4 : Synthèse des mesures de tailles de pore effectuées par Poromètrie.

Partie B. Caractérisation des suspensions de bactéries modèles

Notre objectif étant d'étudier les mécanismes de sélectivité et de colmatage à l'échelle submicronique lors d'une filtration frontale, nous nous sommes intéressés à définir le plus précisément possible la morphologie et la rigidité des particules vivantes présentes en suspension. Dans un premier temps, les résultats obtenus en condition témoin seront présentés pour toutes les techniques d'observations utilisées, dans une seconde partie les conséquences de la mise en contact de molécules antibiotiques avec les cellules bactériennes seront analysées.

B.1. Formes et dimensions des particules vivantes

La mesure des caractéristiques morphologiques des cellules bactériennes en suspension, a été réalisée à l'aide de trois techniques différentes : par lecture de la DLS de la suspension bactérienne, par analyse d'images obtenues à très fort grossissement par TEM et par examen de la surface des cellules vivantes par AFM. Ces trois approches ont été sélectionnées afin d'observer les cellules à différentes échelles, mais aussi, afin de couvrir plusieurs types de préparation de l'échantillon.

B.1.1. Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)

Tout d'abord, nous avons évalué la distribution de tailles des populations bactériennes par DLS. Même si la bibliographie (Harding, 1986) présente cette méthode analytique comme relativement peu adaptée à la détermination fine des dimensions des bactéries, elle reste malgré tout une technique facile et rapide à mettre en œuvre pour observer la polydispersité d'une suspension cellulaire. De plus, elle est la seule des trois techniques employées dans ce projet qui permette d'analyser la taille de cellules de manière non invasive et sans préparation spécifique de l'échantillon: sur cellules vivantes et en suspension dans le milieu de filtration (eau physiologique).

Les résultats expérimentaux obtenus par analyse DLS sont présentés Figure III.5 pour les trois souches sélectionnées. En condition témoin, les diamètres hydrodynamiques des cellules sont respectivement : 1150 nm pour *E. coli*, 980 nm pour *P. aeruginosa* et 1100 nm pour *S. aureus*.

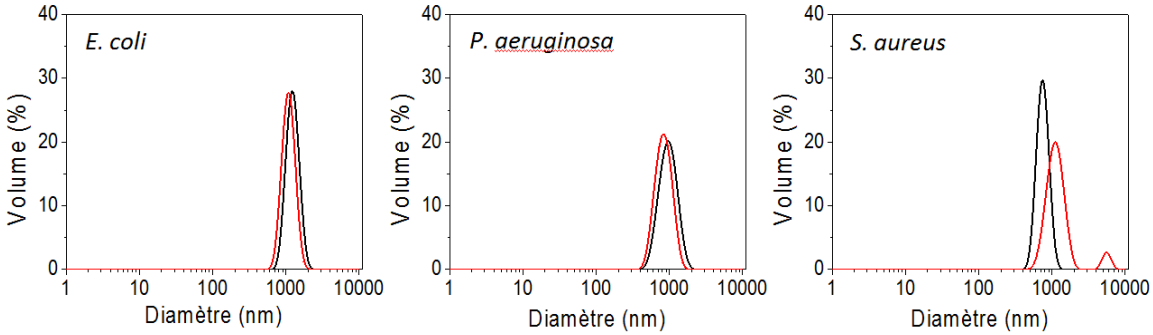


Figure III.5: Courbes, mesurées par DLS, de distribution des dimensions des cellules bactériennes en suspension dans de l'eau physiologique (courbes en noir) et après une phase d'exposition (τ : 90 min) à un antibiotique à la concentration CMI/2 (courbes en rouge).

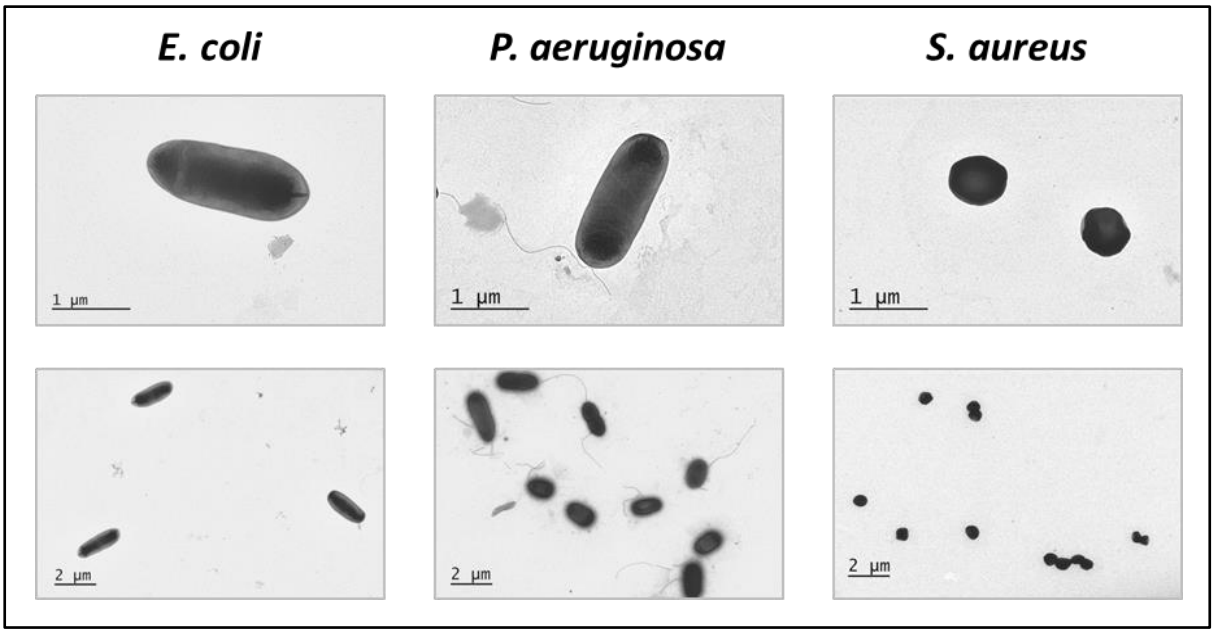


Figure III.6: Images, obtenues par TEM, des cellules bactériennes en condition témoin (eau physiologique) et après coloration négative (grossissement 8000 X et 3000 X).

La mesure par DLS intègre la totalité des particules sous une forme sphérique car le modèle employé, afin de calculer le diamètre hydrodynamique, est basée sur l'équation de Stokes-Einstein (cf. Chapitre II.C.2). Ainsi, le diamètre calculé n'est pas seulement dépendant de la taille des particules, mais aussi de leur forme, ce qui dans notre cas d'étude ne permet pas de révéler des différences notoires entre les trois souches bactériennes.

Cependant, la mesure par DLS nous a permis de valider deux points majeurs pour notre problématique : une absence de particules fines et une homogénéité satisfaisante des cellules en suspension en termes de taille. Effectivement, pour les trois souches et dans toutes les conditions testées, aucune particule n'est mesurée à une échelle inférieure au micromètre sur une population importante de cellules. Ce point est particulièrement intéressant puisqu'il nous offre la certitude que les suspensions bactériennes destinées aux expériences de filtration ne contiennent pas de particules (cellules ou débris) de tailles inférieures aux diamètres des pores des différentes membranes utilisées pour notre étude. De plus, pour les trois souches en condition témoin, toutes les mesures DLS ont présenté un caractère monodisperse ce qui confirme, dans ce cas, l'absence d'agrégat cellulaire de très grande taille (>10 µm). Cependant, comme indiqué précédemment, les mesures par DLS ne permettent pas de déterminer les plus petites dimensions des cellules bactériennes, données d'un intérêt majeur pour l'interprétation des résultats de filtration en termes de transfert. C'est pourquoi, nous avons complété ces premières mesures avec les analyses présentées par la suite.

B.1.2. Microscopie Electronique à Transmission (TEM)

La mesure des dimensions cellulaires des souches a été réalisée par analyse d'images obtenues par TEM sur des suspensions bactériennes colorées négativement à l'acétate d'uranyle. L'utilisation d'un tel outil permet d'obtenir des images en deux dimensions et à très fort grossissement de plusieurs cellules bactériennes (cf. Chapitre II.C.3). Les images obtenues sont présentées Figure III.6 et permettent de déterminer avec précision les dimensions d'une cellule bactérienne (la plus petite dimension - la hauteur et la longueur), sa forme, et potentiellement la présence de structure extracellulaire (flagelles et pili) ou encore l'organisation collective des cellules.

Souche	Forme	Gram	Dimensions cellulaires en condition témoin		Dimensions cellulaires après traitement antibiotique	
			h (µm)	*L (µm)*	*h (µm)*	*L (µm)*
E. coli	bacille	-	0,91 ± 0,1	2,04 ± 0,32	0,92 ± 0,12	1,99 ± 0,34
P. aeruginosa	bacille	-	0,79 ± 0,09	1,63 ± 0,27	0,75 ± 0,1	1,60 ± 0,32
S. aureus	coque	+	0,74 ± 0,1		0,76 ± 0,1	

Figure III.7: Dimensions moyennes (h hauteur et L longueur) des trois souches modèles, mesurées par TEM (N= 30 cellules par échantillon), en suspension dans de l'eau physiologique ou après un traitement antibiotique.

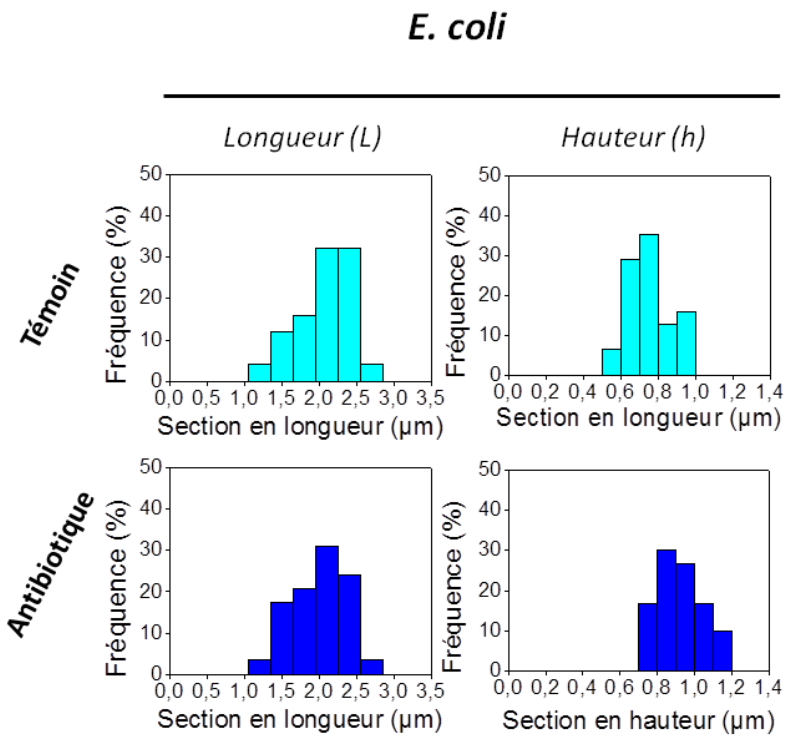


Figure III.8: Distribution des dimensions cellulaires de la souche *E. coli*, mesurées par TEM (N= 30 cellules par échantillon), en suspension dans de l'eau physiologique ou après une phase d'exposition (τ : 90 min) à un antibiotique (Amoxicilline à la concentration CMI/2).

Les mesures ont été réalisées pour chacune des trois souches et pour les différentes conditions chimiques (en condition témoin ou après une phase d'exposition à un antibiotique) sur un total de 30 cellules par échantillon. Les résultats sont exposés sous la forme d'histogrammes afin de représenter la diversité des dimensions mesurées par échantillon pour les suspensions de *E. coli* (Figure III.8), de *P. aeruginosa* (Figure III.9), et de *S. aureus* (Figure III.10) et sous forme d'un tableau synthétique des moyennes calculées (Figure III.7). Nos images témoignent de la forme des cellules sélectionnées : les deux souches à Gram négatif ont la forme caractéristique d'un bacille (bâtonnet), alors que la souche à Gram positif a la forme d'un coque (sphère). Les plus petites dimensions moyennes mesurées, pour les trois bactéries, en suspension dans de l'eau physiologique (NaCl 9g/L) sont respectivement : 0,91 µm pour la souche *E. coli*, 0,79 µm pour *P. aeruginosa*, et 0,74 µm pour *S. aureus*. Pour les deux souches à la forme de bacille (*E. coli* et *P. aeruginosa*) la plus petite dimension correspond à la hauteur de la cellule; pour la souche à la forme de coque (*S. aureus*), la plus petite dimension représente le diamètre d'un disque du fait de la forme sphérique de la cellule.

Ces résultats sont en accord avec les dimensions de référence pour ces trois souches en condition physiologique (cf. Figure II.1). Cependant, les dimensions mesurées sont à mettre au regard des conditions de préparation des suspensions bactériennes afin d'expliquer la légère diminution de la taille observée dans nos travaux. Les conditions de mise en suspension utilisées pour nos expériences comportent une phase d'incubation (τ) en milieu non nutritif qui impacte la physiologie des cellules en suspension (cf. paragraphe II.B.1.) : l'absence de source carbonée dans le fluide provoque une carence nutritive qui engendre une phase de latence et diminue les capacités des microorganismes à démarrer un cycle de croissance favorisant, également, une atrophie de la cellule (Chien et al., 2012).

Ainsi, les résultats obtenus grâce à l'analyse d'images par TEM nous donnent la possibilité de mesurer la plus petite dimension des bactéries. Pour les trois souches et dans toutes les conditions testées, nos résultats confirment une bonne homogénéité des dimensions mesurées (sur une population de 30 cellules par échantillon). De plus, nous pouvons confirmer le fait que les plus petites dimensions des cellules bactériennes (la hauteur pour *E. coli* et *P. aeruginosa*, le diamètre pour *S. aureus*) sont strictement supérieures à 0,4 µm (correspondant au diamètre de pore membranaire maximal testé).

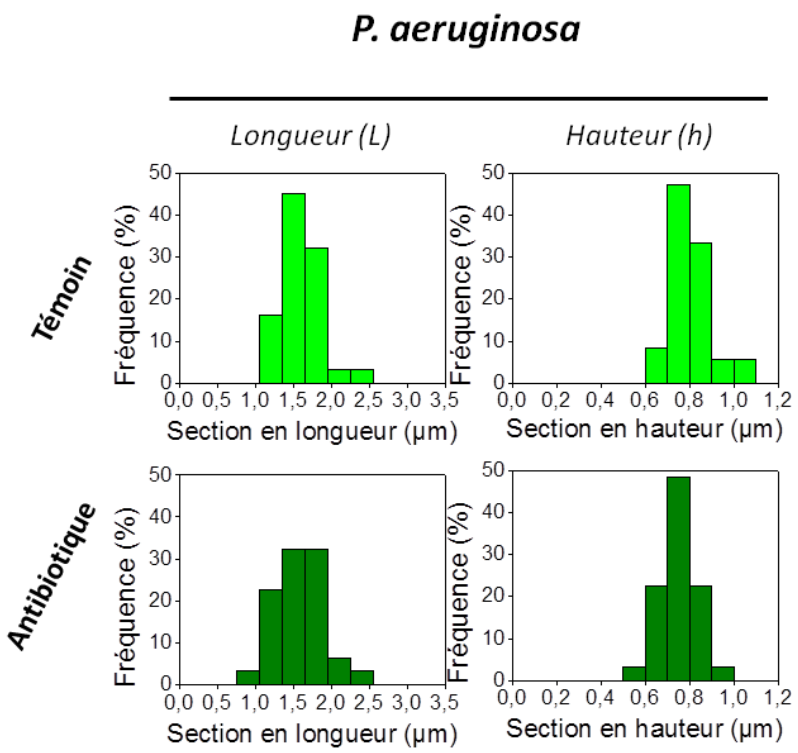


Figure III.9: Distribution des dimensions cellulaires de la souche *P. aeruginosa*, mesurées par TEM (N= 30 cellules par échantillon), en suspension dans de l'eau physiologique ou après une phase d'exposition (τ : 90 min) à un antibiotique (Ticarciline à la concentration CMI/2).

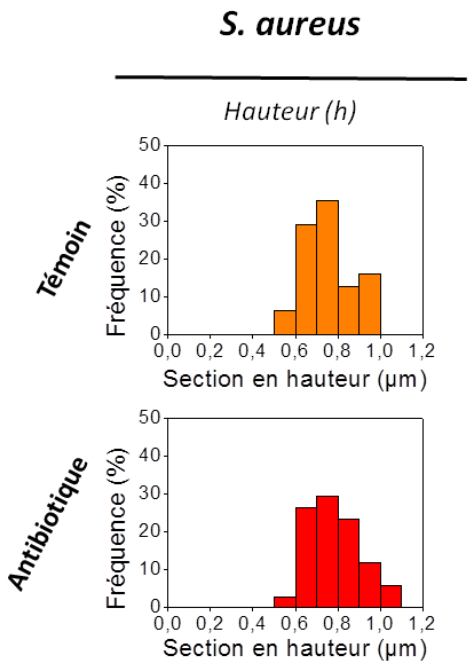


Figure III.10: Distribution des dimensions cellulaires de la souche *S. aureus* obtenues par TEM (N= 30 cellules par échantillon), en suspension dans de l'eau physiologique ou après une phase d'exposition (τ : 90 min) à un antibiotique (Amoxicilline à la concentration CMI/2).

B.1.3. Microscopie à Force Atomique (AFM)

Une troisième, et dernière, technologie d'observation a été employée afin de déterminer les caractéristiques des cellules bactériennes : l'AFM. L'utilisation de l'AFM nous permet d'étudier la morphologie de cellules, à l'échelle individuelle, immobilisées et vivantes (cf. chapitre II.C.3.2.). En effet, après l'étape de mise en suspension, l'échantillon n'est pas fixé (provocant l'arrêt des fonctions biologiques) mais immobilisé à la surface d'un matériau. Pour rappel, deux techniques différentes d'immobilisation ont été employées dans ce projet à cause des différentes caractéristiques morphologiques des cellules étudiées: une technique d'immobilisation électrostatique pour les deux souches à Gram négatif à la forme de bacille, une technique d'immobilisation mécanique pour la souche à Gram positif *S. aureus*. En effet, la souche *S. aureus* a présenté, dans nos conditions d'observation, un taux élevé de décrochage de la cellule immobilisée par liaisons électrostatiques sur une lame de verre. Inévitablement, pendant l'acquisition AFM en mode contact, la pointe balaye la surface de la cellule de *S. aureus* qui, de forme sphérique et faiblement immobilisée sur un substrat plat, se déplace et est éjectée de la zone analysée. Dans cette étude, l'utilisation d'une technique d'immobilisation physique dans les microstructures d'un timbre en PDMS, a démontré, pour la première fois à ce jour, son véritable potentiel pour l'observation des cellules bactériennes de forme sphérique. L'utilisation des timbres en PDMS donne la possibilité d'observer les cellules de *S. aureus* de manière individuelle : les microcavités présentes à la surface du timbre sont partiellement remplies de cellules. En effet, la taille de *S. aureus* (0,8 µm) et le diamètre des puits utilisés (1,5 µm) pour nos acquisitions sont très proches, permettant l'isolement de cellules par immobilisation mécanique. Néanmoins, le taux de remplissage des puits les plus petits disponibles à la surface du timbre s'est avéré relativement faible ainsi qu'un phénomène d'accumulation des cellules à l'intérieur d'un même puits a pu être observé. La méthode de dépôt des cellules (mouvement convectif capillaire créé manuellement à l'aide d'une lamelle de verre) nécessiterait donc, pour un meilleur rendement opérationnel, de nouvelles optimisations (température et humidité contrôlées, vitesse de déplacement du ménisque, angle de contact du matériau, tension de surface du liquide). Dans le futur, la séquence de dépôt des cellules pourrait être réalisée automatiquement à l'aide d'une plateforme motorisée dans des conditions de température et d'humidité contrôlées (Dague et al., 2011).

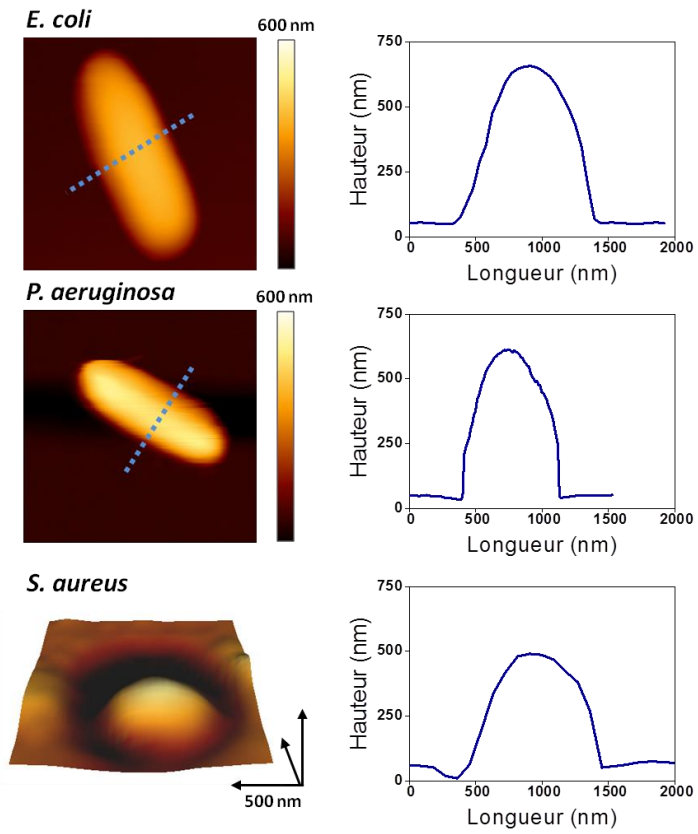


Figure III.11 : Images de hauteur obtenues par AFM (gauche) et profils topographiques (droite) des cellules bactériennes modèles.
Les cellules sont vivantes et immobilisées en milieu liquide (condition témoin). Pour les souches *E. coli* et *P. aeruginosa*, sur les images de hauteur (mode Contact) - la ligne pointillée bleue matérialise l'emplacement de la section horizontale mesurée. Pour *S. aureus*, image 3D produite après traitement d'une carte Force Volume (4096 courbes de forces).

Afin d'observer les cellules bactériennes, la déflexion du laser aligné sur la pointe qui balaye la surface est enregistrée et analysée pour reconstruire numériquement les images de hauteur qui révèlent la topographie de la surface analysée. L'image dite de déflexion verticale correspond aux variations de hauteurs mesurées avant compensation de la hauteur par la boucle de rétrocontrôle négatif. Les images de hauteur obtenues par mesure AFM pour les deux souches à Gram négatif en condition témoin (eau physiologique) sont présentées Figure III.11. Pour les cellules de la souche *S. aureus* (Gram positif), les images de hauteur ont été obtenues grâce au mode Force Volume car, comme décrit précédemment, le mode contact est inadapté à cette situation en raison des fortes forces de cisaillement latérales qu'il génère. Grâce au traitement des courbes de forces obtenues avec le mode Force Volume (qui permet de déterminer la hauteur du point de contact entre la pointe et la cellule) nous pouvons obtenir la reconstruction d'image de hauteur de l'échantillon (Figure III.11). Ces différentes images témoignent de l'efficacité des deux techniques d'immobilisation des cellules vivantes utilisées dans le but d'observer leurs morphologies et cela pour chacune des trois souches modèles, malgré la nécessité d'utiliser des modes d'acquisition AFM différents selon la souche. La technologie AFM offre, également, la possibilité d'observer la topographie des cellules. Cette fois, à la différence des deux techniques d'analyses utilisées précédemment (DLS et SEM), la cellule est observée individuellement alors qu'elle est immobilisée et vivante dans de l'eau physiologique. La Figure III.11 présente le tracé de la hauteur (mesurée le long de la ligne en pointillé bleu) en fonction de la longueur du microorganisme. Cette méthodologie permet d'acquérir des résultats complémentaires puisque les dimensions de la cellule peuvent être observées sans étape de fixation et d'altération de l'échantillon. Nous trouvons, pour la souche *E. coli* les dimensions suivantes : une hauteur de 680 ±100 nm, une largeur de 810 ±115 nm, longueur de 1,9 ±0,3 µm ; pour la souche *P. aeruginosa* les dimensions moyennes mesurées sont hauteur de 630 ±95 nm, largeur de 750 ±100 nm, longueur de 1,5 ±0,2 µm et enfin, pour *S. aureus*, une hauteur de 490 ±280 nm et une largeur de 695 ±150 nm. Les dimensions mesurées par AFM sont légèrement plus petites que celles obtenues par TEM car cette technique d'analyse appuie sur la surface de l'échantillon. Cependant, l'AFM n'est pas la technique la plus pertinente pour la mesure des dimensions d'une population cellulaire car elle est chronophage et relativement complexe à mettre en œuvre si l'on souhaite obtenir des mesures de taille pour un grand nombre de cellules.

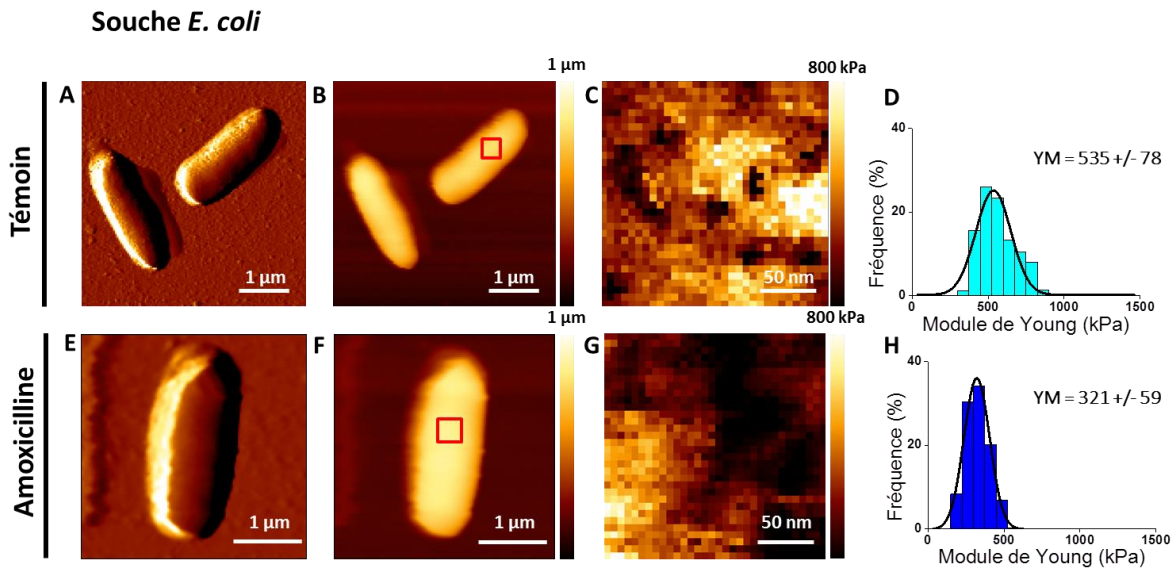


Figure III.12 : Etude par AFM de la topographie et de la rigidité des cellules de *E. coli* en condition témoin et après un traitement antibiotique.

E. coli dans de l'eau physiologique (haut) : A) Image de déflection verticale, B) Image de hauteur (mode Contact) - le carré rouge symbolise la zone où a été réalisée la carte d'élasticité, C) Carte d'élasticité (mode Force Volume) des 1024 courbes de forces obtenues avec une force d'appui de 0,5nN sur l'échantillon, D) Distribution des modules de Young obtenue après traitement numérique des courbes de forces (modèle de Hertz).

E. coli après une phase d'exposition (τ : 90 min) à l'Amoxicilline à la concentration CMI/2 (bas) : E) Image de déflection verticale, F) Image de hauteur (mode Contact) - le carré rouge symbolise la zone où a été réalisée la carte d'élasticité, G) Carte d'élasticité (mode Force Volume) des 1024 courbes de forces obtenues avec une force d'appui de 0,5nN sur l'échantillon, H) Distribution des modules de Young obtenue après traitement numérique des courbes de forces (modèle de Hertz).

B.2. Elasticité des particules biologiques vivantes

Comme nous l'avons vu, la technologie AFM permet d'analyser la morphologie et la topographie des cellules bactériennes mais, elle offre aussi la possibilité d'obtenir des informations nanomécaniques sur les parois bactériennes et cela en fonction des différentes conditions expérimentales appliquées.

Les premières expériences ont été réalisées sur les cellules bactériennes en condition témoin, c'est-à-dire dans de l'eau physiologique puis après contact avec un antibiotique (commenté paragraphe III.B.3.). Le mode spectroscopie de force de l'AFM a été utilisé pour acquérir une carte d'élasticité de 200 nm de côté sur la surface des cellules bactériennes. Cette carte correspond à 1024 courbes de forces qui suivent une matrice spatiale carré de 32 positions de côté (à chaque pixel de la carte d'élasticité correspond une courbe de force). Ces courbes de forces ont été obtenues avec une force d'appui de 0,5 nN d'indentation, et permettent après traitement de déterminer l'élasticité moyenne (exprimée en termes de module de Young) de la paroi de la cellule bactérienne vivante analysée. Pour chacune des trois souches et pour les différentes conditions expérimentales, la mesure du module de Young de la paroi bactérienne est réalisée sur un total de 9 cellules provenant de trois suspensions différentes issues de trois cultures indépendantes.

Les différents résultats obtenus par mesure AFM pour chacune des trois souches sélectionnées sont présentés Figure III.12 pour *E. coli*, Figure III.13 pour *P. aeruginosa* et enfin Figure III.14 pour *S. aureus*.

Les moyennes des modules de Young mesurés par AFM (N= 9 cellules provenant de trois suspensions différentes issues de trois cultures indépendantes) sont, en condition témoin dans le l'eau physiologique, respectivement : 539 ± 75 kPa pour la souche *E. coli*, 521 ± 56 kPa pour la souche *P. aeruginosa* et enfin 748 ± 101 kPa pour la souche à Gram positif *S. aureus*. Les deux souches à Gram négatif ont une valeur du module de Young très proche en milieu physiologique. La souche *S. aureus*, qui possède une structure pariétale différente caractéristique des Gram positif, présente un module de Young plus élevé confirmant la rigidité plus importante des parois de ce type de cellules.

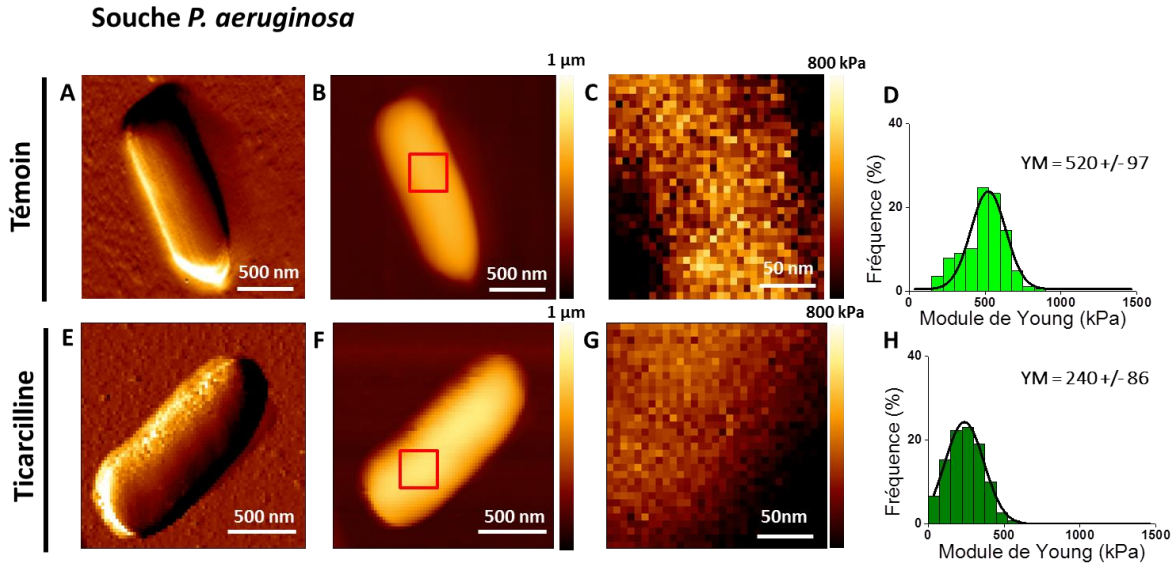


Figure III.13 : Etude par AFM de la topographie et de la rigidité des cellules de *P. aeruginosa* en condition témoin et après un traitement antibiotique.
P. aeruginosa dans de l'eau physiologique (haut) : A) Image de déflection verticale, B) Image de hauteur (mode Contact) - le carré rouge symbolise la zone où a été réalisée la carte d'élasticité, C) Carte d'élasticité (mode Force Volume) des 1024 courbes de forces obtenues avec une force d'appui de 0,5nN sur l'échantillon, D) Distribution des modules de Young obtenue après traitement numérique des courbes de forces (modèle de Hertz).
P. aeruginosa après une phase d'exposition (τ : 90 min) à la Ticarcilline à la concentration CMI/2 (bas) : E) Image de déflection verticale, F) Image de hauteur (mode Contact) - le carré rouge symbolise la zone où a été réalisée la carte d'élasticité, G) Carte d'élasticité (mode Force Volume) des 1024 courbes de forces obtenues avec une force d'appui de 0,5nN sur l'échantillon, H) Distribution des modules de Young obtenue après traitement numérique des courbes de forces (modèle de Hertz).

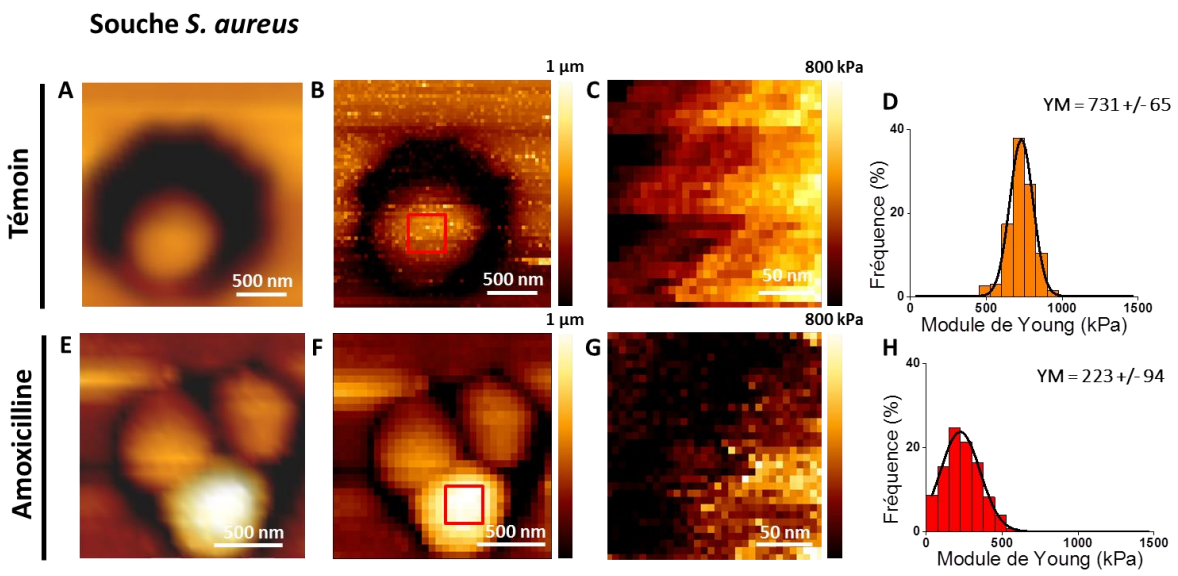


Figure III.14 : Etude par AFM de la topographie et de la rigidité des cellules de *S. aureus* en condition témoin et après un traitement antibiotique.

S. aureus dans de l'eau physiologique (haut) : A) Image de reconstruction 3D, B) Image de hauteur (mode Force Volume) - le carré rouge symbolise la zone où a été réalisée la carte d'élasticité, C) Carte d'élasticité (mode Force Volume) des 1024 courbes de forces obtenues avec une force d'appui de 0,5nN sur l'échantillon, D) Distribution des modules de Young obtenue après traitement numérique des courbes de forces (modèle de Hertz).

S. aureus après une phase d'exposition (τ : 90 min) à l'Amoxicilline à la concentration CMI/2 (bas) : E) Image de reconstruction 3D, F) Image de hauteur (mode Force Volume) - le carré rouge symbolise la zone où a été réalisée la carte d'élasticité, G) Carte d'élasticité (mode Force Volume) des 1024 courbes de forces obtenues avec une force d'appui de 0,5nN sur l'échantillon, H) Distribution des modules de Young obtenue après traitement numérique des courbes de forces (modèle de Hertz).

Ces différences de rigidité des parois cellulaires s'expliquent par le fait que, comme détaillé en introduction, la paroi des bactéries à Gram positif est composée d'une couche de peptidoglycane épaisse, localisée à l'extérieur de l'enveloppe cellulaire. Ainsi, l'épaisseur de la couche de peptidoglycane détermine la valeur du module de Young mesurée expérimentalement. Les mesures des propriétés nanomécaniques des parois de cellules bactériennes nous permettent donc de mettre en évidence une différence supplémentaire, vis-à-vis de notre problématique, entre les trois souches étudiées : en plus du facteur de forme des cellules qui différencie les souches bactériennes, il existe également une différence de rigidité entre les cellules à Gram négatif et à Gram positif démontrée par mesure AFM, paramètre clé qui intervient nécessairement dans le mécanisme de sélectivité spécifique aux microorganismes déformables lors d'une filtration membranaire.

B.3. Conséquences d'une exposition courte à un antibiotique

La présence, à faible dose, d'un antibiotique dans une suspension bactérienne peut provoquer une altération de la structure des cellules et une modification de leur comportement sans pour autant entrainer la mort des microorganismes. Les antibiotiques sélectionnés appartiennent à la famille des bêta-lactames, car cette catégorie de principes actifs s'articule autour d'un cycle bêta-lactame qui confère les propriétés biocides à la molécule. Les variations au niveau de la chaîne latérale de l'antibiotique permettent de varier le mode d'action et la résistance de la molécule. De plus, les antibiotiques de la famille des bêta-lactames ont pour effet commun d'altérer la synthèse, la formation et l'arrangement de la couche de peptidoglycane présent dans la paroi des bactéries (Greenwood, 1986). Plus spécifiquement, ces antibiotiques perturbent la synthèse de la couche de peptidoglycane par inhibition d'une catégorie spécifique de protéines: les transpeptidases. Ces enzymes catalysent la formation des liaisons peptidiques nécessaire à l'assemblage de la couche de peptidoglycane, ainsi lorsque son action est perturbée en présence de bêta-lactames, les cellules bactériennes présentent une grande variété de réponses biologiques, réponses qui sont dépendantes de la concentration de l'antibiotique (Greenwood, 1986; Kaplan et al., 2012; Poole, 2004) : mise en place d'un mécanisme de résistance individuel ou collectif, altération de la morphologie des cellules, relargage de composés cellulaires ou mort de la cellule. Bien évidemment, la complexité des modes d'action des bêta-lactames provient du fait qu'il existe une grande variété d'interactions possibles entre la molécule d'intérêt et le microorganisme.

Les mesures de caractéristiques morphologiques des souches sélectionnées ont donc été réalisées sur les suspensions bactériennes après une phase d'exposition de 90 min à un antibiotique à la concentration CMI/2, respectivement de 1 µg/mL et 0,05 µg/mL d'Amoxicilline pour les souches *E. coli* et *S. aureus*, et de 15 µg/mL de Ticarcilline pour la souche *P. aeruginosa*. Les résultats obtenus sont présentés sur les différentes figures respectives aux trois techniques d'analyses employées (cf. Figure III.5, Figure III.7, Figure III.12, Figure III.13 et Figure III.14) et sont résumés numériquement dans le tableau suivant (Figure III.15).

L'analyse par DLS des dimensions de populations bactériennes en suspension démontre un impact très faible de l'antibiotique sur le diamètre des deux souches à Gram négatif. Les souches *E. coli* et *P. aeruginosa* présentent un diamètre hydrodynamique plus faible au contact de l'antibiotique mais les différences observées sont minimes et non représentatives d'une possible altération des cellules bactériennes (écart inférieur ou égal à 5 %). De plus, les populations à Gram négatif exposées aux antibiotiques conservent leur caractère monodisperse (cf. Figure III.5). Ces résultats sont confirmés par l'analyse des images obtenues par TEM (cf. Figure III.8, Figure III.9 et Figure III.10) qui ne révèlent pas de modifications des bactéries exposées aux antibiotiques : pas de changement significatif des dimensions (et spécifiquement de la plus petite dimension des cellules), pas d'altération de la morphologie des cellules observées individuellement.

Souche	Forme	Gram	Condition	Dimensions L x h (µm)	Diamètre hydrodynamique (µm)	Module de Young (kPa)
				TEM	**DLS**	**AFM**
E. coli	bacille	-	eau Phy.	2,04x0,91	1,15	539 ± 75
			Amoxicilline	1,99x0,92	1,10	329 ± 67
P. aeruginosa	bacille	-	eau Phy.	1,63x0,79	0,98	521 ± 56
			Ticarcilline	1,60x0,75	0,92	279 ± 79
S. aureus	coque	+	eau Phy.	0,74	1,1	748 ± 101
			Amoxicilline	0,76	1,2 (et 4,0)	218 ± 67

Figure III.15 : Caractéristiques morphologiques et nanomécaniques des cellules modèles.

En revanche, l'effet de chacun des antibiotiques sur les deux souches à Gram négatif a été mis en évidence par la mesure réalisée par AFM. Utilisée en mode Force Volume, les mesures par AFM ont démontré une diminution significative des valeurs du module de Young des parois à Gram négatif exposées à l'antibiotique (cf. Figure III.12 et Figure III.13) passant respectivement de 539 ± 75 kPa en condition témoin à 329 ± 67 kPa après le traitement antibiotique pour la souche *E. coli* et de 521 ± 56 kPa à 279 ± 79 kPa pour la souche *P. aeruginosa*. La présence d'un antibiotique dans la suspension a donc pour effet d'altérer les propriétés nanomécaniques des parois des deux souches à Gram négatif en diminuant la rigidité de l'enveloppe cellulaire sans modifier la forme des microorganismes.

Concernant la souche *S. aureus,* à Gram positif et de forme sphérique, les résultats obtenus sur les suspensions soumises à l'action de l'Amoxicilline pendant 90 min mettent en évidence plusieurs effets. La mesure par DLS démontre une perturbation du comportement des cellules traitées (cf. Figure III.5). En effet, après une phase d'exposition à l'Amoxicilline, la suspension de *S. aureus* présente deux populations: une première à 1200 nm et une seconde à 4000 nm. Ce résultat illustre la formation d'agrégats cellulaires de taille importante. Ce phénomène est également observé sur les images réalisées par TEM où les cellules de *S. aureus* exposées à l'Amoxicilline présentent une adhésion intercellulaire importante (cf. Figure III.16).

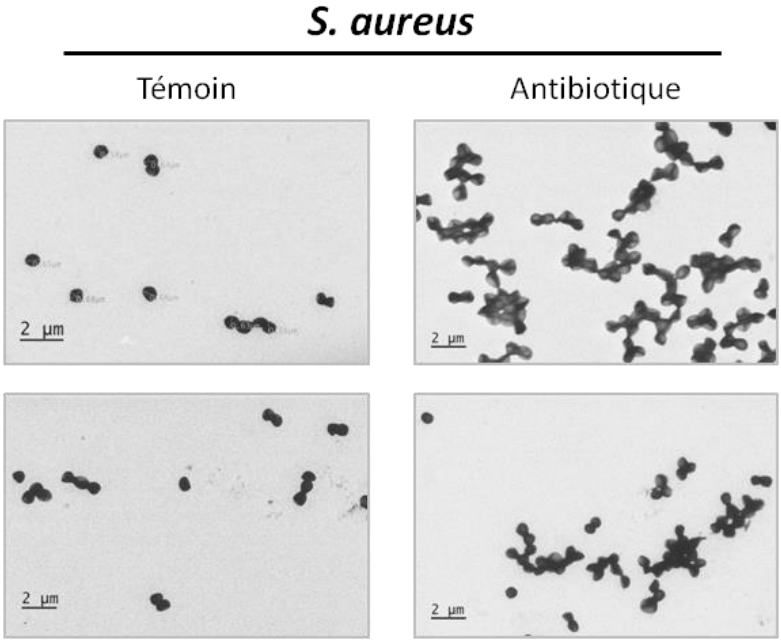


Figure III.16 : Observation par TEM de l'agrégation des cellules de *S. aureus* après une exposition avec un antibiotique (Amoxicilline à la concentration CMI/2).

La formation d'agrégats est l'une des capacités de la souche *S. aureus* impliquée dans la formation de biofilms dans l'organisme infecté (Brady et al., 2008) qui a été mise en évidence par différents travaux dans des conditions de culture en laboratoire (Merino et al., 2009; Seidl et al., 2008) ou en présence de cas cliniques (Burmølle et al., 2010; Fazli et al., 2009). La formation d'agrégats de taille importante a également été observée à plusieurs reprises comme réaction de défense lors d'une exposition de *S. aureus* à des concentrations faibles de différentes familles d'antibiotiques (Haaber et al., 2012; Kaplan et al., 2012) : la formation d'agrégats augmente la tolérance de la souche à l'antibiotique présent, la matrice de l'agrégat s'oppose à la pénétration de l'agent biocide et lui confère des propriétés de résistances mécaniques aux forces de cisaillement plus importantes. Néanmoins, à l'échelle individuelle, la forme et la taille des cellules traitées ne sont pas modifiées. Une nouvelle fois, ce sont les mesures par AFM réalisées sur la souche *S. aureus* qui ont permis de mettre en évidence, dans nos conditions expérimentales, l'impact majeur d'une exposition à l'Amoxicilline sur les valeurs du module de Young des parois bactériennes (cf. Figure III.14) passant respectivement de 748 ± 101 kPa en condition témoin à 218 ± 67 kPa après le traitement antibiotique.

D'après nos observations, la présence d'un antibiotique dans la suspension engendre donc deux modifications chez la souche *S. aureus* : à l'échelle de la population cellulaire, la formation d'agrégats de taille importante est amplifiée ; à l'échelle de la cellule, la bactérie conserve sa forme de coque mais la rigidité de l'enveloppe cellulaire est grandement diminuée.

Du fait des différences de composition et de structure de la couche de peptidoglycane qui forme la paroi des bactéries à Gram négatif et positif, le mécanisme d'action des bêta-lactames varie sensiblement pour chacune de ces familles bactériennes (Greenwood, 1986). Pour les souches à Gram négatif, la paroi de peptidoglycane est d'une faible épaisseur et relativement peu réticulée. De plus, à l'extérieur de la couche de peptidoglycane, la paroi des bactéries à Gram négatif présente une membrane externe (cf. Figure I.5) composée de polysaccharides complexés à des phospholipides et des protéines membranaires. Ces protéines transmembranaires (de type porines), comme des canaux, peuvent faciliter ou gêner le transport des antibiotiques de l'extérieur de la cellule vers leur cible et cela en fonction de l'hydrophobicité ou du poids moléculaire des molécules antibiotiques (Nikaido, 2003; Yoshimura and Nikaido, 1985). A l'inverse, pour les souches à Gram positif, la paroi

de la cellule ne présente pas de membrane externe. Dans ce cas, la couche de peptidoglycane, épaisse et hautement réticulée, constitue l'interface directe entre la cellule bactérienne et son environnement. Ces différences expliquent pourquoi la souche *S. aureus* est la souche la plus sensible à l'action de l'antibiotique de la famille des bêta-lactames. En effet, la paroi de peptidoglycane est exposée directement à l'action de l'antibiotique présent dans l'environnement à la différence des cellules à Gram négatif qui possèdent une barrière supplémentaire (la membrane externe) qui diminue la diffusion de l'antibiotique.

La modification des propriétés pariétales des microorganismes exposés à différents traitements antibiotiques est étudiée dans le cadre médical et pharmaceutique afin de déterminer les mécanismes d'action de molécules thérapeutiques. Il a déjà été démontré que la présence, au contact des cellules bactériennes de composés bactéricides entraine, à des concentrations non létales, des altérations importantes des membranes bactériennes. La concentration de l'agent chimique est un paramètre qui détermine les effets sur les microorganismes ciblés (Braga and Ricci, 1998, 2000) . Des travaux supplémentaires attestent de l'effet de molécules thérapeutiques (antibiotiques, peptides antimicrobiens, nanoparticules) sur la forme ou sur les propriétés nanomécaniques des cellules vivantes qui se traduisent très souvent par une altération de la morphologie des cellules et une diminution du module de Young de la surface bactérienne (Flores et al., 2010; Formosa et al., 2012b; Longo et al., 2013; Mortensen et al., 2009) synonyme d'une baisse de la rigidité de la parois. Pour une concentration supérieure à la CMI, l'antibiotique induit des altérations dont les effets sont plus sévères : perte de cytoplasme, renflements, augmentation de la rugosité, lyse cellulaire... La Figure I.10 dans le chapitre introductif, présente les effets de traitements antibiotiques sur les souches modèles sélectionnées. Les effets d'une exposition, sur des temps de contact long (culture de 24 h, à la concentration CMI/2), à la Ticarcilline pour la souche *P. aeruginosa* ont été étudiés (Formosa et al., 2012a) : la cellule traitée a une forme modifiée, plus allongée alors que la rigidité de la paroi cellulaire diminue en présence de l'antibiotique. Pour *S. aureus*, la lyse de la membrane externe de la cellule bactérienne entraine également une altération rapide (à partir de 80 min d'exposition) de la paroi exposée à la lysostaphine (Francius et al., 2008).

Dans notre étude, la phase d'exposition à l'antibiotique est courte (90 min) et s'effectue dans de l'eau physiologique (NaCl 9 g/L), à la différence de certains

travaux qui étudient les effets sur les populations bactériennes d'une exposition prolongée (24h) dans le milieu de culture (Formosa et al., 2012a; Kaplan et al., 2012). Ce temps d'exposition plus long n'est pas adapté à l'objectif de notre étude. En effet, une phase d'exposition plus longue à un antibiotique demande de placer la souche bactérienne en phase de croissance en présence de nutriments. La diminution de la viabilité cellulaire est alors compensée par le phénomène de multiplication des microorganismes et l'effet d'un antibiotique sur plusieurs générations de cellules est alors observable. Dans nos travaux, nous souhaitons ne faire varier qu'un seul paramètre à la fois. Ainsi, en modifiant les propriétés nanomécaniques de la cellule par action d'un antibiotique, nous souhaitons par ailleurs maintenir la concentration en bactéries constante et les dimensions des cellules en suspension relativement stables, ce que n'aurait pas permis l'utilisation de cellules en phase de multiplication.

Conclusion

Ce chapitre s'est intéressé à la caractérisation des membranes et des suspensions bactériennes qui seront utilisées ultérieurement dans les expériences de filtration.

D'une part, nous avons pu valider l'utilisation des membranes isopores comme matériau poreux modèle pour nos expériences de microfiltration frontale. Néanmoins, il est apparu nécessaire de mettre en place deux étapes de sélection des coupons utilisés pour les expériences de filtration bactérienne. La membrane échantillonnée doit valider un test de point de bulle et ensuite la perméabilité hydraulique de la membrane doit être conforme à la moyenne mesurée pour un nombre important de coupons. Ces deux étapes préalables à toute expérience ont permis, grâce à un taux de rejet important, d'éviter l'utilisation de membranes présentant des défauts et le risque de présence de pores anormalement gros est ainsi écarté. Après validation, les membranes isopores utilisées présentent donc les propriétés souhaitées pour nos travaux : des pores cylindriques de taille, forme et longueur homogène. Pour les coupons intègres, les valeurs moyennes des principales caractéristiques mesurées dans ce chapitre sont résumées, sous la forme d'un tableau, dans la Figure III.17. Enfin, ce matériau possède les caractéristiques de résistance chimique nécessaires à son utilisation en conditions stériles puisque la membrane a été stérilisée par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 200 ppm de Cl_2 pendant 20 minutes avant d'être placée dans la cellule de filtration.

Caractéristiques moyennes des membranes isopores en polycarbonate			
Taille de pore donnée fabricant		0,22	0,4
Diamètre de pore moyen	µm	0,24	0,43
Diamètre de pore maximum		0,27	0,47
Epaisseur	mm	20	
Porosité	%	6-11	17-21
Perméabilité hydraulique (Lp)	L/h.m².bar	3 300 ±330	13 800 ±1380
Résistance hydraulique (Rm)	m^{-1}	$1,1.10^{11}$ ±0,1	$2,6.10^{10}$ ±0,2

Figure III.17: Tableau récapitulatif des caractéristiques des membranes modèles.

D'autre part, nous avons étudié la forme, la taille et les propriétés nanomécaniques des cellules bactériennes présentes en suspension dans les conditions physico-chimiques du fluide à filtrer. A l'aide de trois techniques d'observations différentes, les cellules bactériennes ont été caractérisées à différentes échelles. Premièrement le comportement des cellules bactériennes en suspension a pu être analysé par diffraction dynamique de la lumière. En condition témoin (après mise en suspension pendant 90 minutes dans de l'eau physiologique), les suspensions bactériennes des trois souches modèles sélectionnées (*E. coli, P. aeruginosa* et *S. aureus*) ont présenté un caractère monodisperse. Deuxièmement, la morphologie et les dimensions des cellules ont été observées, à l'échelle individuelle, par microscopie électronique à transmission. Enfin, l'utilisation de la microscopie à force atomique a permis de mesurer les propriétés nanomécaniques des parois des cellules bactériennes et de révéler une différence de rigidité entre la paroi des cellules à Gram négatif, plus souple, et la paroi des bactéries à Gram positif, plus rigide, car composée d'une épaisse couche de peptidoglycane exposée à l'extérieur de la paroi cellulaire.

Les effets de la présence d'un agent chimique, tel qu'un antibiotique, au contact des microorganismes en suspension ont également été analysés dans cette première partie. Les deux molécules antibiotiques sélectionnées pour notre étude appartiennent à la famille des bêta-lactamines et ont pour effet d'altérer la synthèse et la structuration de la couche de peptidoglycane présent dans la paroi des cellules bactériennes. Dans un premier temps, il a fallu déterminer les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales bactéricides, pour chacune des trois souches exposées à un antibiotique spécifique.

Des observations ont été réalisées sur les suspensions bactériennes exposées à un antibiotique spécifique, pendant une courte période de 90 minutes, à une concentration non létale. Les différents résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence des modifications profondes de la forme et de la taille des cellules bactériennes traitées. Cependant, la caractérisation par microscopie à force atomique utilisée en mode spectroscopie de force (cf. Figure III.18) démontre une diminution importante de la rigidité des parois bactériennes soumises à la présence de la molécule bactéricide.

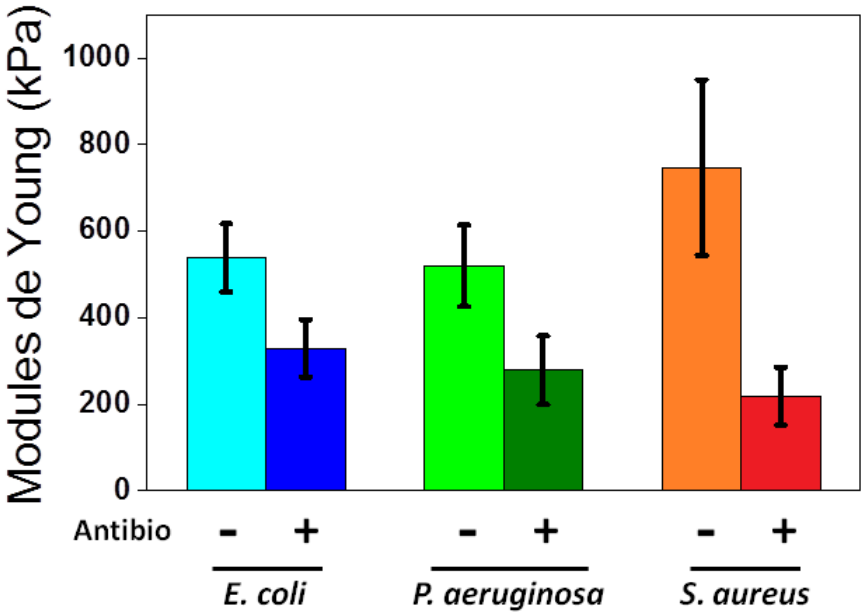


Figure III.18 : Effet de l'exposition à un antibiotique sur la valeur des modules de Young des parois cellulaires des bactéries modèles.
Les barres d'erreur représentent la déviation standard mesurée pour N= 9 cellules issues de trois cultures indépendantes.

Ce phénomène est plus important chez la souche à Gram positif étudiée (*S. aureus*) du fait des caractéristiques pariétales de ce germe. Enfin, le comportement de cette souche bactérienne est d'autant plus spécifique puisque nous avons observé la mise en place d'un mécanisme collectif de défense qui engendre la formation d'agrégats cellulaires de taille importante en présence de l'antibiotique.

La caractérisation de cet ensemble membrane/particules propre à notre étude expérimentale de filtration frontale constitue la première partie de ce projet. Toutes les informations acquises vont nous permettre, dans le chapitre suivant, d'analyser les transferts observés pendant les premières minutes d'une filtration frontale.

Chapitre IV Etude paramétrique du transfert de bactéries déformables au temps initial d'une filtration

Introduction

Ce chapitre a pour objectif de préciser le mécanisme de transfert par déformation des bactéries au cours des premiers instants d'une filtration membranaire. Dans le cas d'une microfiltration, si la taille des pores présents à la surface de la membrane est plus petite que les dimensions des cellules bactériennes en suspension, une rétention totale est attendue. Cependant, comme nous l'avons vu dans le Chapitre I, de nombreux travaux font état d'un transfert de cellules bactériennes viables au cours d'une filtration dans laquelle le rapport de la dimension de la cellule sur celle du pore est supérieur à 1, et cela à travers différents matériaux membranaires.

Nous proposons dans ce chapitre d'affiner les connaissances sur les paramètres physiques, chimiques ou biologiques de la cellule, mais aussi ceux relatifs au procédé de filtration, qui gouvernent l'aptitude au transfert des bactéries déformables, à travers des membranes dont les pores sont d'une taille inférieure à 1 µm donc en deçà des petites dimensions des souches bactériennes étudiées.

Ce chapitre s'organise en deux parties : la première propose de détailler la rétention des trois souches bactériennes modèles par des membranes isopores neuves et cela dans des conditions de filtration étroitement contrôlées. L'effet de différents paramètres opératoires sera étudié : la concentration en bactéries dans l'alimentation, la pression transmembranaire ainsi que la présence d'antibiotique dans la suspension initiale. Dans une seconde partie, nous proposons de décrire le mécanisme de sélectivité spécifique aux bactéries à l'aide d'un modèle numérique dont les tendances seront comparées à nos résultats expérimentaux.

Partie A. Etude paramétrique du transfert sur membrane isopore neuve

A.1. Protocole expérimental spécifique à ce chapitre

Le transfert de microorganismes à travers la membrane de filtration, ou plus précisément le nombre de cellules bactériennes qui traversent la membrane par unité de temps ou de volume filtré, n'est pas un phénomène stable ou constant. Au cours d'une filtration membranaire, la quantité de bactéries qui parvient à se déformer et à atteindre le compartiment perméat est susceptible d'évoluer en fonction du temps suite au colmatage de la membrane.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au transfert de bactéries aux premiers instants d'une filtration. Dans ce cas d'étude, la membrane n'est pas (ou peu) colmatée et pourrait être définie comme "neuve" ou encore vierge de toute contamination. L'objectif de cette partie du projet doctoral est alors de déterminer l'influence de différents paramètres opératoires sur le transfert de bactéries déformables au contact direct de l'interface membranaire.

L'évolution de la concentration bactérienne dans le perméat au cours d'une filtration de longue durée ainsi que l'impact des paramètres opératoires sur la dynamique du transfert et du flux de perméat seront étudiés dans le Chapitre V.

Un protocole expérimental de filtration a été développé pour permettre de quantifier le transfert de cellules bactériennes pendant les premières minutes d'une filtration frontale. Pour cela, deux points sont à souligner :

- le volume de suspension bactérienne filtré doit être relativement faible afin d'éviter la formation d'un dépôt de cellules à la surface de la membrane. Nous avons fixé ce volume à 50 mL pour trois raisons. Premièrement, la filtration de ce volume de suspension à une concentration élevée de 10^7 UFC/mL permet de réaliser un test de rétention avec une charge ($\approx 5.10^7$ UFC/cm²) légèrement supérieure à la valeur préconisée pour les tests standardisés qui est de 10^7 cellules par cm² de surface filtrante effective. Deuxièmement, pour ce volume, aucune diminution du transfert n'est observée pour les trois souches modèles, diminution qui pourrait représenter l'amorce de l'impact d'un colmatage sur le transfert des bactéries (vérification expérimentale dans le chapitre suivant). Enfin, ce volume est suffisamment faible pour correspondre au volume de remplissage de la cellule de filtration Amicon et

permet ainsi d'éviter l'utilisation de l'enceinte pressurisée comme réservoir d'alimentation.

- La totalité des 50 mL de la suspension présents dans la cellule Amicon est filtrée et récupérée intégralement dans un tube stérile. L'évaluation de la concentration bactérienne dans la phase perméat est donc une valeur du transfert moyen pour un volume filtré total de 50 mL.

Les résultats obtenus pour les différents tests seront représentés en concentration bactérienne dans le perméat (Cp en UFC/mL), pour un volume filtré de 50 mL, en fonction des paramètres opératoires étudiés (concentration bactérienne de l'alimentation, PTM, présence antibiotique) et cela pour chacune des trois souches modèles (*E. coli, P. aeruginosa, S. aureus*). Ces trois souches ont été sélectionnées pour leurs différentes caractéristiques morphologiques et structurales (cf. Figure IV.1) comme nous l'avons détaillé dans le chapitre II puis vérifié dans le Chapitre III, et nous permettront d'affiner l'étude du rôle des différents paramètres biologiques (forme, taille, gram, élasticité de la paroi) sur le transfert de cellules vivantes au travers de pores submicrométriques.

Les suspensions étant préparées dans de l'eau physiologique stérile (9g/L NaCl), les microorganismes sont placés dans un milieu non nutritif, c'est à dire sans substrat carboné, dans lequel les cellules vivantes sont en phase de latence diminuant ainsi leur capacité à démarrer un cycle de croissance par division cellulaire. Ceci nous permet de considérer le fait que les paramètres géométriques mesurés dans le chapitre III sur les cellules bactériennes en suspension correspondent aux caractéristiques des bactéries qui se présentent à l'entrée du pore lors de l'expérience de filtration. L'ajout de l'antibiotique dans le milieu de filtration est réalisé comme décrit dans le chapitre II.

La valeur du paramètre λ est obtenue en calculant le rapport entre le diamètre moyen de pores des membranes et le diamètre de la bactérie. Dans le cas des deux bacilles, la plus petite dimension du microorganisme est employée pour évaluer le paramètre λ car il représente le cas le plus défavorable vis-à-vis de la rétention par un mécanisme d'exclusion stérique.

Souche	Forme	Gram	Dimension (µm)	Volume cellulaire (μm^3)	Module de Young (kPa)	Epaisseur du peptidoglycane (nm)	Potentiel zêta (mV)
E. coli	bacille	-	0,91x2,04	1,1	539	6,4[1]	-16,23[3]
P. aeruginosa	bacille	-	0,79x1,63	0,67	521	2,4[1]	-17,4[3]
S. aureus	coque	+	0,74	0,21	748	15-30[2]	-21,5[3]

Figure IV.1 : Rappel des principales caractéristiques morphologiques et nanomécaniques des souches modèles sélectionnées.
Références : [1]Matias 2003, [2]Volmer 2008, [3]Lebleu 2007.

Il est important de noter qu'un des aspects critiques de la filtration (stérilisante) n'est pas pris en compte dans notre étude : la déformation de cellules à l'entrée d'un pore entraine potentiellement une altération ou un déchirement de la paroi cellulaire du fait des fortes contraintes de cisaillement locales générées par la filtration (Franken 1990). Une rupture de la paroi cellulaire peut selon les cas provoquer la mort du microorganisme, avoir pour conséquences de relarguer l'ensemble des composés cytoplasmiques dans le perméat ou encore de diminuer les capacités de croissance des cellules endommagées (Ghayeni 1999). Une diminution des capacités de croissance d'un microorganisme ne signifie pas nécessairement qu'il est mort ou inactivé de manière irréversible. Il a été démontré que la chloration de l'eau destinée à la consommation entraine une incapacité à croitre des bactéries coliformes sur certains milieux de croissance et que différents pathogènes peuvent retrouver la capacité de se multiplier après leur transport jusqu'aux points de distribution (McFeters 1986). Le protocole employé dans notre étude sous-estime donc potentiellement le nombre de cellules présentes dans le perméat après une filtration puisque nous avons uniquement dénombré les cellules revivifiables par culture sur milieu nutritif à 37°C. L'analyse de composés toxiques (endotoxines et exotoxines) présents dans le perméat et issus d'une rupture de la paroi et de la libération du cytoplasme des cellules pourrait être envisagée mais s'avère potentiellement complexe du fait des faibles concentrations à doser.

Pour rappel, les échantillons de perméat sont collectés après la filtration de 50 mL de suspension bactérienne et sont ensuite dilués puis ensemencés. Enfin, le nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) est évalué, en duplicat, après 24 h d'incubation à

37 °C pour mesurer les concentrations bactériennes dans l'alimentation et le perméat produit. Pour chaque condition testée, les résultats sont présentés sous la forme d'une concentration moyenne calculée à partir des résultats obtenus lors de trois expériences indépendantes.

A.2. Résultats expérimentaux

Dans cette partie, nous allons étudier les variations du transfert bactérien en fonction des caractéristiques de la souche filtrée (cf. Chapitre III), de la concentration bactérienne de l'alimentation, de la pression transmembranaire appliquée et de la présence d'un antibiotique dans la suspension.

A.2.1. Effet de la taille des pores

Lorsque les expériences de filtration sont réalisées sur des membranes ispores de 0,22 µm dans les conditions définies pour ce chapitre, les fuites observées sont trop faible pour révéler un effet des paramètres étudiés. Alors tous les résultats expérimentaux présentés dans ce chapitre ont été obtenus sur des membranes isopores de 0,4 µm de diamètre de pore.

A.2.2. Etude de l'effet de la souche bactérienne

Les résultats obtenus pour les trois souches étudiées sont présentés Figure IV.2 et permettent de mettre en évidence deux types de comportements spécifiques à la forme ou au caractère Gram des cellules bactériennes. Même si notre plan de manipulation ne nous permet pas de distinguer lequel de ces deux paramètres joue un rôle prépondérant dans le transfert des cellules biologiques (les deux bactéries à Gram négatif ont la forme de bacille alors que la souche à Gram positif sélectionnée a la forme de coque), grâce aux travaux disponibles dans la littérature (cf. Chapitre I), nous savons que la structure de la paroi cellulaire (épaisseur de la couche de peptidoglycane et élasticité de la paroi cellulaire) gouverne l'aptitude au transfert des bactéries, et non la forme de la cellule bactérienne. Ce résultat est confirmé à nouveau par nos travaux puisque la souche *S. aureus* présente la meilleure rétention par la membrane (ou le transfert le plus faible) alors qu'elle possède un diamètre proche voire inférieur à la plus petite dimension des deux autres germes testés. Ainsi, les deux souches à Gram négatif transfèrent toujours de manière plus importante que la souche à Gram positif.

.

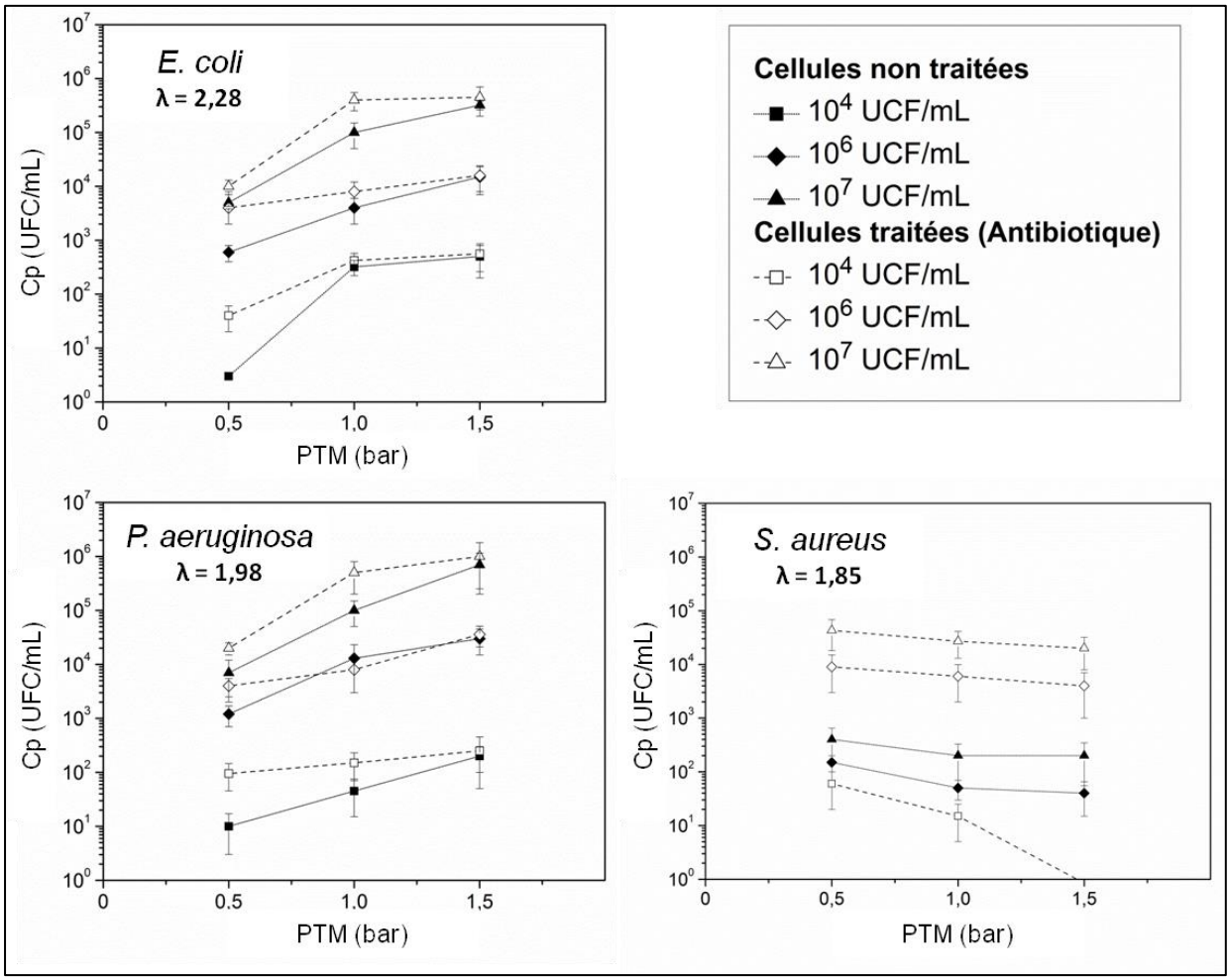


Figure IV.2 : Evolution de la concentration bactérienne dans le perméat (Cp) en fonction de la pression transmembranaire appliquée (PTM) lors de filtration de suspensions bactériennes de concentration croissante (voisine de 10^4, 10^6 et 10^7 UFC/mL) sur membranes neuves. Les résultats pour les trois souches sont présentés pour des suspensions non traitées ou traitées par ajout de l'antibiotique sélectionné à la concentration CMI/2.

Ensuite, lorsque l'on compare deux souches déformables, c'est-à-dire les deux germes à Gram négatif, nos résultats démontrent que les dimensions des cellules bactériennes jouent incontestablement un rôle sur le transfert à travers la membrane. En effet, les cellules de *P. aeruginosa* possèdent la plus petite dimension pour une élasticité de la paroi cellulaire proche de celle de la souche *E. coli.* C'est donc la souche aux dimensions cellulaires les plus petites, ici *P. aeruginosa*, qui présente globalement le transfert le plus important même si les écarts restent faibles.

A.2.3. Etude de l'effet de la concentration bactérienne de l'alimentation

Afin d'évaluer l'impact de la concentration en bactéries d'une suspension sur le transfert des cellules, les essais sur membranes isopores neuves ont été réalisés à trois concentrations : 10^4, 10^6 et 10^7 UFC/mL.

Les résultats présentés sur la Figure IV.2 démontrent que, pour un volume filtré faible, l'augmentation de la concentration de la suspension entraine une augmentation importante du nombre de cellules qui transfèrent et cela pour les trois souches étudiées. Ce résultat est bien évidemment lié au fait que la probabilité de rencontre entre une cellule et un pore membranaire augmente avec la concentration de la suspension bactérienne.

A la concentration d'étude la plus faible (10^4 UFC/mL), les deux souches à Gram négatif sont retrouvées dans le perméat après la filtration d'un volume de 50 mL de suspension. A l'inverse, le germe à Gram positif, *S. aureus*, est absent du fluide filtré (sauf si la suspension est mise en contact avec l'Amoxicilline - cf. paragraphe A.2.5.): les points expérimentaux correspondant ne sont pas portés sur le graphique du fait de l'échelle logarithmique. Cette différence de rétention entre les souches à Gram négatif et positif pour une faible concentration de la suspension d'alimentation correspond parfaitement aux observations et aux conclusions de travaux antérieurs (Lebleu et al., 2009).

Lorsque la concentration bactérienne de la suspension de *S. aureus* est supérieure ou égale à 10^6 UFC/mL, une contamination non négligeable en cellules viables est observée dans le perméat. Celle-ci reste, cependant, toujours plus faible que lors de la filtration des deux souches à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*).

A.2.4. Etude de l'effet de la pression transmembranaire

La pression transmembranaire appliquée aux procédés de filtration est l'un des paramètres opératoires qui gouvernent la productivité et la sélectivité du procédé. La pression transmembranaire apporte l'énergie mécanique nécessaire au transfert du fluide à travers la membrane et participe donc à fournir l'énergie à la cellule bactérienne présente à l'entrée d'un pore pour permettre son transfert.

Nous avons donc cherché à déterminer l'évolution de la rétention en fonction de la pression transmembranaire sur une gamme qui couvre celle en microfiltration industrielle. Comme présenté sur la Figure IV.2, pour les deux souches à Gram négatif, l'augmentation de la pression transmembranaire entraine une importante augmentation du transfert entre les deux pressions testées de 0,5 et 1 bar. Au-delà de 1 bar, l'impact de la pression transmembranaire semble s'atténuer progressivement, et le transfert de cellules se stabilise autour d'une valeur maximale qui est fonction de la concentration dans la suspension d'alimentation.

Concernant la souche *S. aureus*, les variations de pression n'ont pas le même effet. Dans la gamme étudiée, le transfert de la souche à Gram positif décroit légèrement lorsque la pression transmembranaire appliquée est augmentée. Ce résultat qui est en opposition avec les résultats obtenus pour les bacilles à Gram négatif sera discuté dans le paragraphe A.3.

A.2.5. Etude de l'effet d'un antibiotique

Nous avons démontré l'impact de la présence d'un antibiotique en solution au contact des bactéries sur les propriétés nanomécaniques des parois cellulaires grâce aux expériences menées par AFM sur cellules vivantes, travaux décrits dans le Chapitre III.

Dans le cadre de notre étude, l'exposition à un antibiotique pendant une durée courte (τ : 90 min) et à une concentration faible (CMI/2) entraine pour les trois souches étudiées une diminution du module de Young, module qui correspond à l'élasticité de la paroi membranaire des cellules vivantes. Cette diminution de l'élasticité des parois cellulaires se traduit expérimentalement par l'augmentation du transfert de cellules à travers la membrane de filtration comme le démontrent les différents résultats présentés Figure IV.2.

Pour les trois souches bactériennes, en présence d'antibiotique, les transferts de cellules viables à travers la membrane sont globalement amplifiés par rapport à la condition témoin. Cette différence de rétention est toujours plus importante à la pression transmembranaire la plus faible (0,5 bar). Avec l'augmentation de la pression, l'effet sur le transfert de l'exposition à l'antibiotique est diminué pour les deux souches à Gram négatif : malgré le fait que la paroi des souches de *E. coli* et *P. aeruginosa* soit exposée respectivement à l'Amoxicilline et la Ticarcilline, aucune amplification significative du transfert et donc de la concentration bactérienne dans le perméat n'est observée à la plus forte pression testée (1,5 bar). Le comportement des suspensions de *S. aureus* au contact de l'Amoxicilline est différent. Le transfert est nettement accru puisque la souche à Gram positif passe d'un caractère rigide à déformable ce qui a pour conséquence de diminuer significativement la rétention de ce type de cellules. A la concentration étudiée la plus faible (10^4 UFC/mL), alors que la suspension de *S. aureus* était totalement retenue sans exposition à l'antibiotique, le traitement par l'amoxicilline se traduit par un passage de *S. aureus* à travers des pores membranaires de 0,4 µm. Aux concentrations supérieures et sur la gamme de pressions testée, la suspension de *S. aureus* modifiée présente un transfert du même ordre de grandeur que ceux obtenus pour les bactéries à Gram négatif pour des conditions expérimentales identiques. Enfin, la différence de transfert entre les conditions témoins et après exposition à l'antibiotique ne diminue pas avec l'augmentation de la pression transmembranaire comme observé pour les bactéries à Gram négatif.

A.3. Discussion

Les résultats présentés dans ce chapitre démontrent qu'un transfert de bactéries peut être observé à travers des pores de plus petites dimensions que le microorganisme. Deux comportements ont été révélés en fonction du type de Gram de chacune des souches étudiées. Les propriétés de surface des bactéries telles que le potentiel zêta ou le caractère hydrophile des cellules pourraient être à l'origine de cette différence. Cependant, rappelons que les suspensions sont préparées dans de l'eau physiologique (NaCl 9 g/L), dont la force ionique élevée écrante fortement les interactions électrostatiques. Concernant le caractère hydrophile des souches modèles, le classement proposé par Lebleu (Lebleu, 2007) ne permet pas d'expliquer les résultats obtenus dans des conditions opératoires identiques.

Alors, seule la différence d'aptitude à la déformation des cellules bactériennes doit être considérée pour exploiter les résultats. Les souches à Gram négatif sont facilement déformables et de ce fait susceptibles de traverser des pores de taille inférieure à leurs plus petites dimensions. Ainsi, même pour les conditions opératoires testées les moins favorables à un transfert (faible concentration de l'alimentation : 10^4 UFC/mL, faible pression transmembranaire : 0,5 bar et en l'absence d'antibiotique), les germes à Gram négatif sont retrouvés dans la phase perméat. De plus, le caractère déformable de ces cellules se traduit expérimentalement par deux observations spécifiques. La contamination du perméat augmente avec la concentration de l'alimentation et la pression transmembranaire appliquée au procédé. Enfin, lorsque l'on compare deux souches à Gram négatif aux caractéristiques structurales similaires comme *E. coli* et *P. aeruginosa*, nous pouvons noter que le paramètre λ (c'est-à-dire l'encombrement stérique à l'entrée du pore) gouverne l'aptitude au transfert du microorganisme à travers la membrane. En effet, la souche *P. aeruginosa* (λ=1,98) transfère plus que la souche *E. coli* (λ=2,28) pour des conditions de filtration identiques. La souche à Gram positif utilisée pour nos essais (*S. aureus*) présente un caractère de type rigide. A l'inverse des germes à Gram négatif, la souche *S. aureus* ne démontre aucune contamination du perméat à la plus faible concentration de l'alimentation testée (10^4 UFC/mL) et cela même si la pression transmembranaire est importante (1,5 Bar). Toutefois, aux concentrations de l'alimentation supérieures étudiées (10^6 UFC/mL et 10^7 UFC/mL), un transfert non négligeable de cellules de *S. aureus* est observé dans le perméat après la filtration d'un volume de 50 mL de suspension bactérienne. Même si la concentration de *S. aureus* quantifiée dans la phase perméat est toujours plus faible en comparaison des concentrations obtenues pour les deux souches à Gram négatif, ce résultat signifie néanmoins que les cellules de *S. aureus* ont également la capacité de traverser des pores de 0,4 µm par déformation. En effet, les autres causes ont été écartées dans la Chapitre III : nous pouvions craindre que l'augmentation de la concentration en bactéries dans l'alimentation entraîne l'augmentation du nombre de cellules de plus petites dimensions par rapport aux dimensions moyennes mesurées par microscopie sur une population de 30 individus. Hors, il a été démontré que les dimensions cellulaires d'une population de *S. aureus* s'étalent de 0,5 à 1,1 µm. Ainsi, le diamètre de la plus petite cellule de *S. aureus* n'est jamais inférieur à 0,4 µm. D'autre part, l'augmentation de la concentration de la suspension bactérienne se traduit par l'amplification du taux de recouvrement de la surface de

la membrane par les cellules et donc de la probabilité qu'une cellule rencontre un défaut de structure qui pourrait être présent sur le matériau filtrant. Cette dernière hypothèse ne peut pas être retenue puisque la caractérisation des membranes isopores, réalisée dans ce travail, et la mise en œuvre d'étapes de contrôle d'intégrité ont permis d'écarter la manipulation de coupons présentant des défauts de structure. Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Lebleu et al., 2009; Onyango et al., 2010) qui ont démontré la capacité de *Staphylococcus* à se déformer pour traverser des pores membranaires avec un taux de transfert toujours très faible en comparaison d'autre souches.

Concernant l'évolution du transfert de la souche à Gram positif en fonction de la pression transmembranaire, les cellules de *S. aureus* présentent une nouvelle fois un comportement différent. En effet, l'augmentation de la pression appliquée n'est pas corrélée à une augmentation du transfert : les résultats expérimentaux démontrent même le phénomène inverse puisque la rétention croît légèrement avec la pression transmembranaire appliquée. Cette observation pourrait être expliquée par différentes hypothèses. La première est liée au comportement collectif de la souche *S. aureus* en suspension qui, comme nous l'avons présenté dans le Chapitre III, a une tendance forte à former des agrégats cellulaires. La formation d'agrégats peut subvenir pendant les phases de mise en suspension et d'incubation des microorganismes qui précèdent la filtration, phénomène que nous avons écarté en condition témoin grâce aux résultats présentés dans le paragraphe B.1 du Chapitre III, mais aussi pendant l'expérience de filtration elle-même puisque des phénomènes de turbulences liés à l'hydrodynamique du système sont nécessairement présents au voisinage du filtre au cours d'une filtration frontale sous pression. Nous pouvons aisément supposer que l'augmentation de la pression transmembranaire appliquée à la filtration et donc des lignes de courant à l'approche des pores va amplifier la formation d'agrégats. L'existence de ces agrégats cellulaires en surface du filtre a potentiellement pour effet d'améliorer la sélectivité stérique du procédé membranaire. La seconde hypothèse est liée au fait que l'augmentation de la pression appliquée dans la gamme étudiée (0,5 à 1,5 bar) ne suffit pas à agir sur la déformation des cellules à Gram positif de manière suffisante pour qu'un effet significatif sur le transfert soit mesurable. A l'inverse, nous pouvons supposer qu'une augmentation de la pression contribue au blocage d'un certain nombre de pores à la surface des quels une bactérie se présente. Ce dernier point permettrait d'expliquer

la chute de la concentration mesurée dans le perméat lorsque la pression transmembranaire appliquée augmente.

Concernant plus spécifiquement l'impact de la composition du milieu de filtration sur la sélectivité, chaque étude expérimentale disponible dans la littérature utilise un fluide aux caractéristiques physico-chimiques propre à l'étude, ce qui entraine l'observation de cellules de tailles variables selon les articles. Ce point déterminant permet la manipulation de cellules de plus petites dimensions en comparaison des tailles cellulaires observées en phase de croissance (Cavicchioli 2003). Dans notre étude, toutes les souches bactériennes sont mises en suspension dans de l'eau physiologique stérile : un milieu sans nutriment et pauvre en source carboné (COT < 0,5 mg/mL).

La présence d'un agent chimique, tel qu'un antibiotique, dans le milieu filtré a pour effet de modifier les caractéristiques structurales des cellules en suspension et peut entrainer une diminution de la rétention membranaire lors du procédé de filtration. Ces deux points sont abordés dans nos travaux : les modifications des propriétés nanomécaniques de la paroi liées à l'exposition à un antibiotique ont été étudiées dans le Chapitre III par AFM et l'analyse du comportement en filtration des souches modifiées par l'action d'un antibiotique est présentée dans cette partie du projet. Nos résultats démontrent que la présence d'un antibiotique (de la famille des bêta-lactamines), à une dose non létale, dans le fluide filtré peut favoriser le transfert des cellules au travers des pores submicrométriques. En effet, pour les trois souches étudiées, l'antibiotique a pour effet d'augmenter les concentrations bactériennes mesurées dans la phase perméat après la filtration d'un volume de 50 mL de suspension. Ces résultats expérimentaux sont corrélés aux observations des propriétés nanomécaniques des parois bactériennes : une diminution du module de Young mesurée par AFM pour les trois souches en présence d'un antibiotique a été observée. Cet effet est dû, comme nous l'avons vu précédemment, à une diminution de la rigidité des parois cellulaires. Pour les deux souches à Gram négatif, l'impact de l'antibiotique sur le transfert de bactéries s'atténue avec l'augmentation de la pression transmembranaire. Il semble donc qu'à partir d'une certaine pression appliquée, le transfert de bactéries à Gram négatif ne dépende plus des propriétés pariétales des cellules mais de la probabilité de rencontre entre une bactérie et un pore (directement corrélée à la concentration de l'alimentation) pour des conditions identiques par ailleurs (même valeur de λ).

A l'inverse, l'amplitude du transfert de la souche à Gram positif modifié par l'antibiotique est fortement augmentée par rapport aux conditions témoins (sans antibiotique) sur toute la gamme de pressions transmembranaires testée. De plus, comme pour la condition témoin, le transfert n'augmente pas avec la pression appliquée alors que le caractère déformable des cellules de *S. aureus* exposées à l'antibiotique (YM = 279 kPa) est plus marqué que celui de *E. coli* après traitement antibiotique (YM = 330 kPa). Ce résultat confirme le fait que lors de la filtration d'une bactérie à Gram négatif, la tension de surface de la cellule n'est pas le seul paramètre qui peut s'opposer à sa déformation. Ce dernier point sera repris et discuté dans le dernier paragraphe de ce chapitre.

Les différents paramètres opératoires étudiés ont démontré un effet sur l'amplitude du transfert de microorganismes à travers une membrane neuve. Depuis de nombreuses années déjà, un grand nombre de travaux s'intéresse à la définition de tests de rétention et de performance de filtres (cf. Chapitre I). Cependant, une très grande variété de matériels (type de membranes et matériaux, pilotes de filtration, cellules vivantes), de protocoles (filtration frontale ou tangentielle, filtre seringue, volume filtré, pression transmembranaire), de méthodes utilisées pour cultiver les microorganismes et les placer en suspension (culture en milieu solide, liquide, bioréacteur, milieux et temps d'incubation variés) sont sélectionnés pour réaliser ces tests. Les recommandations normalisées internationales fournissent une base opératoire solide pour évaluer les performances d'une membrane. La norme ASTM-F838-05, l'un des documents les plus récents dédiés au contrôle d'un filtre stérilisant, précise plus spécifiquement les conditions et le protocole opératoires à maitriser pendant le test expérimental. C'est pourquoi, notre protocole s'appuie en grande partie sur les différents paramètres définis dans ce texte comme nous l'avons justifié dans le Chapitre II. Les ajustements que nous avons imposés au protocole standardisé portent principalement sur la méthode de préparation de l'échantillon biologique. Le choix effectué dans la plupart des travaux antérieures est de modifier les conditions de croissance afin de générer des bactéries aux propriétés différentes. Dans notre travail, nous avons souhaité standardiser la production des cellules vivantes pour les modifier dans un second temps et ensuite évaluer leur comportement en filtration dans de nouvelles conditions physicochimiques. Obtenus dans des conditions physiologiques relativement peu favorables à multiplication

cellulaire, nos résultats permettent de définir des conditions opératoires critiques pour lesquelles le transfert de bactéries par déformation est favorisé:

- utilisation d'une membrane peu colmatée (une membrane neuve ou après un cycle de nettoyage/rétrolavage) : avant la mise en place d'un dépôt de particules à la surface de la membrane (démonstration expérimentale dans le Chapitre V),

- un fluide filtré à faible valeur de CODB (Carbone Organique Dissous Biodégradable) et pauvre en nutriment ce qui provoque, par carence, une diminution des dimensions des microorganismes en suspension,

- une pression transmembranaire appliquée au procédé de filtration qui dépend des objectifs opérationnels.

Enfin, l'un des paramètres majeurs qui détermine le transfert de bactéries par déformation demeure l'état physiologique des cellules en suspension qui dépend du temps de contact entre la cellule (ou une population de cellules) et son environnement. Pour nos travaux, ce temps de contact (τ) a été fixé à 90 min pour toutes les préparations des suspensions bactériennes destinées aux expériences de filtration (cf. Chapitre II). Pendant cette période, aucune mortalité significative des bactéries en suspension n'a été observée. Néanmoins, comme discuté dans le Chapitre III, il pourrait s'avérer intéressant de faire varier ce paramètre, dans le but de préciser l'évolution du transfert de cellules à travers une membrane, en fonction de l'état physiologique et des propriétés morphologiques des cellules bactériennes présentes en suspension dans le fluide filtré.

Partie B. Description du mécanisme de sélectivité spécifique aux bactéries déformables

Comme présenté dans le chapitre introductif, un nombre important de travaux démontre le caractère déformable des cellules vivantes. Les globules rouges, les érythrocytes ou encore les bactéries et les levures sont susceptibles, sous l'action d'une contrainte extérieure, de se déformer de manière non négligeable. L'ensemble des résultats expérimentaux présentés dans ce chapitre démontre pour sa part le comportement spécifique des bactéries en filtration : certaines d'entre elles sont susceptibles de se déformer à l'entrée d'un pore et donc de passer à travers la membrane filtrante. Comme nous l'avons détaillé, l'amplitude de ce transfert est dépendant de nombreux paramètres tels que la pression transmembranaire, la concentration de la suspension bactérienne filtrée, mais aussi les propriétés morphologiques et structurales des microorganismes qui sont potentiellement modifiées par les caractéristiques physico-chimiques du milieu et les conditions environnementales appliquées à une étape de filtration.

D'après nos résultats, un mécanisme de sélectivité basé sur l'aptitude à la déformation des microorganismes doit être employé. En effet, les mécanismes de sélectivité classiquement mentionnés tels l'exclusion par la taille ou par la charge ne permettent pas, dans les conditions opératoires étudiées, d'expliquer les fuites de bactéries observées dans la phase perméat.

Dans le cas où la bactérie se trouve à l'entrée du pore, elle est soumise aux forces de cisaillement et de trainée engendrées par le flux de perméat qui est provoqué par le gradient de pression transmembranaire appliqué au procédé de filtration. Dans les conditions expérimentales testées dans ce chapitre, une bactérie présente à l'entrée d'un pore cylindrique de diamètre 0,4 µm peut subir une déformation importante qui lui permettra de pénétrer à l'intérieur du pore et de migrer à travers la membrane contaminant ainsi la phase perméat. Ce processus de déformation peut être succinctement schématisé comme présenté Figure IV.3. Nous avons cherché à le décrire à l'aide d'un modèle théorique simplifié reliant les propriétés de la cellule à sa rétention.

B.1. Approche théorique

L'approche théorique que nous avons développée a pour objectif de relier le comportement macroscopique des bactéries (en termes de rétention) au cours d'une filtration frontale à des informations microscopiques caractéristiques de la morphologie et de l'élasticité des cellules en suspension.

Dans le cas où le procédé est gouverné par un mécanisme de sélectivité basé sur la déformation, deux développements peuvent théoriquement être envisagés lors du transfert d'une cellule viable à travers un pore membranaire. D'une part, il est possible de considérer que le microorganisme s'étire et que sa surface augmente jusqu'à adopter la forme du pore membranaire, d'autre part nous pouvons supposer que la cellule bactérienne se vide d'une partie de son liquide intracellulaire entrainant une diminution de son volume cytoplasmique ce qui rend alors possible son entrée dans le pore.

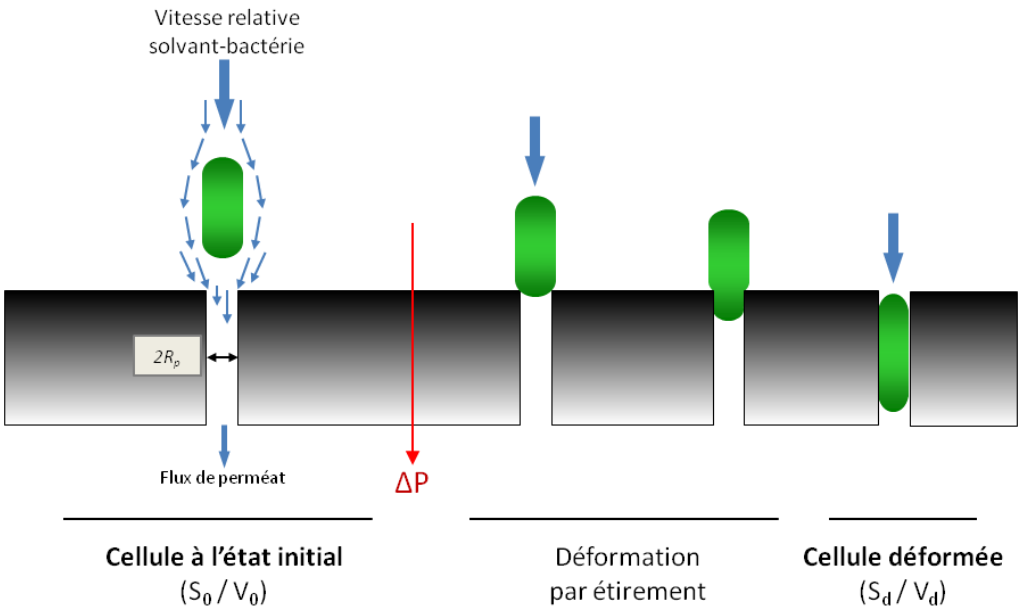


Figure IV.3 : Schéma du transfert par déformation d'une cellule bactérienne de forme bacille à travers un pore membranaire sous l'action du flux de filtration imposé par la différence de pression transmembranaire.

Pour la mise en place de notre approche théorique, nous avons considéré que la déformation subie par le microorganisme au cours de son transfert résulte principalement d'un mécanisme d'étirement de la paroi cellulaire sans variation de volume. La bactérie est définie dans son état initial par le couple surface/volume (S_0/V_0) déterminé par une longueur L_0 et un rayon R_0. Puis une fois à l'intérieur du pore membranaire, la cellule adopte une nouvelle forme dépendant de la géométrie du pore cylindrique. Les nouvelles dimensions de la cellule bactérienne, présente à l'intérieur d'un pore de rayon R_p, sont définies par le couple S_d/V_d déterminé par une longueur L_d et un rayon R_d.

Afin de mettre en relation l'ensemble des paramètres qui influencent le transfert de microorganismes déformables, différentes hypothèses ont été employées dont certaines seront validées par la suite :

- (1) à l'état physiologique en suspension et avant la phase de déformation, les bactéries de type bacille sont représentées sous une forme sphérocylindrique (deux hémisphères et un cylindre) et les bactéries de type coque sous la forme d'une sphère ;
- (2) lors de son transfert à travers la membrane, la cellule bactérienne ne dépasse pas du pore membranaire coté perméat, ainsi sa forme à l'intérieur du pore peut être représentée sous une forme sphérocylindrique (soit $L_d<L_m$ avec L_m l'épaisseur de la membrane de filtration cf. Chapitre III) ;
- (3) la surface des cellules bactériennes est définie comme un matériau élastique qui possède une limite à l'étirement de l'ordre de 300% (soit le rapport S_d/S_0 <3). En effet, (Koch and Woeste, 1992) ont étudié les propriétés mécaniques de la saccule d'*E. coli* (capsule de peptidoglycane extraite de la bactérie et isolée) et ont déterminé que ce type de capsule biologique pouvait s'étendre ou rétrécir d'un facteur trois sans rupture.
- (4) la déformation des cellules bactériennes s'effectue par étirement : le volume des cellules bactériennes est constant alors que la surface cellulaire augmente durant les phases de déformation et de transfert à travers la membrane ($V_0 = V_d$);
- (5) la cellule déformée présente à l'intérieur du pore membranaire occupe l'intégralité de l'espace disponible (soit $R_d = R_p$).

Dans le cas d'une bactérie à la forme d'un bacille, les termes S_0 et V_0 correspondant respectivement à la surface et au volume initial de la bactérie en suspension sont définis de la façon suivante :

$$S_0 = 4\pi R_0^2 + 2\pi R_0 L_0 \qquad \text{Eq IV.1}$$

$$V_0 = \frac{4}{3}\pi R_0^3 + \pi R_0^2 L_0 \qquad \text{Eq IV.2}$$

Lorsque la bactérie a subi une déformation pour pénétrer à l'intérieur d'un pore de rayon R_p et d'après l'hypothèse (5), la surface et le volume de la cellule déformée deviennent S_d et V_d définis par :

$$S_d = 4\pi R_p^2 + 2\pi R_p L_d \qquad \text{Eq IV.3}$$

$$V_d = \frac{4}{3}\pi R_p^3 + \pi R_p^2 L_d \qquad \text{Eq IV.4}$$

Cette déformation qui est imposée par les forces de pression à l'entrée du pore s'effectue, d'après notre hypothèse (4), sans variation du volume de la cellule bactérienne, on obtient donc l'égalité suivante :

$$V_0 = V_d$$

Soit

$$\frac{4}{3}\pi R_0^3 + \pi R_0^2 L_0 = \frac{4}{3}\pi R_p^3 + \pi R_p^2 L_d \qquad \text{Eq IV.5}$$

Qui permet d'obtenir la longueur L_d de la bactérie à l'intérieur du pore :

$$L_d = \frac{\frac{4}{3}(R_0^3 - R_p^3) + R_0^2 L_0}{R_p^2} \qquad \text{Eq IV.6}$$

En combinant les équations (IV.3) et (IV.6), on obtient l'expression de la surface S_d de la bactérie une fois à l'intérieur du pore en fonction de paramètres connus que sont les dimensions de la cellule à l'état initial et les dimensions du pore membranaire :

$$S_d = \frac{1}{R_p}\left(\frac{4}{3}\pi R_p^3 + \frac{8}{3}\pi R_0^3 + 2\pi R_0^2 L_0\right) \qquad \text{Eq IV.7}$$

Le même raisonnement est employé pour la souche *S. aureus* à la différence que celle-ci passe d'une géométrie initiale sphérique à la forme shéprocylindrique à l'intérieur du pore membranaire. Dans ce cas, les dimensions de la souche L'_d et S'_d s'expriment :

$$L'_d = \frac{\frac{4}{3}(R_0^3 - R_p^3)}{R_p^2} \qquad \text{Eq IV.8}$$

$$S'_d = \frac{1}{R_p}\left(\frac{4}{3}\pi R_p^3 + \frac{8}{3}\pi R_0^3\right) \qquad \text{Eq IV.9}$$

La connaissance de la valeur de S_d permet d'évaluer le facteur de déformation cellulaire noté D, qui normalise la différence entre la surface de la cellule à l'état initial en suspension et la surface de la cellule une fois dans le pore, il est défini par la relation suivante:

$$D = \frac{S_d - S_0}{S_0} \qquad \text{Eq IV.10}$$

Grâce à notre hypothèse de travail (3) qui suppose que la paroi bactérienne est élastique, il est possible d'exprimer la tension T qui symbolise la tension de surface de la paroi cellulaire du microorganisme. La tension de surface T de la cellule à l'intérieure du pore est proportionnelle à la déformation subie et s'exprime par :

$$T = Kcell \cdot D = e \cdot E \cdot \frac{S_d - S_0}{S_0} \qquad \text{Eq IV.11}$$

où Kcell est le module de surface de la paroi du microorganisme qui correspond au produit de l'épaisseur de la paroi cellulaire (e) et du module de Young (E). Le terme T est ainsi déterminé par les dimensions du pore membranaire et par l'ensemble des caractéristiques morphologiques et nanomécaniques des cellules bactériennes qui sont en notre possession d'après la Figure IV.1. Dans le cas où seule la valeur de E diminue alors que l'ensemble des autres paramètres reste constant, la valeur de T est étroitement corrélée à l'élasticité de la paroi cellulaire. Le contact avec l'antibiotique présent dans le milieu de filtration aura donc pour effet de diminuer la valeur de T pour chacune des bactéries étudiées puisque, comme nous l'avons démontré, l'exposition sur un temps court et à faible dose aux bêta-lactamines entraine une diminution significative du module de Young de la paroi cellulaire

altérée des trois souches sélectionnées sans modification de leurs caractéristiques morphologiques (forme et dimensions).

La Figure IV.4 représente de manière schématique l'effet de l'exposition aux antibiotiques sur la valeur du module de surface de la paroi cellulaire de chacun des microorganismes modèles. Deux classes de microorganismes sont représentées sur ce schéma : les cellules déformables (globule rouge, bactéries à Gram négatif) sont caractérisées par une tension de surface faible à l'inverse des microorganismes rigides (levures et bactéries à Gram positif) qui sont caractérisés par une tension de surface plus élevée.

Dans les conditions expérimentales de notre étude, le traitement par l'antibiotique a pour effet de diminuer significativement la valeur de la tension de surface de la souche *S. aureus* qui passe, d'un point de vue mécanique, d'un caractère de type rigide à un caractère proche des particules déformables.

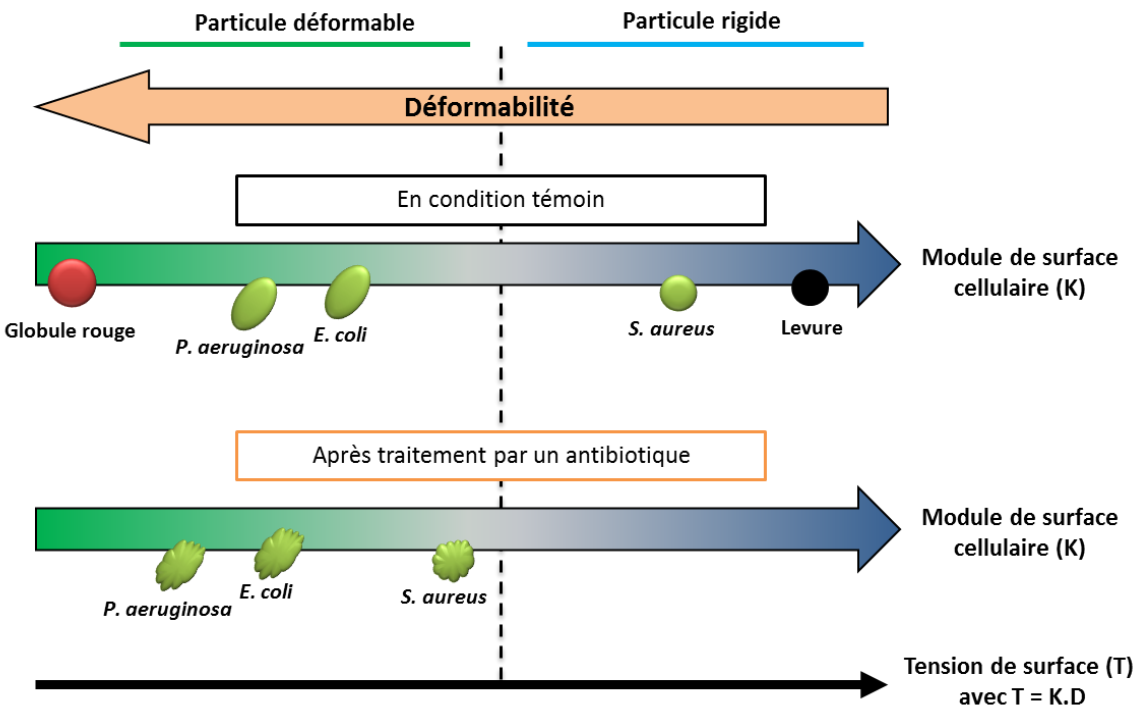


Figure IV.4 : Schéma illustrant l'effet d'une exposition à un antibiotique de type β-lactamine sur le module de surface (K) des microorganismes étudiés.
Les microorganismes sont représentés selon une échelle qui respecte l'ordre de grandeur des valeurs de tension de surface T des cellules.

Enfin, il est possible de calculer la valeur du LRV (cf. Chapitre I) pour chacun de nos résultats à partir de la concentration moyenne de la suspension d'alimentation (Ca) et de la concentration dans les 50 mL de perméat recueillis pendant l'expérience de filtration. L'intérêt du calcul du LRV réside dans le fait de pouvoir intégrer la valeur de la charge en microorganismes dans le fluide à filtrer (Ca) comme paramètre supplémentaire dans la représentation de nos résultats expérimentaux. Ainsi, nous pouvons représenter les valeurs de LRV mesurées expérimentalement (LRVexp) en fonction de la tension de surface T calculée pour chacune des trois souches dans les conditions physiologiques testées (condition témoin ou après traitement antibiotique).

B.2. Résultats numériques

Pour les trois souches étudiées, les valeurs numériques obtenues pour chacun des paramètres (L_d, T et S_d/S_0) sont résumées Figure IV.5. Ainsi, si l'on considère que l'épaisseur de la membrane isopore est égale à L_m = 20 µm (cf. Chapitre III), l'hypothèse (2) est satisfaite pour les trois souches, avec $L_d<L_m$. Par ailleurs, les rapports de surface S_d/S_0 sont bien inférieurs à 3 ce qui permet de valider l'hypothèse (3).

	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
Ld (µm)	8,7	5,2	1,8
T (10^{-3}.N/m)	2,90	0,86	10,30
S_d/S_0	1,97	1,70	1,40

Figure IV.5 : Valeurs calculées pour les paramètres Ld, T et le rapport Sd/S0.

Nous avons alors porté sur la Figure IV.6 l'évolution des LRVexp obtenus pour tous les paramètres étudiés (différentes concentrations d'alimentation Ca: 10^4, 10^6 et 10^7 UFC/mL et pressions transmembranaires PTM: 0,5 - 1 et 1,5 bar) en fonction de la tension de surface T calculée pour les trois souches modèles d'après l'équation IV.11 en contact ou non avec un antibiotique.

La valeur de T la plus faible correspond à la souche *P. aeruginosa* en contact avec la Ticarcilline (particule déformable T : $0,41.10^{-03}$ N/m), alors que la valeur de T la plus élevée représente la souche *S. aureus* en condition témoin (particule rigide T : $10,30.10^{-03}$ N/m). De cette façon, l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus en fonction des paramètres opératoires balayés dans ce chapitre (cf. Figure IV.2),

sont matérialisés sur un graphique unique. Cette représentation révèle l'augmentation des LRVexp avec la tension T, nous permettant ainsi de mettre en évidence le rôle prépondérant des propriétés pariétales des cellules bactériennes sur la sélectivité du procédé.

Néanmoins, la dispersion des points expérimentaux est encore très large puisque pour une même valeur de T calculée, plusieurs LRVexp sont obtenus en fonction des différents paramètres testés (Ca et PTM) pendant nos expériences. Nous avons alors souhaité intégrer la pression transmembranaire (PTM) comme variable dans notre représentation des résultats. Nous avons donc cherché à développer un modèle simple qui permette de quantifier le rôle que pourrait jouer la pression transmembranaire sur la déformation de la cellule. Pour cela, deux nouveaux paramètres sont définis :

- la force appliquée à une cellule bactérienne présente dans un pore membranaire cylindrique et qui induit son transfert notée Fp :

$$Fp = PTM \cdot \pi R_p^2 \qquad \text{Eq IV.12}$$

- la force liée à la tension, notée Ft, qui représente la force à apporter pour accroitre par étirement la surface de la cellule dans un pore de rayon Rp:

$$Ft = T \cdot 2\pi R_p \qquad \text{Eq IV.13}$$

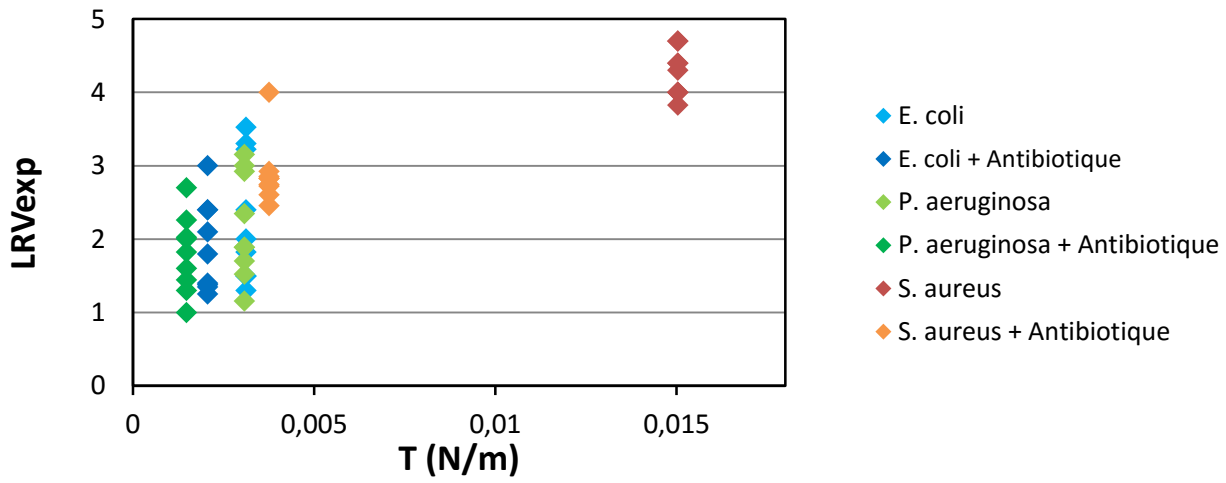


Figure IV.6 : Evolution de l'abattement expérimental pour les différentes pressions transmembranaires et concentrations d'alimentation testées en fonction de la tension de surface calculée des parois bactériennes.

Il est alors possible de calculer le rapport Ft/Fp, qui représente le rapport entre la force nécessaire à l'extension de la cellule et la force appliquée par la filtration, d'après la relation :

$$Ft/Fp = \frac{2T}{PTM \cdot R_p} \qquad \text{Eq IV.14}$$

Les nouvelles données obtenues à partir de la relation IV.14 sont portées sur la Figure IV.7 qui représente l'évolution des LRVexp en fonction des valeurs de Ft/Fp calculées pour chacune des souches modèles toutes conditions confondues.

Ce graphique permet de représenter une bien meilleure corrélation entre toutes les données expérimentales en comparaison du graphique présenté Figure V.6. Grâce à cette représentation, on peut remarquer que la sélectivité exprimée en LRV des souches à Gram négatif, qui possèdent pour toutes les conditions testées des valeurs de Ft/Fp inférieure à 1, présente une relation forte avec le rapport de forces tension/pression (Ft/Fp). A l'inverse, les points qui symbolisent les rétentions obtenues avec la souche à Gram positif *S. aureus* (points orange et rouge) ne semblent pas, graphiquement, suivre la même tendance.

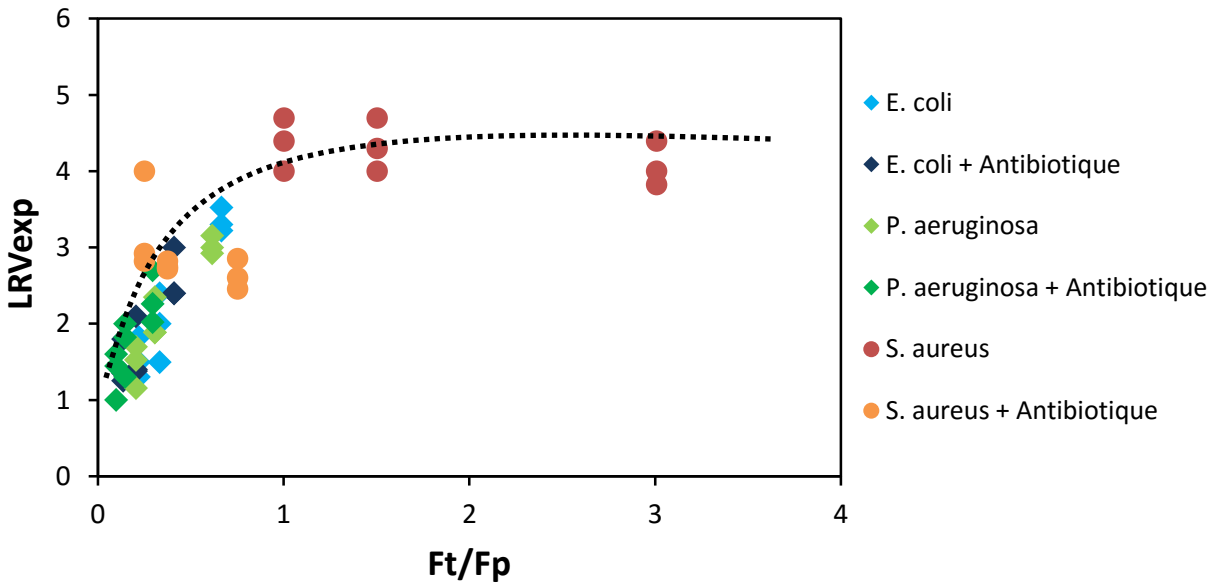
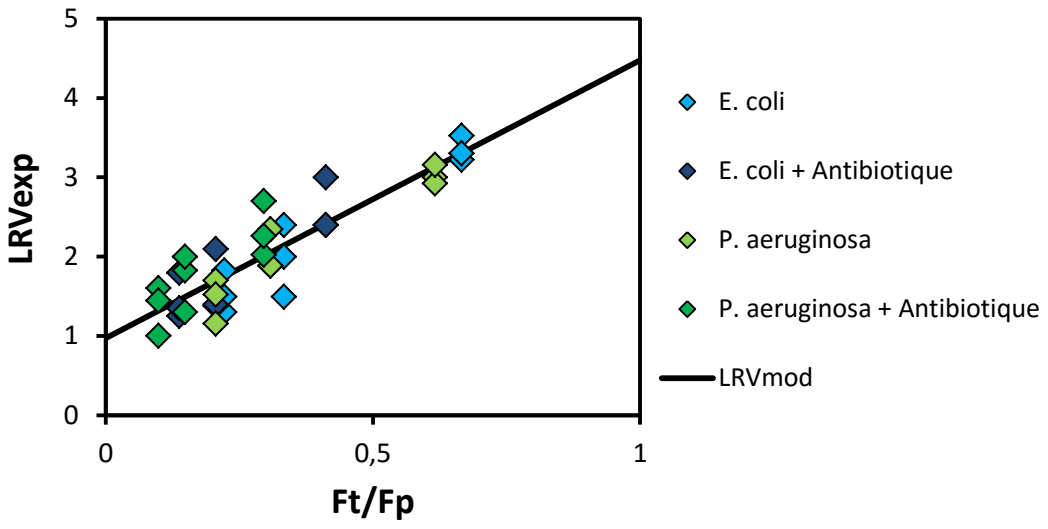


Figure IV.7 : Evolution de l'abattement expérimental en fonction du rapport Ft/Fp.
La courbe en pointillée est portée pour symboliser la tendance observée.



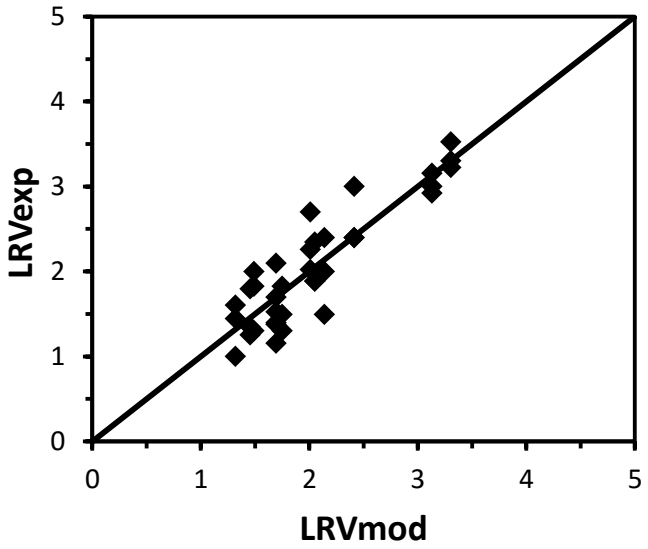


Figure IV.8 : Evolution (en haut) des LRV expérimentaux en fonction de Ft/Fp (zoom de la Figure IV.7) et comparaison (en bas) des LRV expérimentaux et calculés d'après l'équation IV.16.

En effet, pour cette souche en condition témoin le rapport Ft/Fp est supérieur à 1 pour toutes les conditions testées. Dans ce cas, le LRV est constant, ce qui peut aisément s'expliquer par le fait que la force de pression appliquée reste inférieure à la force de tension. Pour la souche *S. aureus* en contact avec l'antibiotique, le rapport Ft/Fp est inférieur à 1 tout comme les souches à Gram négatif, mais les points expérimentaux sont beaucoup plus dispersés et s'éloignent de la courbe qui représente, sur la Figure IV.7, la tendance moyenne observée.

Dans le cas des souches à Gram négatif, nous avons alors souhaité aller plus loin dans l'analyse des résultats car la probabilité de passage de la cellule semble liée au rapport de forces Ft/Fp. Dans le but de traduire ce lien qualitativement, nous avons considéré une distribution de Boltzmann pour évaluer la probabilité de passage des bactéries fonction du rapport Ft/Fp telle que :

$$\Pi = \alpha e^{-\beta \frac{Ft}{Fp}} \qquad \text{Eq IV.15}$$

avec α et ß qui sont des constantes que nous ajusterons. Ainsi, pour une valeur du rapport Ft/Fp qui tend vers zéro, c'est-à-dire pour une PTM appliquée largement supérieur à la tension T, la probabilité de passage Π est maximale et est égale à 1 ; à l'inverse, pour un rapport Ft/Fp qui tend vers 1, cas pour lequel les forces de tension et de pression sont proches, la probabilité de passage de la souche à travers le pore est nulle. De cette façon, il existe alors une valeur de force de pression Fp pour laquelle la déformation imposée à la cellule bactérienne rend le passage possible.

On suppose que l'étape limitante de ce mécanisme de sélectivité est l'introduction de la bactérie dans le pore membranaire. Une fois à l'intérieur du pore, son transfert jusqu'au perméat est assuré. La probabilité Π calculée précédemment permet de déduire l'abattement théorique (LRVmod) calculé uniquement à partir de données numériques spécifiques à la souche bactérienne filtrée et aux conditions opératoires appliquées, défini par la relation suivante :

$$LRV\text{mod} = -\log(\Pi) = -\log(\alpha e^{-\beta \frac{Ft}{F_p}}) \qquad \text{Eq IV.16}$$

Cette hypothèse est cohérente avec les résultats obtenus par Secomb et Hsu (1996) qui, lors de la simulation numérique du temps de transfert de globules rouges à travers des pores micrométriques, démontrent que le temps nécessaire à l'entrée de la cellule représente 50 à 75 % du temps total nécessaire à son passage. La Figure IV.8 permet de comparer les LRV expérimentaux mesurés lors de nos essais et les

LRV modèles calculés à partir de l'équation IV.16 pour les deux souches à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) pour toutes les conditions opératoires testées. Les paramètres α et β ont été fixés, par la méthode des moindres carrés, respectivement à 0,106 et à 8,062. Les résultats obtenus pour la souche à Gram positif *S. aureus* ne sont pas représentés ici du fait de son comportement particulier mis en évidence sur le graphique reliant le LRVexp à Ft/Fp (cf. Figure IV.7).

Pour les souches à Gram négatif, ce modèle montre que le transfert des cellules vivantes à travers la membrane peut être décrit par un phénomène étroitement corrélé au rapport de force entre la tension de la paroi bactérienne et la pression transmembranaire appliquée, car cette dernière fournit une énergie mécanique pouvant conduire à la déformation de la cellule et à son passage à travers le pore.

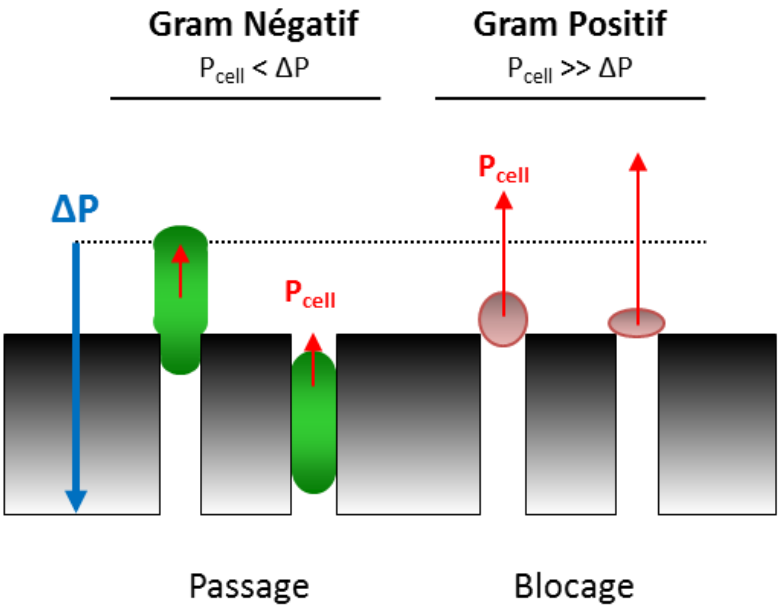


Figure IV.9 : Schéma du mécanisme de transfert des cellules bactériennes à Gram Négatif et de rétention des souches à Gram positif.

Concernant la souche à Gram positif, ce modèle ne permet pas d'expliquer les résultats et notamment le fait que la rétention des cellules rigides augmente lorsque la PTM augmente (cf. Figure IV.2). Cette différence de comportement et tout particulièrement dans les cas où Ft/Fp est inférieur à 1 (cas pour *S. aureus* après exposition à l'antibiotique) peut s'expliquer par un caractère spécifique des cellules à Gram positif non pris en compte jusque-là : la pression interne de la cellule qui peut influencer la réaction du microorganisme à la contrainte extérieure imposée. En effet, les cellules à Gram positif tel *S. aureus* possèdent une pression de turgescence

élevée (de l'ordre Pcell 4 à 6.10^5 Pa) (Yao et al., 2002)) qui pourrait limiter les phénomènes de déformation cellulaire et de compression. A l'inverse, les cellules de *E. coli* possèdent une pression de turgescence beaucoup plus faible (Pcell 0,1 à 2.10^5 Pa) ce qui ne serait pas un paramètre limitant à la déformation de la cellule (cf. Figure IV.9 – à gauche). Ainsi, dans le cas où la pression de turgescence, Pcell, est élevée (cf. Figure IV.9 – à droite) et supérieure à la pression appliquée (Pcell > ΔP), il est probable que la pression interne ne permette pas la déformation de la cellule : le passage à travers la membrane de filtration est bloqué. La rétention pourrait même s'amplifier lorsque la pression appliquée augmente conduisant à un aplatissement de la cellule à l'entrée du pore.

Notre modèle permet de traduire le comportement collectif d'une population de cellules à Gram négatif en termes de transfert par déformation à travers la membrane grâce à une approche simple. A partir d'informations telles que la pression transmembranaire et la tension de surface des cellules bactériennes, il est possible d'anticiper l'amplitude du transfert. Le comportement spécifique des souches à Gram positif qui n'est pas expliqué par notre modèle confirme l'existence d'un mécanisme de sélectivité différent pour ce type de cellule. Des expériences complémentaires devront être envisagées afin d'observer les effets de la pression transmembranaire sur ce type de bactéries (comportement individuel et collectif sous contrainte d'origine hydrodynamique).

Conclusion

Le transfert de microorganismes à travers des membranes filtrantes dont les pores sont de plus petit diamètre que les dimensions des cellules bactériennes est un phénomène observé depuis plusieurs années. Le mécanisme de sélectivité stérique communément envisagé lors de l'utilisation d'un procédé de filtration notamment en MF et UF ne s'applique donc pas aux cellules vivantes qui sont déformables. La conséquence de ce comportement est la diminution progressive, au cours des années (cf. Chapitre I), de la taille de pore employée en vue d'une filtration stérilisante : la norme ASTM préconise l'usage d'un filtre de taille de pore 0,22 µm et malgré cela, il a été démontré qu'une souche de forme spiralée telle que *H. gracilis*, qui possède une plus petite dimension de 0,20 µm, peut traverser des pores de 0,1 µm (Wang et al., 2008).

Les paramètres opératoires tels que la pression transmembranaire ou la concentration bactérienne de l'alimentation sont deux éléments qui impactent sur le transfert de bactéries déformables. Néanmoins ce sont les caractéristiques structurales des cellules couplées aux données de l'élasticité de la paroi cellulaire qui déterminent le mécanisme de sélectivité spécifique aux cellules vivantes déformables. En effet, en présence d'un antibiotique qui altère les propriétés mécaniques des parois des cellules bactériennes en diminuant leur rigidité, nous avons observé une amplification de la contamination de la phase perméat. Nos résultats démontrent une relation forte entre l'abattement expérimental de la membrane (le LRV) et la valeur de la tension de surface calculée à l'aide d'un modèle numérique simplifié pour les trois souches étudiées. La tension de surface, comme nous l'avons décrite, est exprimée en fonction de l'ensemble des caractéristiques morphologiques de la cellule : l'épaisseur et l'élasticité de la paroi cellulaire et le facteur de déformation cellulaire qui correspond à la relation entre la plus petite dimension de la cellule et la taille du pore membranaire. Le modèle développé permet de relier le comportement macroscopique, en termes de rétention, d'une suspension de bactéries à Gram négatif aux informations microscopiques des cellules bactériennes filtrées. Concernant, les souches à Gram positif, le modèle développé ne permet pas de décrire nos résultats expérimentaux : le mécanisme de rétention de ce type de cellules pourrait être limité par la pression de turgescence élevée des cellules à Gram positif.

Cette partie du projet n'a pas abordé les effets du colmatage sur le transfert de bactéries déformables. Cet aspect sera étudié plus en détails dans le chapitre suivant. Le suivi du transfert des particules et des flux de filtration sera couplé à l'analyse par microscopie de la formation du dépôt de bactéries à la surface de la membrane.

Chapitre V Etude du transfert de bactéries déformables et du colmatage sur des temps longs de filtration

Introduction

Ce dernier chapitre se consacre à la description de l'évolution de la sélectivité et de la productivité d'une filtration de suspension bactérienne sur des volumes filtrés suffisants pour générer un colmatage de la membrane, en fonction de différents paramètres opératoires (taille de pore, agitation de la cellule de filtration, concentration de la suspension d'alimentation et présence d'un antibiotique).

Dans un premier temps, les transferts des trois souches modèles sélectionnées seront quantifiés séquentiellement pendant l'expérience de filtration. Dans une deuxième partie, les flux de filtration mesurés seront analysés dans le but de déterminer le mécanisme de colmatage mis en jeu et en déduire les grandeurs caractéristiques. Enfin, dans une troisième partie, l'ensemble des informations obtenues sera complété par des observations réalisées par microscopie de la morphologie du dépôt colmatant à certains volumes filtrés et enfin par la mesure des composés extracellulaires présents à la surface de la membrane dans les dépôts colmatants de *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Partie A. Influence des paramètres opératoires sur l'évolution du transfert de bactéries déformables

Dans cette première partie du Chapitre V, nous nous intéresserons au suivi du transfert des trois bactéries modèles pendant une filtration à volume fixé. Dans le chapitre précédent, le transfert de ces mêmes souches a été quantifié aux premiers instants d'une filtration frontale par prélèvement des 50 mL filtrés et mesure de la concentration bactérienne moyenne en UFC/mL dans la totalité de ce volume. Le protocole de filtration est adapté ici (cf. Chapitre II) afin d'effectuer des prélèvements séquencés qui permettront de suivre l'évolution des concentrations bactériennes dans le perméat produit pour des volumes filtrés jusqu'à 1 000 mL, ceci avec un premier prélèvement dès les 5 premiers mL filtrés.

Un balayage des conditions physiques et chimiques (taille de pore, PTM, composition et concentration de la suspension d'alimentation) a été effectué afin de comprendre le rôle de chacun des paramètres étudiés sur le mécanisme de sélectivité mis en jeu au long d'une filtration. Chacun des points expérimentaux présentés provient de la moyenne des résultats obtenus pour un minimum de deux expériences de filtration indépendantes. Pour rappel, le suivi du nombre de cellules bactériennes présentes dans le perméat est réalisé après mise en culture, en duplicat, des prélèvements séquencés et lecture du nombre d'Unités Formant Colonie (UFC) présentes après 24 h d'incubation à 37 °C.

Les résultats de transfert étudiés dans cette première partie seront ensuite mis en regard des flux de perméation mesurés au cours des filtrations dans la partie B de ce chapitre.

A.1. Suivi du transfert pour les trois souches modèles

A.1.1. Evolution du transfert au cours d'une filtration à forte concentration dans l'alimentation

La Figure V.1 présente l'évolution de la concentration, à différents volumes filtrés, des cellules bactériennes viables présentes dans le perméat pour des conditions opératoires identiques (membrane de 0,4 µm, Ca:10^7 UFC/mL, PTM : 0,5 bar) et cela pour chacune des trois souches modèles étudiées dans l'eau physiologique. Cette première série d'expériences a donc été réalisée avec une concentration de

l'alimentation élevée dans le but d'observer les tendances générales dans le cas d'un transfert important : on augmente ainsi la charge d'entrée Ca pour mettre en évidence avec une bonne sensibilité des différences en termes de transfert (en UFC/mL) en fonction des conditions appliquées.

On remarque que pour chacune des souches, le transfert est susceptible d'évoluer au cours du temps (ou avec l'augmentation du volume filtré). Les différences de volumes filtrés finaux pour les trois souches (Vf_{max} = 500 mL pour *E. coli* et *S. Aureus*; 300 mL pour *P. aeruginosa*), sont expliquées par les singularités des débits observés pendant l'expérience : la suspension de *P. aeruginosa* a conduit à des flux plus faibles. Comme annoncé, l'analyse de ces différences en termes de flux sera effectuée dans la seconde partie de ce chapitre (cf. Partie B).

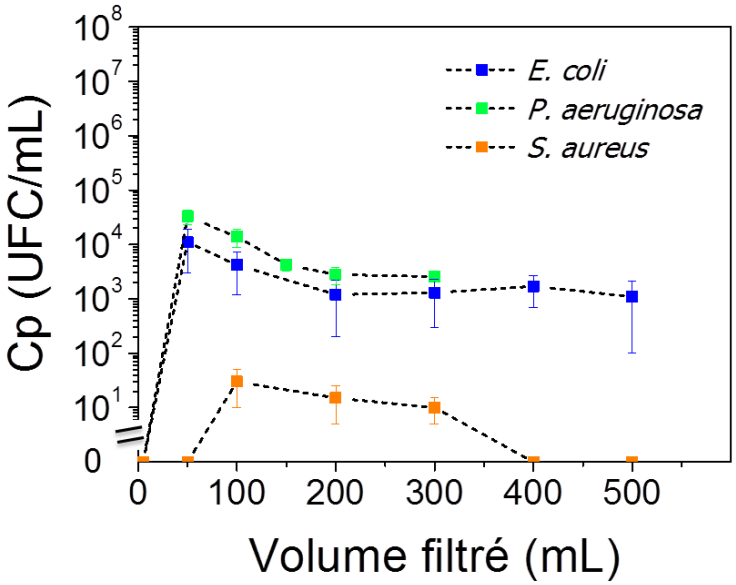


Figure V.1 : Evolution de la concentration bactérienne de la phase perméat au cours d'une filtration sur membrane isopore de 0,4 µm à une pression transmembranaire appliquée de 0,5 bar et pour une suspension de *E. coli*, de *P. aeruginosa* et de *S. aureus* à une concentration voisine de 10^7 UFC/mL dans de l'eau physiologique.

Tout d'abord, pour les trois souches, aucune cellule n'est observée dans le perméat collecté après 5 mL de volume filtré (jusqu'à 50 mL pour *S. aureus*). Pour les valeurs de Cp mesurées au-delà de Vf = 50 mL, comme attendu d'après nos premières conclusions (cf. Chapitre IV) - les résultats obtenus attestent d'une différence de transfert qui est fonction du caractère Gram des souches bactériennes. Les cellules Gram négatif de *E. coli* et *P. aeruginosa*, déjà définies comme déformables, démontrent leur capacité à traverser des pores de dimensions inférieurs à leurs dimensions et cela pendant toute l'expérience de filtration frontale (Vf ≥ 300 mL).

Le profil décroissant des courbes expérimentales démontre l'effet du colmatage progressif de la membrane sur les mécanismes de sélectivité mis en jeu. En effet, au second prélèvement (Vf : 50 mL), la concentration des cellules bactériennes dans la phase perméat atteint une valeur maximale proche de: 1.10^4 UFC/mL pour *E. coli* et 3.10^4 UFC/mL pour *P. aeruginosa*. A partir de cette valeur maximale, les concentrations mesurées dans les prélèvements séquencés de perméat diminuent progressivement au cours du temps. Concernant la bactérie à Gram positif, *S. aureus*, la contamination du perméat n'est observée qu'à partir du prélèvement réalisé à 100 mL qui semble également correspondre à un transfert maximal. En effet au-delà de Vf = 100 mL, la concentration Cp mesurée diminue pour atteindre à nouveau une valeur nulle pour un volume proche de 400 mL. Cette évolution progressive de l'abattement et donc de la sélectivité du procédé peut être expliquée par la mise en place d'un colmatage bactérien qui, d'une part entraine une diminution du transfert de solvant et donc des débits de perméation mesurés et, d'autre part modifie les propriétés de rétention du procédé.

Les concentrations mesurées dans cette première partie sont du même ordre de grandeur que celles obtenues dans le Chapitre IV qui correspondaient aux contaminations moyennes pour les 50 premiers mL filtrés. En effet, pour les deux souches à Gram négatif, nous retrouvons dans le prélèvement réalisé à Vf = 50 mL, une concentration de l'ordre de 10^4 UFC/mL, ce qui correspond aux tendances mesurées dans le chapitre précédent. Pour la souche S. *aureus*, par contre, aucun transfert n'est observé à Vf = 50 mL alors qu'une concentration de l'ordre de 10^2 UFC/mL a été mise en évidence lorsque l'intégralité des 50 mL de perméat filtré est échantillonnée (cf. Figure IV.2). Cet écart peut s'expliquer par la différence de protocole employé dont l'impact sur le transfert lors des premiers volumes filtrés

sera plus marqué pour cette souche qui traverse très peu la membrane en condition témoin.

A.1.2. Evolution du transfert au cours d'une filtration à différentes concentrations dans l'alimentation

Dans le but d'étudier l'influence de la concentration en bactéries d'une suspension sur le transfert des cellules pendant une filtration, les essais ont été réalisés à trois concentrations différentes: 10^4, 10^6 et 10^7 UFC/mL pour une taille de pore de 0,4 µm. Les résultats obtenus pour les deux souches à Gram négatif sont présentés Figure V.2. Pour la souche *S. aureus*, aucun transfert coté perméat n'a pu être observé aux concentrations de l'alimentation de 10^4 et 10^6 UFC/mL, les résultats obtenus avec la concentration d'alimentation la plus élevée de 10^7 UFC/mL sont présentés sur la Figure V.1. Ces différentes courbes permettent de mettre en évidence le rôle de la concentration bactérienne de l'alimentation sur l'amplitude du transfert de cellules vers le perméat. Pour les deux souches à Gram négatif, l'augmentation de la concentration de l'alimentation entraine, comme nous l'avons déjà vu, des différences de transfert sur les premiers volumes filtrés mais impacte également les profils d'évolution du transfert.

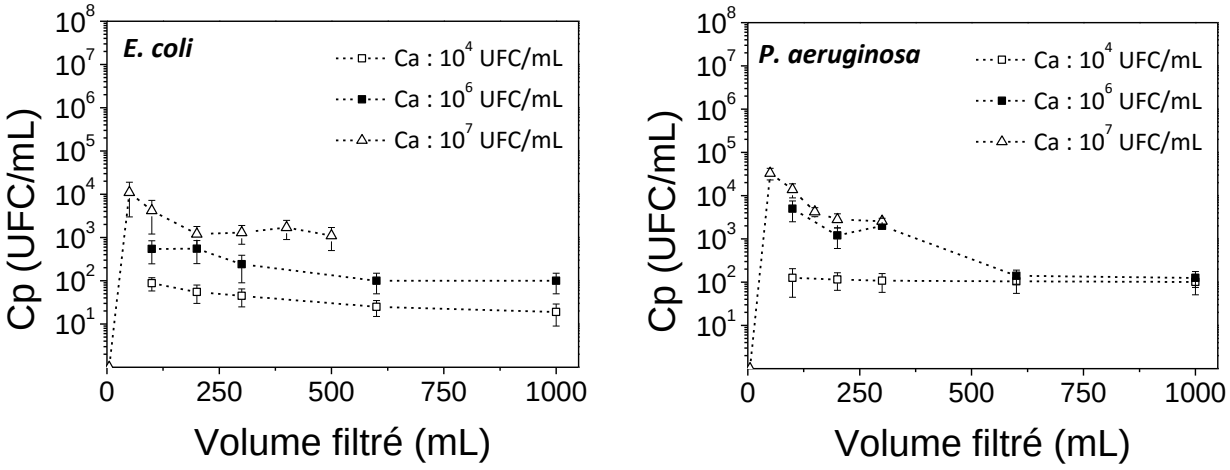


Figure V.2 : Evolution de la concentration bactérienne de la phase perméat (Cp) au cours d'une filtration sur membrane isopore de 0,4 µm pour des suspensions de *E. coli* ou de *P. aeruginosa* à des concentrations voisines de 10^4, 10^6 et 10^7 UFC/mL, dans de l'eau physiologique, à une pression transmembranaire appliquée de 0,5 bar.

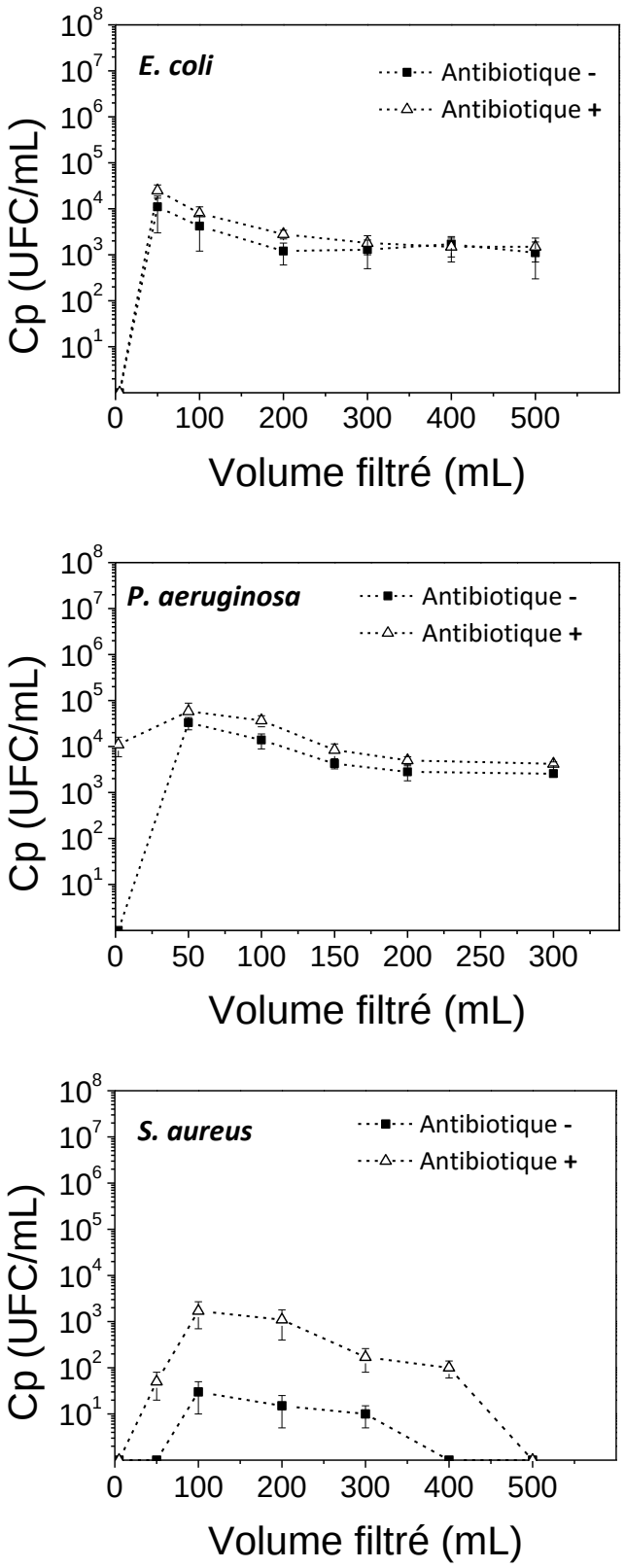


Figure V.3 : Evolution de la concentration bactérienne de la phase perméat (Cp), pendant une filtration sur membrane isopore de 0,4 µm, des suspensions de bactéries modèles à une concentration voisine de 10^7 UFC/mL en condition témoin ou modifiées par un antibiotique à une pression transmembranaire de 0,5 bar.

On remarque ainsi que pour la concentration de l'alimentation testée la plus faible (10^4 UFC/mL), les concentrations mesurées dans la phase perméat évoluent de façon négligeable avec le volume filtré. Dans ce cas, à l'inverse des profils décroissants obtenus avec des concentrations d'alimentation supérieures (Ca>10^6 UFC/mL), la faible quantité de cellules amenées à la surface de la membrane ne permet pas la mise en place d'un colmatage bactérien, la rétention n'évolue donc pendant la production de perméat.

A.1.3. Effet d'un antibiotique

Le suivi du transfert des souches modifiées au contact d'un antibiotique, de la famille des bêta-lactamines, a également été réalisé dans cette partie du projet. Selon le protocole proposé (cf. Chapitre II), les suspensions bactériennes ont été exposées à un antibiotique pendant une durée courte (τ : 90 min) et à une concentration faible (CMI/2). La diminution de l'élasticité des parois cellulaires mise en évidence dans le Chapitre III a pour effet global d'augmenter le transfert de cellules à travers la membrane comme le démontre la Figure V.3 qui présente la comparaison des concentrations bactériennes mesurées dans la phase perméat pour les suspensions bactériennes des trois souches modèles exposées ou non à un antibiotique (toutes les autres conditions opératoires étant identiques par ailleurs; Ca:10^7 UFC/mL, PTM : 0,5 bar, membrane de 0,4 µm).

Pour les deux souches à Gram négatif, l'altération des propriétés pariétales des cellules bactériennes augmente sensiblement la quantité de cellules dénombrées dans les prélèvements séquencés de perméat. Ces résultats sont tout à fait identiques à ceux présentés sur le Figure IV.2 du chapitre précédent. Néanmoins, une exposition à l'antibiotique n'a pas pour effet de modifier le profil de concentration mesuré au cours de la filtration. Pour les deux conditions testées: présence ou non d'antibiotique, les concentrations mesurées dans la phase perméat sont décroissantes à partir de Vf = 50 mL et tendent vers une même valeur minimale moyenne de 1.10^3 UCF/mL pour *E. coli* alors que pour *P. aeruginosa* une légère différence est encore visible à Vf = 300 mL. Deuxièmement, l'exposition à un antibiotique, qui diminue la rigidité des parois bactériennes, peut raccourcir la période de latence pendant laquelle aucune bactérie n'a encore atteint la phase perméat, comme le démontrent les données obtenues avec la souche *P. aeruginosa* qui est retrouvée, dans ces conditions opératoires, dans le premier échantillon de

perméat prélevé (Vf = 5 mL) alors que celui-ci était stérile lors de la filtration dans de l'eau physiologique.

Concernant la souche à Gram positif *S. aureus*, le profil obtenu dans le cas d'une exposition à l'Amoxicilline démontre une amplification nette de la contamination du perméat produit pendant la filtration, résultat également cohérent avec ceux portés sur la Figure IV.2. Passant d'un caractère rigide à souple après une exposition à l'agent chimique, la souche *S. aureus* a la capacité de traverser la membrane de filtration plus rapidement car elle est révélée, dans ce cas uniquement, dans le second échantillon de perméat (Vf = 50 mL). Après une première phase croissante, le transfert de cellules diminue à partir de Vf = 100 mL pour atteindre une valeur nulle, synonyme à nouveau d'une absence de contamination dans le perméat produit, pour des volumes filtrés importants (Vf> 400 mL).

A.2. Discussion

Tout d'abord, il est nécessaire de rappeler qu'il existe un volume mort de liquide présent dans le compartiment perméat de notre système (liquide présent dans le collecteur de perméat ainsi que dans le tube de collecte estimé à 3 mL pour notre pilote) rempli d'eau avant l'expérience de filtration. Afin de collecter un premier échantillon représentatif, ce facteur a dû être considéré et le premier prélèvement s'effectue toujours après le remplacement de ce volume par du perméat de filtration soit à un volume filtré de 5 mL.

Le choix de travailler dans ce chapitre (comme dans le précédent) avec une taille de pore de 0,4 µm fait suite à une première série d'expériences réalisées avec des membranes de taille de pore 0,22 µm. Des suspensions des trois souches modèles en condition témoin ou après une exposition à l'antibiotique ont été filtrées jusqu'à un volume de perméat minimum de 300 mL. Les rétentions alors mesurées ne peuvent pas être représentées sous une forme graphique du fait des trop faibles concentrations détectées dans les échantillons de perméat prélevés : comprises entre 0 et 5 UFC/mL pour les bactéries à Gram négatif, toujours nulle pour la bactérie à Gram positif (cf. Figure V.4). Ces résultats soulignent néanmoins le fait que les perméats analysés ne sont pas tous exempts de bactéries. Ainsi, dans nos conditions expérimentales de filtration, l'utilisation d'une taille de pore de 0,22 µm ne permet pas de garantir la production d'un perméat stérile. Même si la souche *S. aureus* n'est pas retrouvée dans les prélèvements séquencés de perméat, cette observation ne

nous permet pas d'affirmer que la filtration est stérilisante. Ces résultats peuvent être utilisés afin de définir un seuil de taille de pore à partir duquel tout transfert de bactérie par déformation sera impossible. Dans nos conditions expérimentales, il semble que l'utilisation d'une membrane de 0,1 µm soit nécessaire pour atteindre cet objectif.

Souche	Cp_{max} mesurée	
Condition	**eau phy.**	**antibiotique**
E. coli	≤ 5 UFC/mL	≤ 5 UFC/mL
P. aeruginosa	≤ 5 UFC/mL	NM
S. aureus	ND	ND

Figure V.4 : Contamination maximale mesurée dans les prélèvements de perméat réalisés au cours d'une filtration sur membrane isopore de 0,22 µm pour des suspensions de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* dans de l'eau physiologique (avec Ca : 10^7 UFC/mL, PTM : 0,5 bar). ND : aucune cellule n'est détectée, NM : non mesuré

Pour la taille de pore de 0,4 µm, les conclusions du chapitre précédent sont complétées ici par l'étude du transfert de bactéries déformables sur des temps plus longs. Pour les souches déformables à Gram négatif, un transfert important des cellules est observé lors de la filtration des premiers volumes de suspension. Pour la souche de caractère rigide *S. aureus,* le transfert mesuré est toujours plus faible et nécessite une concentration d'alimentation élevée ainsi qu'un volume de suspension filtré plus important pour être observé. Après une valeur de contamination du perméat maximale, fonction du type de Gram des cellules, les concentrations mesurées présentent un profil décroissant nécessairement corrélé au colmatage de la membrane. En effet, pour la concentration d'alimentation testée la plus faible (Ca: 10^4 UCF/mL), le transfert de cellules déformables à Gram négatif est relativement stable au cours de l'expérience. A cette concentration d'alimentation, aucune diminution du flux de perméat n'a été mise en évidence pendant l'expérience (cf. partie C). Dans l'hypothèse où tous les microorganismes sont déposés sur la membrane, une alimentation de faible concentration (Ca: 10^4 UCF/mL) entraine le recouvrement de seulement 1% de la surface de la membrane pour un Vf = 100 mL et 10 % pour un Vf = 1 L par les cellules bactériennes. Cette faible valeur confirme que

la quantité de bactéries apportées à la membrane n'est pas suffisante pour entrainer la mise en place d'une monocouche de cellules à sa surface.

Nos résultats démontrent également qu'il existe, en fonction des caractéristiques des bactéries, une phase de latence spécifique à chaque souche avant la première détection de contamination du perméat. Cette phase de latence est déterminée par le volume minimum à filtrer pour permettre à la cellule de se déformer et traverser l'intégralité du matériau poreux. Les souches à Gram négatif (bactéries déformables) sont retrouvées dans le perméat après la filtration d'un volume plus faible en comparaison de la souche au caractère rigide *S. aureus*. Des travaux ont déjà mis en évidence l'existence de cette phase de latence pour la souche spiralée *H. gracilis* lors d'expériences de filtration (Wang et al., 2008) : la première contamination du perméat apparait après Vf =10 mL pour une filtration avec des pores de 0,22 µm alors qu'à une taille de pore supérieure (0,4 µm), la contamination est détectée dès le premier mL filtré. Ce phénomène est également observé lors d'expériences microfluidiques de filtration de globules rouges (Quinn et al., 2011; Secomb and Hsu, 1996; Suchecka et al., 2003) : le temps nécessaire à l'entrée de la cellule dans le pore représente plus de 50 % du temps total nécessaire à son passage à travers le matériau poreux. Nos observations prouvent, de plus, que cette phase de latence peut être réduite quand les propriétés mécaniques des microorganismes sont altérées par l'action d'un antibiotique qui entraine une diminution de la rigidité des parois cellulaires.

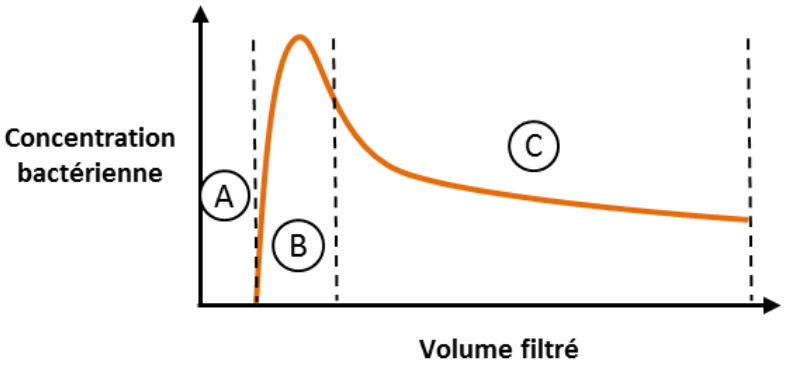
L'ensemble de ces observations peut être résumé sous la forme d'un tableau dans lequel les souches bactériennes sont classées en fonction de la phase de latence et de la position de Cp_{max} mesurées expérimentalement (cf. Figure V.5). Les valeurs de tension de surface des cellules bactériennes, notées T et issues du Chapitre IV, sont également renseignées. Pour rappel, la valeur de T exprime la tension de la paroi de la cellule bactérienne une fois déformée à l'intérieur d'un pore de 0,4 µm. On remarque ainsi que la souche *P. aeruginosa* en présence de l'antibiotique est la condition expérimentale qui présente la valeur de tension de surface calculée la plus faible (T: $0{,}41.10^{-3}$ N/m) et la phase de latence la plus courte (Vf= 5 mL avec un Cp_{max}= 50 mL). Pour l'ensemble des conditions correspondant à T ~ 2 $\pm 1.10^{-3}$ N/m, le premier prélèvement contaminé est détecté à un Vf = 50 mL pour une Cp_{max}= 50 mL. Pour la souche *S. aureus* en présence de l'antibiotique, avec T: $3{,}02.10^{-3}$ N/m, la phase de latence correspond toujours à 50 mL mais la Cp_{max} est décalée à Vf = 100

mL. Enfin, pour *S. aureus* en condition témoin dans de l'eau physiologique, avec T: $10,30.10^{-3}$ N/m, le premier prélèvement contaminé n'apparait que pour un Vf = 100 mL avec une Cp_{max} identique. Cette approche permet de mettre en évidence la corrélation qu'il existe entre les caractéristiques morphologiques des bactéries, les dimensions des pores de la membrane de filtration et les propriétés du premier prélèvement de perméat contaminé.

Souche	Condition	Vf minimum pour 1er prélèvement contaminé	Vf correspondant à Cp_{max}	Tension de surface des cellules bactériennes T
		mL	**mL**	**(10^{-3}.N/m)**
P. aeruginosa	Ticarcilline	5	50	0,41
	eau Phy.	50	50	0,86
E. coli	Amoxicilline	50	50	1,78
	eau Phy.	50	50	2,90
S. aureus	Amoxicilline	50	100	3,02
	eau Phy.	100	100	10,30

Figure V.5 : Classement des souches modèles en fonction des volumes filtrés caractéristiques de la première contamination de la phase perméat et de la concentration maximale Cp_{max} détectée pendant la filtration.

Enfin, ces différents résultats nous permettent de transcrire l'évolution de la contamination du perméat selon une courbe théorique, représentée Figure V.6, dont l'amplitude est dépendante des paramètres opératoires qui jouent un rôle sur le transfert de bactéries par déformation.



.

Figure V.6 : Représentation schématique de l'évolution de la concentration bactérienne dans le perméat au cours d'une filtration membranaire frontale à pression constante.

Trois phases distinctes sont représentées :

- ✓ une phase de latence (phase A, Figure V.6) : pour les premiers mL filtrés lors d'une filtration membranaire, la rétention semble totale puisque aucune cellule bactérienne n'a atteint le perméat. En effet, un volume (ou temps) de filtration minimum est nécessaire aux bactéries pour entrer dans les pores. Une fois ce volume minimum filtré, les bactéries commencent à migrer au travers de la membrane et à atteindre le compartiment collectant le perméat. Nos résultats démontrent que, dans les conditions testées, le paramètre majeur qui contrôle cette phase est la tension de surface de la cellule. Les autres paramètres qui peuvent impacter cette latence sont : l'épaisseur de la membrane de filtration, le flux (et donc la PTM), le ratio taille de bactérie/taille de pore, et les affinités entre le matériau qui compose la membrane de filtration et la paroi cellulaire des microorganismes (Suchecka et al., 2003; Wang et al., 2008).

- ✓ une phase de transfert maximal (phase B) : le second intervalle de la courbe représente la phase où la concentration bactérienne dans le perméat augmente jusqu'à une valeur maximale (Cp_{max}), tous les pores de la membrane étant encore accessibles par les microorganismes (absence de

colmatage). La position de ce maximum semble également être impactée par la valeur de tension de surface de la cellule.

- ✓ une phase de diminution du transfert (phase C) : cette dernière phase intervient après le point critique du transfert et représente la majeure partie d'un cycle de filtration membranaire à pression constante. Cette diminution, fonction du volume filtré, s'explique par le fait qu'à la surface de la membrane de filtration se forme un colmatage bactérien qui favorise la rétention des microorganismes et entraine une chute du flux de perméat.

Le colmatage progressif du matériau filtrant n'est donc pas sans effet sur la sélectivité du procédé de la filtration d'objets déformables. Dans la suite de ce chapitre, le mécanisme de colmatage mis en place pendant l'expérience de filtration sera déterminé et son impact sur le transfert discuté.

Partie B. Analyse des flux de filtration

Pendant les expériences de filtration frontale dédiées à la mesure de l'évolution du transfert de bactéries, la mesure des flux de perméation a également été réalisée. Cette partie de nos travaux va donc s'attacher à analyser l'évolution des courbes de flux en fonction du temps de filtration puis du volume filtré. Premièrement, l'impact de l'agitation dans la cellule de filtration frontale Amicon sera discuté. Puis, l'analyse des courbes permettra de réaliser le choix d'un modèle de colmatage à partir duquel l'ensemble des données seront traitées. Ainsi, les paramètres caractéristiques du colmatage bactérien pourront être déduits (résistance spécifique, porosité, compressibilité) en fonction du type de souche et de son exposition à un antibiotique.

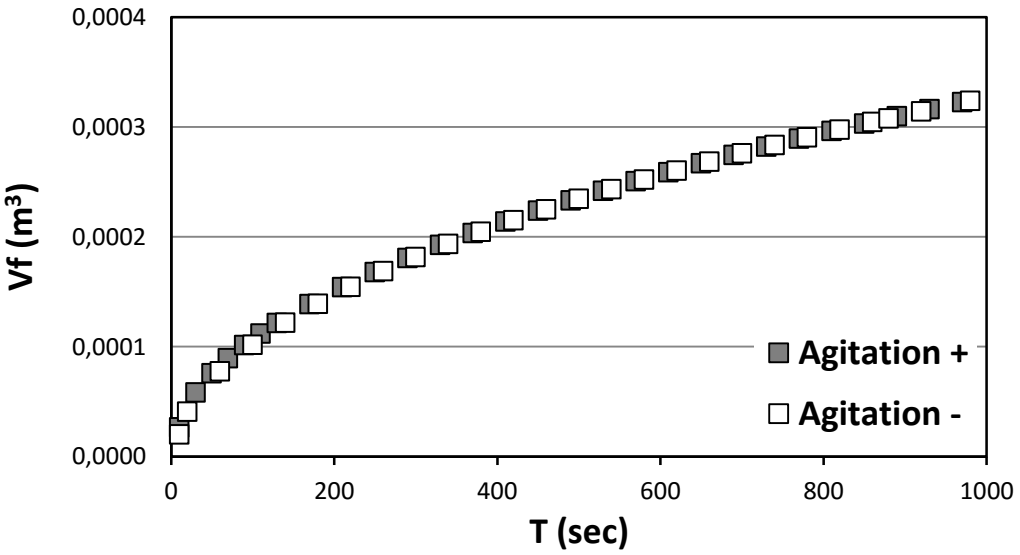


Figure V.7 Evolution du volume filtré en fonction du temps pour des filtrations de suspension de E. coli réalisées avec ou sans agitation de la cellule amicon sur membrane isopore de 0,4 µm (avec Ca 10^7 UFC/mL et PTM: 0,5 bar).

B.1. Effets des paramètres opératoires

B.1.1. Agitation de la cellule de filtration

Dans le but de tester l'influence, dans nos conditions expérimentales, de l'agitation de la phase rétentat sur la filtration des bactéries, une série d'expérience a été réalisée avec ou sans rotation (200 RPM) du barreau aimanté présent dans la cellule de filtration frontale (cf. Chapitre II.B.3.). Ces essais ont été effectués avec la souche *E. coli* pour des conditions opératoires identiques par ailleurs (taille de pore de 0,4 µm, concentration en bactéries de 10^7 UFC/mL en suspension dans de l'eau physiologique, pression transmembranaire fixée à 0,5 bar) ; la masse du perméat produit a été mesurée spécifiquement pour ce test, toutes les 10 secondes. La concentration maximale en bactéries a été choisie ici volontairement afin de réaliser ces essais dans les conditions de colmatage les plus sévères.

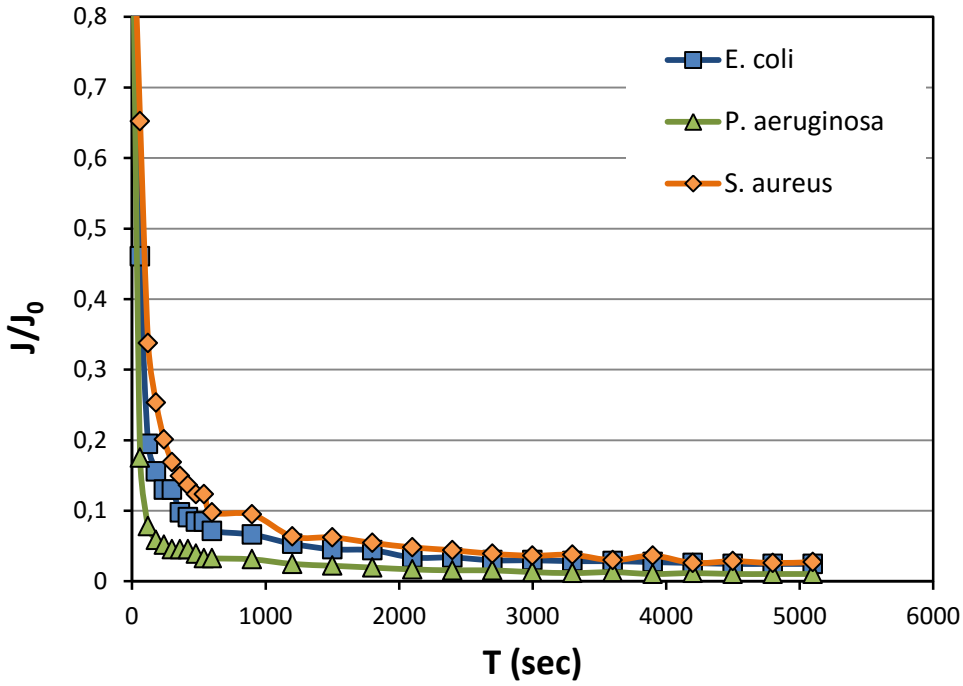
Les résultats bruts obtenus sont présentés Figure V.7 et détaillent l'évolution du volume filtré en fonction du temps. Les deux courbes sont parfaitement identiques. L'agitation de la suspension bactérienne présente dans la phase rétentat n'a donc pas d'effet sur la dynamique de colmatage pendant nos expériences de filtration frontale. De plus, l'agitation de la suspension n'a pas démontré d'effet significatif sur les valeurs de transfert mesurées pendant les expériences de filtration frontale.

B.1.2. Taille de pore

Dans ce paragraphe, les flux de filtration mesurés (sous la forme J/J_0) pour chacune des trois souches modèles (*E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*) en fonction du temps sont présentés Figure V.8 pour les deux tailles de pores testées dans nos travaux : 0,22 et 0,40 µm. Toutes ces filtrations ont été réalisées pour des concentrations en bactéries similaires voisines de 10^7 UFC/mL préparées en condition témoin (eau physiologique) à une pression transmembranaire constante de 0,5 bar. La valeur de J_0 utilisée pour cette représentation correspond au flux mesuré, pour chaque membrane, à l'eau pure (avec PTM = 0,5 bar).

Pour les deux tailles de pore étudiées, ces résultats illustrent l'effet du colmatage sur les performances d'une filtration membranaire du fait de la rétention importante de cellules bactériennes à la surface de la membrane. Les flux mesurés pour chacune des expériences ont présenté la caractéristique d'être fonction de la souche bactérienne.

A) Membranes 0,4 µm



B) Membranes 0,22 µm

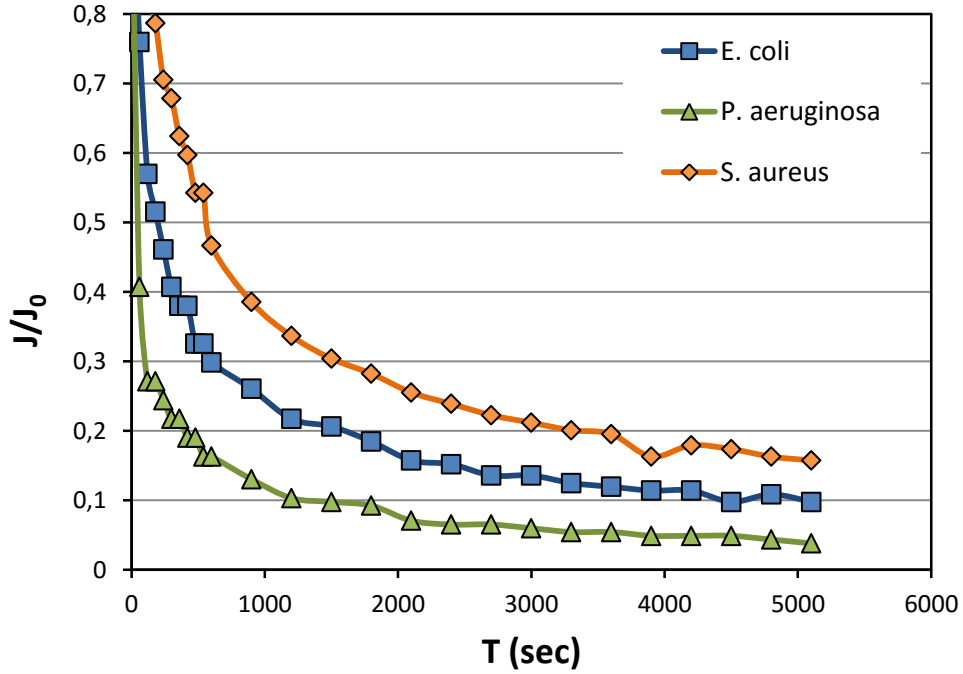


Figure V.8: Evolution des flux de perméat normalisés (J/J_0) en fonction du temps mesurés lors des filtrations de suspensions bactériennes sur membrane isopore de (A) 0,40 µm et (B) 0,22 µm (avec Ca : 10^7 UFC/mL, PTM: 0,5 bar).

Afin de traduire ces différences, la résistance additionnelle (définie par l'équation I.5) liée au colmatage de la membrane (Rc) a été calculée grâce à la relation suivante, sans préjuger pour l'instant du type de colmatage qui intervient:

$$Rc = \frac{PTM}{\mu J} - Rm \qquad \text{Eq V.1}$$

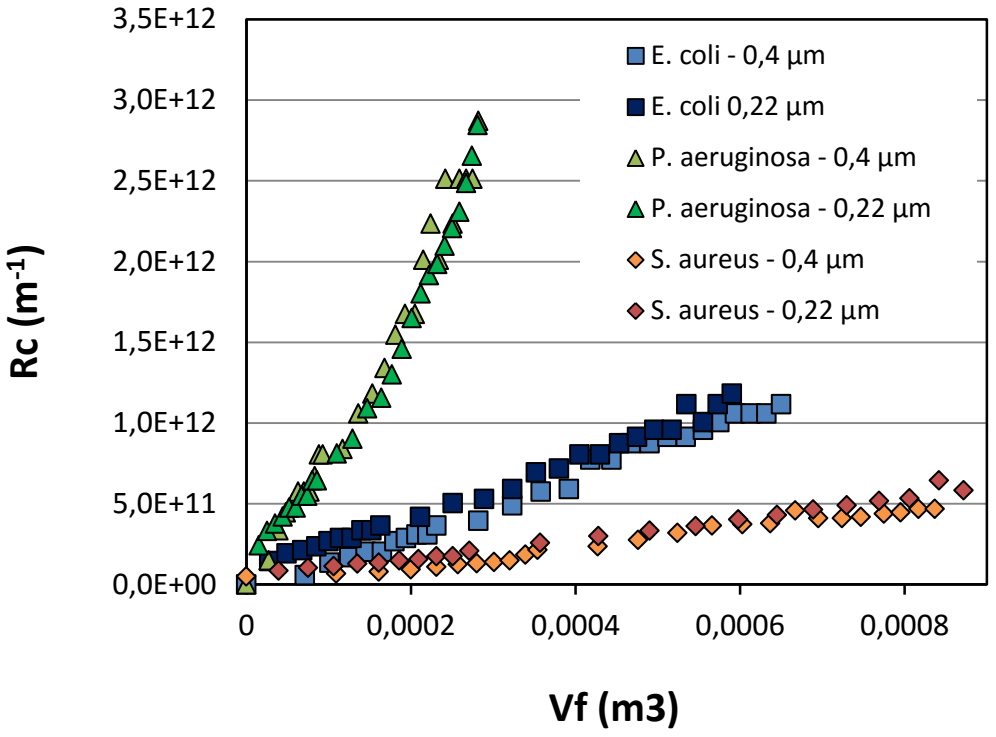
Les évolutions des résistances de colmatage (Rc) en fonction du volume filtré sont présentées Figure V.9.A et cela pour les deux tailles de pore étudiées : 0,4 µm et 0,22 µm (avec Ca: 10^7 UCF/mL et PTM: 0,5 bar). Tout d'abord, l'ordre de grandeur des valeurs Rc mesurées est supérieur à la résistance hydraulique moyenne Rm déterminée pour les membranes isopores neuves. Cette observation est vraie pour les deux tailles de pore puisque, pour la taille de pore 0,22 µm, Rm est égale à $1{,}1.10^{-11}$ m^{-1} et pour 0,4 µm, Rm vaut $2{,}6.10^{-10}$ m^{-1} (cf. Chapitre III). De plus, pour chacune des souches modèles, nos résultats permettent de mettre en évidence le fait que, dans nos conditions expérimentales de filtration, les valeurs de résistances Rc sont indépendantes de la taille des pores (cf. Figure V.9.A).

Enfin, chacune des trois souches étudiées présentent une résistance à l'écoulement qui lui est spécifique : le colmatage formé par *P. aeruginosa* possède la résistance la plus élevée, et celui formé par *S. aureus* la résistance la plus faible. On remarque ainsi que les deux souches, *E. coli* et *P. aerurginosa*, à la forme de bacille et aux caractéristiques morphologiques relativement proches (cf. Chapitre III) conduisent à des résistances à l'écoulement d'amplitude différente. Cette série de résultats permet donc de confirmer le fait que le colmatage de la membrane est, dans notre cas d'étude, uniquement lié aux spécificités de la souche filtrée et que la taille de pore de la membrane n'a pas d'incidence sur la dynamique et le mécanisme de colmatage.

B.2. Description du mécanisme de colmatage

Afin de déterminer quel mécanisme est responsable des pertes de flux mesurées pendant nos expériences de filtration frontale, nous avons réalisé, en première approche le tracé des résistances Rc en fonction du temps. Cette représentation permet, d'après (Tracey and Davis, 1994), de discriminer le type de processus à l'origine du colmatage (colmatage interne du filtre ou formation d'un dépôt de surface).

A) Rc=f(V)



B) Rc=f(t)

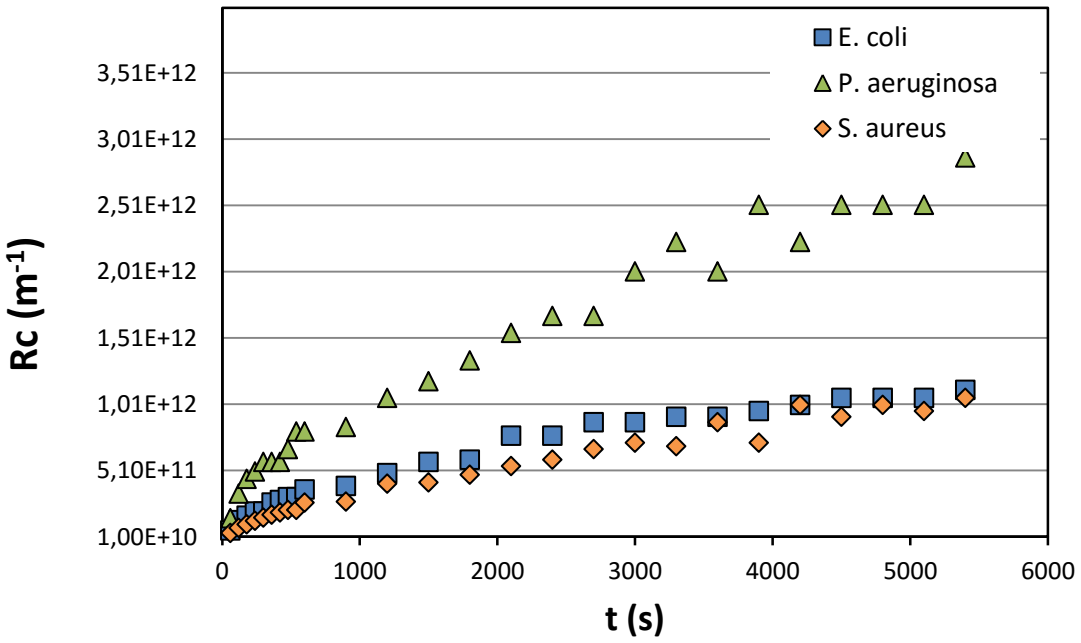


Figure V.9 Comparaison des Rc mesurées lors des filtrations (A) sur deux tailles de pore en fonction du volume filtré et (B) sur une taille en fonction du temps.

Dans le cas où la résistance augmente avec une pente qui diminue au cours du temps, les auteurs expliquent que la diminution du flux de perméat est caractérisée par un mécanisme de formation de dépôt. A l'inverse, lorsque la résistance augmente avec une pente croissante au cours du temps, alors la diminution du flux est décrite par un des modèles caractérisant le colmatage du média filtrant (blocage standard ou blocage complet). Les résultats expérimentaux exposés précédemment Figure V.9.A. sont présentés sous la forme $Rc = f(t)$ Figure V.9.B. et démontrent une évolution de la résistance Rc dont l'amplitude diminue au cours du temps, nous orientant vers le choix d'un colmatage par formation d'un dépôt à la surface de la membrane.

Afin de pouvoir conclure définitivement à un colmatage par dépôt, nous avons traité l'ensemble de nos résultats en utilisant le modèle développé par (Hermans and Bredée, 1935). Celui-ci utilise la représentation des données de filtration sous la forme caractéristique $\frac{d^2t}{dV^2} = k \cdot \left(\frac{dt}{dV}\right)^n$. Dans ce cas, la détermination de la valeur de n permet d'identifier le mécanisme de colmatage sans prédéfinir lequel est mis en jeu : pour n= 2 blocage complet, n= 1,5 blocage standard, n= 1 blocage intermédiaire et n= 0 formation de dépôt (cf. Chapitre I). La Figure V.10 représente le tracé des points expérimentaux sous la forme $\frac{d^2t}{dV^2} = f\left(\frac{dt}{dV}\right)$ pour la filtration d'une suspension de *E. coli* sur une membrane isopore de 0,4 µm (avec Ca: 10^7 UFC/mL et PTM: 0,5 bar).

Les différentes valeurs de n obtenues pour les filtrations des trois souches modèles en condition témoin et après exposition à un antibiotique sont résumées sous la forme d'un tableau Figure V.11. On remarque ainsi que les valeurs de n sont comprises entre 0,1 < n < 0, 48 pour les différentes conditions testées, ce qui ne correspond à aucune valeur de pente théorique. Néanmoins, n étant proche de zéro, l'hypothèse d'un mécanisme de colmatage principalement lié à la formation d'un dépôt bactérien à la surface de la membrane sera retenue. Le fait que les valeurs de n soient supérieures à 0 peut être expliqué d'une part, par la présence en faible proportion d'un phénomène de colmatage lié au blocage de quelques pores de la membrane (blocage intermédiaire) et d'autre part, par les incertitudes sur la mesure de flux qui sont liées à notre mode d'acquisition (balance et chronomètre).

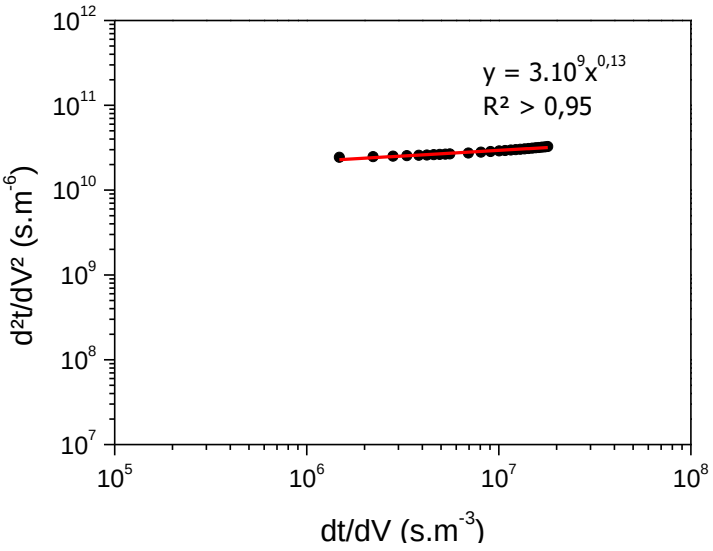


Figure V.10: Exemple de détermination de la pente n pour l'identification du mécanisme de colmatage (données expérimentales pour une filtration de *E. coli* sur membrane isopore de 0,4 µm (avec Ca: 10^7 UFC/mL et PTM: 0,5 bar).

Souche	Condition	Pente n
E. coli	eau Phy	0,13
	Amoxicilline	0,35
P. aeruginosa	eau Phy	0,21
	Ticarcilline	0,15
S. aureus	eau Phy	0,48
	Amoxicilline	0,1

Figure V.11 : Valeurs de pente n déduites des filtrations réalisées pour les trois souches modèles en condition témoin (eau physiologique) ou après une phase d'exposition à l'antibiotique.

Enfin, aucun changement de pente n'est observé sur l'ensemble des tracés $\frac{d^2t}{dV^2} = f\left(\frac{dt}{dV}\right)$ ce qui permet de conclure à l'absence de changement de mécanisme de colmatage, comme cela a pu être observé par (Ho and Zydney, 2000) lors de la filtration de protéines sur des membranes isopores ou lors de la filtration de suspensions bactériennes (Hwang and Liao, 2012; Xu and Chellam, 2005). Dans le cas d'une filtration sur dépôt, le colmatage de la membrane satisfait le modèle de linéarisation des profils de filtration suivant (cf. Chapitre I) :

$$\frac{t}{V} = \frac{a\mu Cs}{2A^2\Delta P}\mathrm{V} + \frac{\mu Rm}{A\Delta P} \qquad \text{Eq V.2}$$

Les données expérimentales représentées sous cette forme ont alors suivent un tracé linaire et la résistance spécifique du dépôt α peut être évaluée par le calcul de la pente de la droite. La concentration cellulaire Cs (kg/m^3) est communément définie comme la masse de cellules par unité de volume de suspension et par conséquent on néglige la quantité de fluide retenu dans le dépôt. Pour déterminer cette valeur, nous avons utilisé une méthode décrite en détail en annexe de ce manuscrit (basée sur les dimensions moyennes mesurées par SEM dans le Chapitre III).

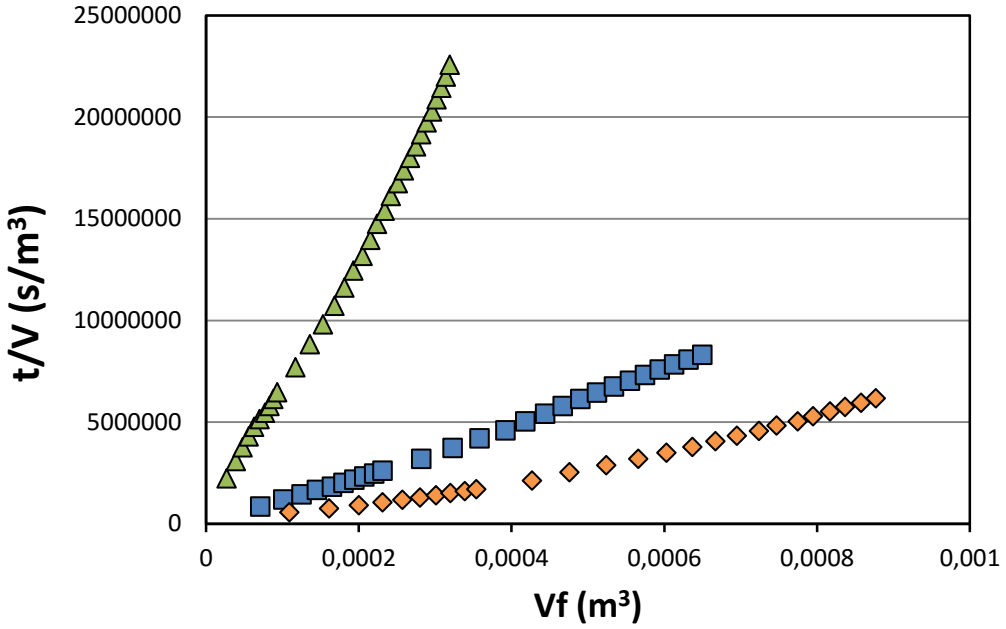
B.3. Calcul des caractéristiques des dépôts bactériens

B.3.1. Mesure de alpha

Les données expérimentales des flux sont représentées sous la forme t/V sur la Figure V.12 pour les trois souches modèles en condition témoin pour deux tailles de pore testées (0,22 et 0,4 µm).

Nous observons dans certains cas une légère dérive des points par rapport à la linéarité des profils en fin de filtration. Cette dérive s'explique par le fait que la résistance spécifique du dépôt n'est plus strictement proportionnelle à la masse de bactéries déposées, résultat d'une évolution de la structure interne du dépôt colmatant. Ce cas est rencontré si l'alimentation est de plus en plus riche en plus petites particules (évolution de Cs pendant la filtration). Dans nos expériences, cette explication ne semble pas pouvoir être retenue car les objets apportés à la membrane sont identiques. Cette dérive aurait donc pour origine le réarrangement ou la compression du dépôt bactérien pendant l'expérience de filtration (Foley, 2006). Cette hypothèse semble la plus pertinente dans notre cas d'étude car nous sommes en présence de cellules bactériennes qui sont déformables.

A) Membranes 0,4 µm



B) Membranes 0,22 µm

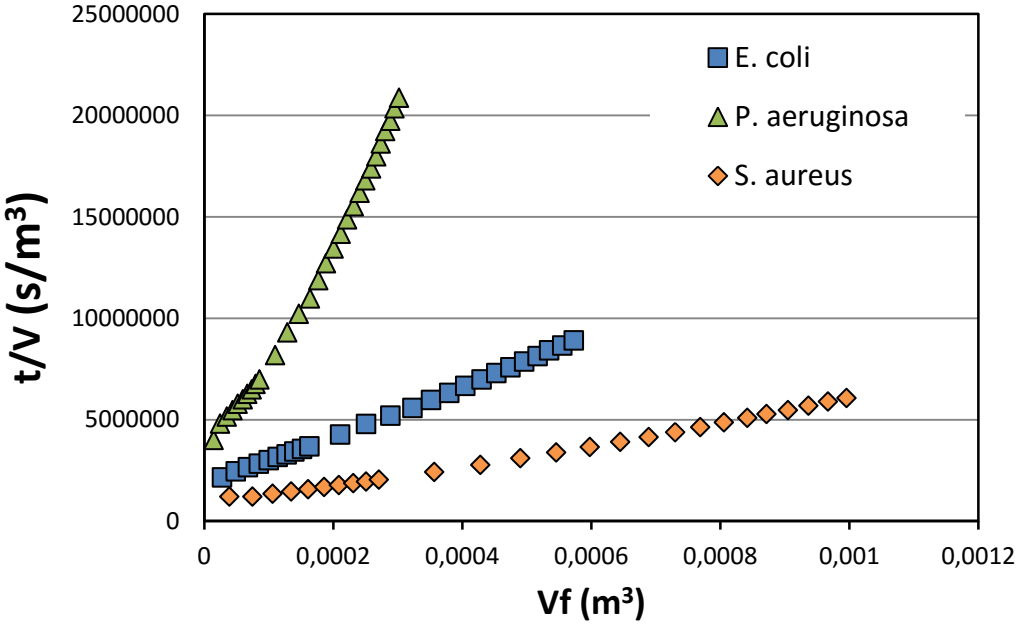


Figure V.12 Représentation des flux de filtration sous la forme t/v en fonction du volume filtré pour des suspensions de bactéries modèles sur membrane isopore (A) de 0,40 µm et (B) de 0,22 µm (avec Ca : 10^7 UFC/mL, PTM: 0,5 bar).

Afin de s'affranchir de ce phénomène retrouvé principalement pour les filtrations de la souche *P. aeruginosa*, seules les parties linéaires des courbes (avec un $R^2 > 0,95$ entre la droite d'ajustement et les données brutes) ont été utilisées pour déterminer les valeurs de résistance spécifique du dépôt bactérien (α) à partir des données expérimentales représentées sous la forme $\frac{t}{V} = f(V)$.

Les premières valeurs de résistance spécifique ont été calculées pour des filtrations réalisées sur des membranes isopores de taille de pore 0,4 µm. Les valeurs de α déterminées sont pour chacune des trois souches respectivement de $7,3.10^{13}$ m/kg pour le dépôt de *E. coli*, $7,9.10^{14}$ m/kg pour le dépôt de *P. aeruginosa* et $1,6.10^{14}$ m/kg pour *S. aureus*. Lorsque le même raisonnement est appliqué aux données expérimentales des filtrations réalisées sur membranes isopores 0,22 µm, on obtient les valeurs de α suivantes : $7,6.10^{13}$ pour le dépôt de *E. coli*, $7,1.10^{14}$ m/kg pour le dépôt de *P. aeruginosa* et $1,5.10^{14}$ m/kg pour *S. aureus*. Les valeurs de résistances mesurées pour les deux tailles de pores sont donc très proches. Cette observation s'explique par le fait que le colmatage de la membrane est gouverné par la formation du dépôt bactérien en surface du filtre, la taille des pores de la membrane n'ayant aucune incidence sur l'organisation et la structure de ce dépôt.

Effet de la concentration de la suspension

Les filtrations des suspensions bactériennes ont été réalisées à trois concentrations de l'alimentation différentes: 10^4, 10^6 et 10^7 UFC/mL pour une taille de pore de 0,4 µm et une pression transmembranaire de 0,5 bar. Les flux mesurés avec la souche *E. coli* pour les trois concentrations testées sont présentés comme exemple Figure V.13 sous la forme t/V. Les tendances observées pour les différentes conditions sont similaires pour les trois souches modèles.

Les résultats obtenus sont en accord avec la définition de la résistance du dépôt Rd (cf. Eq. I.6). Plus la concentration de la suspension d'alimentation est importante, plus le nombre de cellules déposées à la surface de la membrane sera élevé par unité de volume filtré, plus Rd sera grande. Pour les deux concentrations d'alimentation testées les plus hautes, la formation du dépôt colmatant est matérialisée sur les courbes par l'augmentation linéaire du rapport t/V en fonction de Vf.

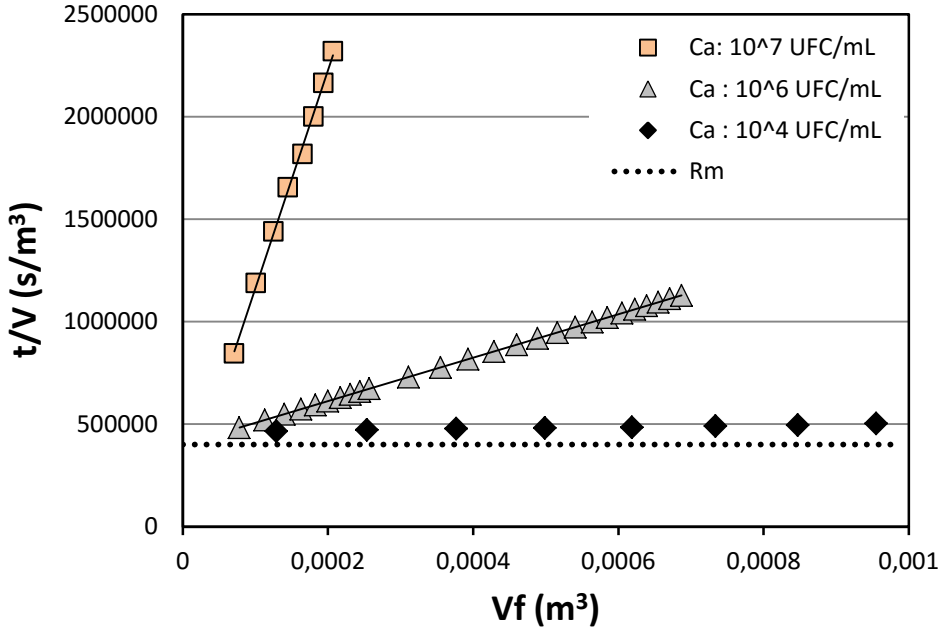


Figure V.13 Représentation des flux de filtration sous la forme t/v en fonction du volume filtré pour des suspensions de *E. coli* à différentes concentrations, sur membrane isopore de 0,40 µm (PTM: 0,5 bar).

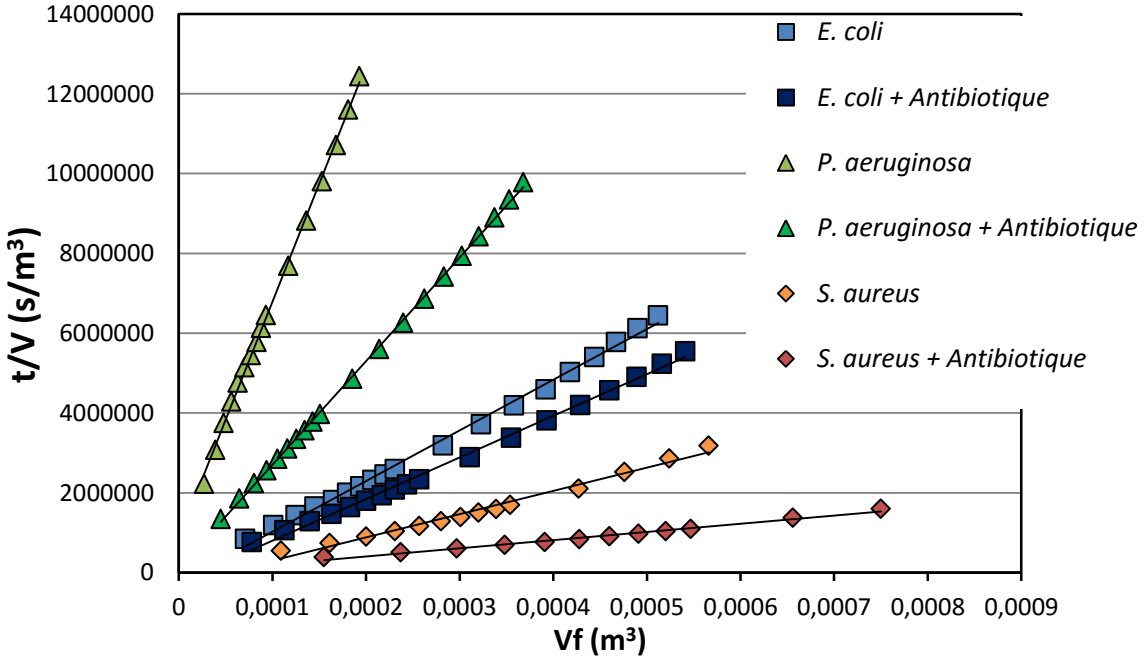


Figure V.14 Représentation des flux de filtration sous la forme t/v en fonction du volume filtré pour des suspensions de bactéries modèles en condition témoin ou modifiées par un antibiotique sur membrane isopore de 0,40 µm (Ca: 10^7 UFC/mL, PTM: 0,5 bar).

Dans le cas d'une filtration à très faible concentration dans l'alimentation (10^4 UFC/mL), la valeur constante du rapport t/V symbolise une absence de colmatage, le nombre de cellules déposées étant trop faible pour recouvrir significativement la surface de la membrane (surface de membrane recouverte de l'ordre de 10% par les cellules bactériennes pour un Vf = 1 L).

Les valeurs de résistance spécifique du dépôt α déterminées pour les deux concentrations d'alimentation de 10^6 et 10^7 UFC/mL sont très proches, respectivement, de $7{,}3.10^{13}$ m/kg et de $7{,}1.10^{13}$ m/kg. Le dépôt bactérien qui se forme à la surface de la membrane présente donc des caractéristiques intrinsèques indépendantes de la concentration de la suspension bactérienne filtrée. La parfaite similitude entre ces valeurs de α et celle obtenue toujours lors de filtration de *E. coli* (avec Ca = 10^7 UFC/mL) mais sur des membranes de 0,22 µm (α: $7{,}6.10^{13}$ m/kg) démontre l'excellente reproductibilité de structure des dépôts bactériens formés d'une filtration à l'autre.

Effet de la présence d'un antibiotique

La mesure des pertes de flux engendrées par la filtration de souches modifiées au contact d'un antibiotique a été réalisée dans les conditions opératoires détaillées dans la partie A.2 de ce chapitre. Les bactéries sont soumises à un antibiotique pendant une durée courte (τ : 90 min) et à une concentration faible (CMI/2). Les données expérimentales exprimées sous la forme t/V en fonction de Vf pour chacune des trois souches en condition témoin (eau physiologique) ou après traitement sont représentées Figure V.14, toutes les autres conditions opératoires étant identiques par ailleurs (avec Ca:10^7 UFC/mL, PTM : 0,5 bar, membrane de 0,4 µm).

Pour toutes les filtrations réalisées après l'altération des propriétés nanomécaniques des cellules bactériennes, une augmentation des flux de filtration est observée. Cette modification des résistances des dépôts formés se traduit sur la Figure V.14 par des courbes t/V de pente plus faible que celles obtenues en condition témoin, et donc par une légère diminution de la valeur de α déduite de ces tracés. Les différentes résistances spécifiques calculées α pour les trois bactéries modèles et pour les deux conditions physicochimiques testées (témoin et après exposition à un antibiotique) sont comparées sur un histogramme présenté Figure V.15.

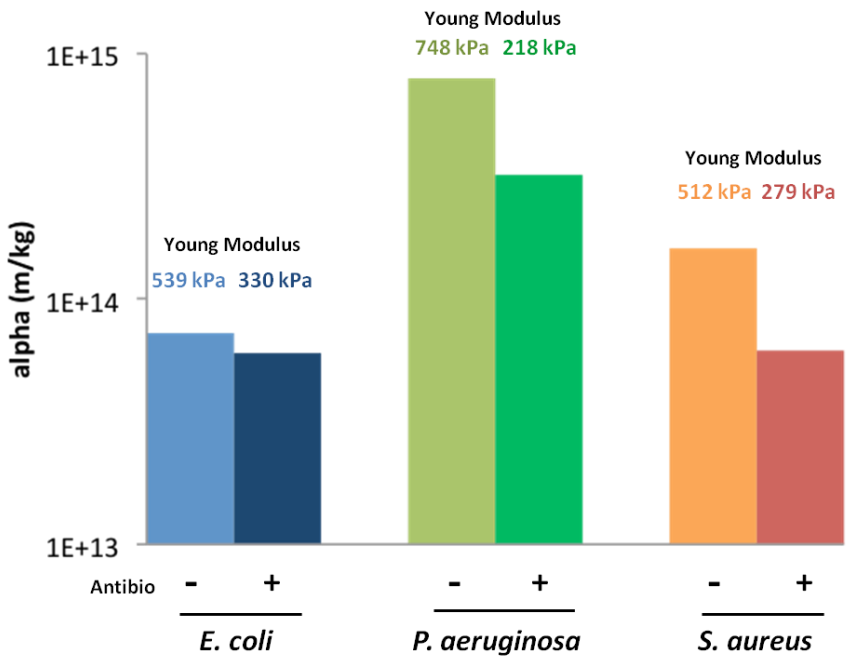


Figure V.15 : Valeurs des résistances spécifiques des dépôts bactériens déduites des filtrations de suspensions de bactéries modèles en condition témoin ou modifiées par un antibiotique.

Nous avons démontré une augmentation sensible du transfert de cellules déformables à travers la membrane lorsque les bactéries sont modifiées par un antibiotique (cf. partie A). Puisque le calcul de α est lié à la concentration massique Cs des bactéries qui forment le dépôt, si un plus grand nombre de cellules traverse la membrane, la valeur de Cs est nécessairement plus faible. Néanmoins, le nombre de cellules qui traverse la membrane est toujours négligeable en comparaison de la quantité de cellules apportée par l'alimentation et déposée à la surface de la membrane même après l'exposition à l'antibiotique : en effet, les expériences sont réalisées avec une Ca proche de 10^7 UFC/mL alors que les concentrations mesurées dans le perméat ne dépassent jamais 10^5 UFC/mL. Cela signifie que la masse de cellules qui traverse la membrane ne représente, au maximum, que 0,01 % de la masse totale de cellules qui forme le dépôt.

La Figure V.15 met en évidence pour les trois souches modèles une diminution de la résistance spécifique des dépôts obtenus à partir des suspensions exposées à l'antibiotique : l'augmentation du caractère déformable des cellules engendre donc des dépôts de résistance spécifique plus faible. Par ailleurs nos résultats montrent

qu'il n'existe pas de lien quantitatif direct entre la valeur de α mesurée et le module de Young des cellules bactérienne. Par exemple, la souche modifiée avec la résistance spécifique de dépôt la plus importante est *P. aeruginosa* alors que cette bactérie présente le module de Young le plus faible de ceux obtenus pour les cellules altérées.

Etant donné le fait que nos expériences de filtration frontale ont été réalisées avec des suspensions bactériennes pures, nos résultats peuvent être comparés aux données de la littérature. Bien qu'il n'en existe qu'une quantité limitée de travaux s'intéressant précisément à la filtration de suspensions bactériennes (et non à la filtration de suspensions de levures), les valeurs de résistances spécifiques déterminées dans notre étude correspondent aux ordres de grandeur établis. En effet, pour la souche *E. coli*, des résistances spécifiques de dépôt de 4.10^{13} m/kg à 300 mbar et de $2,7.10^{13}$ m/kg à 490 mbar ont précédemment été observés dans des cas de filtration frontale (Beaufort et al., 2011; Tanaka et al., 1996). Dans le cas d'une filtration tangentielle, des valeurs de résistances comprises entre $1.10^{14} < \alpha < 4.10^{14}$ m/kg ont été mesurées pour des pressions transmembranaires appliquées de 20 mbar à 2 bar (Nakanishi et al., 1987). Les écarts avec les valeurs obtenues en mode frontal sont expliqués par le fait que la résistance spécifique des dépôts bactériens pourrait être liée à l'organisation du dépôt colmatant : aléatoire en mode frontal, les cellules bactériennes sont orientées dans le sens du flux en mode tangentiel (Tanaka et al., 1996). Comme mentionné précédemment, si l'on compare dans un premier temps le comportement d'une souche à l'autre dans la condition témoin (eau physiologique), nos résultats bien que cohérents avec la littérature, révèlent l'absence de corrélation entre α et le module de Young de la bactérie filtrée. La prise en compte de la morphologie des cellules bactériennes ne nous apporte pas plus d'explications. Des éléments de compréhension pourront être apportés grâce à l'observation de la structure des dépôts réalisée dans la partie C de ce chapitre.

Concernant la présence d'un agent chimique au contact des souches bactériennes modèles, nos résultats démontrent la diminution des résistances spécifiques des dépôts ainsi formés. La modification de la rigidité des parois des microorganismes induite par l'exposition à un antibiotique a donc pour effet de modifier les caractéristiques du dépôt bactérien formé pendant la filtration. Cette modification de la résistance spécifique a été observée lors de la filtration de levures exposées à un traitement au glutaraldéhyde qui altère les propriétés mécaniques des parois cellulaires en augmentant leur rigidité (Tung et al., 2010). Les auteurs mettent alors

en évidence une augmentation des flux de perméat mesurés avec les cellules de levures exposées à l'agent chimique. Dans ce cas et à l'inverse de nos observations, une augmentation de la rigidité des parois cellulaires est corrélée à une diminution de la résistance du dépôt à l'écoulement. Les travaux de Hwang et al. (2010) ont également montré, lors de la filtration de particules de microgel souples, une augmentation de la résistance spécifique du dépôt formé corrélé à la "souplesse" des particules. Aucun des paramètres pris en compte jusque-là nous permet d'expliquer les tendances observées, en particulier, la diminution de la valeur de α avec l'augmentation du caractère déformables des bactéries observée dans ce travail. Une hypothèse qui pourrait être explorée est l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire. En effet, Novo et al. (2000) ont démontré qu'un traitement de la souche *S. aureus* avec de l'Amoxicilline à des concentrations égales à la CMI/2 et à la CMI/4 conduit à une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire de plus de 30 % dans les 2 h qui suivent la mise en contact, et cela sans perte de viabilité de la souche bactérienne. Nous pourrions donc envisager que, lors de la filtration d'un fluide à travers un dépôt constitué de ce type de cellules, un transfert de liquide ait lieu au travers des bactéries et non seulement autour, augmentant les flux de filtration.

A partir des valeurs de résistances spécifiques déterminées expérimentalement, la porosité des différents dépôts a été évaluée à partir de l'équation de Kozeny-Carman. Dans l'hypothèse où le transfert de fluide (à travers un dépôt non compressible de particules sphériques, de diamètre homogène) suit un écoulement de Stokes (nombre de Reynolds faible), cette expression permet de relier la résistance spécifique du dépôt à sa porosité en intégrant la morphologie des microorganismes, tel que :

$$\alpha = \frac{K(1-\varepsilon)S_v^2}{\varepsilon^3 \rho_c} \qquad \text{Eq V.3}$$

avec α la résistance spécifique de dépôt (m/kg), ρ_c la masse volumique des cellules bactériennes (kg/m3), ε la porosité du dépôt, Sv le ratio surface/volume de la particule (m^{-1}), K la constante de Kozeny.

La valeur de ce coefficient K est discutée dans la littérature lors de l'utilisation de l'équation V.3 pour évaluer la porosité des dépôts bactériens. Foley et al. (2006) soulignent de nombreuses incohérences entre les valeurs de résistances spécifiques des dépôts de levures ou de bactéries et leur porosité quand une valeur de 5 est

utilisée, valeur classiquement admise dans les systèmes à lit compact. Cependant, comme de nombreux autres auteurs (Mota et al., 2001; Shimizu et al., 1994), nous utiliserons cette valeur de K (égale à 5) afin d'évaluer en première approximation les porosités des dépôts formés dans notre travail. Les porosités ε calculées à partir de nos résultats sont de 0,11 pour le dépôt de *E. coli*, de 0,05 pour *P. aeruginosa*, et de 0,07 pour *S. aureus*. Ces résultats sont similaires à ceux reportées dans la littérature pour la souche *E. coli* : ε varient entre 0,08 à 0,12 (Fane et al., 1991) et entre 0,14 et 0,17 en fonction de la pression appliquée (Beaufort et al., 2011). Dans le cas d'une simulation numérique, l'empilement de particules à la forme de cylindre possède une porosité théorique de 0,251 (Mota et al., 2001). Dans notre cas d'étude, les porosités calculées pour les bactéries à la forme de bacille, *E. coli* et *P. aeruginosa*, sont nettement plus faibles que la valeur théorique, ce qui traduit la densité élevée des dépôts bactériens formés : l'empilement aléatoire des cellules ne suit pas une structure parallèle (la valeur théorique ε = 0,251 est basée sur un empilement en mur de brique). L'orientation aléatoire, à l'intérieur du dépôt, des cellules à la forme de bacille peut donc expliquer les valeurs de porosités observées. En effet, dans le cas d'un empilement orthogonal, la porosité d'un dépôt de particules à la forme cylindrique diminue à une valeur de 0,093 (Nakanishi et al., 1987). De plus, la présence des organites extracellulaires (pili, flagelles) ou des composées à haut poids moléculaire sécrétés par les cellules (EPS) peuvent également avoir un effet significatif sur les valeurs de porosités calculées (Hodgson et al., 1993). La porosité théorique d'un dépôt formé par une suspension monodisperse de sphères est quant à elle comprise entre 0,364 et 0,445 (Nolan and Kavanagh, 1992). Dans le cas du dépôt formé par les cellules de *S. aureus* à la forme de coque, la porosité mesurée expérimentalement est ici aussi nettement inférieure à cette gamme de valeurs théoriques.

B.3.2. Compressibilité

Afin de compléter notre étude, des mesures de compressibilité des dépôts ont été effectuées. Pour cela, les dépôts préalablement formés à la surface de la membrane ont subi des tests de filtration à l'eau avec incrément de pression et cela pour les trois souches étudiées (en condition témoin et après exposition à un antibiotique).

Le protocole spécifique dédié à ce paragraphe consiste, dans un premier temps, à réaliser une filtration d'un volume fixe de 300 mL de suspension bactérienne de concentration connue (Ca: 10^7 UCF/mL) puis dans un second temps, de l'eau stérile

est filtrée à travers la membrane colmatée. Les courbes de flux mesurées en fonction de la pression transmembranaire sont présentées Figure V.16 pour les trois souches modèles en condition témoin. Pour chaque pression transmembranaire appliquée, le flux est mesuré une fois stabilisé pour déterminer la résistance spécifique du dépôt (α) d'après la relation I.8 (cf. Chapitre I). L'absence d'augmentation du flux à l'eau lors des incréments de pression sur les dépôts de *E. coli* et de *P. aeruginosa* traduit un effondrement de la structure du dépôt. La

Figure V.17 présente l'évolution de la résistance spécifique du dépôt bactérien en fonction de la pression transmembranaire appliquée pour les trois souches modèles et pour les deux conditions physicochimiques testées (condition témoin ou après un traitement antibiotique). Afin de modéliser la variation de la résistance spécifique α en fonction de la pression transmembranaire et traduire la compressibilité des dépôts, une relation de type puissance est proposée dans la littérature telle que (Foley, 2011):

$$\propto = a\Delta P^n \qquad \text{Eq V.4}$$

avec a une constante et n un index qui traduit la compressibilité du dépôt bactérien colmatant (n est égal à 0 pour un gâteau incompressible et augmente pour des compressibilités croissantes).

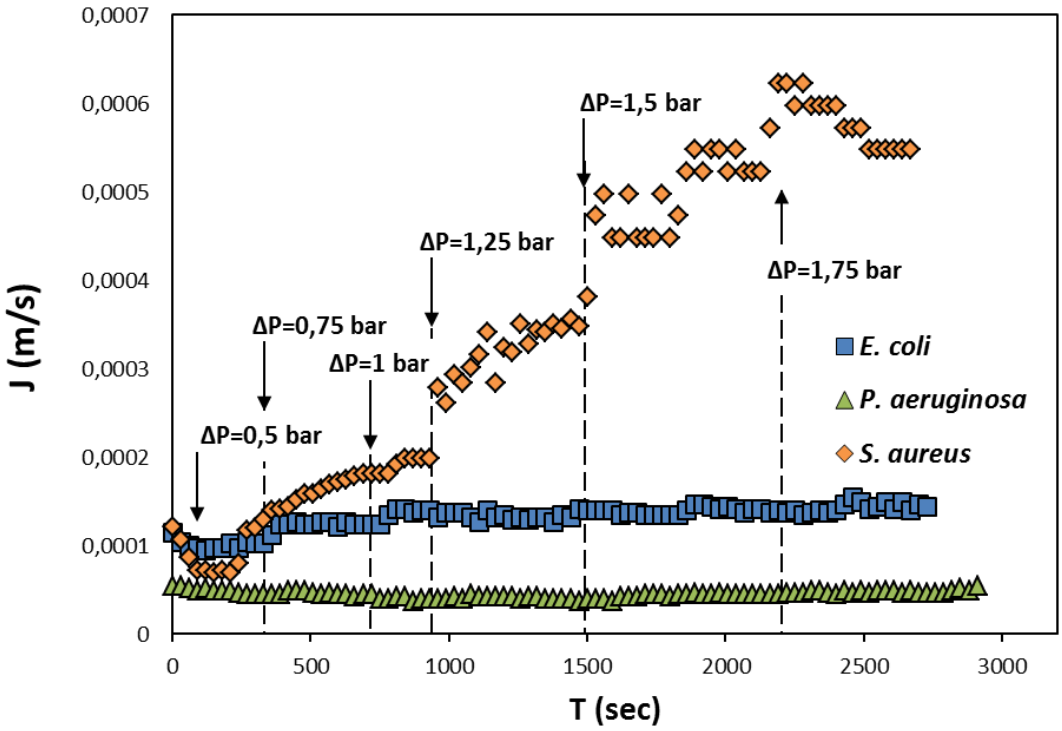


Figure V.16 : Evolution des flux mesurés en fonction des incréments de pression lors de filtration à l'eau pure sur membrane colmatée.

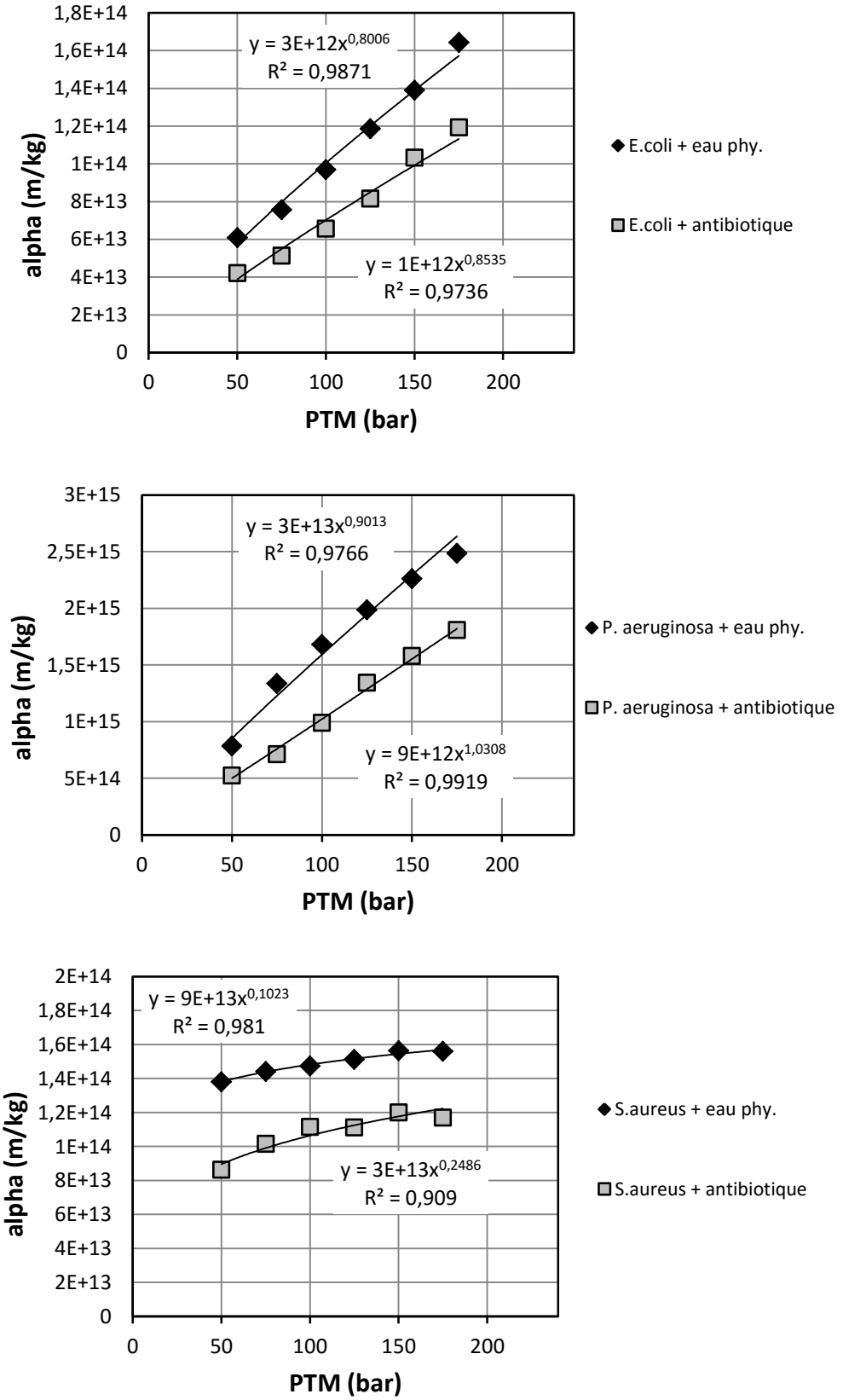


Figure V.17 Evolution des résistances spécifiques des dépôts bactériens en fonction de la pression transmembranaire appliquée.

Souche	Condition	n	Δn	ΔYM
E. coli	eau Phy.	0,80		
	Amoxicilline	0,85	+ 6 %	- 39 %
P. aeruginosa	eau Phy.	0,90		
	Ticarcilline	1,03	+ 14 %	- 47 %
S. aureus	eau Phy.	0,10		
	Amoxicilline	0,25	+ 250 %	- 71 %

Figure V.18: Indice de compressibilité mesuré (n) pour des dépôts de bactéries modèles en condition témoin ou après exposition à un antibiotique et écarts relatifs de compressibilité et de module de Young entre les deux conditions testées.

Les mesures de compressibilité des dépôts sont synthétisées sous forme de tableau dans la Figure V.18. En condition témoin (eau physiologique), on distingue ainsi deux comportements en fonction du type de Gram des bactéries qui composent le dépôt. Pour les souches *E. coli* et *P. aeruginosa*, les dépôts formés sont de nature compressible : avec l'augmentation de la pression, le dépôt se comprime et sa résistance spécifique augmente. A noter que l'on retrouve pour *E. coli*, un indice de compressibilité proche de celui disponible dans la littérature - n: 0,79 (Nakanishi et al., 1987). A l'inverse, dans le cas de la souche *S. aureus* à Gram positif les caractéristiques morphologiques de cette bactérie lui confèrent, encore une fois, des propriétés spécifiques : le dépôt formé par les cellules rigides et sphériques est incompressible. Les faibles valeurs de n, mises en évidence avec *S. aureus*, se rapprochent des compressibilités caractéristiques des levures, avec $n < 0,5$ (Beaufort et al., 2011; Foley, 2006; Nakanishi et al., 1987). Nos résultats prouvent également qu'une diminution de la rigidité des cellules bactériennes exposées à un antibiotique entraine la formation de dépôts de compressibilité plus importante. Cette augmentation de l'indice n est plus prononcée pour la souche *S. aureus* traitée avec l'antibiotique, perturbation qui semble directement corrélée à la diminution du module de Young des parois cellulaires (cf. Chapitre III).

Il a également été montré par McCarthy et al. (1998) une dépendance entre l'indice de compressibilité et le facteur de forme aussi appelé rapport d'aspect du microorganisme filtré. Le rapport d'aspect, noté Lcell, est utilisé dans la littérature pour simplifier l'expression de la morphologie des cellules bactériennes et est défini par la relation suivante:

$$\text{Lcell} = \frac{L}{h} \qquad \text{Eq V.5}$$

avec L la longueur et h la hauteur de la cellule bactérienne (cf. Chapitre III), où h n'est autre que le diamètre du cylindre utilisé pour représenter schématiquement une bactérie à la forme de bacille. Dans le cas d'une cellule à la forme de sphère, comme la souche modèle utilisée dans notre étude *S. aureus*, le rapport d'aspect est égal à 1. A l'inverse, plus la cellule bactérienne va être allongée sous la forme d'un filament et plus la valeur de Lcell sera élevée. Nous avons donc souhaité étudier l'impact combiné, sur l'indice de compressibilité, du rapport d'aspect et de la rigidité des bactéries. Pour cela, le paramètre de module de surface de la paroi cellulaire a été considéré, noté Kcell et défini dans le Chapitre IV.

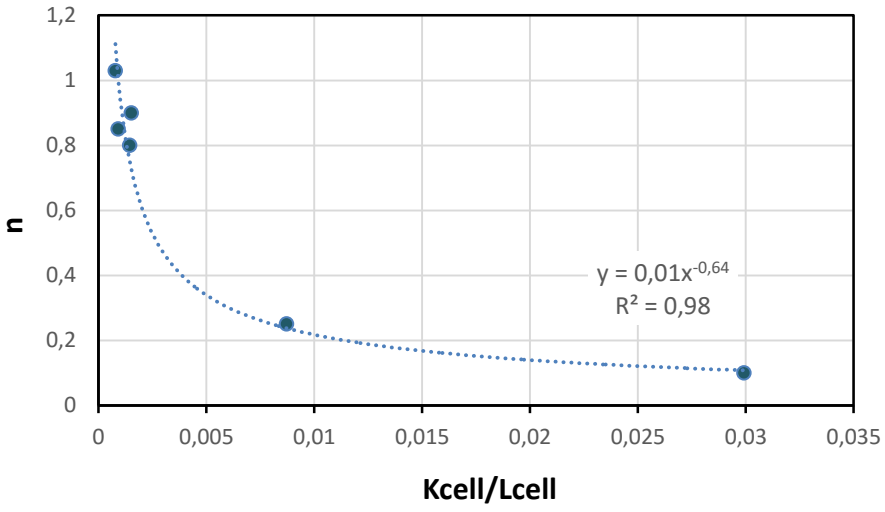


Figure V.19: Evolution de l'indice de compressibilité en fonction du rapport Kcell/Lcell des cellules bactériennes.

Sur la base d'une diminution de n avec l'augmentation de Kcell (rigidité de la bactérie) et avec la diminution de Lcell (rapport d'aspect), nous avons fait le choix d'un paramètre Kcell/Lcell comme variable. Ceci permet de prendre en compte les

propriétés mécaniques et morphologiques des cellules bactériennes dans un seul indicateur. Pour chaque souche bactérienne étudiée, et pour les conditions physicochimiques testées, on représente graphiquement l'indice de compressibilité n déterminé expérimentalement en fonction du rapport Kcell/Lcell (cf. Figure V.19). Une loi puissance est utilisée pour traduire mathématiquement la tendance observée. Il apparait clairement que la compressibilité d'un dépôt est d'autant plus élevée quand les cellules bactériennes possèdent un rapport Kcell/Lcell petit, caractéristique des cellules à faible tension de surface (cellules déformables) avec un rapport d'aspect important (cellules allongées ou filamenteuses). Ainsi, l'évolution de la compressibilité des dépôts formés dans ce travail suit une tendance cohérente avec les propriétés morphologiques et nanomécaniques des cellules bactériennes, ce qui n'était pas le cas des résistances spécifiques des dépôts. La partie suivante va nous permettre de revenir sur ce dernier point.

Partie C. Caractérisation des dépôts bactériens

Afin d'aller plus loin dans la connaissance des dépôts formés lors de la filtration frontale de souches à Gram positif et à Gram négatif dans la condition témoin (eau physiologique), nous avons souhaité réaliser la caractérisation des dépôts. Les résultats obtenus par microscopie ainsi que par chromatographie d'exclusion stérique sont présentés par la suite. L'objectif principal est d'amener des éléments de compréhension à l'évolution de la résistance spécifique des dépôts car la seule prise en compte du module de Young ou des propriétés morphologiques des cellules ne permet pas d'expliquer les tendances mesurées.

Tous les résultats présentés dans cette partie du Chapitre V ont été obtenus pour des essais conduits pour un seul ensemble de conditions opératoires tel que: la taille de pore de la membrane est de 0,4 µm, la concentration de la suspension d'alimentation est voisine de 10^7 UFC/mL, la pression transmembranaire appliquée est de 0,5 bar.

C.1. Observation de la morphologie du dépôt par microscopie

Deux techniques ont été utilisées pour visualiser la structure du dépôt bactérien qui se forme pendant la filtration frontale de suspensions bactériennes. Pour cela, et bien que ces deux techniques nécessitent l'arrêt de l'expérience de filtration à un volume déterminé pour réaliser l'immobilisation, la fixation et l'observation de la surface de la membrane, la microscopie à balayage électronique (SEM) et la microscopie à balayage laser (CLSM) ont été employées. En effet, la cellule de filtration frontale ainsi que notre dispositif placé sous hôte à flux laminaire ne permettent pas l'observation *in situ* de la membrane. Une membrane neuve sur laquelle est filtrée une nouvelle suspension est alors utilisée pour chaque acquisition (correspondant à un volume filtré déterminé), le coupon étant extrait de la cellule pour les observations. Le choix de deux techniques différentes d'observation nous a permis de nous assurer que pour chacune d'elles, la nature "destructive", vis-à-vis de la membrane, des protocoles mis en œuvre (nécessité de fixer l'échantillon biologique ou de le révéler à l'aide d'un marqueur fluorescent en milieu liquide) n'avait pas pour effet d'altérer la morphologie du dépôt.

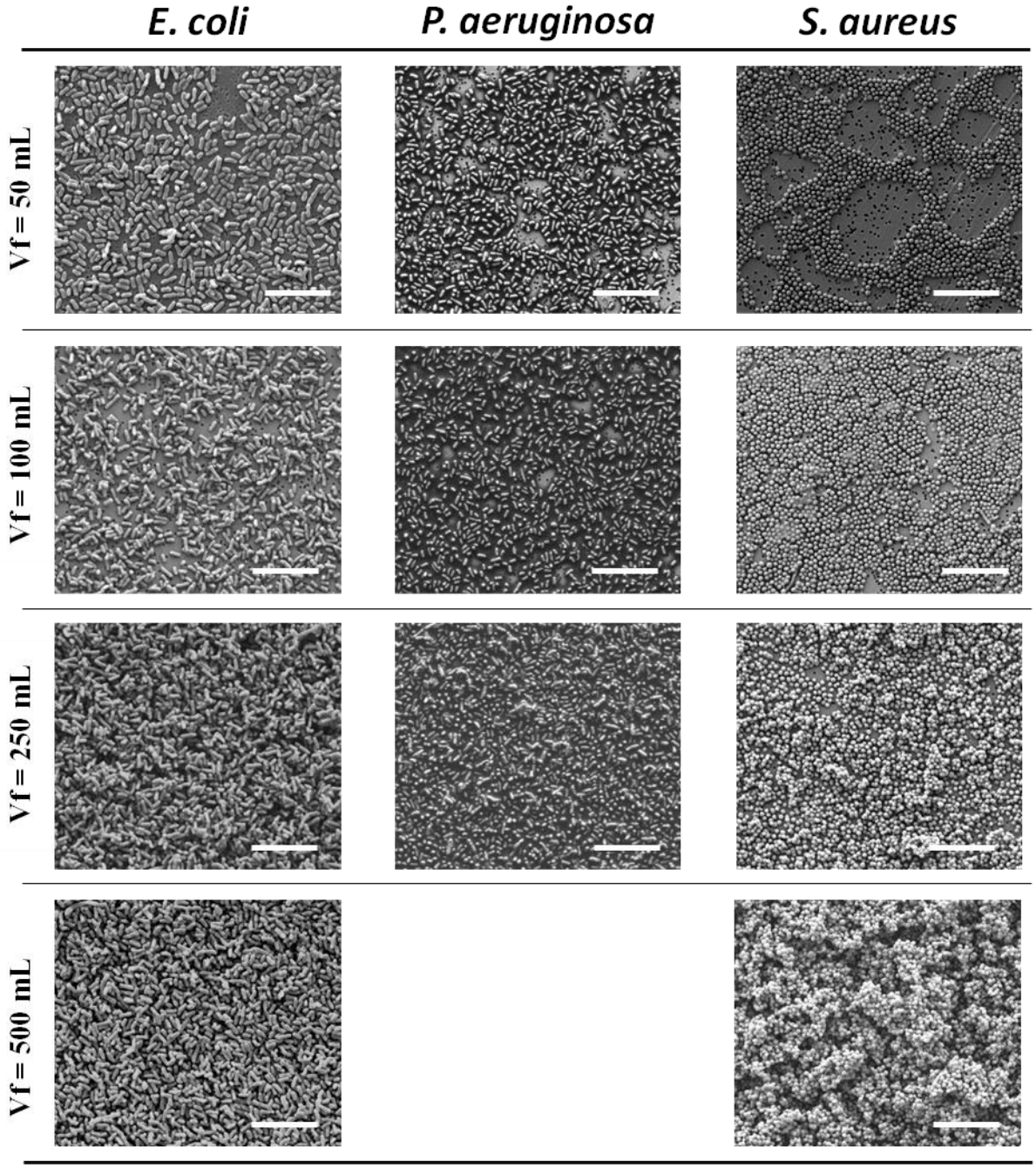


Figure V.20 : Observation SEM des dépôts bactériens formés à différents volumes filtrés après des filtrations réalisées sur membrane isopore 0,4 µm (avec Ca : 10^7 UCF/mL ; PTM : 0,5 bar - barre d'échelle : 10 µm).

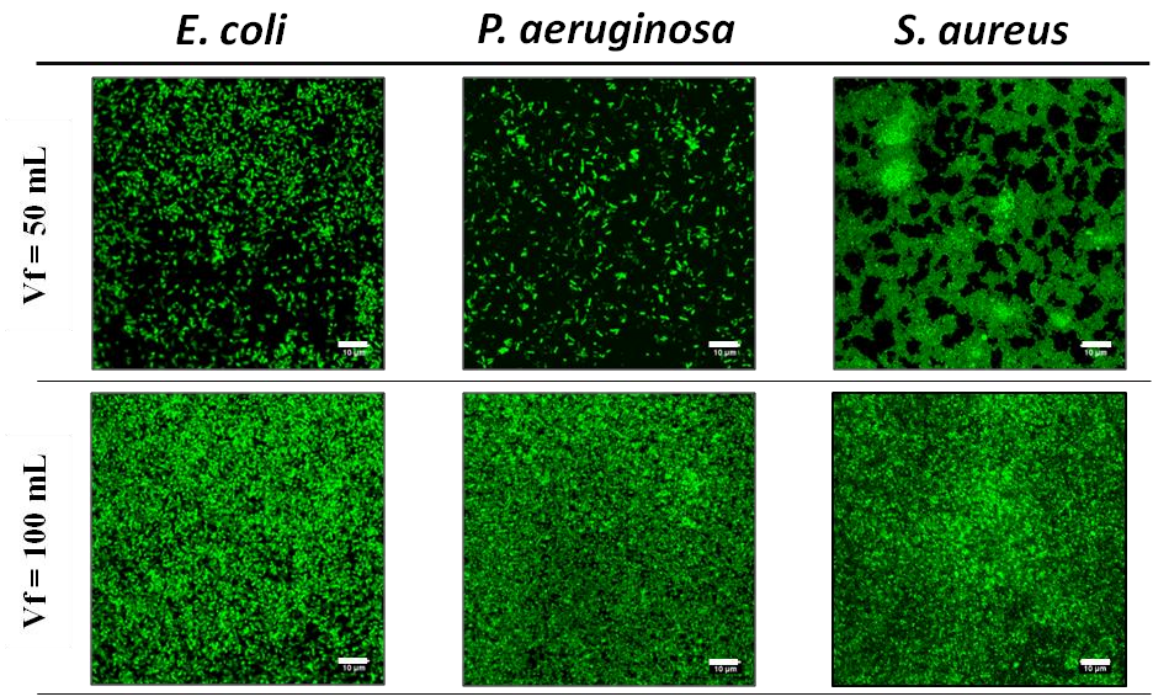


Figure V.21 : Observation des projections maximales d'intensités mesurées par CLSM sur des dépôts bactériens formés à différents volumes filtrés lors de filtrations réalisées sur membrane isopore 0,4 µm, Ca : 10^7 UCF/mL ; PTM : 0,5 bar (barre d'échelle : 10 µm)

La Figure V.20 présente les images obtenues, par observation SEM, des dépôts bactériens formés pour différents volumes filtrés à la surface de la membrane isopore. La Figure V.21 présente les images de projections orthogonales des intensités maximales, mesurées par CLSM, de ces mêmes dépôts bactériens. Ces données brutes nous offrent la possibilité de reconstruire en 3D les dépôts (cf. Figure V.22).

Tout d'abord, les images obtenues avec ces deux techniques attestent du maintien de la structure du dépôt bactérien pendant les différentes étapes de préparation des échantillons. Effectivement, pour tous les volumes filtrés, les différentes morphologies révélées par l'acquisition SEM correspondent à celles mises en évidence par les observations CLSM et cela, pour les différentes échelles d'observations correspondantes (cf. Figure V.20 Figure V.21 Figure V.22.)

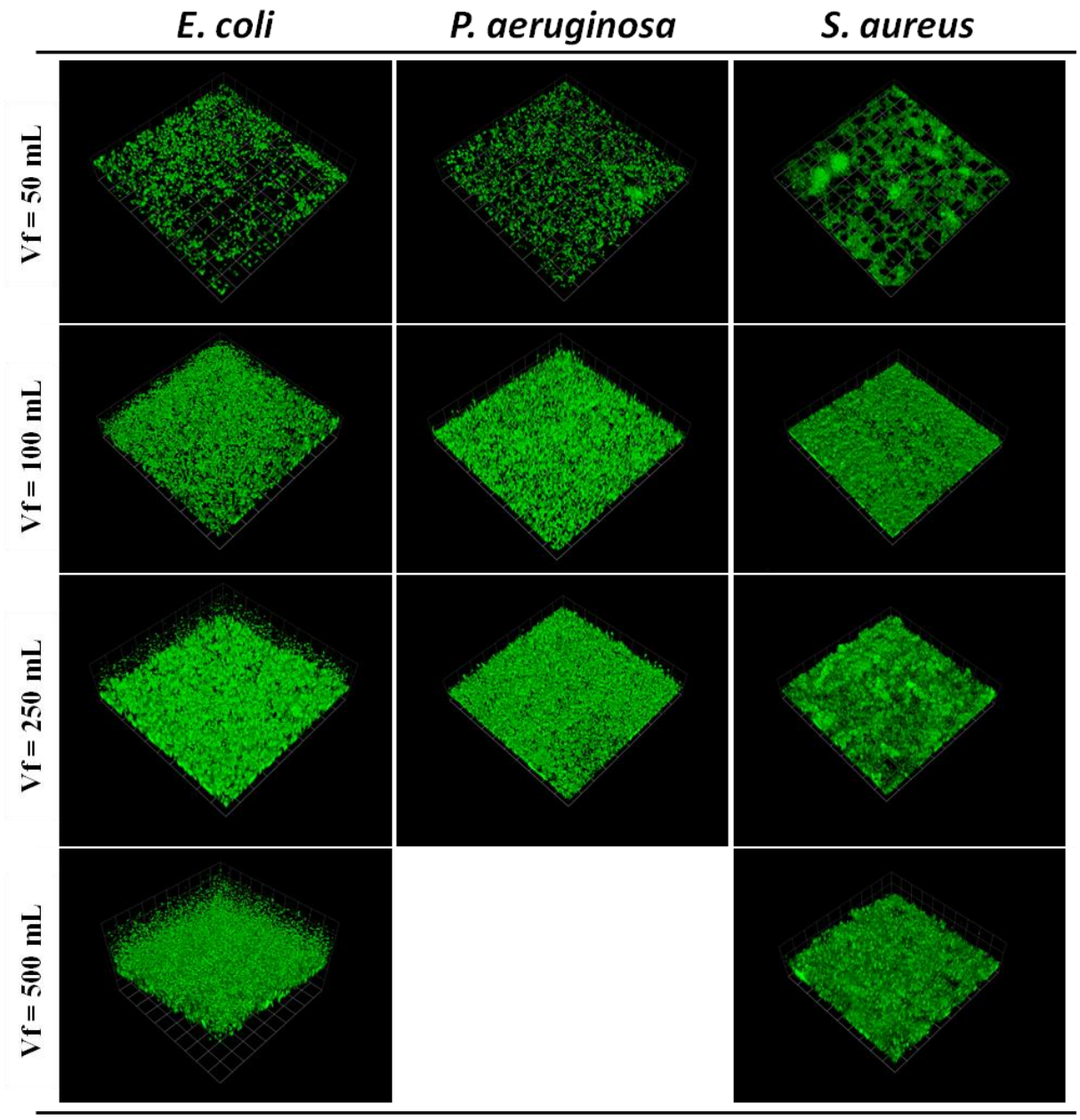


Figure V.22 : Reconstruction 3D à partir des mesures CLSM de dépôts bactériens formés à différents volumes filtrés lors de filtrations réalisées sur membrane isopore 0,4 µm, (avec Ca : 10^7 UCF/mL ; PTM : 0,5 bar). La surface observée en x-y = 93,5 x 93,5 µm.

Pour les souches à Gram négatif, la construction progressive du dépôt bactérien suit les étapes classiques de formation d'un dépôt colmatant. Au volume filtré observé le plus faible (Vf = 50 mL), les cellules commencent à recouvrir uniformément la surface de la membrane. Avec l'augmentation du volume filtré, le recouvrement de la membrane s'amplifie : à Vf= 100 mL, on observe une couche homogène de cellules au contact direct de la membrane ainsi que le début de la formation ponctuelle d'une seconde couche de cellules; à Vf= 250 mL, la membrane est uniformément recouverte par plusieurs couches de cellules. Pour le dernier volume filtré observé (Vf= 500 mL), le dépôt bactérien est composé d'une épaisse couche de bactéries.

Concernant la souche à la forme de coque *S. aureus*, la morphologie spécifique du dépôt semble être gouverné par la nature sphérique des cellules d'une part, mais aussi par son organisation collective en agrégats. En effet, pour le volume filtré le plus faible, le dépôt des premières cellules de *S. aureus* n'est pas homogène et uniforme. Il est structuré sous la forme d'ilots de cellules interconnectés, alternant ainsi des zones à fortes densité en cellules et des zones vides où la membrane n'est pas colmatée. Cette organisation spécifique à la souche *S. aureus* provient certainement de sa capacité, comme discuter dans le chapitre précédent, à former des agrégats en suspension en réaction à des contraintes extérieures. Pour les volumes filtrés plus importants, la construction du dépôt de *S. aureus* se poursuit avec la formation de la première couche de cellules à Vf= 100 mL, puis avec l'empilement progressif d'agrégats cellulaires aboutissant à la formation d'un dépôt colmatant de structure irrégulière avec des voies d'écoulement préférentiel.

Afin d'aller plus loin dans l'exploitation des résultats, sur les images obtenues par CLSM et réalisées au volume filtré le plus faible Vf= 50 mL (cf. Figure V.21), il est possible de déterminer par analyse d'image le taux de couverture de la surface de la membrane par les cellules bactériennes. Même si cette information est obtenue pour une petite surface de membrane (inférieure à 100 μm^2), les mesures réalisées permettent de mettre en évidence des différences importantes : pour la souche *E. coli* les cellules recouvrent de 40 à 55 % de la surface de la membrane, pour *P. aeruginosa* les cellules recouvrent 40 à 50 % de la membrane et pour *S. aureus* on trouve un taux de couverture de l'ordre de 35 à 45 % en fonction de la zone analysée. Ainsi, le taux de couverture pour Vf = 50 mL est sensiblement le même pour les bactéries à Gram négatif alors qu'il est effectivement plus faible pour la souche à Gram positif, toutes autres conditions étant identiques par ailleurs.

Pour Vf = 100 mL, la Figure V.23 présente un zoom de la surface de la membrane dans le cas de la filtration de *E. coli* et de *P. aeruginosa*. De plus, des coupes transversales des images obtenues par CLSM sont présentées Figure V.24 afin de visualiser les différences de structure des premières couches de cellules à la surface de la membrane et ceci, toujours pour une quantité de bactéries déposées sur la membrane identique. Sur ces images, nous observons des dépôts de structures différentes. Il semble que pour la souche *P. aeruginosa*, le dépôt soit plus dense que celui formé par *E. coli*. En effet, sur la Figure V.23, nous pouvons distinguer pour *E. coli* un empilement de certaines bactéries alors que la totalité de la surface de la membrane n'est pas intégralement couverte, ce qui se traduit Figure V.24 par la visualisation d'un dépôt occupant une épaisseur plus importante que dans le cas de *P. aeruginosa*. Pour cette dernière souche, la première couche de cellules parait plus homogène (cf. Figure V.23) et donc l'épaisseur du dépôt semble plus faible (cf. Figure V.24).

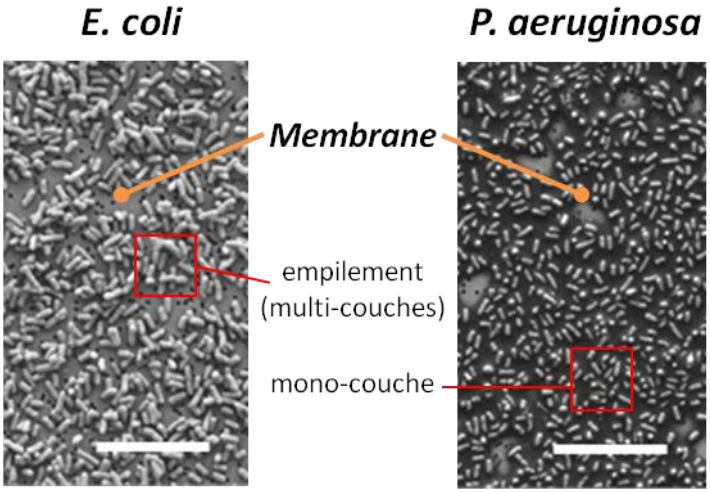


Figure V.23 : Observation SEM de la formation des premiers couches de cellules à la surface de la membrane isopore à Vf = 100 mL (barre d'échelle : 10 µm).

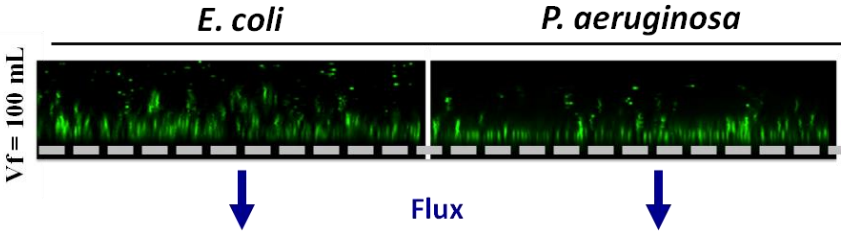


Figure V.24: Coupes transversales, obtenues à partir des images CLSM à Vf = 50 mL, des dépôts bactériens de *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Ces images permettent donc de souligner les différences de structures des dépôts bactériens formés par les trois souches modèles et attestent également des différences de porosités. Ainsi, si l'on compare les images obtenues par microscopies avec les valeurs de résistances spécifiques calculées à partir des données de flux de filtration, on remarque que le dépôt formés par la souche *P. aeruginosa* possède la résistance calculée la plus élevée (α = 7,9.10^{14} m/kg) et présente des images où la densité bactérienne à la surface de la membrane semble la plus importante. De plus, les cellules de *P. aeruginosa* ont présenté, sur les images SEM (cf. Figure V.20), la caractéristique d'être enveloppées par une nette coloration noire ressemblant à un gel. Afin de déterminer si cette observation pouvait provenir d'une production accrue de composés extracellulaires (noté EPS, cf. Chapitre I), la quantification des molécules à hauts poids moléculaires présentes dans les dépôts formés par les souches *E. coli* et *P. aeruginosa* a été envisagée.

C.2. Analyse de la composition en EPS des dépôts bactériens

Toutes les filtrations présentées dans cette étude ont été réalisées, en condition stérile, avec des suspensions bactériennes issues de cultures pures. C'est pourquoi, dans un premier temps, seule la caractérisation morphologique des cellules bactériennes en suspension dans de l'eau physiologique a été envisagée (cf. Chapitre III). Néanmoins, afin d'expliquer les différences de résistances spécifiques des différents dépôts bactériens mesurées dans cette partie, et plus spécifiquement les écarts entres les souches de même forme *E. coli* et *P. aeruginosa*, (cf. Figure III.6), la quantification des composés extracellulaires (EPS) présents à l'intérieur du dépôt a été effectuée. Grâce à la chromatographie d'exclusion stérique, les compositions relatives en EPS des dépôts bactériens formés après une filtration, sur membrane isopore de 0,4 µm, de 300 mL de suspension bactérienne à une concentration voisine 10^{7} UFC/mL ont été comparées. Le protocole employé a pour objectif d'extraire les EPS présents à la surface du filtre sans entrainer des phénomènes de lyse cellulaire qui pourraient impacter les concentrations mesurées (cf. Chapitre II). Les chromatogrammes obtenus pour les deux dépôts analysés (*E. coli* et *P. aeruginosa*) sont exposés Figure V.25. Pour rappel, les EPS sont révélés en sortie de colonnes grâce à leur absorbance dans l'UV (λ : 210 et 280 nm) et par fluorescence (λ_{Ex} 221/ λ_{Em} 350 nm).

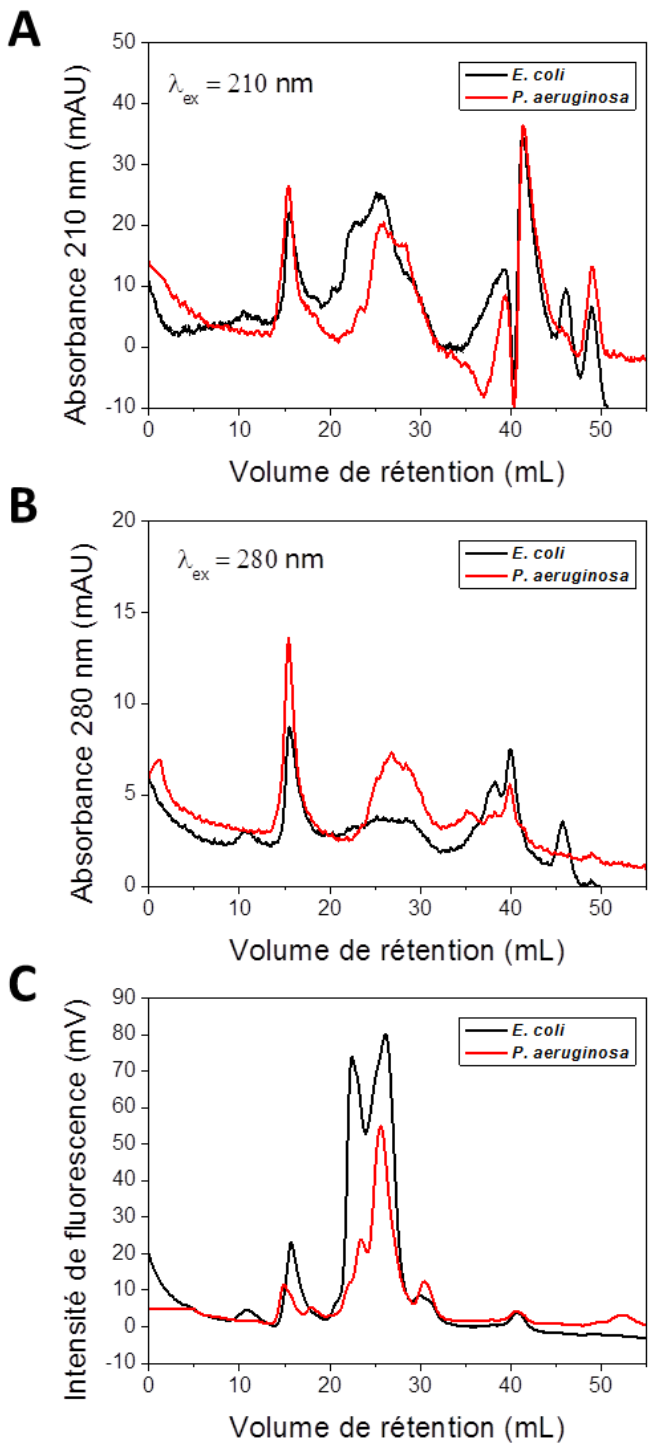


Figure V.25 : Profils de la composition des EPS présents dans les dépôts de *E. coli* et *P. aeruginosa* révélés en sortie de colonnes par UV (A et B) et par fluorescence (C).

L'analyse des profils des chromatogrammes, par intégration globale des pics, permet de révéler les points suivants :

- à λ = 280 nm, utilisée pour détecter les protéines et les acides nucléiques, on observe trois fois plus de composés organiques complexes dans le dépôt de *P. aeruginosa* en comparaison du dépôt de *E. coli* (respectivement 100,4 mAU.mL et 35,1 mAU.mL). De plus, une quantité deux fois plus importante de molécules de hauts poids moléculaires (tailles supérieures à 1 000 kDa) est mesurée dans le dépôt de *P. aeruginosa* (90 mAU.mL contre 40,1 mAU.mL pour le dépôt de *E. coli*);

- à λ = 210 nm, dédiée à la détection des sucres, des molécules aliphatiques et de tous les composés organiques, les quantités globales des EPS dans les deux dépôts sont proches (298,7 mAU.mL pour *P. aeruginosa* et 281,4 mAU.mL pour *E. coli*);

- par fluorescence, qui permet de révéler les protéines, on mesure deux fois plus de protéines dans le dépôt de *E. coli* que dans le dépôt de *P. aeruginosa* (respectivement 396,3 mV.mL et 173,8 mV.mL).

Ces observations permettent de mettre en évidence une différence de composition entre les deux dépôts étudiés. Plus spécifiquement pour la souche *P. aeruginosa*, une quantité importante de macromolécules et de composés organiques complexes (EPS de hauts poids moléculaires >1 000 kDa) est détectée en comparaison du dépôt formé par *E. coli*.

C.3. Discussion

Ces informations quantitatives et qualitatives permettent d'expliquer les écarts de résistances spécifiques des dépôts mis en évidence précédemment dans ce chapitre. La filtration de la souche *P. aeruginosa* conduit donc à la formation d'un dépôt plus homogène et semble-t-il plus dense que les deux autres souches modèles. De plus cette bactérie libère, lors de la filtration, une grande quantité d'EPS de hauts poids moléculaires qui contribuent également à abaisser la porosité du dépôt et donc à augmenter sa résistance spécifique. En effet, les bactéries sont susceptibles de secréter dans l'environnement des EPS qui, en raison de leur poids moléculaire élevé et de leurs rôles importants dans la structuration des biofilms (cf. Chapitre I), sont en grande partie localisés dans le dépôt bactérien. Leur accumulation à la surface de

la membrane peut induire la mise en place d'une polarisation de concentration à l'échelle moléculaire et par conséquent entraîner une diminution du flux de perméation. C'est pourquoi, les EPS sont considérées, dans différents travaux, comme la cause principale du colmatage de la membrane lors de l'élimination de microorganismes par des traitements UF/MF ou lors de la mise en œuvre de bioréacteurs à membranes (Hernandez Rojas et al., 2005; Rosenberger and Kraume, 2002). Cette quantification des EPS, bien que non exhaustive, nous permet ainsi d'expliquer les différences de flux mesurées dans la partie B de ce chapitre entre les deux souches à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) qui possèdent, à l'échelle de la cellule, des caractéristiques morphologiques relativement proches.

Dans le cas de la filtration de la bactérie à Gram positif, le dépôt formé présente une structure très irrégulière avec des voies d'écoulement préférentiel. Ceci s'explique par l'aptitude de *S. aureus* à former des agrégats en réaction à des contraintes extérieures. Cette souche présente, cependant, des résistances spécifiques de dépôt proches de cellules mesurées avec *E. coli* ce qui laisse penser que du matériel extracellulaire peut dans le cas de *S. aureus*, comme avec la souche *P. aeruginosa*, avoir un rôle déterminant dans l'évolution du flux de filtration.

Nous pouvions donc attendre du dépôt de *S. aureus* une plus grande compressibilité que pour les deux souches à Gram négatif, ce qui n'est pas le cas. Nos résultats semblent donc montrer que, dans nos conditions opératoires, les trois souches modèles, conduisent à des dépôts d'indice de compressibilité fortement dépendant au rapport Kcell/Lcell, la structure intrinsèque du dépôt n'ayant qu'un rôle secondaire.

Conclusion

Cette dernière partie du projet de thèse s'est intéressée, dans un premier temps, au suivi de la sélectivité d'une microfiltration sur des temps longs, alors que les pores de la membrane sont de plus petit diamètre que les dimensions des cellules bactériennes présentes en suspension dans le fluide filtré. A nouveau, nos résultats ont mis en évidence des différences d'abattement en fonction de la souche bactérienne étudiée et plus précisément en fonction de son type de Gram. Les bactéries à Gram négatif qui ont été définies dans nos travaux comme déformables (*E. coli* et *P. aeruginosa*) ont présenté des profils à l'allure caractéristique : après une phase de latence pendant laquelle les cellules se déforment à l'entrée du pore et traversent la membrane, le transfert atteint rapidement une valeur maximale puis diminue progressivement avec l'augmentation du volume filtré. Ce phénomène est expliqué par la mise en place d'un colmatage à la surface de la membrane qui augmente la sélectivité de la membrane en plus d'avoir un impact négatif sur les flux de perméation. L'utilisation des différents modèles de filtration a permis, dans nos conditions opératoires, de définir la formation d'un dépôt bactérien comme mécanisme principal de colmatage de la membrane.

Concernant la souche *S. aureus*, le transfert observé est toujours d'une amplitude inférieure en comparaison des souches déformables. Néanmoins, l'exposition à un agent chimique perturbe significativement la rétention de ce type de cellules, alors que dans le cas des bactéries à Gram négatif, le traitement ne modifie l'amplitude de l'abattement que de façon minime. Nos résultats démontrent, néanmoins, que pour les microorganismes exposés à un traitement antibiotique qui altère les propriétés nanomécaniques des parois cellulaires, la contamination du perméat pouvait être observée pour des volumes filtrés plus faibles (phase de latence plus courte).

La diminution du transfert avec la mise en place du colmatage peut être expliquée par le très fort encombrement qui empêche les cellules bactériennes d'accéder aux pores mais diminue aussi leur possibilité de s'orienter préférentiellement dans le sens de l'écoulement pour pénétrer dans un pore, cela malgré le fait qu'il existe une pression plus importante sur les cellules qui sont en contact avec la membrane en comparaison de celles présentes au cœur du dépôt (Meireles et al., 2004).

Les images obtenues par microscopies (SEM et CLSM) ont permis de vérifier la présence d'un dépôt bactérien à la surface de la membrane et d'observer sa formation pendant l'expérience de filtration frontale. Réalisées dans des conditions opératoires identiques (taille de pore, concentration d'alimentation et pression transmembranaire), nos observations ont permis de révéler des structures de dépôts spécifiques à chacune des trois souches modèles étudiées. Enfin, la quantification des composés extracellulaires présents dans les dépôts formés pendant la filtration des suspensions de *E. coli* et *P. aeruginosa* a permis d'expliquer les différences de flux et de résistances spécifiques des dépôts mesurées entre ces deux souches. Ainsi, il a été démontré que le dépôt formé lors de la filtration de la souche *P. aeruginosa* est non seulement constitué des cellules bactériennes mais également d'une grande quantité d'EPS de hauts poids moléculaire libérés par les bactéries. Ce point explique pourquoi cette souche présente des valeurs de résistances spécifiques de dépôts les plus élevées.

Enfin, des mesures de compressibilités des dépôts formés ont révélé une relation directe entre cet indice et le rapport du module de surface de la paroi par le facteur de forme de la cellule, la structure du dépôt ne jouant semble-t-il qu'un rôle secondaire.

Conclusion générale et perspectives

Ce projet doctoral avait pour objectif premier d'observer et de quantifier le transfert de bactéries déformables à travers une membrane, dans le cas où les dimensions des cellules (de l'ordre du µm) sont supérieures à la taille des pores de la membrane (inférieure à 0,5 µm). Dans ce cas, le mécanisme de sélectivité basé sur la taille des particules présentes dans le fluide filtré ne permet plus de garantir la rétention totale des cellules vivantes. Ce phénomène, observé à de nombreuses reprises dans la littérature à l'échelle du laboratoire, explique pourquoi une contamination du perméat peut subvenir dans un procédé industriel de microfiltration, ou en ultra et nanofiltration lorsque les membranes sont altérées et vieillissantes. Dans ce contexte se posent de nombreuses questions : *comment valider la capacité d'une membrane à retenir des microorganismes ? L'utilisation d'un test normalisé sera-t-elle suffisamment sécuritaire ? Quels risques sont pris lors d'un changement des conditions opératoires ?* Ce projet visait à apporter des éléments de réponses à ces questions en poursuivant l'analyse des mécanismes de déformation des cellules biologiques en fonction d'une palette de conditions de filtration réalistes par rapport aux conditions réelles d'utilisation.

Pour cela, nous nous sommes placés dans un cas expérimental spécifique : la filtration est réalisée en condition stérile et en mode frontal sur une membrane isopore, membrane aux propriétés particulières qui en font un outil de choix pour notre étude (surface plane, taille de pore calibrée, pores uniformes et cylindriques). Après les différentes étapes de contrôle d'intégrité mises en place en amont des expériences de filtration, ces membranes nous ont permis d'étudier le transfert de bactéries à travers des pores de taille connue de 0,4 et 0,22 µm.

Observation réalisées par SEM de cellules de *E. coli* (à gauche) et de *S. aureus* (à droite) sur des membranes isopores de 0,4 µm

Les trois microorganismes modèles sélectionnés pour notre étude (*E. coli, P. aeruginosa* et *S. aureus*) appartiennent au genre bactérien et sont des pathogènes d'origine hydrique responsables d'infections nosocomiales. Nous avons, dans un premier temps, étudié la forme, la taille et les propriétés nanomécaniques de ces

bactéries placées en suspension dans des conditions physico-chimiques identiques à celles appliquées à nos expériences de filtration. Les différents outils mis en œuvre (DLS, TEM, AFM) nous ont permis de mesurer les dimensions et notamment la plus petite dimension des cellules bactériennes. La technologie AFM, quant à elle, a révélé des différences importantes de rigidité entre les trois souches modèles, différences qui sont liées à l'architecture et à la composition des parois cellulaires. Pour ces dernières analyses, alors qu'une immobilisation électrostatique convenait très bien aux deux souches à Gram positif à la forme de bacille, une technique d'immobilisation physique a dû être spécifiquement mise au point pour la souche à Gram positif en forme de coque.

Les informations acquises sur les bactéries en suspension ont ensuite été utilisées pour comprendre le rôle des caractéristiques morphologiques et mécaniques dans le transfert des cellules par déformation à travers un pore. Les premiers tests réalisés sur membrane de taille de pore 0,2 µm ont conduit à des contaminations du perméat nulles à très faibles. Cette taille de pore, même si elle n'assure pas une rétention totale, n'a donc pas permis de quantifier de façon sensible et reproductible les variations du transfert bactérien en réponse aux divers paramètres étudiés tels que la pression transmembranaire ou encore la concentration en bactéries dans l'alimentation. Ce volet du projet a donc été développé sur membrane de taille de pore 0,4 µm, dimension pour laquelle la sensibilité souhaitée a été atteinte.

Nos résultats démontrent que ce sont les caractéristiques structurales des bactéries couplées aux données d'élasticité de la paroi cellulaire qui déterminent le mécanisme de sélectivité appliqué aux cellules vivantes. L'amplitude et l'évolution de la contamination du perméat pendant une expérience de filtration sont donc liées au caractère de Gram des cellules bactériennes. Les bactéries à Gram négatif qui ont été définies dans nos travaux comme déformables (*E. coli* et *P. aeruginosa*) ont démontré qu'elles étaient susceptibles de traverser la membrane dès les premiers volumes filtrés et que le transfert atteint rapidement une valeur maximale pour ensuite diminuer progressivement. Ce phénomène est expliqué par la mise en place d'un colmatage à la surface de la membrane qui augmente la sélectivité de la membrane en plus d'avoir un impact négatif sur les flux de perméation. Dans le cas de la souche *S. aureus* à Gram positif (définie comme rigide), le transfert mesuré est toujours d'une amplitude inférieure.

Nous avons alors quantifié l'impact de différents paramètres opératoires sur le transfert: la pression transmembranaire appliquée, l'agitation de la phase rétentat de la cellule de filtration Amicon, la concentration en bactéries dans l'alimentation et l'exposition de la souche à un antibiotique. Dans nos conditions expérimentales, l'agitation de la cellule de filtration n'a pas démontré d'effet mesurable que ce soit sur le transfert bactérien ou sur la mise en place du colmatage.

Alors que, comme attendu, l'augmentation de la concentration en bactéries entraîne pour les trois souches utilisées une augmentation du transfert lors d'une filtration sur membrane vierge (en l'absence de colmatage), l'effet de la pression transmembranaire dépend quant à lui du type de Gram de la bactérie. Quand le transfert augmente avec la pression pour *E. coli* et *P. aeruginosa*, à l'inverse il diminue pour *S. aureus*. Ce comportement particulier a été attribué à la tendance de *S. aureus* à former des agrégats sous l'effet de forces de cisaillement mais aussi à sa pression interne (ou pression de turgescence) plus élevée que celle des bactéries à Gram négatif, pression interne qui peut s'opposer à la contrainte extérieure imposée et donc être un facteur limitant au transfert de cellules par déformation.

Notre démarche expérimentale s'est également intéressée aux effets d'une exposition, dans le fluide filtré, des cellules bactériennes à un agent chimique. Pour cela, nous avons sélectionné des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines pour modifier les propriétés pariétales des microorganismes sans pour autant affecter leur viabilité. Nos observations, réalisées sur des temps de contact relativement court (90 min) et pour une concentration faible en antibiotique (CMI/2) n'ont pas démontré de modifications profondes de la forme et de la taille des cellules, mais une diminution importante de la rigidité des parois bactériennes traitées. Cette modification des propriétés nanomécaniques des parois bactériennes engendre une perturbation de la rétention des cellules déformables. En effet, nos résultats démontrent que les cellules exposées à l'antibiotique ont une capacité accrue à se déformer pour traverser la membrane : la contamination du perméat est observée plus rapidement (pour des volumes filtrés plus faibles) et le transfert peut être amplifié notamment pour les cellules à Gram positif qui passent d'un caractère rigide à déformable une fois exposées à l'action de l'antibiotique.

Sur la base des données acquises en termes de caractérisation des cellules en suspension et de leur transfert lors de la filtration, un modèle numérique simplifié a

été développé. Celui-ci permet de relier l'amplitude du transfert à travers un abattement LVR calculé au rapport entre la force à apporter pour déformer la cellule (qui est corrélé à la tension de surface de la bactérie et à la taille du pore dans lequel elle pénètre) et la force appliquée sur la cellule par la pression transmembranaire. Pour les raisons évoquées précédemment ce modèle ne prend pas en compte les spécificités de la souche à Gram positif et seuls les résultats expérimentaux obtenus avec les souches à Gram négatif sont comparés aux valeurs calculées. L'excellent accord obtenu démontre que le modèle développé permet de relier la rétention d'une bactérie Gram négatif par un pore de diamètre connu aux caractéristiques microscopiques de la cellule, à la concentration en suspension et la pression transmembranaire appliquée.

Concernant la mise en place d'un colmatage bactérien à la surface de la membrane, nos expériences de filtration ont permis d'une part d'identifier un mécanisme de colmatage par formation de dépôt, avec tout de même une faible contribution d'un mécanisme de blocage intermédiaire, et d'autre part d'observer les différences de résistance à l'écoulement en fonction du comportement spécifique à chaque souche bactérienne filtrée. En effet, la forme et la taille des cellules en suspension ne permettent pas d'expliquer, seules, les différences de flux mesurées. Nos résultats, appuyés par des observations par microscopies (SEM et CLSM), soulignent le fait que le comportement collectif des cellules (formation d'agrégats pour *S. aureus*) ainsi que la production des EPS au sein du dépôt bactérien (chez *P. aeruginosa*) sont des facteurs qui déterminent l'organisation, la structure et la résistivité des dépôts colmatants. Enfin, l'étude de la compressibilité des dépôts bactériens démontre que ce facteur est quant à lui fortement corrélé à la forme (le rapport d'aspect) et à la rigidité des parois cellulaires (module de Young), la structure des dépôts ayant semble-t-il un rôle secondaire sur ce facteur.

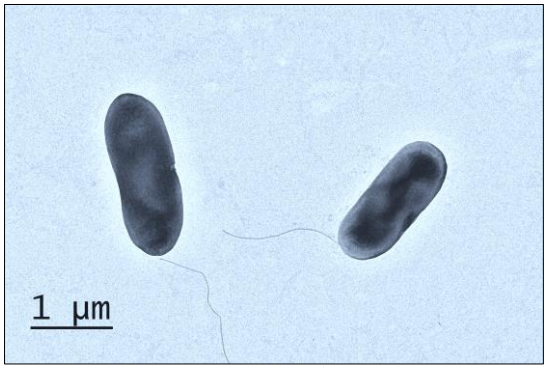
L'ensemble des résultats qui viennent d'être résumés ouvrent de nombreuses perspectives. Concernant les techniques analytiques employées dans nos travaux, nous nous sommes limités à la quantification des cellules viables (capables de se multiplier) présentes dans le perméat. Il serait nécessaire à l'avenir d'augmenter la résolution de nos mesures en utilisant des techniques susceptibles de déterminer les concentrations en cellules vivantes et mortes, en plus de différencier différentes souches bactériennes présentes dans une suspension complexe. Par exemple, l'utilisation d'un compteur de particules ou d'un cytomètre en flux permettrait de

quantifier le transfert total de cellules, vivantes et mortes, de mesurer leurs granulométries, en plus de potentiellement les distinguer grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents spécifiques (Guo et al., 2010; Wang et al., 2010). Ces deux techniques ont comme avantage supplémentaire de ne pas demander la mise en culture des échantillons, limitant alors grandement le temps nécessaire pour déterminer l'amplitude de la contamination du perméat en plus de diminuer significativement les incertitudes de mesures liées à la nécessité de réaliser des dilutions des échantillons. Enfin, le dosage et l'analyse des composés toxiques (endotoxines et exotoxines) présents potentiellement dans le perméat et issus d'une rupture de la paroi des cellules bactériennes devrait être envisagé pour apporter des informations complémentaires sur le caractère stérile d'une filtration.

Ces travaux se sont donc restreints à l'étude du transfert de bactéries à l'échelle du laboratoire. De nombreux points seraient à envisager dans le but d'affiner les connaissances vis-à-vis de la déformation des cellules vivantes lors de leur transfert à travers des pores. En effet, nous nous sommes limités à l'étude de suspensions pures ne contenant qu'une seule souche bactérienne : il pourrait être particulièrement intéressant de complexifier la suspension d'alimentation afin de s'orienter vers des cas rencontrés dans l'industrie. En mélangeant plusieurs souches bactériennes, plusieurs types de microorganismes ou encore en ajoutant des particules rigides au fluide filtré, les comportements observés en filtration, tant sur le plan de la sélectivité que de la productivité, seront nécessairement différents du fait des interactions entre les particules. Un autre aspect pourrait être envisagé sans nécessairement augmenter la complexité de la suspension filtrée, il pourrait être particulièrement intéressant de faire varier les caractéristiques physiologiques, morphologiques ou structurales d'une même souche bactérienne en modifiant son code génétique. Dans ce cas, il serait possible de filtrer deux suspensions bactériennes qui ne diffèrent que par la modification d'une propriété spécifique de la cellule (par exemple, la présence ou non de flagelles – structure impliquée dans le déplacement des bactéries ; l'utilisation de souches mucoïdes et souches mutées non mucoïdes – lié à production des composés extracellulaires).

Outre l'augmentation de la complexité de la suspension filtrée, nous pourrions envisager de faire varier fortement la composition physico-chimique du fluide qui, comme nous l'avons démontré, peut modifier le comportement des cellules bactériennes en amplifiant le transfert une fois leur caractéristiques morphologiques

altérées. L'utilisation d'antibiotiques retrouvés dans les eaux de surface, ou de tout autre agent susceptible de modifier les propriétés morphologiques et structurales des cellules bactériennes doit être envisagée (tensioactifs, résidus chlorés, etc…). De plus, il pourrait être intéressant de faire varier le temps de contact, que nous avions fixé ici à 90 min, entre les cellules bactériennes et l'agent chimique afin de mesurer les conséquences d'une exposition prolongée sur la morphologie et le transfert des cellules à travers la membrane. Un intérêt tout particulier pourrait être porté à la concentration en sel du milieu de filtration. Dans notre cas d'étude, nous nous sommes placés volontairement en condition iso-osmotique afin de limiter les phénomènes de pression osmotique. Néanmoins, des études préliminaires menées au laboratoire ont permis de suggérer les effets d'une variation de pression osmotique du fluide filtré : les conditions hypo-osmotiques contribuent favorablement à la rétention des bactéries en provoquant une augmentation du volume de la cellule, à l'inverse, les conditions hyper-osmotiques imposent une diminution de la taille des bactéries favorisant ainsi leur transfert à travers la membrane.



Observation réalisée par TEM de cellules de *E. coli* équipées de structures externes (de type flagelle).

Enfin, l'un des outils de choix à mettre au profit de l'étude de la déformation des bactéries est la microfluidique couplée aux observations par microscopie à fluorescence. Quand le développement de cette technique permettra de réaliser des pores ou canaux d'une taille inférieure au micromètre, cette technique permettra alors de visualiser et de quantifier en temps réel le transfert des bactéries à travers une structure poreuse.

Annexes

Détermination de la concentration massique des suspensions (*Cs*)

Un des aspects problématiques liés à la filtration de particules biologiques en milieu dilué - et notamment de microorganismes de très petite taille comme les bactéries - concerne la mesure de la concentration massique Cs (kg/m^3) de la suspension filtrée, ou plus précisément de la concentration des cellules à l'état hydraté (traduction de l'anglais "wet cell mass") qui représente la masse des cellules - en présence de son liquide intracellulaire : le cytoplasme. En effet dans notre cas d'étude, la suspension bactérienne destinée aux expériences de filtration ne contient qu'une fraction très fine de bactéries (en masse) en comparaison du volume diluant d'eau physiologique. Même si les concentrations bactériennes, exprimées en UFC/mL, sont déterminées avec précision grâce à la technique d'ensemencement par inclusion (limite de détection : 1 bactérie/mL d'après Lebleu 2007), elles ne confèrent aucune turbidité à la suspension filtrée même à la concentration maximale testée de 10^7 UFC/mL. A cette concentration et sur les volumes étudiés, la centrifugation ne permet pas d'extraire un culot de cellules. De plus, le dépôt formé à la surface de la membrane pendant une filtration est d'une masse trop faible (< 10mg), sur notre échelle de temps, pour être mesurée de manière satisfaisante à l'aide d'une balance de précision.

Alors, pour évaluer ce paramètre, nous avons souhaité utiliser les dimensions des cellules bactériennes déterminées dans nos travaux, acquises dans des conditions physiologiques identiques à celles appliquées à nos expériences de filtration. Pour cela, en première approche, les données présentées dans le Chapitre 3 qui détaillent les dimensions des trois souches modèles (*E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, cf. Figure III.7) sont utilisées pour calculées le volume moyen d'une bactérie selon les équations suivantes:

- ✓ pour une bactérie de type bacille, une forme sphérocylindrique est utilisée pour traduire le volume de la cellule bactérienne tel que:

$$V_{\text{bacille}} = \frac{4}{3}\pi R^3 + \pi R^2 L_0$$

avec R le rayon du cylindre et de la sphère utilisés pour représenter schématiquement la bactérie et L_0 la longueur du cylindre définie par $L_0 = L - 2R$ avec L la longueur totale de la cellule (mesurés par analyse d'image),

- ✓ pour une bactérie à la forme de coque, une sphère est utilisée pour définir le volume de la cellule tel que:

$$V_{\text{coque}} = \frac{4}{3}\pi R^3$$

avec R le rayon de la sphère qui représente schématiquement la bactérie (mesuré par analyse d'image).

Afin de déterminer la masse d'une cellule, son volume est multiplié par la densité volumique des bactéries, généralement admise comme égale à 1 g/cm^3 (≈eau) mais qui peut être ajustée plus précisément à une valeur de ρ_{bact} égale à 1,16 g/cm^3 d'après (Godin et al., 2010). On obtient alors une estimation de la masse de la cellule m_{bact}, en fonction de sa forme, dont l'unité est équivalente à des g/cellule. Enfin, la concentration massique de la suspension bactérienne Cs (en kg/m^3) est calculée grâce à la relation suivante:

$$Cs = m_{bact} \cdot C_{\text{bact}}$$

où

$$m_{bact} = \rho_{bact} \cdot V$$

avec C_{bact} la concentration bactérienne de la suspension en UFC/mL (unité transformée pour les besoins du calcul en cellule/mL). Nous obtenons par ce calcul les valeurs, pour les trois bactéries, suivantes:

Souche	Condition	V (10^{-12}.cm^3)	m_{bact} (10^{-12}g/cell)	C_s (kg/m^3)*
E. coli	eau Phy.	1,13	1,31	0,027
	Amoxicilline	1,12	1,30	0,026
P. aeruginosa	eau Phy.	0,67	0,78	0,016
	Ticarcilline	0,59	0,69	0,014
S. aureus	eau Phy.	0,21	0,25	0,0050
	Amoxicilline	0,23	0,27	0,0053

*les valeurs de Cs sont présentées, à titre d'exemple, pour une concentration C_{bact} de 2.10^7 UFC/mL. Cette méthode de calcul de Cs a été utilisée pour évaluer les résistances spécifiques des dépôts bactériens α présentées dans le Chapitre 5 partie B. de ce manuscrit.

L'ordre de grandeur mesuré de la masse d'une cellule bactérienne (≈1.10^{-12} g) correspond à la valeur communément admise en microbiologie.

Liste des abréviations

μ	viscosité dynamique de l'eau	Pa.s
A	surface utile de la membrane	m^2
AFM	microscopie à force atomique	-
C_a	concentration de l'alimentation	UFC/mL
CLSM	microscopie confocale à balayage laser	-
C_p	concentration du perméat	UFC/mL
C_r	concentration du rétentat	UFC/mL
Cs	concentration massique	$kg.m^{-3}$
D_p	diamètre des pores	m
D	facteur de déformation	-
DLS	diffusion dynamique de la lumière	-
e	épaisseur de la paroi	m
E (ou YM)	module de Young	Pa
h	hauteur de la particule	m
J	flux de perméat	$m.s^{-1}$
K	constance de Kozeny	-
Kcell	module de surface	$n.m^{-1}$
L	longueur de la particule	m
Lp	perméabilité de la membrane	$m.Pa^{-1}.s^{-1}$
LRV	abattement	-
M	masse de particules par unité de surface	$kg.m^{-2}$
n	indice de compressibilité	-
P_b	pression de point de bulle	Pa
Pcell	pression de turgescence	Pa

PTM (ou ΔP)	pression transmembranaire	Pa (ou bar)
Rc	résistance de colmatage	m^{-1}
Rd	résistance du dépôt	m^{-1}
Rm	résistance hydraulique	m^{-1}
S	surface de la particule	m^2
SEM	microscopie électronique à balayage	-
S_v	ratio surface/volume	m^{-1}
t	temps	min
T	tension de surface	$n.m^{-1}$
TEM	microscopie électronique à transmission	-
TR	taux de rétention	-
V	volume filtré	m^3
V_0	volume de la particule	m^3
α	résistance spécifique	$m.kg^{-1}$
γ	tension de surface du fluide	$N.m^{-1}$
ε	porosité	-
λ	longueur d'onde	nm
Π	probabilité de passage	-
ρ_c	masse volumique des particules	$kg.m^{-3}$

Références bibliographiques

Aimar, P., P. Bacchin, P., and Maurel, A. (2010). Filtration Membranaire – Mécanismes de Transfert.

Amsler, C.D., Cho, M., and Matsumura, P. (1993). Multiple factors underlying the maximum motility of Escherichia coli as cultures enter post-exponential growth. J. Bacteriol. *175*, 6238–6244.

Apel, P. (2001). Track etching technique in membrane technology. Radiation Measurements *34*, 559–566.

ASTM International (2015). ASTM F838-15a. Standard Test Method for Determining Bacterial Retention of Membrane Filters Utilized for Liquid Filtration.

Baldwin, W.W., Sheu, M.J., Bankston, P.W., and Woldringh, C.L. (1988). Changes in buoyant density and cell size of Escherichia coli in response to osmotic shocks. J. Bacteriol. *170*, 452–455.

Beaufort, S., Alfenore, S., and Lafforgue, C. (2011). Use of fluorescent microorganisms to perform in vivo and in situ local characterization of microbial deposits. Journal of Membrane Science *369*, 30–39.

Beech, I.B., Smith, J.R., Steele, A.A., Penegar, I., and Campbell, S.A. (2002). The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces *23*, 231–247.

Bhushan, B., and Marti, O. (2010). Scanning Probe Microscopy – Principle of Operation, Instrumentation, and Probes. In Springer Handbook of Nanotechnology, P.B. Bhushan, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 573–617.

Binnig, G., and Quate, C.F. (1986). Atomic force microscope. Phys. Rev. Letters. *56*, 930–933.

Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., and Weibel, E. (1982). Tunneling through a controllable vacuum gap. Appl. Phys. Lett. *40*, 178–180.

Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. Phys. Rev. Lett. *56*, 930–933.

Bolshakova, A.V., Kiselyova, O.I., Filonov, A.S., Frolova, O.Y., Lyubchenko, Y.L., and Yaminsky, I.V. (2001). Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. Ultramicroscopy *86*, 121–128.

Bouchillon, S.K., Hoban, D.J., Johnson, B.M., Johnson, J.L., Hsiung, A., and Dowzicky, M.J. (2005). In vitro activity of tigecycline against 3989 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the United States Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program; 2004). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease *52*, 173–179.

Bourven, I., Costa, G., and Guibaud, G. (2012). Qualitative characterization of the protein fraction of exopolymeric substances (EPS) extracted with EDTA from sludge. Bioresource Technology *104*, 486–496.

Brady, R.A., Leid, J.G., Calhoun, J.H., Costerton, J.W., and Shirtliff, M.E. (2008). Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. FEMS Immunology & Medical Microbiology *52*, 13–22.

Braga, P.C., and Ricci, D. (1998). Atomic Force Microscopy: Application to Investigation of Escherichia coli Morphology before and after Exposure to Cefodizime. Antimicrob Agents Chemother *42*, 18–22.

Braga, P.C., and Ricci, D. (2000). Detection of rokitamycin-induced morphostructural alterations in Helicobacter pylori by atomic force microscopy. Chemotherapy *46*, 15–22.

Brooks, G., Burgess, W., Colthurst, D., Hinks, J.D., Hunt, E., Pearson, M.J., Shea, B., Takle, A.K., Wilson, J.M., and Woodnutt, G. (2001). Pleuromutilins. Part 1: The identification of novel mutilin 14-carbamates. Bioorganic & Medicinal Chemistry *9*, 1221–1231.

Burmølle, M., Thomsen, T.R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., Tvede, M., Nyvad, B., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., et al. (2010). Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. FEMS Immunol. Med. Microbiol. *59*, 324–336.

Chandler, F.W., and Clark, J.W. (1970). Passage of Treponema pallidum Through Membrane Filters of Various Pore Sizes. Appl Microbiol *19*, 326–328.

Chao, Y., and Zhang, T. (2011). Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. Appl Microbiol Biotechnol *92*, 381–392.

Chen, Y., Norde, W., van der Mei, H.C., and Busscher, H.J. (2012). Bacterial Cell Surface Deformation under External Loading. mBio *3*, e00378-12-e00378-12.

Chien, A.-C., Hill, N.S., and Levin, P.A. (2012). Cell Size Control in Bacteria. Curr Biol *22*, R340–R349.

Chopinet, L., Formosa, C., Rols, M.P., Duval, R.E., and Dague, E. (2013). Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode. Micron *48*, 26–33.

Colville, K., Tompkins, N., Rutenberg, A.D., and Jericho, M.H. (2010). Effects of Poly(l-lysine) Substrates on Attached Escherichia coli Bacteria. Langmuir *26*, 2639–2644.

Dague, E., Jauvert, E., Laplatine, L., Viallet, B., Thibault, C., and Ressier, L. (2011). Assembly of live micro-organisms on microstructured PDMS stamps by convective/capillary deposition for AFM bio-experiments. Nanotechnology *22*, 395102.

Davey, M.E., and O'toole, G.A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *64*, 847–867.

Delebecque, N., Causserand, C., Roques, C., and Aimar, P. (2006). Membrane processes for water disinfection: investigation on bacterial transfer mechanisms. Desalination *199*, 81–83.

Doktycz, M.J., Sullivan, C.J., Hoyt, P.R., Pelletier, D.A., Wu, S., and Allison, D.P. (2003). AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. Ultramicroscopy *97*, 209–216.

Dufrêne, Y.F. (2002). Atomic Force Microscopy, a Powerful Tool in Microbiology. J Bacteriol *184*, 5205–5213.

Dufrêne, Y.F. (2004). Using nanotechniques to explore microbial surfaces. Nat Rev Micro *2*, 451–460.

El Kirat, K., Burton, I., Dupres, V., and Dufrene, Y.F. (2005). Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. J Microsc *218*, 199–207.

Fane, A.G. (1984). Ultrafiltration of suspensions. Journal of Membrane Science *20*, 249–259.

Fane, A.G., Fell, C.J.D., Hodgson, P.H., Leslie, G., and Marshall, K. (1991). Microfiltration of biomass and biofluids: Effects of membrane morphology and operating conditions. Filtration & Separation *28*, 332–331.

Fazli, M., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jørgensen, B., Andersen, A.S., Krogfelt, K.A., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T. (2009). Nonrandom Distribution of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in Chronic Wounds. J Clin Microbiol *47*, 4084–4089.

Feliciano, L., Li, J., Lee, J., and Pascall, M.A. (2012). Efficacies of Sodium Hypochlorite and Quaternary Ammonium Sanitizers for Reduction of Norovirus and Selected Bacteria during Ware-Washing Operations. PLoS One *7*.

Ferrando, M., Rŏżek, A., Zator, M., López, F., and Güell, C. (2005). An approach to membrane fouling characterization by confocal scanning laser microscopy. Journal of Membrane Science *250*, 283–293.

Flores, C.Y., Diaz, C., Rubert, A., Benítez, G.A., Moreno, M.S., Fernández Lorenzo de Mele, M.A., Salvarezza, R.C., Schilardi, P.L., and Vericat, C. (2010). Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO2 surfaces. Antibacterial effect on Pseudomonas aeruginosa. J Colloid Interface Sci *350*, 402–408.

Foley, G. (2006). A review of factors affecting filter cake properties in dead-end microfiltration of microbial suspensions. Journal of Membrane Science *274*, 38–46.

Foley, G. (2011). Evaluation of variable volume diafiltration processes using the Logarithmic Integral. Desalination and Water Treatment *25*, 286–290.

Formosa, C., Grare, M., Duval, R.E., and Dague, E. (2012a). Nanoscale effects of antibiotics on P. aeruginosa. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine *8*, 12–16.

Formosa, C., Grare, M., Jauvert, E., Coutable, A., Regnouf-de-Vains, J.B., Mourer, M., Duval, R.E., and Dague, E. (2012b). Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a Pseudomonas aeruginosa multidrug-resistant strain. Sci Rep *2*.

Formosa, C., Pillet, F., Schiavone, M., Duval, R.E., Ressier, L., and Dague, E. (2015). Generation of living cell arrays for atomic force microscopy studies. Nat. Protocols *10*, 199–204.

Francius, G., Domenech, O., Mingeot-Leclercq, M.P., and Dufrêne, Y.F. (2008). Direct Observation of Staphylococcus aureus Cell Wall Digestion by Lysostaphin. J Bacteriol *190*, 7904–7909.

Francius, G., Polyakov, P., Merlin, J., Abe, Y., Ghigo, J.-M., Merlin, C., Beloin, C., and Duval, J.F.L. (2011). Bacterial Surface Appendages Strongly Impact Nanomechanical and Electrokinetic Properties of Escherichia coli Cells Subjected to Osmotic Stress. PLoS ONE *6*, e20066.

Francois, J.M., Formosa, C., Schiavone, M., Pillet, F., Martin-Yken, H., and Dague, E. (2013). Use of atomic force microscopy (AFM) to explore cell wall properties and response to stress in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Curr. Genet. *59*, 187–196.

Gabriele, S., Versaevel, M., Preira, P., and Théodoly, O. (2010). A simple microfluidic method to select, isolate, and manipulate single-cells in mechanical and biochemical assays. Lab on a Chip *10*, 1459.

Godin, M., Delgado, F.F., Son, S., Grover, W.H., Bryan, A.K., Tzur, A., Jorgensen, P., Payer, K., Grossman, A.D., Kirschner, M.W., et al. (2010). Using buoyant mass to measure the growth of single cells. Nature Methods *7*, 387–390.

Graves, K., Rozeboom, G., Heng, M., and Glatz, C. (2006). Broth conditions determining specific cake resistance during microfiltration ofBacillus subtilis. Biotechnology and Bioengineering *94*, 346–352.

Greenwood, D. (1986). An Overview of the Response of Bacteria to -Lactam Antibiotics. Clinical Infectious Diseases *8*, S487–S495.

Grenier, A., Meireles, M., Aimar, P., and Carvin, P. (2008). Analysing flux decline in dead-end filtration. Chemical Engineering Research and Design *86*, 1281–1293.

Grzywna, Z.J., Siwy, Z., and Bashford, C.L. (1996). Nonlinear theory for ionic transport through track-etched nuclear membranes. Journal of Membrane Science *121*, 261–269.

Guo, H., Wyart, Y., Perot, J., Nauleau, F., and Moulin, P. (2010). Low-pressure membrane integrity tests for drinking water treatment: A review. Water Research *44*, 41–57.

Haaber, J., Cohn, M.T., Frees, D., Andersen, T.J., and Ingmer, H. (2012). Planktonic aggregates of Staphylococcus aureus protect against common antibiotics. PLoS ONE *7*, e41075.

Harding, S.E. (1986). Applications of light scattering in microbiology. Biotechnol. Appl. Biochem. *8*, 489–509.

Hasegawa, H., Naganuma, K., Nakagawa, Y., and Matsuyama, T. (2003). Membrane filter (pore size, 0.22-0.45 micro m; thickness, 150 micro m) passing-through activity of Pseudomonas aeruginosa and other bacterial species with indigenous infiltration ability. FEMS Microbiol. Lett. *223*, 41–46.

Hassan, I.B. (2014). Analyse multi-échelle de la filtration sur microsive de particules modèles inertes et biologiques : caractérisation in situ du dépôt par microscopie confocale. phdthesis. INSA de Toulouse.

Hassan, I.B., Lafforgue, C., Ellero, C., Ayadi, A., and Schmitz, P. (2013a). Coupling of local visualization and numerical approach for particle microfiltration optimization. Microsyst Technol *21*, 509–517.

Hassan, I.B., Ennouri, M., Lafforgue, C., Schmitz, P., and Ayadi, A. (2013b). Experimental Study of Membrane Fouling during Crossflow Microfiltration of Yeast and Bacteria Suspensions: Towards an Analysis at the Microscopic Level. Membranes (Basel) *3*, 44–68.

Hermans, P.H., and Bredée, H.L. (1935). Zur Kenntnis der Filtrationsgesetze. Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas *54*, 680–700.

Hernandez Rojas, M.E., Van Kaam, R., Schetrite, S., and Albasi, C. (2005). Role and variations of supernatant compounds in submerged membrane bioreactor fouling. Desalination *179*, 95–107.

Ho, null, and Zydney, null (2000). A Combined Pore Blockage and Cake Filtration Model for Protein Fouling during Microfiltration. J Colloid Interface Sci *232*, 389–399.

Hodgson, P.H., Leslie, G.L., Fane, A.G., Schneider, R.P., Fell, C.J.D., and Marshall, K.C. (1993). Cake resistance and solute rejection in bacterial microfiltration: The role of the extracellular matrix. Journal of Membrane Science *79*, 35–53.

Hutter, J.L., Chen, J., Wan, W.K., Uniyal, S., Leabu, M., and Chan, B.M.C. (2005). Atomic force microscopy investigation of the dependence of cellular elastic moduli on glutaraldehyde fixation. J Microsc *219*, 61–68.

Hwang, K.-J., and Liao, C.-Y. (2012). Effects of membrane morphology and operating conditions on microfiltration particle fouling. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers *43*, 46–52.

Hwang, B.-K., Lee, C.-H., Chang, I.-S., Drews, A., and Field, R. (2012). Membrane bioreactor: TMP rise and characterization of bio-cake structure using CLSM-image analysis. Journal of Membrane Science *419–420*, 33–41.

Hwang, K.-J., Wang, Y.-T., Iritani, E., and Katagiri, N. (2010). Effect of gel particle softness on the performance of cross-flow microfiltration. Journal of Membrane Science *365*, 130–137.

Jauvert, E., Palleau, E., Dague, E., and Ressier, L. (2014). Directed assembly of living Pseudomonas aeruginosa bacteria on PEI patterns generated by nanoxerography for statistical AFM bioexperiments. ACS Appl Mater Interfaces *6*, 21230–21236.

Jornitz (2006). Sterile Filtration (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag).

Kailas, L., Ratcliffe, E.C., Hayhurst, E.J., Walker, M.G., Foster, S.J., and Hobbs, J.K. (2009). Immobilizing live bacteria for AFM imaging of cellular processes. Ultramicroscopy *109*, 775–780.

Kaplan, J.B., Izano, E.A., Gopal, P., Karwacki, M.T., Kim, S., Bose, J.L., Bayles, K.W., and Horswill, A.R. (2012). Low Levels of -Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in Staphylococcus aureus. mBio *3*, e00198-12-e00198-12.

Kasas, S., and Ikai, A. (1995). A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. Biophys J *68*, 1678–1680.

Kell, D.B., Ryder, H.M., Kaprelyants, A.S., and Westerhoff, H.V. (1991). Quantifying heterogeneity: flow cytometry of bacterial cultures. Antonie Van Leeuwenhoek *60*, 145–158.

Kim, K.J., and Stevens, P.V. (1997). Hydraulic and surface characteristics of membranes with parallel cylindrical pores. Journal of Membrane Science *123*, 303–314.

Kim, J., Lee, H., and Shin, S. (2015). Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. Journal of Cellular Biotechnology *1*, 63–79.

Kim, K.-J., Stevens, P.V., and Fane, A.G. (1994). Porosity dependence of pore entry shape in track-etched membranes by image analysis. Journal of Membrane Science *93*, 79–90.

Kobayashi, T., Ono, M., Shibata, M., and Fujii, N. (1998). Cutoff performance of Escherichia coli by charged and noncharged polyacrylonitrile ultrafiltration membranes. Journal of Membrane Science *140*, 1–11.

Koch, A.L., and Woeste, S. (1992). Elasticity of the sacculus of Escherichia coli. J Bacteriol *174*, 4811–4819.

Le Magrex-Debar, E., Lemoine, J., Gellé, M.P., Jacquelin, L.F., and Choisy, C. (2000). Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. Int. J. Food Microbiol. *55*, 239–243.

Lebleu, N. (2007). Désinfection des eaux par procédés membranaires : étude des mécanismes de transfert des bactéries. phd. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.

Lebleu, N., Roques, C., Aimar, P., and Causserand, C. (2009). Role of the cell-wall structure in the retention of bacteria by microfiltration membranes. Journal of Membrane Science *326*, 178–185.

Lee, P.-H., Cotter, S.F., Reyes Prieri, S.C., Attalage, D., and Sung, S. (2013). pH-gradient real-time aeration control for nitritation community selection in a non-porous hollow fiber membrane biofilm reactor (MBfR) with dilute wastewater. Chemosphere *90*, 2320–2325.

Lee, S.W., Jeon, B.Y., and Park, D.H. (2010). Effect of bacterial cell size on electricity generation in a single-compartmented microbial fuel cell. Biotechnol. Lett. *32*, 483–487.

Li, H., Fane, A.G., Coster, H.G.L., and Vigneswaran, S. (1998). Direct observation of particle deposition on the membrane surface during crossflow microfiltration. Journal of Membrane Science *149*, 83–97.

Liu, S., and Wang, Y. (2010). Application of AFM in microbiology: a review. Scanning *32*, 61–73.

Long, T.D., Jacobs, D.L., and Anderson, J.L. (1981). Configurational effects on membrane rejection. Journal of Membrane Science *9*, 13–27.

Longo, G., Rio, L.M., Trampuz, A., Dietler, G., Bizzini, A., and Kasas, S. (2013). Antibiotic-induced modifications of the stiffness of bacterial membranes. J. Microbiol. Methods *93*, 80–84.

Mah, T.-F.C., and O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology *9*, 34–39.

Mannik, J., Driessen, R., Galajda, P., Keymer, J.E., and Dekker, C. (2009). Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 14861–14866.

Männik, J., Wu, F., Hol, F.J.H., Bisicchia, P., Sherratt, D.J., Keymer, J.E., and Dekker, C. (2012). Robustness and accuracy of cell division in Escherichia coli in diverse cell shapes. Proc Natl Acad Sci U S A *109*, 6957–6962.

Martinez de Maranon, I.M., Marechal, P.-A., and Gervais, P. (1996). Passive Response ofSaccharomyces cerevisiaeto Osmotic Shifts: Cell Volume Variations Depending on the Physiological State. Biochemical and Biophysical Research Communications *227*, 519–523.

McCarthy, A.A., Conroy, H., Walsh, P.K., and Foley, G. (1998). The effect of pressure on the specific resistance of yeast filter cakes during dead-end filtration in the range 30–500kPa. Biotechnology Techniques *12*, 909–912.

McNeill, K., and Hamilton, I.. (2003). Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiology Letters *221*, 25–30.

Meireles, M., Molle, C., Clifton, M.J., and Aimar, P. (2004). The origin of high hydraulic resistance for filter cakes of deformable particles: cell-bed deformation or surface-layer effect? Chemical Engineering Science *59*, 5819–5829.

Méndez-Vilas, A., Gallardo-Moreno, A.M., and González-Martín, M.L. (2007). Atomic force microscopy of mechanically trapped bacterial cells. Microsc. Microanal. *13*, 55–64.

Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., Lopez, J.A., Foster, T.J., Penadés, J.R., and Lasa, I. (2009). Protein A-mediated multicellular behavior in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. *191*, 832–843.

Meyer, R.L., Zhou, X., Tang, L., Arpanaei, A., Kingshott, P., and Besenbacher, F. (2010). Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. Ultramicroscopy *110*, 1349–1357.

Miermont, A., Uhlendorf, J., McClean, M., and Hersen, P. (2011). The Dynamical Systems Properties of the HOG Signaling Cascade. Journal of Signal Transduction *2011*, e930940.

Mille, Y., Beney, L., and Gervais, P. (2002). Viability of Escherichia coli after combined osmotic and thermal treatment: a plasma membrane implication. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes *1567*, 41–48.

Mores, W.D., and Davis, R.H. (2001). Direct visual observation of yeast deposition and removal during microfiltration. Journal of Membrane Science *189*, 217–230.

Mortensen, N.P., Fowlkes, J.D., Sullivan, C.J., Allison, D.P., Larsen, N.B., Molin, S., and Doktycz, M.J. (2009). Effects of Colistin on Surface Ultrastructure and Nanomechanics of Pseudomonas aeruginosa Cells. Langmuir *25*, 3728–3733.

Mota, M., Teixeira, J.A., Bowen, W.R., and Yelshin, A. (2001). Binary spherical particle mixed beds : porosity and permeability relationship measurement.

Müller, D.J., and Dufrêne, Y.F. (2011). Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. Trends Cell Biol. *21*, 461–469.

Nakanishi, K., TADOKORO, T., and MATSUNO, R. (1987). On the Specific Resistance of Cakes of Microorganisms. Chemical Engineering Communications *62*, 187–201.

Nakazawa, K., Hasegawa, H., Nakagawa, Y., Terao, M., and Matsuyama, T. (2005). Factors influencing the ability of Listeria monocytogenes to pass through a membrane filter by active infiltration. Appl. Environ. Microbiol. *71*, 7571–7574.

Nikaido, H. (1996). Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. J Bacteriol *178*, 5853–5859.

Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. Microbiol Mol Biol Rev *67*, 593–656.

Nikaido, H., and Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. *49*, 1–32.

Nnadozie, C.F., Lin, J., and Govinden, R. (2015). Selective isolation of bacteria for metagenomic analysis: Impact of membrane characteristics on bacterial filterability. Biotechnol Progress *31*, 853–866.

Nolan, G.T., and Kavanagh, P.E. (1992). Computer simulation of random packing of hard spheres. Powder Technology *72*, 149–155.

Novo, D.J., Perlmutter, N.G., Hunt, R.H., and Shapiro, H.M. (2000). Multiparameter Flow Cytometric Analysis of Antibiotic Effects on Membrane Potential, Membrane Permeability, and Bacterial Counts of Staphylococcus aureus and Micrococcus luteus. Antimicrob Agents Chemother *44*, 827–834.

Okamoto, Y. (2001). Harvest time effects on membrane cake resistance of Escherichia coli broth. Journal of Membrane Science *190*, 93–106.

Onyango, L.A., Dunstan, R., and Roberts, T.K. (2010). Filterability of staphylococcal species through membrane filters following application of stressors. BMC Research Notes *3*, 152.

Ouberai, M., El Garch, F., Bussiere, A., Riou, M., Alsteens, D., Lins, L., Baussanne, I., Dufrêne, Y.F., Brasseur, R., Decout, J.-L., et al. (2011). The Pseudomonas aeruginosa membranes: A target for a new amphiphilic aminoglycoside derivative? Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes *1808*, 1716–1727.

Pandey, A.K., Gautam, M.M., Shukla, J.P., and Iyer, R.H. (2001). Effect of pore characteristics on carrier-facilitated transport of Am(III) across track-etched membranes. Journal of Membrane Science *190*, 9–20.

Patil, Y.P., Ahluwalia, A.K., and Jadhav, S. (2013). Isolation of giant unilamellar vesicles from electroformed vesicle suspensions and their extrusion through nano-pores. Chem. Phys. Lipids *167–168*, 1–8.

Pillet, F., Chopinet, L., Formosa, C., and Dague, É. (2014a). Atomic Force Microscopy and pharmacology: From microbiology to cancerology. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects *1840*, 1028–1050.

Pillet, F., Lemonier, S., Schiavone, M., Formosa, C., Martin-Yken, H., Francois, J.M., and Dague, E. (2014b). Uncovering by Atomic Force Microscopy of an original circular structure at the yeast cell surface in response to heat shock. BMC Biology *12*, 6.

Poole, K. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. Cell. Mol. Life Sci. *61*, 2200–2223.

Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., and Dorel, C. (2001). Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in Escherichia coli via Regulation of the csgD Gene. J Bacteriol *183*, 7213–7223.

Quinn, D.J., Pivkin, I., Wong, S.Y., Chiam, K.-H., Dao, M., Karniadakis, G.E., and Suresh, S. (2011). Combined Simulation and Experimental Study of Large Deformation of Red Blood Cells in Microfluidic Systems. Annals of Biomedical Engineering *39*, 1041–1050.

Ras, M., Lefebvre, D., Derlon, N., Paul, E., and Girbal-Neuhauser, E. (2011). Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. Water Research *45*, 1529–1538.

Rosas, I., Collado, S., Gutiérrez, A., and Díaz, M. (2014). Fouling mechanisms of Pseudomonas putida on PES microfiltration membranes. Journal of Membrane Science *465*, 27–33.

Rosenberger, S., and Kraume, M. (2002). Filterability of activated sludge in membrane bioreactors. Desalination *146*, 373–379.

Sadr Ghayeni, S.B., Beatson, P.J., Fane, A.J., and Schneider, R.P. (1999). Bacterial passage through microfiltration membranes in wastewater applications. Journal of Membrane Science *153*, 71–82.

S. Rouaix (2005). Caractérisation et étude du vieillissement d'une membrane d'ultrafiltration (Toulouse: Université Paul Sabatier).

Secomb, T.W., and Hsu, R. (1996). Analysis of red blood cell motion through cylindrical micropores: effects of cell properties. Biophysical Journal *71*, 1095–1101.

Seidl, K., Goerke, C., Wolz, C., Mack, D., Berger-Bächi, B., and Bischoff, M. (2008). Staphylococcus aureus CcpA Affects Biofilm Formation. Infect Immun *76*, 2044–2050.

Shimizu, Y., Matsushita, K., and Watanabe, A. (1994). Influence of shear breakage of microbial cells on cross-flow microfiltration flux. Journal of Fermentation and Bioengineering *78*, 170–174.

Silhavy, T.J., Kahne, D., and Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology *2*, a000414–a000414.

Simon, S., Païro, B., Villain, M., D'Abzac, P., Hullebusch, E.V., Lens, P., and Guibaud, G. (2009). Evaluation of size exclusion chromatography (SEC) for the characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. Bioresource Technology *100*, 6258–6268.

Singh, S., Friedel, K., Himmerlich, M., Lei, Y., Schlingloff, G., and Schober, A. (2015). Spatiotemporal Photopatterning on Polycarbonate Surface through Visible Light Responsive Polymer Bound DASA Compounds. ACS Macro Letters *4*, 1273–1277.

Smith, A.E., Zhang, Z., and Thomas, C.R. (2000). Wall material properties of yeast cells: Part 1. Cell measurements and compression experiments. Chemical Engineering Science *55*, 2031–2041.

Stewart, P.S., and William Costerton, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The Lancet *358*, 135–138.

Stockner, J.G., Klut, M.E., and Cochlan, W.P. (1990). Leaky Filters: A Warning to Aquatic Ecologists. Can. J. Fish. Aquat. Sci. *47*, 16–23.

Suchecka, T., Biernacka, E., and Piatkiewicz, W. (2003). Microorganism Retention on Microfiltration Membranes. Filtration & Separation *40*, 50–55.

Szwast, M., Suchecka, T., and Piątkiewicz, W. (2012). Mathematical model for biological cell deformation in a cylindrical pore. Chemical and Process Engineering *33*, 385–396.

Tanaka, T., Usui, K., Kouda, K., and Nakanishi, K. (1996). Filtration Behaviors of Rod-Shaped Bacterial Broths in Unsteady-State Phase of Cross-Flow Filtration. Journal of Chemical Engineering of Japan *29*, 973–981.

Teitzel, G.M., and Parsek, M.R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic Pseudomonas aeruginosa. Appl. Environ. Microbiol. *69*, 2313–2320.

Torrella, F., and Morita, R.Y. (1981). Microcultural Study of Bacterial Size Changes and Microcolony and Ultramicrocolony Formation by Heterotrophic Bacteria in Seawater. Appl Environ Microbiol *41*, 518–527.

Touhami, A., Jericho, M.H., and Beveridge, T.J. (2004). Atomic Force Microscopy of Cell Growth and Division in Staphylococcus aureus. J Bacteriol *186*, 3286–3295.

Tracey, E.M., and Davis, R.H. (1994). Protein Fouling of Track-Etched Polycarbonate Microfiltration Membranes. Journal of Colloid and Interface Science *167*, 104–116.

Tung, K.-L., and Chuang, C.-J. (2002). Effect of pore morphology on fluid flow and particle deposition on a track-etched polycarbonate membrane. Desalination *146*, 129–134.

Tung, K.L., Hu, C.C., Chuang, C.J., Hwang, K.J., and Wu, T.Y. (2010). Effects of Soft Particle Deformability and Particle/Pore Size Ratio on the Blocking Mechanism in Dead-End Microfiltration. Chem. Eng. Technol. *33*, 1341–1348.

Urase, T., Yamamoto, K., and Ohgaki, S. (1996). Effect of pore structure of membranes and module configuration on virus retention. Journal of Membrane Science *115*, 21–29.

Vadillo-Rodríguez, V., Busscher, H.J., Norde, W., de Vries, J., Dijkstra, R.J.B., Stokroos, I., and van der Mei, H.C. (2004). Comparison of Atomic Force Microscopy Interaction Forces between Bacteria and Silicon Nitride Substrata for Three Commonly Used Immobilization Methods. Appl Environ Microbiol *70*, 5441–5446.

Vanysacker, L., Declerck, P., and Vankelecom, I. (2013). Development of a high throughput cross-flow filtration system for detailed investigation of fouling processes. J. Membr. Sci. *442*, 168–176.

Velimirov, B. (2001). Nanobacteria, Ultramicrobacteria and Starvation Forms: A Search for the Smallest Metabolizing Bacterium. Microbes and Environments *16*, 67–77.

Wainwright, M., Al Talhi, A., Gilmour, D.J., Anderson, R.W., and Killham, K. (2002). Big bacteria pass through very small holes. Medical Hypotheses *58*, 558–560.

Wang, Y., Hammes, F., Düggelin, M., and Egli, T. (2008). Influence of Size, Shape, and Flexibility on Bacterial Passage through Micropore Membrane Filters. Environmental Science & Technology *42*, 6749–6754.

Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W., and Boon, N. (2010). Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. Trends in Biotechnology *28*, 416–424.

Wendell H. Hall, B.J.O. (1980). Comparative Activities of the Oxa- -Lactam LY127935, Cefotaxime, Cefoperazone, Cefamandole, and Ticarcillin Against Multiply Resistant Gram-Negative Bacilli. Antimicrobial Agents and Chemotherapy *17*, 273–279.

Whitesides, G.M., Ostuni, E., Takayama, S., Jiang, X., and Ingber, D.E. (2001). Soft lithography in biology and biochemistry. Annu Rev Biomed Eng *3*, 335–373.

Wood, J.M. (1999). Osmosensing by Bacteria: Signals and Membrane-Based Sensors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *63*, 230–262.

Wu, Y., and Zhou, A. (2009). In situ, real-time tracking of cell wall topography and nanomechanics of antimycobacterial drugs treated Mycobacterium JLS using atomic force microscopy. Chem. Commun. 7021–7023.

Xu, W., and Chellam, S. (2005). Initial stages of bacterial fouling during dead-end microfiltration. Environ. Sci. Technol. *39*, 6470–6476.

Yamazaki, I.M., Paterson, R., and Geraldo, L.P. (1996). A new generation of track etched membranes for microfiltration and ultrafiltration. Part I. Preparation and characterisation. Journal of Membrane Science *118*, 239–245.

Yao, X., Walter, J., Burke, S., Stewart, S., Jericho, M.H., Pink, D., Hunter, R., and Beveridge, T.J. (2002). Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces *23*, 213–230.

Yoshimura, F., and Nikaido, H. (1985). Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of Escherichia coli K-12. Antimicrob Agents Chemother *27*, 84–92.

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER

Université de Toulouse

Etude des mécanismes de transfert de bactéries déformables en microfiltration frontale

La filtration membranaire est une technique séparative utilisée fréquemment comme procédé permettant de retenir et d'extraire les microorganismes présents dans un fluide. Le mécanisme de sélectivité classiquement admis dans ce procédé est l'exclusion par la taille. Cependant, nos travaux ont permis de mettre en évidence un transfert de microorganismes à travers la structure poreuse des membranes au cours d'opérations de filtration, alors que les dimensions des cellules vivantes en suspension sont supérieures au diamètre moyen des pores de la membrane, entrainant une diminution du taux de récolte des microorganismes et une contamination de la phase perméat.

Les caractéristiques morphologiques et nanomécaniques des cellules bactériennes sélectionnées pour nos travaux ont été observées et les propriétés du matériau membranaire modèle ont été mesurées. Grâce à ces informations, le transfert des bactéries aux premiers instants d'une filtration frontale a pu être évalué et le rôle de différents paramètres opératoires appliqués (type de souche bactérienne, composition physico-chimique de fluide filtré, PTM) a pu être commenté. Ainsi, nos résultats ont permis de préciser les mécanismes de sélectivités appliqués aux bactéries à Gram positif et à Gram négatif qui diffèrent du fait des caractéristiques structurales de la paroi bactérienne (épaisseur et élasticité de la couche de peptidoglycane). Enfin, l'évolution du transfert de cellules vers la phase perméat a également été suivie et la mise en place du dépôt bactérien colmatant à la surface de la membrane a été observée. Le rôle de ce dépôt structuré sur les variations de débit et de transfert a donc pu être mis en évidence pour les trois modèles bactériens sélectionnés. Nos résultats ont permis de définir des conditions critiques (physiques, chimiques et biologiques) pour lesquelles le transfert de cellules bactériennes par déformation est amplifié au cours d'une filtration membranaire frontale.

Mots clés: procédé membranaire, mécanisme de sélectivité, production d'eau potable, fluide stérile, microfiltration frontale, colmatage, bactéries.

Transfer mechanisms of deformable bacteria during dead-end MF

Membrane filtration is a separation technique commonly used as a method for removing and extracting microorganisms present in a fluid. The selectivity mechanism is size exclusion. However, our work has highlighted transfer of microorganisms through the porous membrane structure during filtration operations, even if the size of the living cell in suspension is greater than the average pore size of the membrane, resulting in lowering of the accumulation rate of the microorganisms and thus contamination of the permeate phase.

Morphological and nanomechanical characterization of selected bacteria cells used for our work were performed and the properties of the model membrane were analyzed. With this information, the transfer of bacteria dunring the first moments of the dead-end filtration has been evaluated and the role of operating parameters (type of bacteria strains, physicochemical composition of filtered fluid, TMP) has been studied. Thus, our results have clarified the selectivity mechanisms applied to Gram-positive and Gram-negative bacteria strains because of different structural characteristics of the bacterial cell wall (thickness and elasticity of the peptidoglycan layer). Finally, evolution of cells transfer to the permeate phase has also been followed, and the bacterial deposit clogging the membrane was observed. The role of the structured deposit on the variations in flow and transfer has been demonstrated for the three selected bacterial models. Our results have defined critical conditions (physical, chemical and biological) where the transfer of bacterial cells is amplified by deformation during a frontal membrane filtration.

Keywords: membrane process, selectivity mechanism, drinking water production, sterilizing filter, dead-end microfiltration, fouling, bacteria.