



**HAL**  
open science

## Etude de l'interaction nanoparticules-bactéries : application à l'élaboration d'un biocapteur

Marion Mathélié-Guinlet

► **To cite this version:**

Marion Mathélié-Guinlet. Etude de l'interaction nanoparticules-bactéries : application à l'élaboration d'un biocapteur. Chimie théorique et/ou physique. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0697 . tel-01661488

**HAL Id: tel-01661488**

**<https://theses.hal.science/tel-01661488>**

Submitted on 12 Dec 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 PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE**

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

SPÉCIALITÉ : LASERS, MATIÈRE ET NANOSCIENCES

Par Marion MATHELIÉ-GUINLET

**ÉTUDE DE L'INTERACTION NANOPARTICULES /  
BACTÉRIES - APPLICATION À L'ÉLABORATION  
D'UN BIOCAPTEUR -**

Sous la direction de : Mmes Touria COHEN-BOUHACINA et Marie-Hélène DELVILLE

Soutenue le 17 octobre 2017

Membres du jury :

Mme Magali PHANER-GOUTORBE	Professeur, Ecole Centrale Lyon	Rapporteur
M. Christian MARLIÈRE	Dir. De Recherche, ISMO	Rapporteur
Mme Marie-Christine DURRIEU	Dir. De recherche, CBMN	Président
Mme Rose-Marie SAUVAGE	Direction Générale de l'Armement	Examinateur
Mme Touria COHEN-BOUHACINA	Professeur, Université de Bordeaux	Directeur de thèse
Mme Marie-Hélène DELVILLE	Dir. de recherche, ICMCB	Directeur de thèse
Mme Laure BÉVEN	MCF, Université de Bordeaux	Invité
Mme Christine GRAUBY-HEYWANG	MCF, Université de Bordeaux	Invité

**RÉSUMÉ : ÉTUDE DE L'INTERACTION NANOPARTICULES – BACTÉRIES. APPLICATION  
À L'ÉLABORATION D'UN BIOCAPTEUR POUR LA DÉTECTION DE BACTÉRIES**

Afin de prévenir les risques potentiels des nanoparticules (NPs) mais également de bénéficier de leurs propriétés uniques, il est essentiel de comprendre leurs mécanismes d'interaction avec les systèmes biologiques. Dans ce contexte, nous étudions la cytotoxicité des NPs de silice, de tailles et charges diverses, envers des bactéries *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Pour les deux souches, une activité antibactérienne a été démontrée pour les NPs en dessous d'un diamètre critique  $\varphi_c$ , 50 - 80 nm. En deçà de  $\varphi_c$ , les NPs (i) mènent à l'isolation des bactéries *E. coli*, (ii) induisent une "sphérification" de la cellule initialement en bâtonnet, (iii) provoquent des lésions dans la membrane externe et une réorganisation de sa structure, menant à terme à la lyse cellulaire. Au delà de  $\varphi_c$ , les NPs sont inoffensives. Cette étude fondamentale a mené au développement d'un biocapteur électrochimique pour la détection de bactéries, application notable pour des problèmes biomédicaux, environnementaux et de défense. Les NPs, intégrées à ces outils, offrent un mode de détection rapide, très sensible et peu coûteux. Expérimentalement, une multicouche de polyélectrolytes a été utilisée pour immobiliser des NPs inoffensives ( $\varphi = 100$  nm), auxquelles sont ensuite fixés des anticorps spécifiques, afin d'améliorer la détection finale de la bactérie *E. coli*. L'ensemble des étapes a été optimisé par le procédé du *spin coating* et étudié à l'aide de mesures de microbalance à quartz et de voltamétrie cyclique. L'intégration de NPs au biocapteur a permis une détection linéaire et non saturée des bactéries *E. coli* dans une large gamme de concentration (jusqu'à  $10^9$  CFU/mL) pour une limite de détection de  $10^6$  CFU/mL.

**Mots-clés** : Toxicité, bactéries, nanoparticules, microscopie à force atomique

---

**ABSTRACT : STUDY OF THE INTERACTIONS BETWEEN NANOPARTICLES AND  
BACTERIA. APPLICATION IN THE DESIGN OF A BIOSENSOR FOR BACTERIA  
DETECTION**

To prevent the potential risks of nanoparticles (NPs) but also to benefit from their unique properties, it is essential to know their mechanisms of interactions with biological systems. In this context, we study the cytotoxicity of silica NPs, with diverse sizes and charges, on the properties of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* bacteria. For both strains, an antibacterial activity was shown for NPs below a critical diameter  $\varphi_c$ , 50 - 80 nm. Below  $\varphi_c$ , NPs (i) lead to the isolation of *E. coli* bacteria, (ii) induce a "spherification" of the cell initially rod shaped, and (iii) cause the formation of pore-like lesions in the outer membrane and a reorganization of its structure, leading to cell lysis. Above  $\varphi_c$ , NPs are harmless. This fundamental study has been used to develop an electrochemical biosensor for bacteria, which are of great importance for biomedical, environmental and defense issues. NPs involved in such tools offer a fast, high-sensitive and low-cost way of detection. A polyelectrolyte multilayer was used to immobilize harmless NPs ( $\varphi = 100$  nm), which are, then, functionalized with specific antibodies, in order to enhance the final detection of *E. coli* bacteria. All steps were optimized by a spin coating process and studied through quartz microbalance and cyclic voltametry measurements. Integrating NPs in this biosensor resulted in a linear and unsaturated detection of *E. coli* bacteria in a wide range of concentration (until  $10^9$  CFU/mL) and a limit of detection of  $10^6$  CFU/mL.

**Keywords** : Toxicity, bacteria, nanoparticles, atomic force microscopy

---

**Unités de recherché**

Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine, UMR 5798, 351 Cours de la Libération – 33400 Talence  
Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux, UPR 9048, 87 Avenue du Dr Albert  
Schweitzer, 33600 Pessac

# Remerciements

Ces travaux ont été réalisés conjointement au Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine (LOMA) et l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB). Je remercie les directeurs, Messieurs Jean-Pierre Delville puis Fabio Pistoiesi et Mario Maglione, respectivement, de m'y avoir accueilli dans les meilleures conditions.

Je remercie également la région Aquitaine ainsi que la Direction Générale de l'Armement pour leur financement.

Je souhaite remercier Madame Magali Phaner-Goutorbe, et Monsieur Christian Marlière, rapporteurs de ce mémoire, pour l'attention qu'ils lui ont porté ainsi que pour leur regard critique et les discussions qui s'en suivirent. Je remercie également Mme Rose-Marie Sauvage, qui m'a suivie avec une grande bienveillance au cours de ces trois années, et a examiné ces pages. Enfin, je remercie Mme Marie-Christine Durrieu pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse, ce avec un enthousiasme et une pointe d'humour dont je garderai un excellent souvenir.

Tous mes remerciements s'adressent, plus particulièrement, à mes directrices de thèse, Mmes Touria Cohen-Bouhacina et Marie-Hélène Delville. La confiance qu'elles ont placée en moi, avant même le début de cette thèse, alors que je n'étais qu'une néophyte, et qu'elles ont entretenue au cours de ces trois années m'honore. Le temps qu'elles m'ont consacré, les mots bienveillants qu'elles ont eus durant les périodes difficiles, les concepts scientifiques qu'elles m'ont appris sont autant de pierres portées à l'édifice de ces travaux. Touria - un grand merci pour vos conseils et votre persévérance à m'expliquer cette « satanée phase » ! L'AFM recèlera toujours, pour moi, nombre de mystères mais ce fût un plaisir d'en percer certains avec vous. Marie-Hélène - un grand merci d'avoir insufflé à cette thèse « l'esprit chimiste » qui a également motivé son choix. La « zénitude » tant recherchée, aura, grâce à vous, trouvé sa place ponctuellement à mes côtés, au cours de cette dernière année.

Cette thèse n'aurait pu aboutir sans le soutien infailible de Christine Grauby-Heywang. « Maman Christine », tu as été un socle sur lequel j'ai toujours pu me reposer, l'éternelle oreille attentive, la voix apaisante pour mon caractère parfois si emporté. Une troisième directrice de thèse... de l'ombre à la lumière, il n'y a qu'un pas, franchi depuis bien longtemps. Les chiffres significatifs pour ta contribution à ces travaux seraient bien trop nombreux, tu m'en voudrais presque !

Un immense merci à Laure Béven. Chacune de nos très nombreuses rencontres a été une bouffée d'oxygène et de bonne humeur, mes zygomaties ne t'en sont pas grés ! Dilution, étalement, comptage ... le travail à la chaîne n'a plus de secret pour nous, Charlot peut aller se rhabiller ! Je ne saurais te remercier suffisamment du temps que

tu as consacré à mes travaux, du regard critique que tu y as porté et de la motivation que tu m'as transmise.

L'équipe encadrante ne saurait être au complet sans Daniel Moynet, Ibtissem Gammoudi et Fabien Moroté. Daniel et Ibtissem, vous avez été les premiers à m'immerger dans le monde bactérien, et quelle aventure ! Ibtissem tu m'as soutenu dans les expériences d'électrochimie et à partagé avec moi certains « emportements », un grand merci. Fabien, l'acolyte des manips AFM, le roi du babyfoot, le dénicheur de la radio phare Chantefrance, un grand merci pour ta présence, tes mots toujours légers et ta bonne humeur. Enfin, un immense merci à Rokhaya Faye, qui m'a précédé, pour ses conseils avisés, son écoute et sa présence malgré la distance.

Un grand merci à Lydia Roudier (ICMCB) et Hassan Saadaoui (CRPP) pour leur disponibilité et leur aide sur certaines expériences qui, sans pratique, s'oublent vite : il est alors bon d'avoir un esprit avisé à appeler.

Je tiens à remercier le service Gestion du LOMA - Sophie, Suzanne, Isabelle, Laurette et Josiane - sans qui je n'aurais pu découvrir « le monde », scientifiquement parlant, au travers des congrès. Je les remercie, surtout, pour leur joie de vivre et nos nombreuses conversations - sérieuses, joyeuses et parfois emportées ! Je n'oublie pas les services Optique et Électronique - Marc, Sébastien, William, Bernard, Romain et Etienne - merci pour votre bonne humeur, vos sourires et nos parties « full benzène » (comme dirait Fabien !) de babyfoot. Marc, sans toi et ton passe partout, je n'aurais pu finaliser un certain nombre de manips, souvent tard le soir ; William, ces pages n'auraient pu s'écrire sans tes nombreuses interventions informatiques ; merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.

Certaines personnes, par leur addiction commune à une substance bien nocive, et les discussions qui s'en sont suivies sur la terrasse, ont également contribué, certainement inconsciemment, au bon déroulement de cette thèse. Jean-Pierre, merci pour vos mots, certes parfois trop appuyés mais qui parvenaient, malgré tout, à me faire sourire et pour votre soutien dans les moments de tension. Yann, ton enthousiasme communicatif pour ta science et tes voyages m'ont souvent permis de m'évader, merci. Hamid, c'était un plaisir de vous écouter parler sciences, de découvrir avec vous les multiples facettes de tant d'expériences, merci pour votre apprentissage. Enfin, Sandra, une personnalité que j'apprécie tout autant que son caractère est fort : un rayon de soleil, de bonne/forte humeur au milieu de mes jours gris, un grand merci.

Une thèse, un long fleuve tranquille ? Pas évident...mais les turbulences se sont accompagnées de tant de belles rencontres qu'elles en sont presque anecdotiques. La « team du 1<sup>er</sup> étage » - Rim et Antoine - merci pour votre soutien, votre bonne humeur, nos fous rires, nos soirées pOsÉ, ces petites choses qui font naître une belle amitié. Alexandre, plus qu'une amitié, une belle histoire, merci d'avoir permis mon intégration au laboratoire, d'avoir supporté mon fort caractère, de m'avoir soutenu contre vents et marées ; en un mot, merci pour notre « réciprocité ». « Les amis

théoriciens du 1<sup>er</sup> et 2<sup>nd</sup> étage » - Gocé, Paul, Quentin et Julie - la théorie est tellement plus attrayante grâce à vous ! La dernière ligne droite, tant redoutée, aura été, en votre compagnie, une belle année ; merci pour tous ces bons moments. Quentin, « parce qu'on est deux autistes mais qu'on rigole bien », merci pour ton soutien ; je n'aurais jamais autant parlé et appris en si peu de mots. Un grand merci à mes co-bureaux – Antoine, Alizée, Asma Soussouuuuu, Zeineb - qui ont partagé avec moi quelques moments de folie et de « craquage » ! Je n'oublie pas les anciens docteurs - Marion, Joyce, Julien, Minh, Amine, Antonio et Quentin – et les futurs docteurs – Matthieu, Mathilde, Raphaël, Gabriel, Housseem - avec qui j'ai également passé de très agréables moments et qui ont garanti ma joie de vivre au cours de ces années.

Enfin, les mots ne seront jamais assez forts pour remercier mes parents et ma sœur. Une constante, un infini dans lequel je puise ma force et qui n'a jamais failli à me soutenir, me porter et m'élever. Leur amour inconditionnel a fait de moi la personne que je suis. Ils sont ma fierté, pour toujours et à jamais.

# Table des matières

Préambule.....	9
Liste des abréviations .....	11
Chapitre 1 Les bio-nano-mondes à la loupe .....	13
1.1 La détection sensible et sélective des bactéries, une nécessité grandissante ....	14
1.1.1 Des bactéries omniprésentes dans l’environnement.....	14
1.1.2 Les moyens actuels de détection bactériologique .....	17
1.1.3 L’émergence des biocapteurs .....	19
1.2 Le monde des « nanos », un outil privilégié pour les biocapteurs.....	25
1.2.1 Les NPs, des systèmes prometteurs pour des avancées technologiques ....	25
1.2.2 Les NPs, des outils précieux pour les biocapteurs .....	28
1.2.3 Les interactions entre NPs et cellules .....	31
1.3 Problématique de l’étude .....	37
1.3.1 Objectifs de la thèse.....	37
1.3.2 Choix des modèles.....	40
Bibliographie.....	42
Chapitre 2 Des outils et méthodes au service des bio-nano-mondes.....	51
2.1 La microscopie à force atomique.....	52
2.1.1 L’AFM, une microscopie en champ proche privilégiée.....	52
2.1.2 L’AFM, une pointe en interaction locale avec l’échantillon.....	53
2.1.3 Les modes de fonctionnement .....	57
2.1.4 Matériels et conditions d’imagerie.....	67
2.2 Synthèse et caractérisation des SiO <sub>2</sub> -NPs .....	68
2.2.1 Protocoles de synthèse de SiO <sub>2</sub> -NPs.....	68
2.2.2 Caractérisations des SiO <sub>2</sub> -NPs .....	70
2.3 Préparation et caractérisation des systèmes bactériens .....	74
2.3.1 Souches.....	74
2.3.2 Etude de viabilité des bactéries .....	74
2.3.3 Observations en champ noir.....	77
2.3.4 Préparations pour l’étude AFM.....	77
2.4 Elaboration du biocapteur .....	79
2.4.1 Notions d’électrochimie.....	79
2.4.2 La microbalance à quartz.....	84
2.4.3 Elaboration du biocapteur .....	86
Bibliographie.....	88
Annexes – Calibration de l’AFM.....	90

Chapitre 3	Caractérisation des acteurs de l'interaction.....	93
3.1	Des NPs de taille et charge contrôlées.....	94
3.1.1	SiO <sub>2</sub> -NPs sous forme commerciale.....	94
3.1.2	Synthèse de SiO <sub>2</sub> -NPs de taille contrôlée.....	96
3.1.3	Des SiO <sub>2</sub> -NPs d'état de surface contrôlé.....	97
3.2	<i>E. coli</i> , une bactérie à l'organisation « type cerveau ».....	98
3.2.1	Une eau...de vie.....	98
3.2.2	Caractérisation morphologique d' <i>E. coli</i> .....	100
3.2.3	Une structure de surface de « type cerveau ».....	102
3.2.4	Vieillessement du biofilm bactérien d' <i>E. coli</i> .....	110
3.3	<i>B. subtilis</i> , une bactérie « sans cerveau ».....	113
3.3.1	Survie des bactéries <i>B. subtilis</i> .....	113
3.3.2	Caractérisation par AFM.....	115
	Bilan.....	121
	Bibliographie.....	122
Chapitre 4	Etude de l'interaction nanoparticules – bactéries.....	125
4.1	La taille des SiO <sub>2</sub> -NPs, un paramètre critique de l'interaction.....	126
4.1.1	Survie et organisation de la population bactérienne.....	126
4.1.2	De potentiels changements morphologiques.....	134
4.1.3	Un seuil de taille pour la transition dans l'organisation membranaire ...	144
4.1.4	Des dommages membranaires à la lyse cellulaire.....	146
4.1.5	Existence d'un diamètre critique dans l'interaction NPs - <i>E. coli</i> .....	148
4.2	La charge des SiO <sub>2</sub> -NPs, un paramètre secondaire de l'interaction.....	148
4.2.1	Des attractions électrostatiques favorisées.....	149
4.2.2	De potentiels changements morphologiques.....	153
4.2.3	Préservation de la structure membranaire.....	155
4.2.4	Dommages membranaires.....	157
4.2.5	Les SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>+</sup> , sources de dommages cellulaires indépendamment de leur taille	159
4.3	La membrane externe de la bactérie, première cible des NPs.....	160
4.3.1	Etude de la viabilité de <i>B. subtilis</i> .....	160
4.3.2	<i>B. subtilis</i> , une morphologie résistante.....	162
4.3.3	La structure du peptidoglycane.....	165
4.3.4	L'activité antibactérienne des « petites » SiO <sub>2</sub> -NPs sur <i>B. subtilis</i> .....	169
4.3.5	La membrane externe, cible privilégiée des SiO <sub>2</sub> -NPs.....	170
	Bilan.....	173
	Bibliographie.....	174
	Annexes – Chapitre 4.....	177

Chapitre 5	Elaboration d'un biocapteur pour la détection de bactéries .....	183
5.1	Fonctionnalisation du transducteur .....	184
5.1.1	Etude du transducteur seul .....	184
5.1.2	Dépôt d'un film de polyélectrolytes .....	188
5.2	Immobilisation du biorécepteur .....	199
5.2.1	Dépôt d'un film de NPs positives sur une PEM 6 .....	199
5.2.2	Dépôt du biorécepteur : NPs-Ac .....	203
5.3	Détection des bactéries .....	205
5.3.1	Contrôle en absence d'anticorps.....	206
5.3.2	Détection en présence de NPs.....	206
5.3.3	Les NPs sont-elles indispensables à la détection ? .....	208
5.3.4	Sensibilité et limite de détection du biocapteur .....	209
5.3.5	Spécificité du biocapteur .....	211
5.3.6	Un biocapteur en devenir .....	212
	Bilan.....	215
	Bibliographie.....	216
	Annexes – Chapitre 5 .....	220
	Conclusions et perspectives .....	225
	Annexes .....	229
A.	Les monocouches de LPS, un modèle de la membrane externe d' <i>E. coli</i> .....	230
A.1	Motivations.....	230
A.2	Les techniques de Langmuir (- Blodgett).....	231
A.3	Etude des monocouches de LPS.....	232
A.4	Discussion .....	238
B.	Etude nanomécanique de l'interaction NPs / <i>E. coli</i> .....	241
B.1	Une caractérisation en milieu liquide .....	241
B.2	Module élastique d' <i>E. coli</i> .....	242
B.3	Effet des SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> sur l'élasticité d' <i>E. coli</i> .....	246
	Bibliographie.....	252
C.	Publications .....	255

# Préambule

Quotidiennement, nous sommes confrontés à ces objets infiniment petits que sont les nanoparticules (NPs). Ces particules, de l'ordre du milliardième de mètre, possèdent des propriétés spécifiques, impossibles à obtenir avec le même matériau à l'état massif. Ces propriétés attirent nombre d'industriels et de chercheurs pour des applications technologiques et/ou des recherches fondamentales. Par exemple, que ce soit pour garantir la résistance des pneus de voiture, pour rendre brillants certains bonbons, ou pour prévenir, grâce à des crèmes, les effets du temps, les NPs sont aujourd'hui omniprésentes dans notre vie (Figure 1).



Figure 1. Exemples impliquant l'utilisation de nanoparticules, tirés de notre vie quotidienne, montrant leur omniprésence dans des domaines très variés.

Les nanotechnologies constituent véritablement la révolution de ces dernières décennies. Le champ d'innovations qu'elles offrent montre que les frontières jusqu'alors établies ne cessent d'être repoussées, notamment dans le domaine biomédical. Les recherches sur les thérapies cancéreuses, par exemple, se tournent aujourd'hui vers la vectorisation de médicaments grâce à des nano-objets capables de ne cibler que les cellules tumorales, sans altérer les cellules saines.

Quotidiennement, nous sommes également confrontés à divers micro-organismes, telles les bactéries. Ces bactéries omniprésentes, de l'ordre du millionième de mètre, sont souvent indispensables aux écosystèmes, mais peuvent parfois être pathogènes (Figure 2) et éventuellement à l'origine de maladies mortelles.



Figure 2. Exemples illustrant l'omniprésence des bactéries dans notre vie. Les bactéries peuvent être bénéfiques (yaourts, flore intestinale) ou pathogènes (maladies).

Aussi, un enjeu public majeur, biomédical et sanitaire, est-il de pouvoir détecter et identifier ces micro-organismes. Les méthodes conventionnelles de détection bactériologique (par exemple, le test « enzyme-linked immunosorbent assay », ELISA) sont souvent coûteuses en temps, parfois fastidieuses à mettre en œuvre et onéreuses. L'objectif actuel est donc de disposer d'outils plus performants. Dans ce contexte, le développement de biocapteurs intégrant des NPs suscite un grand intérêt en termes de miniaturisation, de coût, de temps, de sensibilité et de spécificité. La Direction Générale de l'Armement (DGA), co-financeur de cette thèse, est particulièrement intéressée par la conception d'un tel capteur, intégrable à l'équipement du soldat, dans le cadre de contaminations bactériennes et, plus rarement, d'éventuelles attaques biologiques.

Toutefois, la maîtrise d'une telle conception nécessite la compréhension préalable des interactions existant entre NPs et bactéries. En effet, malgré leur intérêt grandissant, les NPs questionnent, notamment sur leur potentielle cytotoxicité vis-à-vis des micro-organismes environnementaux et de nos propres cellules. En raison de leurs dimensions, elles peuvent, en effet, traverser les barrières biologiques, et, en interagissant avec les constituants cellulaires, interférer avec leur métabolisme et altérer leur fonctionnement. Les NPs d'argent sont, par exemple, connues pour leur pouvoir bactéricide ; certains pansements en sont donc recouverts afin de prévenir les infections bactériennes au niveau de plaies.

Dans ce contexte, cette thèse vise (i) à étudier, *via* une approche systématique, les interactions entre NPs et bactéries, d'un point de vue fondamental et (ii) à concevoir un biocapteur, intégrant des NPs aux propriétés contrôlées et optimisées, pour la détection de bactéries, d'un point de vue appliqué.

Ce manuscrit présentera, dans un premier chapitre, un état de l'art sur les bio-nanomondes qui mettra en regard l'omniprésence des populations bactériennes et l'intérêt grandissant des NPs pour la potentielle détection de ces agents pathogènes. Les techniques de caractérisation de l'interaction et d'élaboration du biocapteur seront présentées dans le chapitre 2. Le chapitre 3 sera consacré à la caractérisation, essentiellement morphologique, des bactéries et des NPs de façon indépendante. Cette étude préalable est nécessaire à la compréhension des interactions entre les deux systèmes qui feront l'objet du chapitre 4. Enfin, le chapitre 5 présentera les diverses étapes menant à la conception du biocapteur électrochimique pour la détection de *E. coli*.

# Liste des abréviations

Abréviations	Définition
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	<i>Atomic force microscopy</i> - Microscopie à force atomique
Ag	Antigène
APS	Aminopropyltriéthoxysilane
CAR	Courbe d'approche retrait
CF	Courbe de force
CFU	<i>Colony forming unit</i> - Unité formant colonie
CV	Cyclic voltametry - Voltamétrie (plus largement voltamorgramme) cyclique
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMPC	Dimyristoyl-phosphatidylcholine
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DO	Densité optique
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LB	Luria Broth (milieu nutritif)
LC	Liquide condensé
LOD	<i>Limit of detection</i> - Limite de détection
LPS	Lipopolysaccharide
LE	Liquide expansé
MET	Microscopie électronique en transmission
NHS	N-hydroxysuccinimide
NPs	Nanoparticules
(c / s-)SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>/+</sup>	Nanoparticules de silice chargées négativement ou positivement, commerciales ou synthétisées
OM	<i>Outer membrane</i> - Membrane externe
Ox / Red	Couple oxydant / réducteur
PAH	Polyallylamine hydrochloride
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> - Tampon phosphate salin

PCN	Point de charge nulle
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Réaction de polymérisation en chaîne
PEM	<i>Polyelectrolyte multilayer</i> - Multicouche de polyélectrolytes
PIE	Point isolélectrique
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PSS	Polystyrenesulfonate
QCM (-D)	<i>Quartz microbalance</i> - Microbalance à quartz (avec contrôle de la dissipation)
QD	<i>Quantum dot</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> - Espèce réactive de l'oxygène
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> - Résonance plasmonique de surface
STM	<i>Scanning tunneling microscope</i> - Microscopie à effet tunnel
TEOS	Orthosilicate de tétraéthyle
UV	Ultraviolet

# Chapitre 1 Les bio-nano-mondes à la loupe

## Sommaire

---

1.1	La détection sensible et sélective des bactéries, une nécessité grandissante .....	14
1.1.1	Des bactéries omniprésentes dans l'environnement.....	14
1.1.1.1	L'innocuité voire l'atout de certaines bactéries .....	14
1.1.1.2	Les bactéries, des agents potentiellement pathogènes.....	15
1.1.2	Les moyens actuels de détection bactériologique .....	17
1.1.3	L'émergence des biocapteurs.....	19
1.1.3.1	Principe et caractéristiques.....	19
1.1.3.2	Les transducteurs .....	20
1.1.3.3	Les biorécepteurs.....	23
1.2	Le monde des « nanos », un outil privilégié pour les biocapteurs.....	25
1.2.1	Les NPs, des systèmes prometteurs pour des avancées technologiques.....	25
1.2.1.1	Quelques propriétés .....	26
1.2.1.2	Applications et avenir des nanotechnologies.....	27
1.2.2	Les NPs, des outils précieux pour les biocapteurs.....	28
1.2.2.1	Les biocapteurs basés sur les propriétés optiques des NPs.....	29
1.2.2.2	Les biocapteurs basés sur les propriétés magnétiques des NPs.....	29
1.2.2.3	Les biocapteurs basés sur les propriétés chimiques des NPs.....	30
1.2.2.4	Les nanobiocapteurs gravimétriques.....	31
1.2.3	Les interactions entre NPs et cellules .....	31
1.2.3.1	Les NPs, la médecine de demain?.....	31
1.2.3.2	Les NPs, un danger pour l'environnement et l'Homme ? .....	33
1.2.3.3	L'influence de facteurs multiples sur l'interaction NP - cellule .....	35
1.3	Problématique de l'étude.....	37
1.3.1	Objectifs de la thèse.....	37
1.3.1.1	Maîtriser l'interaction NPs – bactéries .....	37
1.3.1.2	Développer un biocapteur pour la détection de <i>E. coli</i> .....	39
1.3.2	Choix des modèles.....	40
1.3.2.1	<i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> .....	40
1.3.2.2	Les NPs de silice.....	40
	Bibliographie.....	42

---

Ce chapitre présente une description non exhaustive de deux « mondes » qui, bien qu'invisibles, nous entourent au quotidien : le monde des bactéries et le monde des nanoparticules (NPs). Ces deux thématiques sont le cœur de ce travail de thèse qui vise à comprendre les phénomènes de toxicité potentiellement associés aux NPs et à concevoir un biocapteur miniaturisé pour la détection de bactéries.

## 1.1 La détection sensible et sélective des bactéries, une nécessité grandissante

Les bactéries sont des micro-organismes, *i.e.* des organismes vivants de taille microscopique, à l'instar des champignons et des levures. Il s'agit plus précisément, d'organismes procaryotes, ne possédant donc pas de noyau, généralement constitués d'une unique cellule. Elles présentent une grande diversité de tailles et de formes. Toutefois, la majorité des bactéries possède une taille de quelques dixièmes à quelques microns, et sont soit sphériques, soit en forme de bâtonnet. Elles se caractérisent par l'existence d'une paroi cellulaire qui leur confère leur forme et les protège d'un éclatement sous l'effet d'un choc osmotique (Figure 3). Deux sous-groupes se distinguent alors : les bactéries à Gram positif possèdent une membrane plasmique unique tandis que celles à Gram négatif possèdent une membrane plasmique et une membrane externe (cf. chapitre 3) [1].

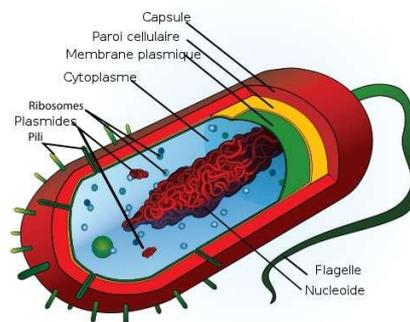


Figure 3. Structure d'une bactérie ([www.futura-sciences.com](http://www.futura-sciences.com)).

### 1.1.1 Des bactéries omniprésentes dans l'environnement

#### 1.1.1.1 L'innocuité voire l'atout de certaines bactéries

Certaines bactéries sont bénéfiques voire indispensables aux hôtes qui les hébergent. Elles participent, à leur insu, à leur construction, leur maintien et même à leur rétablissement. Sans entrer dans une liste exhaustive des bienfaits de certaines bactéries, trois intérêts majeurs pour la santé, l'environnement et l'industrie sont décrits succinctement ci-après.

Les cellules bactériennes sont dix fois plus nombreuses que les cellules humaines au sein de notre corps, colonisant la peau, la bouche mais également, et surtout, l'intestin.

Ce microbiote (ou flore) intestinal(e) permet, notamment à certains animaux dont l'Homme, de digérer certains aliments et de disposer des vitamines essentielles, et est donc à l'origine de processus qu'ils ne pourraient accomplir sans une symbiose avec ce microbiote. De plus, les bactéries assurent un équilibre des stockages et dépenses d'énergie en termes d'assimilation et de rejet des « graisses », suggérant ainsi leur importance dans certaines pathologies, tels l'obésité et le diabète [2].

Par ailleurs, les bactéries sont omniprésentes dans les eaux et les sols. Certaines espèces peuvent, en s'adaptant, résister à des conditions extrêmes, tandis que d'autres trouvent les conditions favorables à leur croissance dans des milieux généralement considérés comme hostiles pour le vivant. Cette capacité est utilisée pour l'autoépuration de ces milieux. La biorémédiation, *i.e.* la gestion des contaminants/polluants par des organismes vivants, a notamment été employée lors de la marée noire survenue dans le Golfe du Mexique en 2010. Les hydrocarbures libérés dans les eaux et les sols, aux propriétés mutagènes et cancérigènes, ont ainsi pu être dégradés par certaines bactéries qui y trouvent une source d'énergie pour leur croissance [3].

Enfin, les bactéries sont également un atout indéniable dans l'industrie agroalimentaire, pour la fabrication notamment de yaourts et fromages ou de vinaigre. Dans le premier cas, l'action des bactéries lactiques sur les composants du lait (production d'acide lactique, dégradation des protéines) conduit à la formation d'un caillé plus ou moins solide. Dans le second cas, la formation du vinaigre est due à l'action d'une bactérie du genre *Acetobacter*, capable de produire de l'acide acétique à partir d'éthanol.

### 1.1.1.2 Les bactéries, des agents potentiellement pathogènes

Bien que les bactéries présentent certains atouts susmentionnés, nombre d'espèces sont pathogènes. En effet, responsables d'infections parfois mortelles, à l'origine d'intoxications alimentaires et de pollutions des écosystèmes, les bactéries sont également ces micro-organismes qui hantent notre quotidien, lorsque, par exemple, nous prenons les transports en commun, serrons des mains, manipulons de l'argent et utilisons nos claviers ou écrans.

#### Pathogènes pour l'environnement

Les bactéries sont capables de survivre et de se multiplier dans des niches écologiques très variées et dans des conditions extrêmes. Elles sont omniprésentes dans l'air, les sols et les eaux, participant ainsi aux processus biogéochimiques responsables des cycles des éléments mais faisant également de l'environnement un réservoir de pathogènes.

Chez les végétaux, les bactéries peuvent causer des maladies, engendrant la perte de cultures entières, avec des impacts économiques très importants. Citons, par exemple, le chancre citrique, dû à *Xanthomonas axonopodis pv. citri*, responsable de la

destruction des vergers d'agrumes et la maladie de Pierce, affectant les cultures de vigne, due à *Xylella fastidiosa*. Les bactéries sporulantes (Gram positive) *Paenibacillus larvae* sont, elles, responsables de la décimation de colonies d'abeilles et peuvent, ainsi, être à l'origine de catastrophes apicoles puisque les abeilles sont indispensables aux processus de pollinisation.

## Pathogènes pour l'Homme

L'environnement, réservoir de pathogènes, constitue également le vecteur des dites bactéries vers les animaux, dont l'Homme. Les maladies bactériennes sont, pour une grande majorité, bénignes car notre organisme possède un système de défense contre ces agresseurs qui, si nécessaire, peut également être secondé par certaines thérapies (par exemple les antibiotiques). Toutefois, les bactéries nous renvoient généralement aux pires fléaux qu'a pu connaître l'humanité (*Yersinia pestis* à l'origine de la peste et *Vibrio cholerae* pour le choléra), et qu'elle connaît encore dans certaines régions du globe (Tableau 1) [4].

Certaines bactéries, à l'origine inoffensives, peuvent également devenir pathogènes en fonction de leur environnement, de leur concentration et de la résistance de l'hôte. Les bactéries *Escherichia coli*, bactéries majeures de notre flore intestinale, peuvent ainsi causer des troubles gastriques ou des infections urinaires tandis que *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, bactéries de notre flore cutanée, peuvent être à l'origine de maladies nosocomiales. De plus, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) alerte aujourd'hui sur la nécessité de développer de nouveaux traitements pour des bactéries multirésistantes, qui présentent la capacité de résister à différentes familles d'antibiotiques actuellement utilisés [5]. Celles-ci présentent une menace accrue dans les milieux hospitaliers au travers des maladies nosocomiales, et agroalimentaires, par les intoxications alimentaires (Tableau 1) [6].

Les ravages causés par certaines bactéries pathogènes, au travers d'eaux, d'aliments et d'animaux contaminés, sont connus depuis longtemps, avant même l'identification de leurs origines. Ces pathogènes, inodores et invisibles, ont ainsi été utilisés en tant qu'armes biologiques. Outre les virus (type variole) ou toxines (type botulique), certaines bactéries constituent des armes potentielles aux effets dévastateurs : *Bacillus anthracis* ou anthrax (maladie du charbon), *Yersinia pestis* (peste) et *Francisella tularensis* (tularémie). Au XX<sup>ème</sup> siècle, l'utilisation de telles armes est étroitement liée à la Seconde Guerre Mondiale pendant laquelle les Japonais et les Britanniques expérimentèrent les bactéries de la peste et le bacille du charbon sur des villes chinoises et des îles écossaises respectivement. Toutefois, la première attaque bioterroriste, à proprement parler, remonte à 2001, aux Etats-Unis, avec des attentats à l'anthrax. Face à une telle menace, le plan Biotix (volet du plan Vigipirate) vise, en France, (i) à constituer des stocks d'antibiotiques et vaccins en cas d'attaques, (ii) à contrôler la circulation et le stockage d'agents pathogènes et (iii) à renforcer les moyens d'analyse

et de détection de ces agents ainsi que les outils de décontamination de l'air, des sols et des eaux en cas de dissémination (*opac.invs.sante.fr*).

Tableau 1. Liste non exhaustive de bactéries pathogènes associées à des maladies d'origines alimentaire et respiratoire (OMS, *www.who.int*).

	Bactéries	Symptômes / Maladies	Origines
Maladies alimentaires	<i>Salmonella</i> , <i>Escherichia coli</i>	Fièvre, maux de tête, vomissements, diarrhées	Produits d'origine animale frais et/ou crus
	<i>Listeria</i>	Avortements, décès du nourrisson	Produits laitiers non pasteurisés
	<i>Vibrio cholerae</i>	Douleurs abdominales, diarrhées	Eaux et aliments contaminés
Maladies respiratoires	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose	
	<i>Corynebacterium diphtheria</i>	Diphthérie	
	<i>Bordetella pertussis</i>	Coqueluche	
	<i>Yersinia pestis</i>	Peste	
	<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra	

### 1.1.2 Les moyens actuels de détection bactériologique

Face aux menaces que représentent ces bactéries pathogènes pour l'Homme et l'environnement, un effort considérable est effectué, en termes de prévention, sur le développement d'outils de détection appropriés (Figure 4) [7].

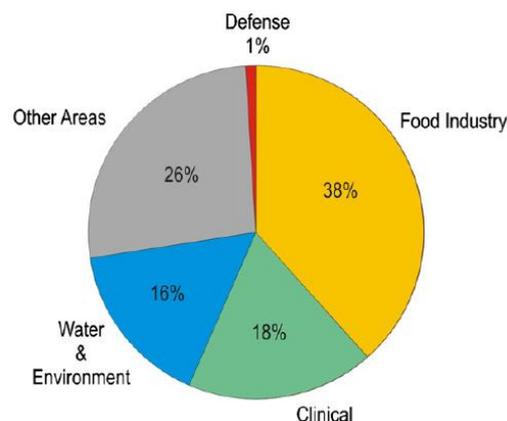


Figure 4. Répartition par thématiques des publications traitant de la détection de bactéries pathogènes, montrant des implications considérables pour l'environnement et l'Homme [7].

De nombreuses méthodes sont aujourd'hui mises en œuvre, au sein des organismes médicaux, industries agroalimentaires et laboratoires de recherche. Ces dernières sont basées sur la détection et l'identification microbiologique et biochimique de l'agent pathogène.

Elles peuvent être regroupées en trois catégories :

- Méthode par culture et comptage de colonies

Cette méthode requiert la mise en culture de l'échantillon. De nombreux tests sont alors effectués afin d'identifier le groupe bactérien (coloration de Gram), la morphologie (microscopie), la capacité à croître dans des milieux divers et la capacité à former des spores. Puis des tests biochimiques / enzymatiques sont réalisés afin de préciser, voire d'identifier la souche bactérienne en culture. Bien que coûteuse en temps (plusieurs jours) et en matériel, cette méthode est notamment employée pour la détection de bactéries pathogènes à l'origine d'intoxications alimentaires [8].

- Méthodes basées sur l'analyse de l'ADN : la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Il s'agit d'identifier la bactérie en isolant, amplifiant et quantifiant des séquences d'ADN de son génome. Cette technique, plus rapide ( $< 1$  jour) et spécifique que la méthode de mise en culture, permet également de détecter simultanément diverses souches bactériennes [9]. Toutefois, sans association avec d'autres techniques préalables, elle ne permet pas de faire la distinction entre les bactéries vivantes et mortes, leur ADN étant intact.

- Méthodes basées sur la détection immunologique

Ces méthodes sont basées sur l'interaction antigène-anticorps. Elles sont donc spécifiques et sensibles et présentent l'avantage d'être robustes et rapides. La méthode immuno-enzymatique ELISA, l'une des méthodes les plus connues du grand public [10], est couramment utilisée dans les laboratoires médicaux ainsi que par les industries agroalimentaires.

L'ensemble de ces méthodes conventionnelles nécessite un pré-enrichissement des échantillons, dans lesquels les bactéries sont initialement en très faible quantité. Pour assurer la détection, les échantillons doivent contenir au moins  $10^3 - 10^4$  CFU<sup>1</sup>/mL. Aussi, bien que sensibles et spécifiques, elles sont limitées par le temps requis pour le traitement et l'analyse d'un échantillon. De plus, ces méthodes sont souvent encombrantes, parfois fastidieuses à mettre en œuvre et onéreuses. Il est donc primordial de disposer, à l'heure actuelle, d'outils miniaturisés permettant de détecter directement, rapidement, spécifiquement et de manière fiable les bactéries au sein d'un échantillon. Dans ce contexte, le développement des biocapteurs suscite un grand intérêt.

---

<sup>1</sup> CFU : unité formant colonie.

## 1.1.3 L'émergence des biocapteurs

### 1.1.3.1 Principe et caractéristiques

Un biocapteur est un outil analytique global, intégré et autonome (Figure 5). Il se compose :

- d'un élément biologique assurant la reconnaissance spécifique d'une molécule dans le milieu étudié, appelé **biorécepteur**,
- d'un élément permettant la transformation de l'évènement de reconnaissance en un signal physique directement mesurable, appelé **transducteur**.

L'association de ces deux systèmes, judicieusement effectuée, permet la détection et le dosage d'une molécule, appelée **analyte**, présente dans un milieu d'analyse. L'évaluation de cette détection se fonde principalement sur quatre points :

- la sélectivité ou **spécificité** : le biocapteur doit être capable de distinguer au sein d'un milieu complexe une molécule cible, phénomène majoritairement assuré par le biorécepteur. Tout évènement non lié à la reconnaissance de cette cible ne doit pas participer au signal réponse du transducteur ;
- la **sensibilité** : la réponse physique du biocapteur doit correspondre aux évènements de reconnaissance ayant lieu, sans perte de signal ;
- la **reproductibilité** : le biocapteur doit présenter des réponses quasi-identiques pour des mesures répétées au sein d'un milieu comptant la même quantité de molécules à détecter ;
- la **limite de détection** (LOD pour *limit of detection*) : il s'agit de la plus petite concentration d'analyte que le biocapteur puisse détecter, sans méprise avec un potentiel bruit de fond.

Selon les objectifs et les contraintes du biocapteur à développer, nombre de biorécepteurs et de transducteurs existent qui, combinés et compatibles, répondent aux exigences attendues (Figure 5).

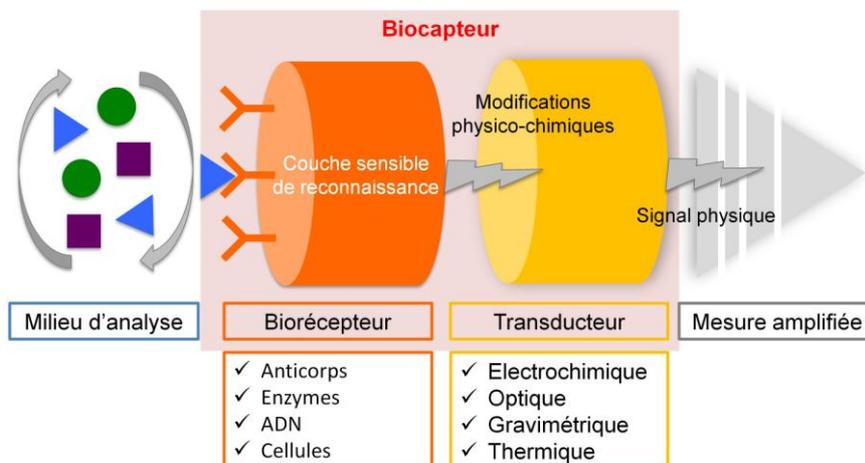


Figure 5. Schéma du principe d'un biocapteur, mentionnant les différents types de biorécepteurs et transducteurs disponibles actuellement.

Sans dresser une liste exhaustive, les principaux transducteurs et biorécepteurs sont brièvement décrits ci-après. Pour une littérature plus riche et générale sur les biocapteurs (définition, caractéristiques et composants), le lecteur pourra se référer à [11–13].

### 1.1.3.2 Les transducteurs

Le transducteur est l'élément indispensable du biocapteur permettant la traduction de la reconnaissance moléculaire en un signal physique quantifiable et interprétable via une amplification ou un post-traitement. Parmi les transducteurs, trois familles se distinguent majoritairement, selon leur principe de fonctionnement et le signal transformé qui en résulte.

#### Les transducteurs électrochimiques

Ils « transforment » une interaction électrochimique à l'interface électrode / analyte, issue d'une réaction spontanée ou d'une stimulation, en un signal électrique mesurable [14] :

- la transduction ampérométrique se base sur la mesure, à potentiel fixe, d'un courant induit par une réaction d'oxydoréduction, directement ou indirectement liée aux processus de bio-reconnaissance (Figure 6);
- la transduction potentiométrique se base sur la mesure, à courant fixe, d'une différence de potentiel entre une électrode de travail et une électrode de référence, induite par la présence d'ions ou de molécules chargées associées aux événements de reconnaissance biologique.
- la transduction conductimétrique se base sur la mesure des variations d'impédance électrique entre deux électrodes, engendrées par des événements de bio-reconnaissance. En effet, la formation de complexes entre les molécules ciblées et les biorécepteurs, catalytiques ou d'affinité (cf. paragraphe 1.1.3.3), conduit à des modifications de capacitance et de résistance aux transferts d'électrons [15].

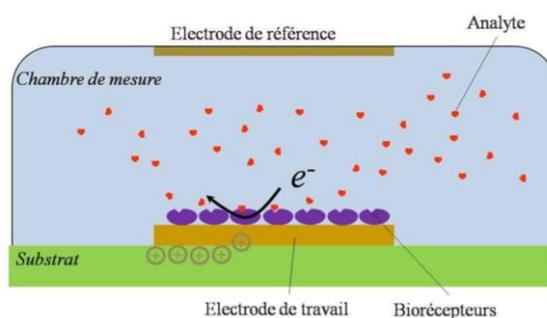


Figure 6. Principe de la transduction ampérométrique [16]. A potentiel fixe, le transfert d'électron entre des espèces oxydante et réductrice en solution est mesuré au travers du courant résultant. Ces transferts peuvent être induits ou modifiés par la reconnaissance biologique entre le biorécepteur et l'analyte.

Les premiers biocapteurs potentiométriques et ampérométriques, à base d'enzymes, ont vu le jour pour des mesures de quantification du glucose, dans le cadre de diagnostics et de thérapies pour le diabète [17]. Ces méthodes électrochimiques se caractérisent par un faible coût de mise en œuvre, une adaptation à la miniaturisation et une grande sensibilité. Elles sont notamment utilisées pour la détection de cellules pathogènes et/ou de toxines, pour des questions (i) de sécurité militaire et civile [18], (ii) de décontamination des eaux polluées [19] et (iii) de contrôle sanitaire agroalimentaire [20].

### Les transducteurs optiques

Ils reposent sur les caractéristiques optiques de l'interaction biorécepteur / analyte (absorbance, réflectance, luminescence ...). Ces transducteurs s'appuient, dans certains cas, sur le développement des fibres optiques [21,22]. Ils peuvent ou non nécessiter un marquage préalable de l'analyte pour la détection. On distingue ainsi :

- la détection après marquage de l'analyte par un fluorophore [23]. Bien que garantissant une faible limite de détection et une spécificité élevée, ces transducteurs nécessitent surtout un pré-traitement de l'échantillon analysé afin de marquer les molécules ciblées. Il est ainsi possible que les éléments de reconnaissance soient dénaturés, rendant la détection moins sensible. De plus, cette méthode s'avère quelque peu fastidieuse.
- la détection directe. Les modifications physico-chimiques à la surface du transducteur sont traduites en signal optique mesurable. Parmi ces transducteurs, la résonance plasmonique de surface (SPR) connaît un grand succès pour le suivi, en temps réel, des interactions biomoléculaires [24]. Cette méthode est basée sur la modification de l'indice de réfraction du transducteur, lors de la reconnaissance d'évènements biomoléculaires, qui engendre une modification des ondes incidente, plasmonique et réfléchie au sein du transducteur optique (Figure 7). Bien qu'extrêmement sensible, la SPR ne favorise pas la miniaturisation des systèmes et possède un coût élevé lié aux outils optiques nécessaires à sa réalisation.

### Les transducteurs gravimétriques

Ils traduisent l'accumulation de l'analyte à la surface du transducteur, *i.e.* l'augmentation de masse, en une variation des propriétés du matériau affecté (essentiellement des modifications de fréquence et de propagation d'onde). On distingue :

- les biocapteurs acoustiques [25] - ces transducteurs se basent sur l'atténuation des ondes acoustiques de surface (vitesse et amplitude) en fonction des propriétés du milieu de propagation, affecté ou non par la reconnaissance d'évènements biologiques.

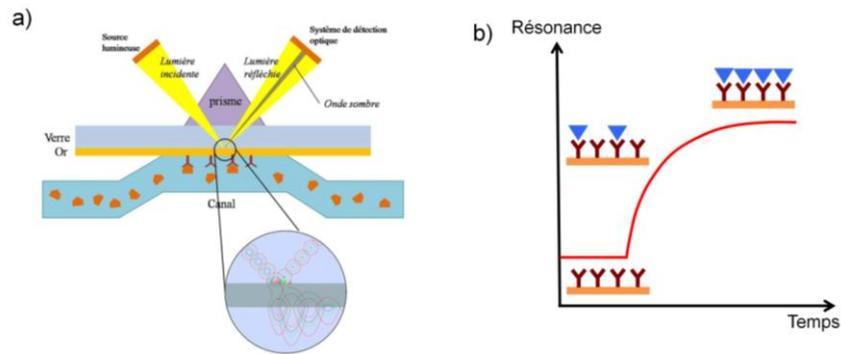


Figure 7. a) Principe de la résonance plasmonique de surface (SPR) [16]. Une lumière incidente illumine une interface entre deux milieux présentant deux indices de réfraction différents, dans des conditions de réflexion totale. Une onde évanescente se propage alors perpendiculairement à l'interface. Ses photons entrent en résonance avec les électrons libres de la couche métallique (or) recouvrant l'interface, donnant lieu au phénomène de SPR. Le faisceau réfléchi l'est avec une intensité et un angle défini, appelé angle de résonance, qui dépend des caractéristiques de l'interface. Un changement d'indice du milieu dans lequel le champ évanescent se propage, par une augmentation de masse (ligands / reconnaissance biologique), engendre une modification de l'angle de résonance. b) Représentation de la variation du signal de résonance lors des événements de reconnaissance biologique. Le signal sature lorsque l'interface est saturée en analytes.

- les biocapteurs piézoélectriques tels que la microbalance à cristal de quartz (QCM-D) [26] - ces transducteurs mesurent les variations de fréquence d'un cristal causées par la fixation d'une quantité d'analyte à sa surface. La vibration piézoélectrique engendre, en effet, un champ électrique dont la fréquence de résonance dépend de la nature chimique, de la taille et de la masse du cristal (Figure 8). Bien que bénéficiant de temps de réponse courts, ces systèmes sont peu spécifiques en raison d'un dépôt de masse potentiellement non induit par un événement de reconnaissance, et possèdent des limites de détection moins élevées que d'autres méthodes.

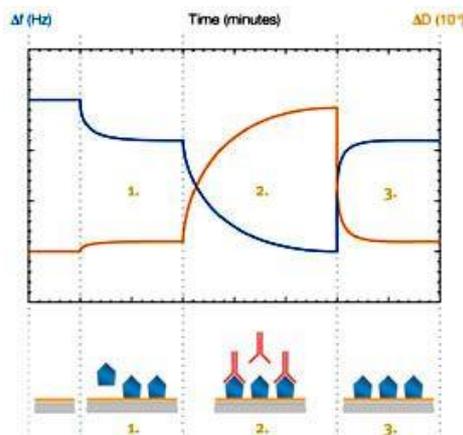


Figure 8. Principe de la QCM-D. Un dépôt de masse à la surface du quartz engendre des variations de la fréquence et de la dissipation de l'onde incidente sur le quartz. Les variations de fréquence renseignent sur la quantité de masse déposée tandis que les variations de dissipation traduisent les propriétés viscoélastiques du dépôt. L'étape 1 traduit la fixation de biorécepteurs à la surface du quartz, l'étape 2, les événements de reconnaissance et l'étape 3, le détachement de l'analyte précédemment détecté, lors d'une phase de rinçage, par exemple ([www.biolinscientific.com](http://www.biolinscientific.com)).

Considérant l'ensemble des domaines associés à la nécessité de détecter et quantifier la présence de bio-organismes au sein d'échantillons divers, de nombreux biocapteurs sont aujourd'hui présents sur le marché. Ils permettent d'étudier, en temps réel, les interactions biomoléculaires à l'interface transducteur / analyte. Citons, par exemple :

- la société Biacore qui développe des biocapteurs optiques (SPR) ;
- la société Q-sense qui développe des biocapteurs gravimétriques (QCM-D) ;
- l'entreprise Medtronic qui développe des biocapteurs électrochimiques implantables pour la détection du glucose et l'autorégulation de l'insuline.

### 1.1.3.3 Les biorécepteurs

La couche sensible du biocapteur est constituée d'un assemblage de biorécepteurs, garantissant l'accroche préférentielle et spécifique de l'élément ciblé au sein d'un milieu réactionnel. Ces biorécepteurs sont majoritairement classés en deux catégories : les biorécepteurs catalytiques et ceux d'affinité.

#### Les biorécepteurs catalytiques

Les enzymes sont des protéines possédant la capacité de catalyser une réaction de transformation chimique d'un substrat donné. Elles peuvent, sans être détruites, générer une très grande quantité du produit de réaction ciblé en un temps très court (la seconde), quantité qui sera aisément détectée par le transducteur. Cette activité confère aux biocapteurs des temps de réponse courts et des possibilités de miniaturisation élevées. Les biocapteurs enzymatiques sont les premiers à avoir été développés par Clark et Lyons, dans un but médical [27]. Toutefois, la dénaturation des enzymes, suite à des variations de température ou pH, inhibant alors leur capacité catalytique rend leur utilisation de moins en moins fréquente.

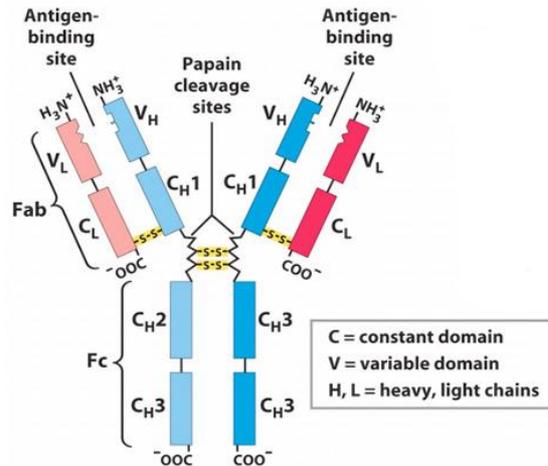
#### Les biorécepteurs d'affinité

Ils permettent une reconnaissance hautement spécifique d'une molécule biologique ciblée, et ce malgré une faible concentration dans un milieu ultra-complexe [11,12]. Deux biorécepteurs d'affinité sont majoritairement exploités dans le monde des biocapteurs :

- les anticorps (Ac) - il s'agit de protéines reconnaissant spécifiquement un antigène (Ag) donné au sein d'un système biologique. Il s'ensuit une réaction immunitaire spécifique. Les Ac possèdent (i) un fragment cristallisable,  $F_c$ , commun aux anticorps d'une même espèce et (ii) un site d'accroche spécifique (*antigen binding*) à un antigène donné,  $F_{ab}$  (Figure 9). La fixation entre les deux systèmes est assurée par des sites de reconnaissance spécifiques, appelés paratopes et épitopes respectivement pour l'Ac et l'Ag.

Dès lors que l'immobilisation des Ac à la surface du transducteur est optimale, *i.e.* dès lors que les sites récepteurs sont orientés uniformément et correctement,

la reconnaissance l'est également. L'utilisation d'anticorps comme éléments de reconnaissance garantit donc une détection robuste, sensible et rapide des analytes. Toutefois, cela nécessite que l'antigène complémentaire ne soit pas dénaturé et que les conditions de couplage soient favorisées. Cette technique est donc conditionnée par les caractéristiques de l'environnement analytique (pH, force ionique, température ...). Les avantages et problèmes liés aux biocapteurs impliquant le couplage Ac-Ag sont détaillés dans la revue de Byrne *et al.* [28].



- L'ADN - bien que moins répandues, les biopuces à ADN ont suscité un intérêt considérable ces dernières années dans le diagnostic précoce de maladies, notamment les cancers. Elles reposent sur l'hybridation de brins d'ADN, immobilisés à la surface du transducteur (optique ou électrochimique) avec ceux, complémentaires, présents au sein du milieu analysé. Les enchaînements nucléotidiques complémentaires étant uniques, ces biorécepteurs garantissent l'ultra-spécificité et l'infailibilité du biocapteur qui les accueille. L'approche par ADN à la base d'une *click chemistry* est, aujourd'hui, utilisée pour étudier un grand nombre de molécules biologiques et démontre une grande robustesse et reproductibilité [29]. Toutefois, la mise en œuvre de cette détection requiert, notamment pour la détection de bactéries, l'extraction, le pré-enrichissement et l'amplification du matériel génétique du système ciblé [30].

### Les techniques d'immobilisation

Le procédé mis en œuvre pour immobiliser le biorécepteur à la surface du transducteur contribue à l'efficacité du biocapteur et doit répondre à deux critères indispensables : (i) permettre le greffage des biorécepteurs afin d'assurer la reconnaissance biologique spécifique du système ciblé mais également (ii) limiter les interactions non-spécifiques entre le transducteur et des molécules non ciblées du milieu d'analyse. Aussi, leur orientation doit être parfaitement maîtrisée et leur densité contrôlée afin de réduire les encombrements gênant l'accès aux sites de reconnaissance.

De nombreuses techniques d'immobilisation existent selon les objectifs et les contraintes du problème [14]. Toutefois, deux d'entre elles sont souvent privilégiées :

- l'adsorption directe - l'adsorption des biorécepteurs sur la surface est due aux liaisons de faible énergie, type van der Waals, les interactions électrostatiques ou les forces polaires. Malgré un faible coût et sa facilité de mise en place, cette technique présente deux inconvénients majeurs : (i) sa réversibilité et (ii) sa non-reproductibilité, du fait du faible contrôle de la quantité de biorécepteurs déposée, de l'homogénéité et de la planéité de la couche ainsi formée.
- La liaison covalente - les biorécepteurs sont liés de façon covalente, non pas au transducteur directement, mais à une couche chimique intermédiaire. Cette méthode, robuste, assure l'absence de dénaturation des biorécepteurs et l'uniformité de la couche déposée.

La réalisation du transducteur ainsi que le choix et l'immobilisation du biorécepteur en surface conditionnent l'efficacité du biocapteur, en termes de spécificité et de sensibilité. Actuellement, la course à la miniaturisation et à l'ultrasensibilité de ces biocapteurs conduit les recherches vers l'intégration, en leur sein, de nanotechnologies, révolution scientifique de ces dernières décennies. Ci-après, nous détaillons ce que sont ces nanotechnologies, leurs propriétés prometteuses, notamment dans la conception de biocapteurs, ainsi que les potentiels dangers liés à leur utilisation.

## 1.2 Le monde des « nanos », un outil privilégié pour les biocapteurs

Consciemment ou inconsciemment, l'Homme évolue dans une société où les NPs sont omniprésentes, d'origine naturelle (tempêtes, volcans, débris biologiques) ou humaine (rejets industriels, produits manufacturés). Mais qu'entendons-nous par "nanoparticule"? Il s'agit de toute particule dont l'une, au moins, de ses trois dimensions est inférieure à 100 nm [31]. Elles peuvent être minérales (métaux, oxydes) ou organiques (carbone, polymères, lipides).

### 1.2.1 Les NPs, des systèmes prometteurs pour des avancées technologiques

Les nanotechnologies regroupent l'ensemble des processus visant à l'étude, la production et l'utilisation de nanomatériaux. La voie *top-down* consiste à miniaturiser une technologie préexistante en divisant la matière tandis que la voie *bottom-up* s'attache à étudier les propriétés de certains assemblages de NPs aux propriétés spécifiques pour répondre à une problématique technologique.

### 1.2.1.1 Quelques propriétés

De par leur petite taille, les NPs sont à la jonction entre l'atome et le matériau, entre la physique classique et la physique quantique. Contrairement au matériau macroscopique, elles possèdent un très grand rapport atomes surfaciques / volumiques et donc une très grande surface spécifique. De plus, en raison des effets de taille, les effets quantiques sont également très importants pour les NPs. Aussi, ces caractéristiques leur confèrent une réactivité chimique et des propriétés physiques (optique, mécanique, électrique et magnétique) prometteuses, qui n'apparaissent qu'à cette échelle :

- les propriétés optiques [32] - par définition, les NPs ont des dimensions inférieures aux longueurs d'onde du visible, les rendant transparentes. L'effet principal réside dans la discrétisation des niveaux d'énergie due au confinement des porteurs de charge au sein de l'atome. Lorsque la taille des NPs diminue l'énergie des transitions énergétiques augmente, et le spectre se déplace vers l'UV. De plus, du fait de leur composition intrinsèque, certaines NPs sont également absorbantes pour les UV (NPs de dioxyde de titane présentes dans les crèmes solaires) ou encore fluorescentes (*quantum dots*).
- les propriétés quantiques [32] - lorsqu'une NP métallique est soumise à un champ électromagnétique dont la longueur d'onde est largement supérieure à sa dimension, les électrons libres de la surface du métal oscillent à une certaine fréquence. Lorsque cette fréquence propre est égale à la fréquence excitatrice, il se produit le phénomène de résonance de plasmon de surface. Ce phénomène engendre une augmentation de l'absorption du faisceau lumineux par les particules, ce qui explique, par exemple, la couleur rouge-bordeaux de l'or colloïdal.
- les propriétés biologiques [33] - la taille des NPs leur permet également d'accéder aux endroits les plus confinés, et notamment d'interagir, en conséquence, avec les systèmes biologiques. Les applications médicales des NPs ont connu un essor grandissant ces dernières décennies avec la vectorisation ciblée de médicaments [34] et les techniques d'imagerie [35]. Toutefois, une utilisation courante des NPs, à de telles fins, requiert la garantie de leur innocuité vis-à-vis des systèmes biologiques.

Pour une revue détaillée des diverses propriétés (optique, magnétique, électrique, mécanique, catalytique ou biologique), le lecteur pourra se référer à [36–38].

### 1.2.1.2 Applications et avenir des nanotechnologies

Devant l'immense potentiel offert par les nanotechnologies, les investissements financiers se font de plus en plus importants, au niveau national et international, tant en recherche fondamentale qu'appliquée pour le développement de nouvelles technologies (Figure 10).

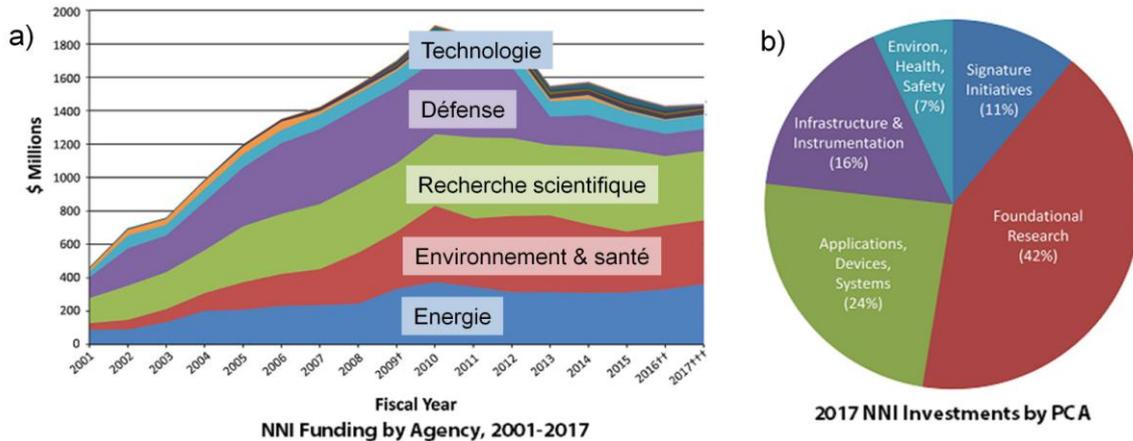


Figure 10. a) Evolution des investissements dans les nanotechnologies depuis 2001. b) Répartition des investissements sur l'année 2017 (*National Nanotechnology Initiative, US*).

De par leurs propriétés spécifiques, les nanotechnologies concernent l'ensemble des secteurs industriels allant des techniques de communication à la santé en passant par l'environnement, l'énergie, l'agro-alimentaire et les matériaux pour le transport, la construction et l'électronique (Figure 11). Elles peuvent être regroupées en trois domaines principaux : (i) les nanomatériaux (34 %), (ii) la pharmaceutique (18 %) et (iii) l'électronique (30 %).

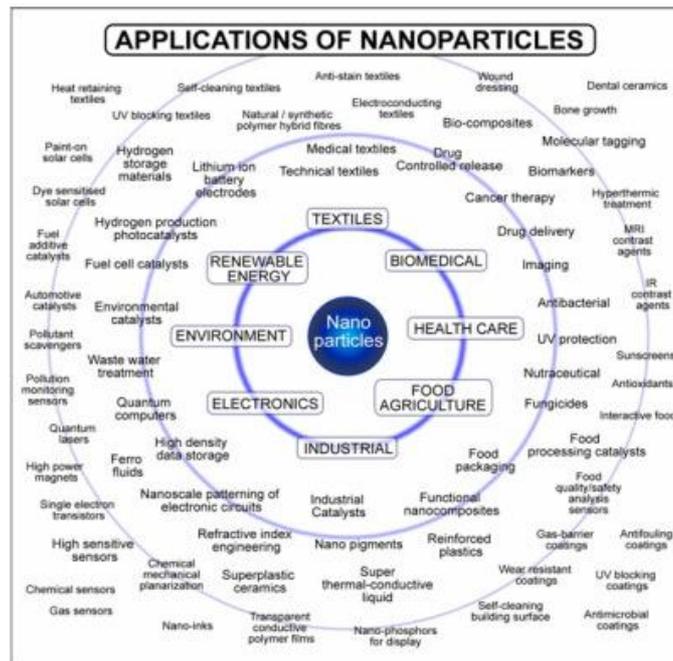


Figure 11. Domaines d'applications des NPs (*nanowerk.com*).

A l'heure actuelle, près de 2000 produits intégrant des nanotechnologies sont commercialisés [39]. Citons, par exemple, parmi les domaines concernés :

- le nanotextile : les NPs peuvent rendre la surface auto-nettoyante, imperméable ou encore anti-bactérienne et anti-odeur (chaussettes incorporant des NPs d'argent) ;
- la nanocosmétique : les crèmes solaires sans traces blanches (NPs de dioxyde de titane), les crèmes anti-sécheresse et rugosité (NPs de dioxyde de silicium) ;
- les nanomatériaux : les nanotubes de carbone confèrent une haute résistance et une plus grande légèreté à certains équipements (raquettes de tennis, automobiles...) ;
- la nanosanté : les NPs sont utilisées comme agents de contraste pour l'imagerie médicale (IRM) et même, bien que la recherche en soit à ses prémises, en tant que médicaments (thérapie cancéreuse, société Nanobiotix : [www.nanobiotix.com](http://www.nanobiotix.com)).

Les nanosciences dans les domaines de la physique et de la chimie ont permis de développer des outils applicables aux systèmes biologiques, donnant ainsi naissance à la nanobiotechnologie, indispensable à l'émergence de la nanomédecine. Les biopuces et les biocapteurs, d'une part, les NPs fonctionnalisées d'autre part, font l'objet de nombreuses recherches afin (i) d'analyser à la plus petite échelle les constituants biologiques mais également (ii) de les marquer et de les sonder à des fins médicales. Nous développerons ci-après ces deux points d'intérêt pour notre étude future : (i) les nanomatériaux pour les capteurs et (ii) les NPs interagissant avec les systèmes biologiques.

### **1.2.2 Les NPs, des outils précieux pour les biocapteurs**

Les NPs participent, de par leurs propriétés spécifiques, non seulement (i) à l'émergence de nouvelles techniques de reconnaissance biologique mais également (ii) à la conception de nouvelles méthodes de transduction pour des biocapteurs. Dans ce contexte, les nanotechnologies pourraient notamment aider à la réduction des rapports signal sur bruit, à la diminution des temps de réponse et à la miniaturisation des systèmes. Bien que la recherche en soit à ses débuts, les NPs ont déjà été utilisées dans le cadre de biocapteurs pour la détection de molécules d'intérêt biologique, *i.e.* certains ions métalliques, des acides nucléiques et des protéines incluant des enzymes [40]. Concernant la détection d'agents pathogènes, les efforts se concentrent sur certaines propriétés des NPs, notamment optiques, magnétiques et électrocatalytiques [41,42].

### 1.2.2.1 Les biocapteurs basés sur les propriétés optiques des NPs

Dans le cadre de biocapteurs basés sur la SPR, l'utilisation de NPs d'or, possédant à l'échelle nanométrique des propriétés plasmoniques particulières, permet de détecter de très faibles variations d'indice de réfraction à l'interface métal / diélectrique dues à l'interaction avec l'analyte [43]. En effet, le spectre SPR des NPs métalliques se caractérise par la présence de pics intenses d'absorption, menant à une amplification significative de la détection. Joung *et al.* ont ainsi pu diminuer la limite de détection de *E. coli* d'un facteur 5500 en comparaison d'un biocapteur SPR, intégrant des acides nucléiques comme biorécepteur mais dépourvus de NPs [44].

Plus généralement, de nombreux biocapteurs reposent également sur la fluorescence émise par certaines NPs. A l'inverse des fluorophores classiques possédant une photostabilité limitée et une émission de faible intensité, les *quantum dots* (QD - NPs constituées d'un matériau semi-conducteur) sont stables et possèdent des spectres d'émission de fluorescence qu'il est possible d'adapter selon leurs taille et composition [45]. Aussi, bien que peu utilisés, ont-ils montré leur efficacité dans la détection multiple de pathogènes, et ce avec des sensibilités élevées. En effet, il est possible de greffer en surface des QD de taille et/ou composition différentes des biorécepteurs spécifiques afin de cibler diverses molécules au sein d'un même échantillon [46]. Les fluorophores classiques (par exemple, l'isothiocyanate de fluorescéine, FITC) restent, malgré tout, plus répandus dans leur usage au sein de biocapteurs. Lors de la reconnaissance de l'évènement biologique, en raison du très grand nombre de fluorophores greffés ou encapsulés au sein des NPs, une amplification du signal optique est obtenue, garantissant une meilleure sensibilité du biocapteur, pouvant atteindre quelques CFU/mL [47]. De nombreuses souches bactériennes (*E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* ...) ont ainsi été détectées par l'intermédiaire de NPs de silice fonctionnalisées par le FITC, par microscopie et immunocapteurs [48,49]. Par ailleurs, en couplant différentes NPs et différents fluorophores il est également possible d'effectuer une détection multiple. Wang *et al.* ont ainsi (i) ajusté la quantité de fluorophores encapsulés au sein de NPs de silice afin qu'elles émettent à des longueurs d'onde différentes et (ii) fonctionnalisé ces dernières avec trois types d'Ac spécifiques aux bactéries ciblées afin de réaliser une détection complexe et multiple au sein d'un même échantillon [50].

### 1.2.2.2 Les biocapteurs basés sur les propriétés magnétiques des NPs

Certaines NPs, notamment celles d'oxydes de fer ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), judicieusement modifiées en surface, possèdent des propriétés magnétiques qui leur permettent d'identifier, de concentrer et de séparer une souche bactérienne ciblée au sein d'un analyte. Les étapes de concentration et de séparation des bactéries, par des NPs

magnétiques couplées à des Ac spécifiques, peuvent être réalisées en amont (au sein de l'analyte) [51] ou pendant [52] la détection par application d'un champ magnétique. Dans ces deux études, des limites de détection allant de 1 à  $10^3$  CFU/mL ont été atteintes. L'atout majeur de cette méthode réside dans la possibilité non seulement de détecter les bactéries mais également de décontaminer le milieu hôte. Les propriétés magnétiques des NPs peuvent également être couplées à leurs propriétés optiques [49,50] et électriques [55] au travers de particules hybrides (*core shell* NPs), garantissant des méthodes de détection variées et d'autant plus efficaces (Figure 12).

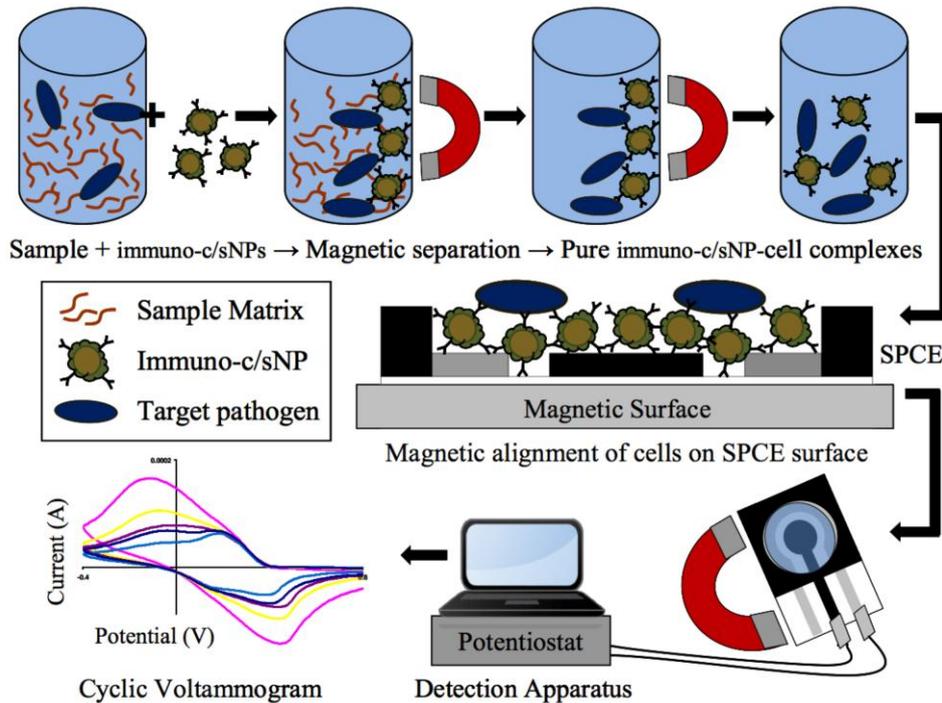


Figure 12. Principe de la séparation immunomagnétique de bactéries ciblées au sein d'un échantillon complexe. Alignement magnétique des dites cibles sur une électrode de travail (*screen printed carbon electrode*, SPCE), garantissant la détection future par un transducteur électrochimique [55].

### 1.2.2.3 Les biocapteurs basés sur les propriétés chimiques des NPs

Les propriétés électroniques et l'activité électrocatalytique de certaines NPs sont des atouts particulièrement intéressants dans leur intégration au sein de biocapteurs électrochimiques. Deux applications des NPs sont envisagées : (i) la conception de nouveaux transducteurs et (ii) le *design* d'outils directs pour la reconnaissance biologique [56]. Dans le premier cas, la surface spécifique développée par les NPs étant très importante, l'immobilisation d'un biorécepteur y est accrue, et donc la détection plus sensible. Par exemple, l'intégration de NPs d'or au sein d'un immunocapteur a permis d'amplifier la détection de *E. coli* d'un facteur 13 en comparaison du capteur classique utilisant une méthode « sandwich » avec un Ac fixant la bactérie au transducteur et un second Ac couplé à une enzyme garantissant le signal électrochimique de détection [57]. Dans le second cas, les NPs jouent le rôle de

« marqueurs », dans le sens où elles se lient directement, dans le milieu, aux bactéries ciblées, cette liaison engendrant selon les méthodes, des signaux de détection divers. Des NPs d'or fonctionnalisées par des brins d'ADN spécifiques ont notamment été utilisées pour détecter l'hybridation avec le brin d'ADN d'une bactérie ciblée [58]. Ce processus biologique, dans certaines conditions, entraîne la dissolution de la NP en ions métalliques, phénomène suivi par la voltamétrie à redissolution anodique. A chaque événement de reconnaissance un grand nombre d'ions est produit, garantissant l'amplification du signal de détection. De plus, des protocoles liant les propriétés de NPs (non métalliques) à celles d'enzymes dont l'activité dépend de la présence des molécules ciblées, ont également permis une détection sensible de *E. coli* et *S. aureus* [59].

#### 1.2.2.4 Les nanobiocapteurs gravimétriques

L'intégration de NPs au sein de biocapteurs gravimétriques, de type QCM, constitue un « amplificateur de masse ». La masse déposée étant linéairement liée aux variations de fréquence observées dans ce cadre, une amplification du signal de détection est ainsi réalisée. La surface spécifique développée par les NPs garantit également une immobilisation accrue des biorécepteurs et donc une meilleure sensibilité du biocapteur. Des NPs d'or et d'oxyde de fer ont ainsi été intégrées au sein d'immunocapteurs pour la détection de *E. coli*, avec des seuils limites de  $10^2$ - $10^3$  CFU/mL [60,61].

### 1.2.3 Les interactions entre NPs et cellules

Outre leurs applications dans le développement de biocapteurs, les NPs suscitent un vif intérêt en recherche biomédicale. Leur taille leur facilite, en effet, l'accès aux systèmes biologiques (cellules humaines, bactéries, virus...) qui, selon les besoins, peuvent être identifiés, ciblés, détectés voire éliminés. Nous verrons donc, ci-après, l'intérêt des NPs en nanomédecine mais également les dangers inhérents à leur potentielle utilisation.

#### 1.2.3.1 Les NPs, la médecine de demain?

La nanomédecine peut être définie comme l'utilisation d'outils nanométriques dans le but de diagnostiquer, prévenir et traiter certaines pathologies. Les travaux actuels n'en sont qu'à leurs prémises, au stade de la recherche et non du développement *in-vivo* [33]. Toutefois, des résultats prometteurs se dessinent, reposant sur les principes décrits ci-dessous de façon non exhaustive. Trois domaines sont concernés :

- le diagnostic, *i.e.* le développement d'outils extérieurs à l'homme permettant notamment la détection précoce et précise d'une pathologie (cf. section précédente pour la détection de maladies bactériennes) ;
- le développement d'outils d'imagerie permettant le suivi en temps réel de cellules ciblées ;

- le développement de biomatériaux permettant, (i) la vectorisation ciblée de médicament (notamment au sein de cellules tumorales) et (ii) l'ingénierie tissulaire, *i.e.* la médecine régénérative [62].

Dans un cadre thérapeutique, contrairement aux agents classiques (radiothérapie, chimiothérapie), les NPs permettraient la délivrance d'un principe actif en ciblant précisément les tissus ou les cellules malades, sans affecter les tissus ou les cellules sains. Pour ce faire, ces vecteurs doivent être biocompatibles et s'adapter aux paramètres bio-physicochimiques des divers éléments rencontrés, notamment les membranes cellulaires, lors de leur internalisation. La taille, la forme, la composition et la fonctionnalisation des NPs influent sur la vectorisation du médicament et sur l'interaction avec les entités biologiques. Moore *et al.* ont présenté une revue sur les différentes NPs étudiées dans cette optique, en soulignant (i) l'efficacité de certaines NPs à délivrer spécifiquement un médicament grâce au ciblage de biomarqueurs spécifiques des entités biologiques non saines, (ii) la capacité d'autres NPs à suivre la voie et la cinétique de distribution du médicament [63]. Des nanocapsules lipidiques ou polymériques permettent aujourd'hui de traverser les barrières tissulaires et cellulaires du cerveau et du système nerveux central, montrant leur intérêt dans les thérapies de maladies neurodégénératives [64,65]. Elles permettent également de cibler les cellules tumorales [66].

Outre leur capacité en tant que vecteurs thérapeutiques, certaines NPs possèdent des propriétés spécifiques, optiques et magnétiques notamment (cf. section 1.2.1.1), utiles en bio-imagerie. Aussi, des NPs multifonctionnelles sont-elles envisagées dans le cadre de la théranostique, contraction de thérapie et diagnostic (Figure 13) [67]. Cela consiste à cartographier, au sein d'un organisme, les cellules tumorales, et à en analyser l'activité par nano-imagerie afin de déterminer la thérapie la plus adaptée.

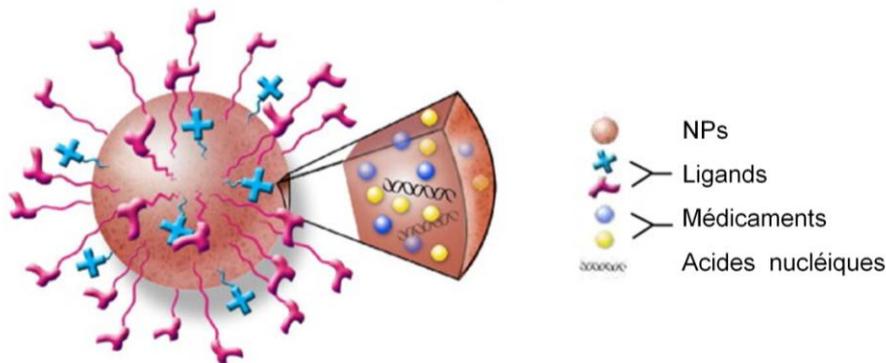


Figure 13. Schéma d'un nano-objet multifonctionnel envisageable en nanomédecine [64]. Les propriétés de la NP et des ligands garantissent la biocompatibilité du système et son internalisation au sein des cellules. Le principe actif à délivrer peut être greffé au système ou encapsulé, et sera délivré spécifiquement à la cible sous l'effet d'une action externe (laser par exemple) ou interne (décomposition du système au contact de certaines molécules, changement du pH). Ce nanomatériau peut être modulé à souhait selon les applications visées, notamment la théranostique.

### 1.2.3.2 Les NPs, un danger pour l'environnement et l'Homme ?

Les raisons même pour lesquelles les NPs suscitent un si grand engouement conduisent aujourd'hui les autorités et les citoyens à se questionner sur leur potentiel danger vis-à-vis de nos écosystèmes et de notre santé. De précédents scandales sanitaires, comme celui de l'amiante dans les années 1990, poussent les chercheurs à respecter le principe de précaution. La grande réactivité des NPs et leur petite taille leur permettent de s'associer aux entités biologiques et d'en franchir les barrières. L'attrait que ces propriétés présentent notamment pour la nanomédecine va de pair avec les risques engendrés par l'usage de NPs dont les caractéristiques et l'innocuité ne sont pas parfaitement établies. Les NPs peuvent, en interagissant avec les systèmes biologiques, interférer avec leur métabolisme et altérer leur fonctionnement. Pour une revue exhaustive des phénomènes de cytotoxicité liés aux NPs, le lecteur pourra se référer à [31,68].

#### Voies d'entrée des NPs

Les voies d'accès des NPs dans notre organisme sont présentées en Figure 14.

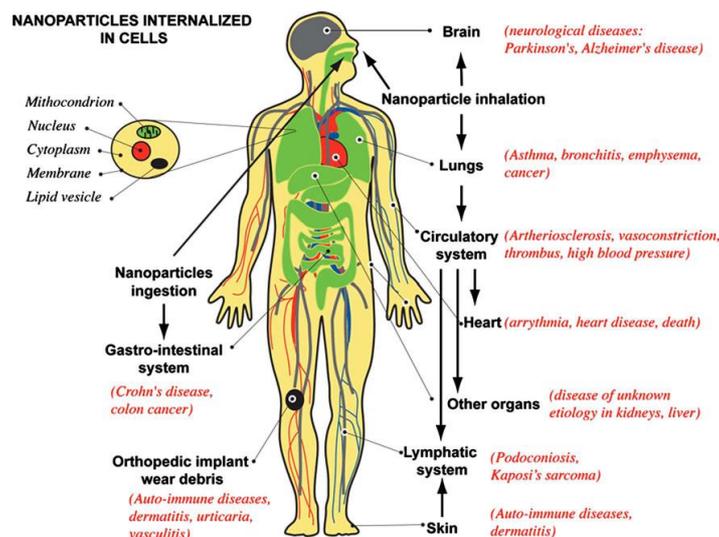


Figure 14. Voies d'internalisation des NPs au sein de notre organisme [31].

Parmi elles, on distingue les voies :

- par inhalation - Les NPs libérées dans l'air peuvent pénétrer dans notre organisme par les voies respiratoires. Les poumons sont une porte d'entrée et un site d'accumulation privilégiés des NPs. Comme toute pollution particulaire, des inflammations chroniques (type asthme, pneumonie) et des cancers dans les pires scénarii peuvent alors se déclarer. De plus, par translocation dans le système sanguin, les NPs peuvent migrer vers divers organes (cœur, cerveau, foie...).
- par ingestion - Les NPs sont aujourd'hui autorisées dans l'industrie alimentaire en tant qu'additifs. Elles se retrouvent ainsi dans le système digestif. Bien que les

parois intestinales, très épaisses, soient des barrières efficaces, les NPs peuvent y pénétrer et être distribuées notamment vers l'estomac, le foie, les reins.

- par voie cutanée - Nombre de cosmétiques, en particulier les crèmes, utilisent des NPs. Le contact est donc direct avec la peau. Toutefois cette voie cutanée est peu privilégiée car la peau, sous réserve qu'elle ne soit pas abimée, est un rempart efficace de quelques millimètres à la pénétration de ces NPs.

## Mécanismes de toxicité des NPs

Une fois dans l'environnement biologique, les NPs peuvent se révéler toxiques vis-à-vis des cellules. Cette toxicité ne nécessite pas forcément la translocation de la NP au sein de la cellule. Les NPs, au contact de l'eau ou de l'oxygène du milieu environnant, peuvent conduire à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*). Les ROS peuvent conduire à des dommages cellulaires irréversibles. Les NPs peuvent donc, ainsi, présenter une toxicité due à la production de ROS.

Toutefois, la toxicité des NPs serait principalement due à leur capacité à traverser les barrières cellulaires. La membrane cellulaire est constituée de lipides, organisés en bicouche, et de protéines assurant les échanges et l'équilibre entre les milieux extra- et intracellulaires. Cette membrane peut s'adapter au passage de matériels, parfois désirables (processus biologiques, nanomédecine) ou indésirables, par des mécanismes actifs d'endocytose : elle s'invagine, accueille ainsi le matériel au sein d'une vésicule qui est finalement internalisée dans le cytoplasme (Figure 15). De plus, les NPs en adhérant aux cellules peuvent pénétrer dans le milieu intracellulaire par diffusion passive. Ce mécanisme suggère la formation de défauts locaux, temporaires ou définitifs, au sein de la membrane. Une fois dans la cellule, les NPs peuvent être transportées vers divers organites et avoir des effets secondaires délétères pour la cellule. Elles peuvent également être dégradées ou même expulsées par un mécanisme d'exocytose.

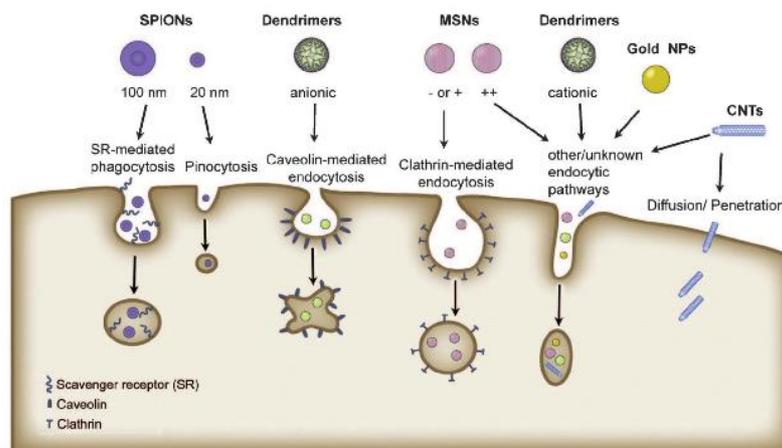


Figure 15. Mécanismes de translocation des NPs au travers des membranes cellulaires. Différents scénarii sont possibles, de la simple diffusion à des processus plus complexes médiés par différentes familles de protéines [67].

Certains de ces mécanismes de toxicité peuvent également s'appliquer aux cellules bactériennes et seront détaillés, pour les plus courants, en section 1.3.1.1 .

Les NPs carbonées, métalliques, d'oxydes métalliques et semi-conductrices ont déjà montré leur intérêt dans nombre d'applications mais leurs études ont également montré les dangers qu'elles pouvaient présenter [69,70]. Toutefois, jusqu'alors, aucune maladie n'a été attribuée directement aux NPs, un grand nombre de facteurs indissociables entrant en jeu, tels la pollution, le tabagisme, l'alimentation et les caractéristiques propres au patient (âge, terrain génétique).

### **1.2.3.3 L'influence de facteurs multiples sur l'interaction NP - cellule**

La toxicité ou l'innocuité des NPs vis-à-vis des cellules dépend fortement d'un grand nombre de paramètres, dont les principaux sont décrits ci-dessous.

#### **La nature des cellules**

Selon qu'il s'agisse d'une cellule humaine ou bactérienne, d'une cellule saine ou tumorale, l'interaction avec les NPs n'est pas la même car les constituants biologiques auxquels elles font face sont différents. Par exemple, certaines NPs peuvent présenter un caractère inerte vis-à-vis de cellules humaines alors qu'elles sont toxiques pour les bactéries ; cette propriété peut être exploitée dans le cadre du développement de revêtements antibactériens. De même, les biomarqueurs spécifiques des cellules tumorales, et absents chez les cellules saines, sont exploités pour la vectorisation spécifique de nanomédicaments.

#### **La nature des NPs**

Selon la composition et la structure chimique des NPs, certains mécanismes de toxicité sont favorisés ou non, notamment la production de ROS et la liaison avec certaines entités biologiques sous l'effet d'un stimulus externe (par exemple une source de lumière). A nature chimique donnée, deux caractéristiques des NPs semblent jouer un rôle prépondérant dans leurs interactions avec les cellules [71,72] :

- la taille des NPs - Il est généralement accepté que plus une NP est petite, plus la toxicité est importante. Un diamètre de 50 nm a été évoqué comme étant optimal pour l'internalisation des NPs (or, semi-conducteur, silice) au sein de cellules HeLa [73–75], cette taille étant proche de celles des vésicules formées lors de l'entrée d'un virus dans une cellule. D'autres études, notamment menées sur des modèles membranaires de type bicouches lipidiques, montrent que des NPs de plus faible diamètre (du nanomètre à la dizaine de nanomètres) peuvent engendrer des dommages irréversibles, tels la formation de pores au sein de la membrane (Figure 16) [76,77]. De plus, dans un environnement biologique, la taille des NPs nues est affectée par la présence d'un certain nombre de

biomolécules, essentiellement des protéines, qui constituent une couronne autour d'elles [78], affectant leur taille, leur forme, leur agrégation et donc leur « identité » pour l'environnement qui les accueille . Cette couronne modifie donc, en conditions biologiques réelles, les interactions NPs - cellules.

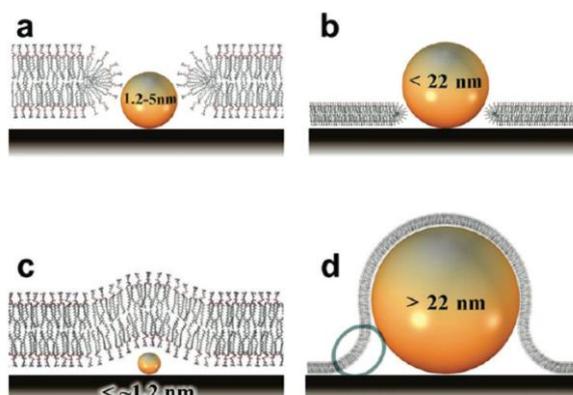


Figure 16. Influence de la taille de NPs de silice sur leur interaction avec une bicouche lipidique de DMPC [79]. La bicouche forme un pore autour de la NP lorsque celle-ci a un diamètre compris entre 1,2 nm et 22 nm (a-b). A l'inverse, elle s'adapte à la forme de la NP, voire l'enveloppe, lorsque celle-ci présente un diamètre inférieur à 1,2 nm ou supérieur à 22 nm (c-d).

- la charge des NPs - La charge des NPs, liée ou non à leur fonctionnalisation, influe fortement sur les interactions avec les membranes cellulaires, elles-mêmes chargées. Les NPs chargées positivement sont internalisées plus efficacement que celles qui sont neutres ou chargées négativement, en raison de leur affinité avec les membranes lipidiques [80,81]. L'internalisation au sein de cellules des NPs négatives et positives par les cellules varie également avec leur chimie de surface montrant ainsi la complexité de l'interaction entre les deux systèmes [82-84].

Par ailleurs, les NPs dont le rapport d'aspect (longueur / largeur) est important présentent une toxicité accrue [85]. C'est le cas notamment des nanotubes de carbone. De même, la fonctionnalisation surfacique des NPs, affectant leurs charge et leur taille, contribue à une interaction privilégiée ou non avec certains marqueurs biologiques. A l'origine inoffensives, certaines NPs peuvent ainsi devenir toxiques et inversement [86].

Enfin, lorsqu'il s'agit d'étudier la toxicologie d'un agent, le paramètre de dose ou concentration est souvent évoqué [87]. En ce qui concerne les NPs, des résultats contradictoires sur une toxicité dose-dépendante peuvent être trouvés dans la littérature. La difficulté à comparer de telles études réside dans le fait que les NPs présentent des propriétés d'agrégation différentes selon l'environnement dans le quel elles évoluent, ainsi que des tailles, charges et compositions diverses. Oberdörster *et al.* soulignent le fait qu'il s'agit moins d'une influence de la dose en terme de masse de NPs, que d'un effet de dose en termes de surface spécifique développée [88]. Ainsi, il est impossible de déterminer une dose létale commune à l'ensemble des NPs.

## 1.3 Problématique de l'étude

### 1.3.1 Objectifs de la thèse

Les nanomatériaux représentent la révolution technologique de demain dans des domaines aussi variés que les équipements militaires, les communications ou les dispositifs biomédicaux. Cette révolution nécessite toutefois la maîtrise de leurs interactions avec les systèmes biologiques, attendues ou inattendues, non seulement pour cibler leurs applications mais également pour contrôler leurs effets néfastes potentiels. Toutefois, à ce jour, un trop grand nombre de NPs existe (nature, taille, forme...) pour qu'une réponse unique puisse être apportée aux applications technologiques et/ou aux problèmes qu'elles peuvent présenter [68]. Ainsi, ce projet de thèse s'intéresse, dans une approche systématique, à l'étude fondamentale du pouvoir bactéricide potentiel de NPs de silice ( $\text{SiO}_2$ -NPs) vis-à-vis de *E. coli* et *B. subtilis* et à l'élaboration, issue de cette analyse, d'un biocapteur pour la détection, voire l'élimination, de bactéries *E. coli* ciblées.

#### 1.3.1.1 Maîtriser l'interaction NPs – bactéries

##### Intérêts de cette étude

Dans le contexte de cette thèse, il s'agit de s'assurer de la maîtrise complète de l'élaboration d'un biocapteur, le signal de détection ne devant s'appliquer qu'à des bactéries vivantes et non mortes. Aussi, l'aspect appliqué de cette thèse nécessite-t-il une étude plus fondamentale, en amont, concernant l'interaction entre bactéries et NPs, celles-ci devant être inertes pour l'étape de détection. Cette étude s'attache donc à déterminer l'influence de la taille et de la charge de  $\text{SiO}_2$ -NPs sur leur caractère inerte ou toxique vis-à-vis de bactéries *E. coli* et *B. subtilis*. Les NPs les plus inoffensives seront, par la suite, intégrées dans le biocapteur tandis que les NPs toxiques serviront, si besoin, à l'élimination des bactéries ainsi détectées.

Outre l'implication dans ces travaux de recherche, cet aspect fondamental pourrait également aider, à l'instar de modèles membranaires, à la compréhension des mécanismes d'interaction et de cytotoxicité des NPs vis-à-vis des bactéries. Connaissant la pathogénicité de certaines souches et leur résistance à certains antibiotiques, la mise en place d'outils bactéricides nouveaux est envisageable avec les nanotechnologies. La DGA, co-financeur de cette thèse, est tout particulièrement intéressée par l'intégration de NPs au sein de textiles intelligents antibactériens pour l'équipement futur du soldat [89,90]. Concernant des pathologies graves associées à une infection bactérienne, les recherches médicales basées sur les NPs en sont encore à leurs prémises. En revanche, à une échelle plus courante, des NPs d'argent sont déjà intégrées au sein de pansements pour lutter contre les infections bactériennes. Enfin, les bactéries sont des organismes vivants, plus proches donc de la réalité biologique que les modèles membranaires simplifiés, type mono- ou bicouches lipidiques couramment

utilisés dans des études de toxicité des NPs. La compréhension de ces mécanismes d'interaction avec diverses cellules (eucaryotes ou procaryotes) est indispensable pour une utilisation sans risque et le développement d'applications, notamment biomédicales.

### Activité antibactérienne avérée de certaines NPs

La majorité des études de toxicité s'est portée, jusqu'à présent, sur les implications des NPs sur la santé de l'Homme tant d'un point de vue bénéfique que délétère. La libération des NPs dans les airs, les eaux et les sols, due à leur production et leur utilisation accrues dans l'industrie, conduit les chercheurs à examiner également leur impact sur l'environnement [91,92], notamment sur la population bactérienne qui y est omniprésente.

Tout comme chez les cellules eucaryotes, les mécanismes de toxicité des NPs sur les cellules bactériennes peuvent nécessiter leur pénétration au sein de l'organisme [93]. Toutefois, nombre d'études présentent des résultats contradictoires, la majorité n'évoquant pas une telle internalisation mais des dommages cellulaires associés à la présence et l'action des NPs au voisinage ou au contact de la bactérie. En effet, deux mécanismes principaux sont envisagés pour l'activité antibactérienne des NPs :

- la production de ROS [94]. Certaines NPs d'oxydes métalliques (ZnO, TiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub>...) présentent une activité antibactérienne en raison du stress oxydant qu'elles engendrent en interagissant avec la cellule. Li *et al.* ont montré une bonne corrélation entre la production de ROS due à une exposition aux UV et le taux de survie de *E. coli* traitées par de telles NPs [95]. Toutefois, ce mécanisme ne nécessite pas forcément l'illumination par UV [96]. La production de ROS mène à des dommages irréversibles dus à l'oxydation et la dégradation subséquente de la membrane.
- la dissolution des NPs conduisant à la présence d'ions susceptibles d'interférer avec le métabolisme bactérien. Ce mécanisme a notamment été privilégié pour la toxicité des NPs d'argent : Xiu *et al.* l'ont démontré en prévenant l'oxydation de Ag(0) et sa dissolution en Ag<sup>+</sup>, dans un milieu anaérobie [97]. De plus, les NPs d'oxydes métalliques, tels ZnO et CuO, peuvent également présenter une cytotoxicité due à leur dissolution et à la libération d'ions Zn<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup> respectivement [98].

Par ailleurs, les NPs peuvent, au contact de la bactérie, créer des défauts surfaciques menant à l'altération de l'intégrité membranaire et conduisant, à terme, à la fuite des composants intracellulaires et donc à la lyse bactérienne [99]. Quel que soit le mécanisme d'interaction, les facteurs tels que la taille et la charge des NPs, précédemment présentés, ont un rôle majeur dans l'action potentiellement antibactérienne d'une NP de nature donnée.

### 1.3.1.2 Développer un biocapteur pour la détection de *E. coli*

Une fois les interactions entre les NPs et les bactéries étudiées, cette thèse vise à concevoir un biocapteur pour la détection d'*E. coli* intégrant les SiO<sub>2</sub>-NPs jugées inoffensives. Dans un souci de simplicité et de rapidité du système, la détection directe de la bactérie a été privilégiée, l'approche indirecte consistant à détecter son ADN ou certaines enzymes étant trop fastidieuse à mettre en œuvre expérimentalement pour un but appliqué.

Les différents biocapteurs, précédemment présentés, ont déjà fait l'objet de recherches dans le but de détecter diverses bactéries, dont *E. coli* (Tableau 2). Les limites de détection ainsi atteintes sont similaires, voire largement inférieures, à celles obtenues par des méthodes conventionnelles, pour des temps considérablement réduits.

Tableau 2. Présentation des limites de détection (LOD) et des temps de détection de quelques biocapteurs pour la détection d'*E. coli*, intégrant ou non des NPs.

Transducteur	LOD (CFU/mL)	Temps (min)	NPs	Réf.
Optique	3	75	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub>	[53]
	180		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub>	[100]
	10 <sup>2</sup>		Non	[101]
Gravimétrique	2 x 10 <sup>3</sup>		Au	[102]
	2.7 x 10 <sup>2</sup>		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[61]
Electrochimique	6	60	Polyaniline-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[55]
	7.4 x 10 <sup>4</sup>	35	Magnétiques	[103]
	50		Magnétiques	[104]
	10 <sup>2</sup>		Non	[105]

Dans ce contexte, le transducteur électrochimique est privilégié pour cette thèse. Cette méthode offre une simplicité d'utilisation, une voie à la portabilité et la miniaturisation du système développé, un coût faible, une durée de détection rapide (quelques minutes à quelques heures) et une grande sensibilité [106,107]. Les biocapteurs ampérométriques sont plus particulièrement attrayants en raison de leur large gamme de travail<sup>2</sup> et de leur haute sensibilité. Il s'agit d'appliquer un potentiel constant et de mesurer le courant associé à la réduction ou l'oxydation d'une espèce électroactive impliquée dans le processus de reconnaissance biologique. Les variations de courant permettront donc de quantifier la quantité de *E. coli* détectée. Des transducteurs optique et gravimétrique auraient également pu être envisagés pour notre étude. Toutefois, des études passées, s'appuyant ou non sur la présence de NPs pour la détection de microorganismes, ont montré des limites de détection similaires à celles obtenues par électrochimie. De plus, les capteurs optiques nécessitent, pour certains,

<sup>2</sup> La gamme de travail est définie comme la gamme de concentration en analyte que le biocapteur est en capacité de détecter (i) sans saturer pour la limite haute et (ii) différentiable du bruit de fond pour la limite basse.

l'ajout d'un fluorophore, tandis que les capteurs gravimétriques requièrent l'usage d'un matériau défini (ex : quartz) : la liberté de mise en œuvre est donc plus limitée que les capteurs électrochimiques.

## 1.3.2 Choix des modèles

### 1.3.2.1 *E. coli* et *B. subtilis*

Des études de toxicologie sur des échantillons naturels de bactéries, bien que préférables pour leur pertinence environnementale, sont difficiles à interpréter, une multitude d'interactions et de facteurs propres aux différents systèmes présents entrant en jeu. Aussi des bactéries modèles sont-elles étudiées pour déterminer précisément les mécanismes de leurs interactions avec les NPs.

Dans ce cadre, nous avons choisi d'étudier deux bactéries modèles, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, déjà utilisées dans des études fondamentales de caractérisation [108] mais également des études appliquées aux biocapteurs [109]. *E. coli* est une bactérie à Gram négatif, *i.e.* elle possède outre la membrane plasmique et une couche de peptidoglycane, classiques, une membrane externe en contact avec le milieu extérieur. Cette structure fera l'objet d'une attention toute particulière au cours de ces travaux, étant impliquée dans des processus de résistance à des stress externes. *B. subtilis* est une bactérie à Gram positif, qui ne possède donc pas de membrane externe. Elle servira de système comparatif dans l'étude sur l'interaction avec les NPs.

### 1.3.2.2 Les NPs de silice

La silice, quelque soit sa forme, est utilisée dans un grand nombre d'applications industrielles ou de la vie quotidienne (alimentation et cosmétique principalement). Sous réserve d'un usage répondant aux critères actuels d'hygiène et sécurité, elle n'a jusqu'alors été associée à aucune maladie. En effet, les SiO<sub>2</sub>-NPs ne présentent pas de toxicité avérée vis-à-vis des cellules humaines, celles-ci étant libérées par des mécanismes d'excrétion lorsque bioaccumulées [110]. De plus, pour leur faible toxicité envers les cellules eucaryotes, leur biocompatibilité, leurs caractéristiques (taille, forme et porosité) contrôlables et leur état de surface facilement fonctionnalisable, les SiO<sub>2</sub>-NPs sont des candidats prometteurs pour l'imagerie médicale, la vectorisation de médicament et les outils de diagnostic [111,112].

Par ailleurs, l'utilisation de SiO<sub>2</sub>-NPs est également envisagée pour la détection de bactéries [113] et leur activité antibactérienne [114]. Toutefois, ces applications requièrent une fonctionnalisation des SiO<sub>2</sub>-NPs nues par d'autres systèmes permettant l'action désirée. Malgré ces atouts, de telles NPs n'ont été que peu étudiées, nues, en interaction avec des bactéries, cellules morphologiquement, structurellement et moléculairement différentes des cellules eucaryotes. Leur activité antibactérienne a été reportée envers différentes souches bactériennes incluant *E. coli* et *B. subtilis* [115,116]. Toutefois, d'autres études suggèrent leur caractère inoffensif vis-à-vis des bactéries. Ces

résultats contradictoires de la littérature pourraient être expliqués par des paramètres d'études très différents : taille, charge, chimie de surface, concentration, temps d'exposition... Notre étude s'est donc intéressée à une approche systématique de cette interaction SiO<sub>2</sub>-NPs / bactéries pour des paramètres donnés. Fruijtier-Polloth fait état, dans une revue détaillée, des intérêts technologiques présentées par les SiO<sub>2</sub>-NPs tout en soulignant les mécanismes de leur toxicité potentielle envers divers systèmes biologiques [110].

Enfin, les mécanismes d'interaction de ces NPs avec des modèles membranaires simplifiés (mono- et bicouches lipidiques) ont été étudiés par Faye *et al.* au sein de l'équipe Biophyna du LOMA. Cette étude a montré l'innocuité de NPs de taille importante (100 nm) et les dommages engendrés (réorganisation lipidique) par des NPs de plus faible diamètre (4 - 10 nm) [117]. Suite à ces premiers travaux, nous avons souhaité étudier, dans une approche systématique, l'effet de SiO<sub>2</sub>-NPs de taille, charge et concentration contrôlées sur des systèmes vivants, les bactéries.

---

En résumé, ce chapitre introductif souligne l'omniprésence, dans notre vie quotidienne, des bactéries et des NPs. Ces deux systèmes, selon leur nature et leurs propriétés intrinsèques, peuvent être bénéfiques ou toxiques pour l'Homme et l'environnement. Dans un contexte de pathogénicité bactérienne, les NPs offrent des perspectives nouvelles en termes de détection (rapide, sensible et portable) et de décontamination (activité antibactérienne).

Dans ce contexte, cette thèse a pour objectif d'étudier l'interaction de NPs de silice avec des bactéries *B. subtilis* et *E. coli* afin d'élaborer un biocapteur pour la détection de ces dernières, basé sur une méthode d'amplification par des NPs. Le chapitre 2 de ce manuscrit sera consacré à la description des outils et méthodes de caractérisation de ces bio-nano-mondes. Il présentera essentiellement la microscopie à force atomique, technique privilégiée pour cette thèse, ainsi que les procédés de synthèse des NPs, les protocoles de préparation des échantillons bactériens et les notions nécessaires à la conception du biocapteur. Un troisième chapitre présentera les acteurs de l'interaction NPs / bactéries. La caractérisation détaillée des NPs de silice ainsi que des bactéries *E. coli* et *B. subtilis* permettront de définir les « contrôles » avant la mise en interaction des systèmes. Cette interaction sera étudiée au cours du chapitre quatre qui mettra en évidence l'influence de la taille et la charge des NPs sur leur activité potentiellement antibactérienne. Le rôle de la membrane externe, présente ou absente chez certaines bactéries, sera également souligné au cours de ce chapitre. Enfin l'étude appliquée concernant la conception d'un biocapteur électrochimique pour la détection d'*E. coli* fera l'objet d'un cinquième chapitre. L'architecture optimisée du biocapteur sera décrite ainsi que l'apport des NPs pour la sensibilité et la rapidité du système conçu.

## Bibliographie

- [1] Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. Seventh Edition. McGraw-Hill Higher Education, 2008; 2008.
- [2] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915–20.
- [3] Das N, Chandran P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnol Res Int* 2011;2011:1–13. doi:10.4061/2011/941810.
- [4] Scannapieco FA. Role of Oral Bacteria in Respiratory Infection. *J Periodontol* 1999;70:793–802. doi:10.1902/jop.1999.70.7.793.
- [5] Van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14:327–35.
- [6] Chemburu S, Wilkins E, Abdel-Hamid I. Detection of pathogenic bacteria in food samples using highly-dispersed carbon particles. *Biosens Bioelectron* 2005;21:491–9. doi:10.1016/j.bios.2004.11.025.
- [7] Lazcka O, Campo FJD, Muñoz FX. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron* 2007;22:1205–17. doi:10.1016/j.bios.2006.06.036.
- [8] Ayçiçek H, Aydoğan H, Küçükaraaslan A, Baysallar M, Başustaoğlu AC. Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. *Food Control* 2004;15:253–9. doi:10.1016/S0956-7135(03)00064-1.
- [9] Jeong SK, Gang GL, Jong SP, Yong HJ, Hyo SK, Soo BK, et al. A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot* 2007;70:1656–62.
- [10] Galikowska E, Kunikowska D, Tokarska-Pietrzak E, Dziadziuszko H, Loś JM, Golec P, et al. Specific detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains by using ELISA with bacteriophages as recognition agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:1067–73. doi:10.1007/s10096-011-1193-2.
- [11] Minh CT. Les biocapteurs : principes, construction et applications. Masson. 1991.
- [12] Biomolecular sensors. Taylor & Francis. London and New York: Electra Gizeli, Christopher R. Lowe; 2002.
- [13] Grieshaber D, MacKenzie R, Voeroes J, Reimhult E. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors* 2008;8:1400–58.
- [14] Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron* 2001;16:121–31.
- [15] Katz E, Willner I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis* 2003;15:913–47.

- 
- [16] Alava T. Conception, fabrication, caractérisation de micromembranes résonantes en silicium, à actionnement piézoélectrique et détection piézorésistive intégrés appliquées à la détection d'agents biologiques simulant la menace. 2010.
- [17] Wang J. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chem Rev* 2008;108:814–25. doi:10.1021/cr068123a.
- [18] Shah J, Wilkins E. Electrochemical biosensors for detection of biological warfare agents. *Electroanalysis* 2003;15:157–67.
- [19] Lagarde F, Jaffrezic-Renault N. Cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment. *Anal Bioanal Chem* 2011;400:947–64. doi:10.1007/s00216-011-4816-7.
- [20] Ivnitski D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E, Stricker S. Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria. *Electroanalysis* 2000;12:317–25.
- [21] Leung A, Shankar PM, Mutharasan R. A review of fiber-optic biosensors. *Sens Actuators B Chem* 2007;125:688–703. doi:10.1016/j.snb.2007.03.010.
- [22] Borisov SM, Wolfbeis OS. Optical Biosensors. *Chem Rev* 2008;108:423–61. doi:10.1021/cr068105t.
- [23] Wolfbeis OS. Materials for fluorescence-based optical chemical sensors. *J Mater Chem* 2005;15:2657. doi:10.1039/b501536g.
- [24] Kambhampati DK, Knoll W. Surface-plasmon optical techniques. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 1999;4:273–80. doi:10.1016/S1359-0294(99)90008-0.
- [25] Länge K, Rapp BE, Rapp M. Surface acoustic wave biosensors: a review. *Anal Bioanal Chem* 2008;391:1509–19. doi:10.1007/s00216-008-1911-5.
- [26] Kurosawa S, Park J-W, Aizawa H, Wakida S-I, Tao H, Ishihara K. Quartz crystal microbalance immunosensors for environmental monitoring. *Sel Pap 2nd Int Meet Microsens Microsyst* 2006;22:473–81. doi:10.1016/j.bios.2006.06.030.
- [27] Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci* 1962;102:29–45.
- [28] Byrne B, Stack E, Gilmartin N, O'Kennedy R. Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins. *Sensors* 2009;9:4407–45. doi:10.3390/s90604407.
- [29] Chevolut Y, Laurenceau E, Phaner-Goutorbe M, Monnier V, Souteyrand E, Meyer A, et al. DNA directed immobilization glycocluster array: applications and perspectives. *Curr Opin Chem Biol* 2014;18:46–54. doi:10.1016/j.cbpa.2013.12.009.
- [30] Sassolas A, Leca-Bouvier BD, Blum LJ. DNA Biosensors and Microarrays. *Chem Rev* 2008;108:109–39. doi:10.1021/cr0684467.
- [31] Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2007;2:MR17–71. doi:10.1116/1.2815690.
- [32] Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J Phys Chem B* 2003;107:668–77. doi:10.1021/jp026731y.

- [33] Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the Microscope. *Mol Pharm* 2011;8:2101–41. doi:10.1021/mp200394t.
- [34] Gao C, Zhang Y, Chen J, Wang T, Qian Y, Yang B, et al. Targeted drug delivery system for platinum-based anticancer drugs. *Mini-Rev Med Chem* 2016;16:872–91.
- [35] Le Trequesser Q, Seznec H, Delville M-H. Functionalized nanomaterials: their use as contrast agents in bioimaging: mono- and multimodal approaches. *Nanotechnol Rev* 2013;2:125–69.
- [36] Roduner E. Size matters: why nanomaterials are different. *Chem Soc Rev* 2006;35:583. doi:10.1039/b502142c.
- [37] Goesmann H, Feldmann C. Nanoparticulate Functional Materials. *Angew Chem Int Ed* 2010;49:1362–95. doi:10.1002/anie.200903053.
- [38] Daniel M-C, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev* 2004;104:293–346.
- [39] Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Rejeski D, et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 2015;6:1769–80. doi:10.3762/bjnano.6.181.
- [40] Mani V, Chikkaveeraiah BV, Patel V, Gutkind JS, Rusling JF. Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and Multienzyme-Particle Amplification. *ACS Nano* 2009;3:585–94. doi:10.1021/nn800863w.
- [41] Wang J. Nanomaterial-Based Amplified Transduction of Biomolecular Interactions. *Small* 2005;1:1036–43. doi:10.1002/smll.200500214.
- [42] Sanvicens N, Pastells C, Pascual N, Marco M-P. Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria. *TrAC Trends Anal Chem* 2009;28:1243–52. doi:10.1016/j.trac.2009.08.002.
- [43] Anker JN, Hall WP, Lyandres O, Shah NC, Zhao J, Van Duyne RP. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat Mater* 2008;7:442–53. doi:10.1038/nmat2162.
- [44] Joung H-A, Lee N-R, Lee SK, Ahn J, Shin YB, Choi H-S, et al. High sensitivity detection of 16s rRNA using peptide nucleic acid probes and a surface plasmon resonance biosensor. *Anal Chim Acta* 2008;630:168–73. doi:10.1016/j.aca.2008.10.001.
- [45] Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, et al. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science* 2005;307:538. doi:10.1126/science.1104274.
- [46] Edgar R, McKinsty M, Hwang J, Oppenheim AB, Fekete RA, Giulian G, et al. High-sensitivity bacterial detection using biotin-tagged phage and quantum-dot nanocomplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4841–5.
- [47] Mechery SJ, Zhao XJ, Wang L, Hilliard LR, Munteanu A, Tan W. Using Bioconjugated Nanoparticles To Monitor *E. coli* in a Flow Channel. *Chem – Asian J* 2006;1:384–90. doi:10.1002/asia.200600009.

- [48] Wang Z, Miu T, Xu H, Duan N, Ding X, Li S. Sensitive immunoassay of *Listeria monocytogenes* with highly fluorescent bioconjugated silica nanoparticles probe. *J Microbiol Methods* 2010;83:179–84. doi:10.1016/j.mimet.2010.08.013.
- [49] Thepwiwatjit N, Thattiyaphong A, Limsuwan P, Tuitemwong K, Tuitemwong P. Antibody-Conjugated Rubpy Dye-Doped Silica Nanoparticles as Signal Amplification for Microscopic Detection of *Vibrio cholerae* O1. *J Nanomater* 2013;2013:1–7. doi:10.1155/2013/274805.
- [50] Wang L, Zhao W, O'Donoghue MB, Tan W. Fluorescent Nanoparticles for Multiplexed Bacteria Monitoring. *Bioconjug Chem* 2007;18:297–301. doi:10.1021/bc060255n.
- [51] Nguyen P-D, Tran TB, Nguyen DTX, Min J. Magnetic silica nanotube-assisted impedimetric immunosensor for the separation and label-free detection of *Salmonella typhimurium*. *Sens Actuators B Chem* 2014;197:314–20. doi:10.1016/j.snb.2014.02.089.
- [52] Maalouf R, Hassen WM, Fournier-Wirth C, Coste J, Jaffrezic-Renault N. Comparison of two innovatives approaches for bacterial detection: paramagnetic nanoparticles and self-assembled multilayer processes. *Microchim Acta* 2008;163:157–61. doi:10.1007/s00604-008-0008-3.
- [53] Hu R-R, Yin Z-Z, Zeng Y-B, Zhang J, Liu H-Q, Shao Y, et al. A novel biosensor for *Escherichia coli* O157:H7 based on fluorescein-releasable biolabels. *Biosens Bioelectron* 2016;78:31–6. doi:10.1016/j.bios.2015.11.018.
- [54] K. Rastogi S, F. Jabal JM, Zhang H, M. Gibson C. Antibody@Silica Coated Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Capture of *E.coli* and Sens Titration of Biomolecules with Antibacterial Silver Colloid. *J Nanomedicine Nanotechnol* 2011;02. doi:10.4172/2157-7439.1000121.
- [55] Settingington EB, Alocilja EC. Electrochemical Biosensor for Rapid and Sensitive Detection of Magnetically Extracted Bacterial Pathogens. *Biosensors* 2012;2:15–31. doi:10.3390/bios2010015.
- [56] Merkoçi A. Electrochemical biosensing with nanoparticles: Electrochemical biosensing with nanoparticles. *FEBS J* 2007;274:310–6. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05603.x.
- [57] Lin Y-H, Chen S-H, Chuang Y-C, Lu Y-C, Shen TY, Chang CA, et al. Disposable amperometric immunosensing strips fabricated by Au nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for the detection of foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens Bioelectron* 2008;23:1832–7. doi:10.1016/j.bios.2008.02.030.
- [58] Pinijsuwan S, Rijiravanich P, Somasundrum M, Surareungchai W. Sub-Femtomolar Electrochemical Detection of DNA Hybridization Based on Latex/Gold Nanoparticle-Assisted Signal Amplification. *Anal Chem* 2008;80:6779–84. doi:10.1021/ac800566d.

- [59] Chen J, Jiang Z, Ackerman JD, Yazdani M, Hou S, Nugen SR, et al. Electrochemical nanoparticle–enzyme sensors for screening bacterial contamination in drinking water. *The Analyst* 2015;140:4991–6. doi:10.1039/C5AN00637F.
- [60] Wang L, Wei Q, Wu C, Hu Z, Ji J, Wang P. The Escherichia coli O157:H7 DNA detection on a gold nanoparticle-enhanced piezoelectric biosensor. *Chin Sci Bull* 2008;53:1175–84. doi:10.1007/s11434-007-0529-x.
- [61] Mao X, Yang L, Su X-L, Li Y. A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157:H7. *Biosens Bioelectron* 2006;21:1178–85. doi:10.1016/j.bios.2005.04.021.
- [62] Cunha C, Panseri S, Iannazzo D, Piperno A, Pistone A, Fazio M, et al. Hybrid composites made of multiwalled carbon nanotubes functionalized with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for tissue engineering applications. *Nanotechnology* 2012;23. doi:10.1088/0957-4484/23/46/465102.
- [63] Moore T, Chen H, Morrison R, Wang F, Anker JN, Alexis F. Nanotechnologies for Noninvasive Measurement of Drug Release. *Mol Pharm* 2014;11:24–39. doi:10.1021/mp400419k.
- [64] Patel T, Zhou J, Piepmeier JM, Saltzman WM. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:701–5. doi:10.1016/j.addr.2011.12.006.
- [65] Blasi P, Schoubben A, Giovagnoli S, Rossi C, Ricci M. Lipid nanoparticles for drug delivery to the brain: In vivo veritas. *J Biomed Nanotechnol* 2009;5:344–50. doi:10.1166/jbn.2009.1043.
- [66] Sun T, Zhang YS, Pang B, Hyun DC, Yang M, Xia Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew Chem - Int Ed* 2014;53:12320–64. doi:10.1002/anie.201403036.
- [67] Xie J, Lee S, Chen X. Nanoparticle-based theranostic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:1064–79. doi:10.1016/j.addr.2010.07.009.
- [68] Beddoes CM, Case CP, Briscoe WH. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Adv Colloid Interface Sci* 2015;218:48–68. doi:10.1016/j.cis.2015.01.007.
- [69] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* 2008;4:26–49. doi:10.1002/smll.200700595.
- [70] Srivastava V, Gusain D, Sharma YC. Critical Review on the Toxicity of Some Widely Used Engineered Nanoparticles. *Ind Eng Chem Res* 2015;54:6209–33. doi:10.1021/acs.iecr.5b01610.
- [71] Bannunah AM, Vllasaliu D, Lord J, Stolnik S. Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge. *Mol Pharm* 2014;11:4363–73. doi:10.1021/mp500439c.
- [72] Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology* 2014;12:5.

- [73] Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett* 2006;6:662–8. doi:10.1021/nl052396o.
- [74] Lu F, Wu S-H, Hung Y, Mou C-Y. Size Effect on Cell Uptake in Well-Suspended, Uniform Mesoporous Silica Nanoparticles. *Small* 2009;5:1408–13. doi:10.1002/smll.200900005.
- [75] Osaki F, Kanamori T, Sando S, Sera T, Aoyama Y. A Quantum Dot Conjugated Sugar Ball and Its Cellular Uptake. On the Size Effects of Endocytosis in the Subviral Region. *J Am Chem Soc* 2004;126:6520–1. doi:10.1021/ja048792a.
- [76] Roiter Y, Ornatska M, Rammohan AR, Balakrishnan J, Heine DR, Minko S. Interaction of Nanoparticles with Lipid Membrane. *Nano Lett* 2008;8:941–4. doi:10.1021/nl080080l.
- [77] Leroueil PR, Hong S, Mecke A, Baker JR, Orr BG, Banaszak Holl MM. Nanoparticle Interaction with Biological Membranes: Does Nanotechnology Present a Janus Face? *Acc Chem Res* 2007;40:335–42. doi:10.1021/ar600012y.
- [78] Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:14265–70.
- [79] Roiter Y, Ornatska M, Rammohan AR, Balakrishnan J, Heine DR, Minko S. Interaction of Lipid Membrane with Nanostructured Surfaces. *Langmuir* 2009;25:6287–99. doi:10.1021/la900119a.
- [80] Cho EC, Xie J, Wurm PA, Xia Y. Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. *Nano Lett* 2009;9:1080–4. doi:10.1021/nl803487r.
- [81] Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353:26–32. doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.135.
- [82] Zhu M, Aikens CM, Hollander FJ, Schatz GC, Jin R. Correlating the crystal structure of A thiol-protected Au<sub>25</sub> cluster and optical properties. *J Am Chem Soc* 2008;130:5883–5. doi:10.1021/ja801173r.
- [83] Villanueva A, Cãete M, Roca AG, Calero M, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ, et al. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology* 2009;20. doi:10.1088/0957-4484/20/11/115103.
- [84] Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug Chem* 2004;15:897–900. doi:10.1021/bc049951i.
- [85] Dasgupta S, Auth T, Gompper G. Shape and orientation matter for the cellular uptake of nonspherical particles. *Nano Lett* 2014;14:687–93. doi:10.1021/nl403949h.

- [86] Wang T, Bai J, Jiang X, Nienhaus GU. Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: A study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry. *ACS Nano* 2012;6:1251–9. doi:10.1021/nm203892h.
- [87] Napierska D, Thomassen LC, Lison D, Martens JA, Hoet PH. The nanosilica hazard: another variable entity. *Part Fibre Toxicol* 2010;7:1.
- [88] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005;113:823–39. doi:10.1289/ehp.7339.
- [89] Dastjerdi R, Montazer M. A review on the application of inorganic nanostructured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;79:5–18. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.03.029.
- [90] Yetisen AK, Qu H, Manbachi A, Butt H, Dokmeci MR, Hinstroza JP, et al. Nanotechnology in Textiles. *ACS Nano* 2016. doi:10.1021/acsnano.5b08176.
- [91] Maurer-Jones MA, Gunsolus IL, Murphy CJ, Haynes CL. Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Anal Chem* 2013;85:3036–49. doi:10.1021/ac303636s.
- [92] Farré M, Gajda-Schrantz K, Kantiani L, Barceló D. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Anal Bioanal Chem* 2009;393:81–95. doi:10.1007/s00216-008-2458-1.
- [93] Kumar A, Pandey AK, Singh SS, Shanker R, Dhawan A. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. *Chemosphere* 2011;83:1124–32. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.025.
- [94] Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, et al. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. *Nano Lett* 2006;6:1794–807. doi:10.1021/nl061025k.
- [95] Li Y, Zhang W, Niu J, Chen Y. Mechanism of Photogenerated Reactive Oxygen Species and Correlation with the Antibacterial Properties of Engineered Metal-Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* 2012;6:5164–73. doi:10.1021/nm300934k.
- [96] Dalai S, Pakrashi S, Kumar RSS, Chandrasekaran N, Mukherjee A. A comparative cytotoxicity study of TiO<sub>2</sub> nanoparticles under light and dark conditions at low exposure concentrations. *Toxicol Res* 2012;1:116–30. doi:10.1039/c2tx00012a.
- [97] Xiu Z, Zhang Q, Puppala HL, Colvin VL, Alvarez PJJ. Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Nano Lett* 2012;12:4271–5. doi:10.1021/nl301934w.
- [98] Xia T, Kovochich M, Liang M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, et al. Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano* 2008;2:2121–34. doi:10.1021/nm800511k.

- [99] Deupree SM, Schoenfisch MH. Morphological analysis of the antimicrobial action of nitric oxide on Gram-negative pathogens using atomic force microscopy. *Acta Biomater* 2009;5:1405–15. doi:10.1016/j.actbio.2009.01.025.
- [100] K. Rastogi S, F. Jabal JM, Zhang H, M. Gibson C. Antibody@Silica Coated Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Capture of E.coli and Sens Titration of Biomolecules with Antibacterial Silver Colloid. *J Nanomedicine Nanotechnol* 2011;02. doi:10.4172/2157-7439.1000121.
- [101] Sun J, Wang X, Yin C, Xiao P, Li H, Cao Z. Optical transduction of *E. Coli O157:H7* concentration by using the enhanced Goos-Hänchen shift. *J Appl Phys* 2012;112:083104. doi:10.1063/1.4759312.
- [102] Wang L, Wei Q, Wu C, Ji J, Liu Q, Yang M, et al. Detection of E. coli O157: H7 DNA by a novel QCM biosensor coupled with gold nanoparticles amplification. *Nanotechnol. 2007 IEEE-NANO 2007 7th IEEE Conf. On, IEEE; 2007*, p. 330–3.
- [103] Varshney M, Li Y. Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle–antibody conjugates for detection of Escherichia coli O157:H7 in food samples. *Biosens Bioelectron* 2007;22:2408–14. doi:10.1016/j.bios.2006.08.030.
- [104] Geng P, Zhang X, Teng Y, Fu Y, Xu L, Xu M, et al. A DNA sequence-specific electrochemical biosensor based on alginic acid-coated cobalt magnetic beads for the detection of E. coli. *Biosens Bioelectron* 2011;26:3325–30. doi:10.1016/j.bios.2011.01.007.
- [105] Chowdhury AD, De A, Chaudhuri CR, Bandyopadhyay K, Sen P. Label free polyaniline based impedimetric biosensor for detection of E. coli O157:H7 Bacteria. *Sens Actuators B Chem* 2012;171-172:916–23. doi:10.1016/j.snb.2012.06.004.
- [106] Wang J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosens Bioelectron* 2006;21:1887–92. doi:10.1016/j.bios.2005.10.027.
- [107] Serra B, Morales MD, Zhang J, Reviejo AJ, Hall EH, Pingarron JM. In-a-Day Electrochemical Detection of Coliforms in Drinking Water Using a Tyrosinase Composite Biosensor. *Anal Chem* 2005;77:8115–21. doi:10.1021/ac051327r.
- [108] Pelletier DA, Suresh AK, Holton GA, McKeown CK, Wang W, Gu B, et al. Effects of Engineered Cerium Oxide Nanoparticles on Bacterial Growth and Viability. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:7981–9. doi:10.1128/AEM.00650-10.
- [109] Poitras C, Tufenkji N. A QCM-D-based biosensor for E. coli O157:H7 highlighting the relevance of the dissipation slope as a transduction signal. *Biosens Bioelectron* 2009;24:2137–42. doi:10.1016/j.bios.2008.11.016.
- [110] Wang Y, Zhao Q, Han N, Bai L, Li J, Liu J, et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2015;11:313–27. doi:10.1016/j.nano.2014.09.014.
- [111] Tan W, Wang K, He X, Zhao XJ, Drake T, Wang L, et al. Bionanotechnology based on silica nanoparticles. *Med Res Rev* 2004;24:621–38. doi:10.1002/med.20003.

- [112]Pham MT, Nguyen TV, Vu Thi TD, Nghiem Thi HL, Tong KT, Tran TT, et al. Synthesis, photophysical properties and application of dye doped water soluble silica-based nanoparticles to label bacteria *E. coli* O157:H7. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol* 2012;3:045013. doi:10.1088/2043-6262/3/4/045013.
- [113]Liu T, Song X, Shen Y, Guo Z, Xue J, Wu H. Antibacterial mechanisms of silica/polydopamine/silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Micro Nano Lett* 2014;9:210–4. doi:10.1049/mnl.2014.0014.
- [114]Jiang W, Mashayekhi H, Xing B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ Pollut* 2009;157:1619–25. doi:10.1016/j.envpol.2008.12.025.
- [115]Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. *Water Res* 2006;40:3527–32. doi:10.1016/j.watres.2006.08.004.
- [116]Fruijtier-Pölloth C. The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica—A nanostructured material. *Toxicology* 2012;294:61–79. doi:10.1016/j.tox.2012.02.001.
- [117]Faye N rokhaya. Study by atomic force microscopy and fluorescence microscopy of the interaction of silica nanoparticles with supported lipid films. Université de Bordeaux, 2014.

# Chapitre 2 Des outils et méthodes au service des bio-nano-mondes

## Sommaire

---

2.1	La microscopie à force atomique .....	52
2.1.1	L'AFM, une microscopie en champ proche privilégiée.....	52
2.1.2	L'AFM, une pointe en interaction locale avec l'échantillon.....	53
2.1.2.1	Origine des forces d'interaction .....	53
2.1.2.2	Origine de la cartographie AFM.....	55
2.1.3	Les modes de fonctionnement .....	57
2.1.3.1	Le mode non-contact .....	57
2.1.3.2	Le mode contact.....	58
2.1.3.3	Le mode contact intermittent.....	62
2.1.4	Matériels .....	67
2.2	Synthèse et caractérisation des SiO <sub>2</sub> -NPs.....	68
2.2.1	Protocoles de synthèse de SiO <sub>2</sub> -NPs .....	68
2.2.1.1	La voie sol-gel.....	68
2.2.1.2	Synthèse des pré-germes de silice .....	69
2.2.1.3	Croissance ensemencée des germes de silice.....	69
2.2.1.4	Fonctionnalisation des SiO <sub>2</sub> -NPs .....	70
2.2.2	Caractérisations des SiO <sub>2</sub> -NPs .....	70
2.2.2.1	Caractérisation par MET .....	70
2.2.2.2	Caractérisation par DLS.....	71
2.2.2.3	Caractérisation par zétamétrie .....	73
2.3	Préparation et caractérisation des systèmes bactériens.....	74
2.3.1	Souches .....	74
2.3.2	Etude de viabilité des bactéries .....	74
2.3.2.1	Préparation des suspensions de bactéries .....	74
2.3.2.2	Principe de l'étude de viabilité.....	75
2.3.2.3	Test de susceptibilité vis-à-vis des NPs.....	76
2.3.3	Observations en champ noir .....	77
2.3.4	Préparations pour l'étude AFM.....	77
2.3.4.1	Suspension bactérienne ( $\pm$ NPs) .....	77
2.3.4.2	Dépôts des suspensions bactériennes ( $\pm$ NPs).....	78
2.4	Elaboration du biocapteur.....	79
2.4.1	Notions d'électrochimie.....	79
2.4.1.1	Les réactions chimiques .....	79
2.4.1.2	La voltamétrie cyclique .....	82
2.4.2	La microbalance à quartz.....	84
2.4.3	Elaboration du biocapteur .....	86
	Bibliographie.....	88
	Annexes – Calibration de l'AFM .....	90

---

Ce chapitre présente le principe et la mise en œuvre des diverses techniques de caractérisation utilisées au cours de ces travaux de thèse : les méthodes d'imagerie (AFM, MET, microscopie optique), les analyses spectroscopiques (DLS, zétamétrie) et électrochimiques (voltamétrie cyclique). Il détaille également, de façon exhaustive, les étapes de la synthèse et/ou de la préparation des systèmes (NPs, bactéries, capteurs) qui seront étudiés et caractérisés par les méthodes citées ci-dessus.

## 2.1 La microscopie à force atomique

Au cours de cette thèse, une technique de caractérisation pour nos systèmes bactériens a été privilégiée, la microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy* en anglais, AFM) dont les caractéristiques et les avantages pour cette étude sont présentés ci-après. La théorie et la mise en œuvre de cette technique ont été détaillées par Garcia et Pérez dont l'article servira de base pour notre compréhension de l'AFM [1]. La thèse de Laurent Nony dédiée à l'analyse de l'ADN par AFM servira, quant à elle, de base à la compréhension du mode dynamique [2].

### 2.1.1 L'AFM, une microscopie en champ proche privilégiée

Pour pallier le manque de résolution dû aux phénomènes de diffraction, dans les microscopies optiques classiques, les années 30 à 60 ont vu naître les microscopies électroniques (en transmission, MET et à balayage, MEB) qui s'appuient sur un faisceau d'électron en interaction avec un échantillon pour en donner une image hautement résolue, potentiellement à l'échelle atomique (Figure 17).

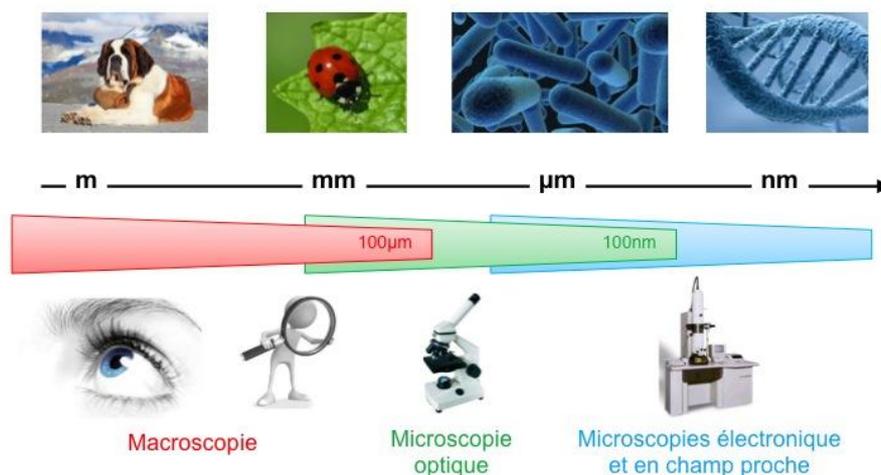


Figure 17. Echelles de caractérisation accessibles selon les microscopies utilisées.

Ces microscopies présentent un pouvoir de résolution bien plus important que les microscopies optiques dû à la longueur d'onde plus faible d'un électron en comparaison d'un photon. Par ailleurs, ces dernières décennies ont également vu naître des microscopies dites en champ proche permettant d'atteindre l'observation à l'échelle

atomique (Figure 17). Elles se basent sur le balayage d'une surface par une sonde de dimensions nanométriques qui garantit la haute résolution de l'observation. Ainsi, depuis l'invention du microscope à effet tunnel (*Scanning Tunneling Microscopy* en anglais, STM) en 1981 [3], ces microscopies ont fait l'objet de nombreux développements et sont devenues des outils indispensables pour la recherche, aussi bien fondamentale qu'appliquée, et dans des domaines aussi variés que la physique, la chimie et la biologie.

L'AFM constitue l'une des microscopies en champ proche les plus répandues pour diverses raisons, détaillées ci-après [4]. Historiquement, son développement a d'abord permis l'analyse, à l'échelle nanométrique, de surfaces conductrices ou isolantes, contrairement à la STM, nécessitant une surface conductrice. Par la suite, parallèlement à son utilisation dans un environnement "classique" sous air, le développement de montages fonctionnant en atmosphère contrôlée (vide ou non) ou en milieu liquide a garanti son accessibilité pour des systèmes fragiles, biologiques notamment. Par ailleurs, l'AFM exploite les interactions à courte portée, à la fois répulsives et attractives, existant entre une pointe nanométrique et la surface d'un échantillon, afin de la cartographier d'un point de vue non seulement topographique mais aussi mécanique (cf. les détails ci-après). La résolution obtenue est de l'ordre du nm latéralement et du dixième de nm perpendiculairement à la surface. Ainsi, cette observation complète et directe, ne nécessitant ni traitement de surface ni traitement « post-observation », en fait un outil privilégié pour la caractérisation de systèmes mous, tels les cellules [5] et les polymères [6] mais aussi de matériaux rigides, tels les NPs et les cristaux [7].

## 2.1.2 L'AFM, une pointe en interaction locale avec l'échantillon

Comme mentionné ci-dessus, l'AFM permet une cartographie 3D d'une surface, à l'échelle nanométrique, grâce à une sonde, ou pointe, extrêmement fine, fixée à l'extrémité d'un levier. Cette pointe est amenée à une distance très proche de l'échantillon dont le déplacement est assuré par un système piézoélectrique, garantissant ainsi la cartographie. La déflexion plus ou moins importante du levier, lorsque le contact s'établit, est fonction des forces interatomiques existant entre les deux systèmes. Elle constitue l'information collectée expérimentalement et "traduite" ultérieurement en termes de contraste topographique et mécanique de l'échantillon.

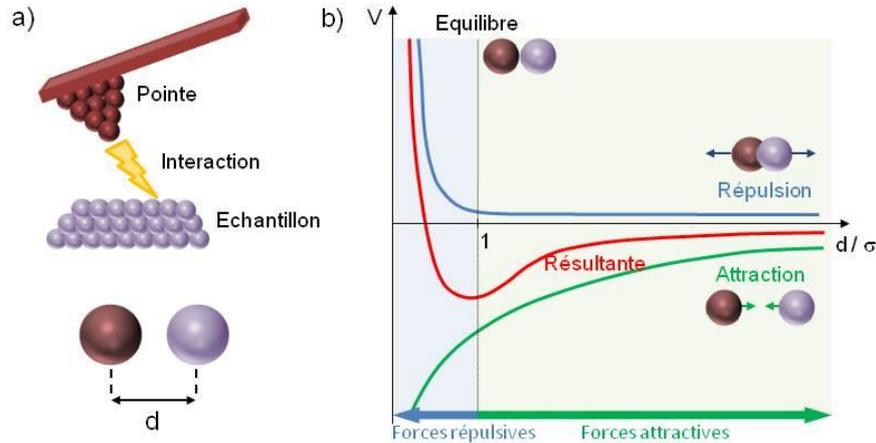
### 2.1.2.1 Origine des forces d'interaction

Le potentiel d'interaction, qui dépend de la distance,  $d$ , entre la pointe et l'échantillon, peut être décrit par un potentiel de type Lennard Jones :

$$V(d) = 4\varepsilon \left( \left( \frac{\sigma}{d} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{d} \right)^6 \right) \quad (1)$$

Où  $\sigma$  est la distance d'équilibre interatomique et  $\varepsilon$  l'énergie potentielle à la distance d'équilibre. L'extrémité de la pointe, ou apex, est ici assimilée à une sphère.

Au sein de ce potentiel d'interaction coexistent des interactions répulsives (premier terme), prédominantes à courte portée et des interactions attractives (second terme), prédominantes à longue distance entre les atomes constituant la pointe et l'échantillon (Figure 18).



Les forces associées sont données par la dérivée de ce potentiel en fonction de la distance  $d$ . Elles dépendent des propriétés de la pointe, de l'échantillon et de l'environnement de mesure. On distingue donc :

- les **forces répulsives**, à l'échelle atomique, qui suivent une loi en  $d^{-12}$ . Importantes au contact de l'échantillon, elles sont dues à l'impossibilité pour les nuages électroniques des atomes (de la pointe et de l'échantillon) de s'interpénétrer, selon le principe d'exclusion de Pauli ;
- les **forces attractives**, actives au-delà du nanomètre, sont classées en différentes catégories :
  - les forces de Van der Waals suivent une loi en  $d^{-6}$  et sont dues aux interactions dipolaires existantes entre les deux systèmes en « quasi-contact ». Elles résultent d'effets thermiques ou de fluctuations quantiques induisant des modifications du champ électromagnétique ;
  - les forces de capillarité, à l'échelle macroscopique, dues à l'humidité de l'air environnant, capables de piéger la pointe à la surface, au travers d'un ménisque ;
  - les forces d'adhésion, également à l'échelle macroscopique, dues aux interactions spécifiques qui peuvent exister entre la pointe et la surface ;

- les **forces électrostatiques**, attractives ou répulsives, plus ou moins écrantées selon l'environnement de mesure (liquide, air, vide) et dépendant des propriétés électriques et des charges présentes à la surface de l'échantillon.

### 2.1.2.2 Origine de la cartographie AFM

En fonction des dites forces, et donc de la distance pointe-échantillon, la pointe se défléchit. Cette déflexion se traduit par un signal différentiel (entre une déflexion nulle loin de la surface et une déflexion non nulle à l'approche) perçu par une photodiode quatre cadrans (Figure 19). L'échantillon est balayé dans le plan (x,y) et en chaque point de l'échantillon, ce signal est mesuré permettant l'obtention d'une image de la surface.

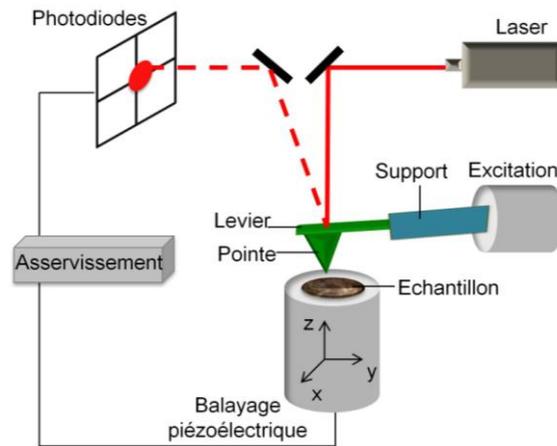


Figure 19. Principe de fonctionnement de l'AFM.

Expérimentalement, divers éléments contribuent à la mise en œuvre du principe de l'AFM :

- **Le système pointe-levier** (Figure 20), origine et collecteur de l'information :

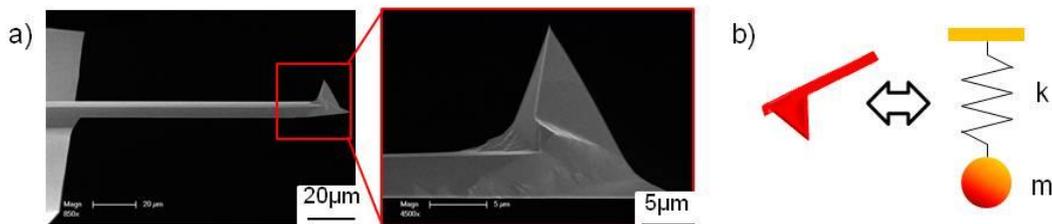


Figure 20. a) Images MEB d'un levier et d'une pointe AFM ([www.bruker.com](http://www.bruker.com)). b) Schéma équivalent entre le système pointe-levier et un oscillateur harmonique.

- La pointe, fixée à l'extrémité du microlevier, perçoit les forces d'interaction. Elle est modélisée par un cône dont l'extrémité, appelé *apex*, est assimilée à une sphère d'un rayon de l'ordre du nanomètre à la dizaine de nanomètres. L'état de cette pointe influence fortement sur la qualité des images de l'échantillon ;

- Le microlevier, généralement en silicium ou en nitrure de silicium, est souple et déformable : il s'adapte aux forces d'interaction qu'il subit de la part de l'échantillon. De forme parallélépipédique ou triangulaire, il mesure une centaine de micromètres de long et possède une raideur  $k$ , du centième à plusieurs dizaines de N/m, calibrée lors de chaque expérience (cf. Annexe – Calibration de l'AFM). Cette raideur est définie par la relation :

$$k = \frac{wEe^3}{4l^3} \quad (2)$$

$E$  étant le module d'élasticité du matériau et  $w$ ,  $l$  et  $e$  les largeur, longueur et épaisseur du levier respectivement ;

- Assimilé à un oscillateur harmonique (Figure 20b), le levier (de masse  $m$ ) a également une fréquence propre d'oscillation,  $\omega_0$ , pouvant aller du kHz à plusieurs centaines de kHz :

$$\omega_0 = \sqrt{k/m} \quad (3)$$

- **Le système de détection** : un rayon laser, focalisé sur l'extrémité du levier, est réfléchi, par l'intermédiaire d'un miroir, vers un photodétecteur quatre cadrans (Figure 19). Le signal différentiel électrique perçu témoigne des déflexions verticales (forces normales et longitudinales) et des torsions (forces latérales) du levier, converties en volts puis en nanomètres à partir d'une calibration (cf. Annexe – Calibration de l'AFM). La détection se fait sur  $\pm 10$  V autour d'une position centrale. Toutefois, le domaine de réponse linéaire est limitée à  $\pm 3$  V, gamme dans laquelle la décroissance d'intensité du faisceau laser n'affecte pas la détection. Les expériences sont donc menées dans ce domaine de linéarité.
- **Le système de balayage**, composé d'une céramique piézoélectrique, permet de sonder l'échantillon dans les directions  $x$ ,  $y$  et  $z$ , l'échantillon ou la pointe étant déplacés. Le tube piézoélectrique est alimenté avec des tensions  $V_x$ ,  $V_y$  et  $V_z$ , suffisamment faibles pour les considérer proportionnelles aux déplacements selon ces trois axes (cf. Annexe – Calibration de l'AFM). Pour de plus grandes amplitudes de déplacement, le système présente une réponse non-linéaire à la tension appliquée. De plus, dans la direction  $z$ , la façon dont est polarisé (positivement ou négativement) le tube induit un comportement hystérétique de la céramique. Les corrections de ces effets non-linéaires sont évaluées grâce à des réseaux calibrés et implémentées dans le logiciel de contrôle de l'AFM. Ainsi, les déplacements vrais sont mesurés dans la gamme de linéarité des photodiodes.
- **La boucle d'asservissement** permet de comparer le signal réfléchi ( $S(t)$ ) par les photodiodes et les valeurs initiales imposées par l'utilisateur ( $C(t)$ ). La consigne

étant faite sur la déflexion (mode contact) ou l'amplitude de déflexion (mode dynamique oscillant), la hauteur de la sonde ( $dz$ ) est ajustée afin que la force exercée entre elle et l'échantillon ( $F(h)$ ) soit maintenue constante et faible pour ne pas abimer l'échantillon. Expérimentalement, l'utilisateur fait notamment varier les gains du correcteur à action Proportionnelle Intégrale et Dérivée (PID) pour affiner l'asservissement en termes de temps d'acquisition et de bruit. L'augmentation des gains améliore la résolution obtenue mais, en contrepartie, augmente le bruit. À l'inverse, moins les gains sont importants, moins l'image est résolue et moins le bruit est présent. De plus, le bruit et la résolution sont également liés à la vitesse de balayage : plus celle-ci est grande, moins l'image est résolue et plus le bruit est important. Il s'agit, ainsi, de trouver un compromis pour obtenir l'image la mieux résolue et la moins bruitée, en faisant varier ces deux paramètres pertinents.

### 2.1.3 Les modes de fonctionnement

En AFM, selon la distance pointe-échantillon, et donc les forces mises en jeu, la pointe peut être au contact de l'échantillon, donnant alors accès à des informations topographiques et mécaniques, ou au voisinage de la surface (modes non contact et contact intermittent), permettant l'obtention d'informations également topographiques mais aussi rhéologiques (Figure 21). Au cours de ces travaux, les modes contact et contact intermittent ont été privilégiés et feront donc l'objet d'une description plus exhaustive, ci-après, que le mode non-contact.

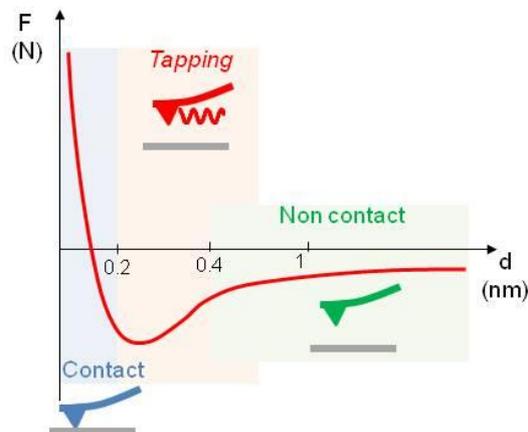


Figure 21. Illustration des trois modes de fonctionnement de l'AFM sur la courbe présentant les forces mises en jeu en fonction de la distance pointe-échantillon.

#### 2.1.3.1 Le mode non-contact

Dans ce mode, la pointe n'est pas en contact avec l'échantillon. La distance pointe/échantillon est fixée, supérieure au nanomètre, les forces attractives de longue portée entrent alors en jeu. Elles sont de l'ordre de 0.01 à 0.1 nN. Ce mode ne sera pas utilisé au cours de ces travaux.

### 2.1.3.2 Le mode contact

#### Principe

Dans le mode contact, la pointe est, comme son nom l'indique, en contact avec l'échantillon à une distance maximale de quelques angströms. Les forces mises en jeu sont alors principalement répulsives, les nuages électroniques des atomes constituant la pointe et la surface de l'échantillon se repoussant les uns les autres. Elles sont très sensibles à la distance pointe échantillon (Figure 21) ; aussi, le relief présent sur l'échantillon impose des variations de ces forces permettant ainsi d'imager la surface.

Lors du balayage de la pointe sur la surface suivant  $(x, y)$ , il est possible de maintenir constante (i) la force de répulsion, en asservissant la hauteur entre la pointe et la surface ou (ii) la hauteur entre l'échantillon et la pointe en asservissant la force appliquée. Dans le premier cas, des informations sur la topographie sont obtenues, sans abîmer l'échantillon. Cependant des artefacts peuvent être présents, liés à la partie électronique de l'asservissement quand les paramètres ne sont pas optimisés. Dans le second cas, des informations sur les variations d'interactions (forces) sont obtenues et sont indépendantes des paramètres d'acquisition ; l'inconvénient majeur étant la possibilité de casser la pointe ou d'abîmer l'échantillon en appliquant une force trop importante.

#### Le mode spectroscopique - la courbe de force

En mode contact, la courbe de force (CF) traduit la variation de la déflexion du levier en fonction de la distance entre la pointe et la surface de l'échantillon. La force résultant de l'interaction,  $F$ , et induisant la déflexion  $z$  du levier, vaut :

$$F = k.z \quad (4)$$

Où  $k$  est la raideur du levier libre.

Cette force est dominée par les interactions répulsives lorsque le levier est comprimé ( $z > 0$ ) et par les interactions attractives lorsqu'il est en extension ( $z < 0$ ). Plus précisément, la Figure 22 présente une CF classique dont les éléments sont décrits ci-après.

Eloignée de la surface, la pointe ne subit aucune interaction, la déflexion est donc nulle (1). Lorsque la surface s'approche de la pointe, une instabilité mécanique survient : à une certaine distance, les forces attractives sont telles que la pointe « plonge » sur l'échantillon, d'où une déflexion négative (2). Au fur et à mesure que la surface s'approche, elle comprime le levier, les forces répulsives entrant en jeu font défléchir ce dernier positivement (3). Puis, la surface s'éloigne entraînant la pointe et le levier avec elle, qui passe d'un état comprimé à un état d'extension (4). La pointe reste « collée » à la surface par des forces d'adhésion et de capillarité, notamment à l'air. A une certaine distance, seules ces forces maintiennent le contact pointe-surface (5). Puis

le contact devient instable, ces forces ne sont plus suffisantes pour maintenir le levier en contact avec la surface et le font décoller ; il revient alors à son état d'équilibre (6).

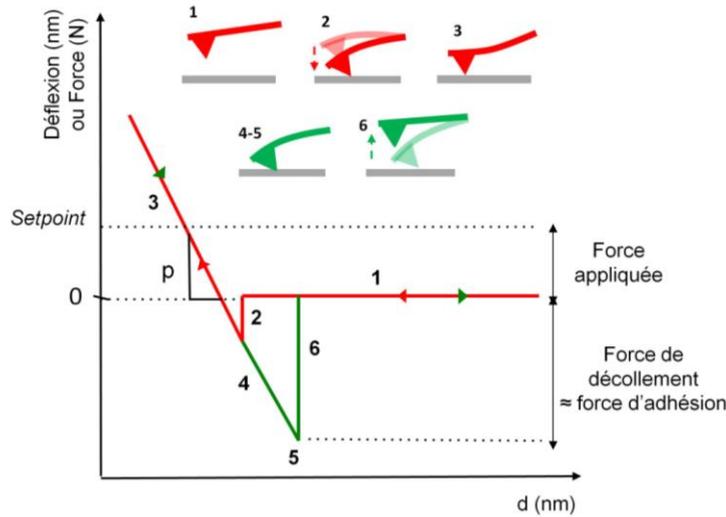


Figure 22. Représentation d'une courbe de force, en mode contact, illustrant le comportement de la pointe AFM à l'approche d'une surface rigide. La valeur de déflexion consignée est appelée *setpoint* (point de fonctionnement).

L'hystérésis qui existe entre les courbes d'aller et de retour (rouge vs. vert en Figure 22) est due à des phénomènes d'adhésion et de dissipation d'énergie lorsque la pointe interagit avec l'échantillon. Ces forces d'adhésion sont définies par :

$$F_{adhesives} = -\frac{HR^*}{6d_c^2} \quad (5)$$

Où  $H$  est la constante de Hamaker, dont l'ordre de grandeur est de  $5 \cdot 10^{-20}$  J,  $R^*$  est le rayon équivalent des deux sphères en interaction<sup>3</sup> et  $d_c$  la distance de contact ( $= 0.165$  nm). La constante de Hamaker dépend, en réalité, de plusieurs paramètres dont les constantes diélectriques des milieux mis en jeu.

Les propriétés viscoélastiques de l'échantillon ainsi que l'environnement de travail peuvent également induire des forces de capillarité, dont l'expression est donnée par :

$$F_{capillarité} = -4\pi R\gamma_L \cos(\theta) \quad (6)$$

Où  $R$  est le rayon de courbure du ménisque formé,  $\gamma_L$  la tension de surface du liquide et  $\theta$  l'angle de mouillage.

La CF permet d'accéder aux propriétés mécaniques du matériau analysé. En effet, la pente de la partie linéaire de cette courbe permet d'estimer la raideur de l'échantillon (Figure 23).

<sup>3</sup> Le rayon équivalent  $R^*$  pour deux sphères en contact de rayon  $R_1$  et  $R_2$  respectivement vaut :

$$R^* = \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}$$

Connaissant la raideur,  $k$ , du système pointe-levier, préalablement calibrée (cf. Annexe – Calibration de l'AFM), une relation lie la raideur de l'échantillon,  $k_{ech}$  à la pente,  $p$ , de la courbe enregistrée expérimentalement:

$$p = \frac{1}{1 + \frac{k}{k_{ech}}} \quad (7)$$

La raideur de l'échantillon est directement liée à son module élastique et à la déformation, voire l'indentation subie. Cet aspect sera développé dans une étude annexe sur les propriétés nanomécaniques de *E. coli* traitées ou non par des NPs (cf. Annexe A).

Pour une surface dure, la surface n'est pas déformée par l'approche de la pointe et, par conséquent, la déflexion du levier est proportionnelle au déplacement de la céramique piézoélectrique ( $p = 1$ ). En revanche, dans le cas d'une surface molle, la surface est effectivement déformée (voire indentée) et la déflexion est, donc, inférieure à ce déplacement ( $p < 1$ ). Aussi, suivant la nature du matériau sondé, la pente de la CF, liée à l'indentation du matériau, peut différer (Figure 23). Ces CF sont notamment utilisées pour étudier les variations des propriétés viscoélastiques et adhésives de cellules suite à leur traitement en présence des NPs [8].

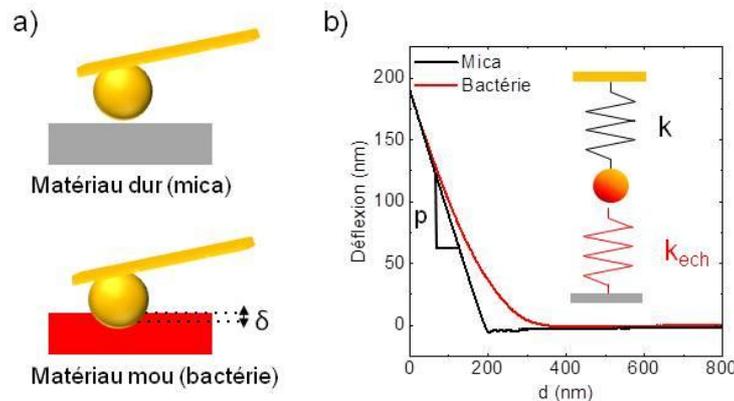


Figure 23. a) Schéma représentant l'indentation  $\delta$  d'une surface, de raideur  $k_{ech}$ , par la pointe, de raideur  $k$ . b) CF expérimentales illustrant le comportement mécanique d'une surface dure (mica) et molle (bactéries).

### Le mode friction – les propriétés tribologiques

Lors du balayage de la surface, des forces de frottement,  $F_f$ , entrent en jeu, notamment dues au contact et à l'adhésion entre la pointe et l'échantillon. Elles sont liées à la force normale appliquée,  $F_N$ , par la relation :

$$F_f = \mu F_N \quad (8)$$

Où  $\mu$  est le coefficient de frottement.

Le balayage peut se faire suivant l'axe du levier (déflexion) ou suivant la direction perpendiculaire (torsion). Les forces de frottement induisent des déflexions additionnelles,  $z_L$ , définies respectivement par :

$$F_f = k z_L \quad (9)$$

$$F_f = k_T z_L \quad (10)$$

Où  $k_T$  est la constante de raideur transversale du levier et  $k$  sa constante de raideur verticale.

La Figure 24 illustre une expérience de frottement, lors de l'aller-retour du levier sur une zone définie. Lors de l'aller, les forces de frottement, opposées au sens du mouvement, induisent des déflexions additionnelles qui s'ajoutent ou se retranchent à la topographie. Un palier est atteint lors du « glissement » du levier sur cette zone. Puis, le retour décrit un cycle inverse dû à la torsion dans le sens opposé du levier.

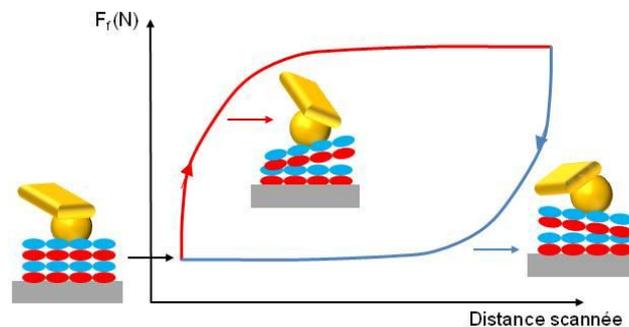


Figure 24. Représentation schématique d'une expérience de frottement. Les forces latérales lors du scan d'un échantillon sont représentées en fonction de la distance balayée. Sont associés à cette courbe des schémas illustrant la déflexion et la torsion du levier lors de son passage.

Ces informations donnent accès aux propriétés tribologiques de l'échantillon, les zones de dureté différentes, sondées par la pointe, subissant des forces de frictions différentes [9,10]. Les forces de friction dépendent non seulement des propriétés visco-élastiques de l'échantillon mais également de l'environnement (air, liquide) et des paramètres de l'expérience, notamment la vitesse de balayage.

### Expérience de grattage

Le mode contact permet un balayage rapide de l'échantillon tout en conservant une haute résolution spatiale. En revanche, il peut conduire à des dégradations de la surface à analyser pour des matériaux mous (type biologique) si les forces appliquées sont trop importantes (expériences de frottement). Cet aspect peut toutefois présenter un avantage lors de la détermination de l'épaisseur d'un échantillon. La pointe AFM est alors utilisée comme un râteau, venant balayer les couches de molécules (Figure 25).

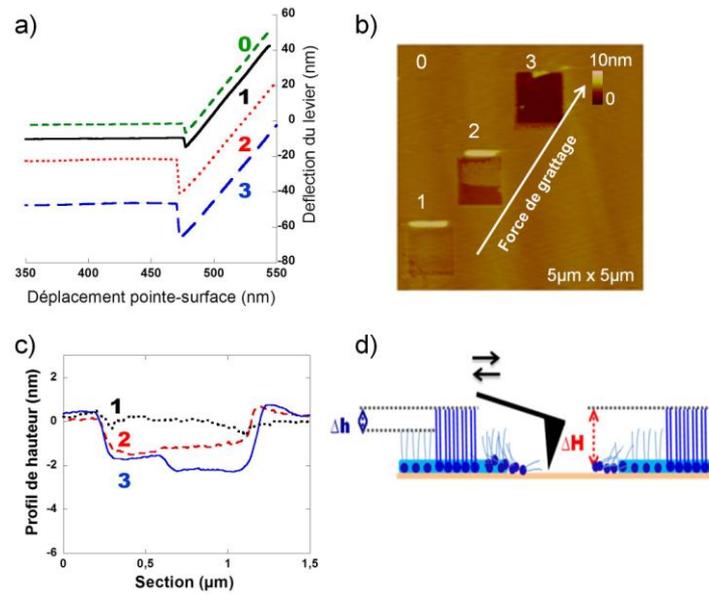


Figure 25. Expérience de grattage réalisée, dans le cadre de la thèse du Dr. Faye [11], sur une monocouche lipidique. a) Courbes de force montrant le principe de grattage en faisant varier la force appliquée). b) Image AFM de hauteur du film lipidique montrant les trois zones grattées avec des forces croissantes. c) Profils de hauteur des trois zones grattées avec des forces croissantes. d) Schéma du principe de détermination de l'épaisseur du film,  $\Delta H$ , par grattage.

En maîtrisant la force appliquée il est possible d'ôter, partiellement ou entièrement, la matière constituant l'échantillon de son substrat sur une zone définie et donc d'en déterminer l'épaisseur à partir d'un profil de hauteur englobant les zones intactes autour de la zone grattée (Figure 25c).

### 2.1.3.3 Le mode contact intermittent

#### Principe

Le mode contact intermittent, dit mode *tapping*, permet de pallier les dommages potentiels engendrés en mode contact sur des surfaces molles par les forces adhésives et de friction. En effet, il permet de minimiser grandement les forces de frottement / cisaillement à l'interface pointe-échantillon, la pointe oscillant au-dessus de la surface et ne venant que périodiquement en contact de l'échantillon.

#### Le système pointe-levier, un oscillateur harmonique

Comme mentionné précédemment, le système pointe-levier peut être assimilé à un oscillateur harmonique (Figure 26a) de raideur  $k$  et de masse  $m$  dont la fréquence de résonance  $\nu_0$  est estimée avant toute expérience, en réalisant la courbe de résonance du levier loin de la surface, en lui appliquant une force périodique (Figure 26b).

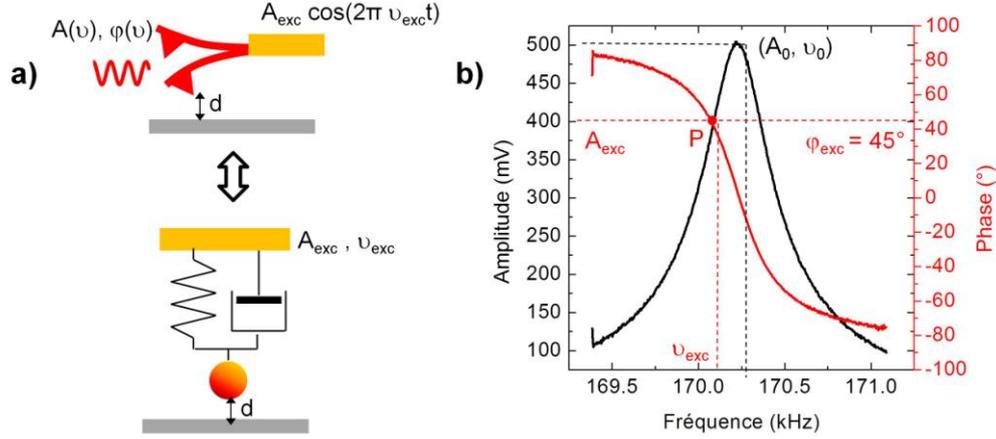


Figure 26. a) Schéma montrant l'équivalence entre le système pointe-levier vibrant et un oscillateur harmonique amorti. b) Courbe de résonance expérimentale en amplitude et en phase à  $d = 500$  nm. Le point P représente le point de fonctionnement.

Lorsque le système est mis en excitation à une fréquence  $\nu$  (expérimentalement inférieure à  $\nu_0$  pour un maximum de sensibilité) et une amplitude  $A_{exc}$ , il est analogue à un oscillateur amorti en régime forcé (selon l'axe de vibration  $z$ ) dont l'équation du mouvement s'écrit :

$$\ddot{z}(t) + 2\beta_0\dot{z}(t) + \omega_0^2 z(t) = A_{exc}\omega^2 \cos(2\pi\nu t) \quad (11)$$

$2\beta_0 m$  étant le coefficient de frottement du milieu environnant.

Pour des temps suffisamment longs, l'oscillateur atteint un état stationnaire défini par les équations suivantes :

$$z(t) = A(\omega) \cos(\omega t + \varphi(\omega)) \Rightarrow \begin{cases} A(\omega) = \frac{A_{exc}}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + 4\beta_0^2 \omega^2}} \\ \varphi(\omega) = \tan^{-1}\left(\frac{2\beta_0 \omega}{\omega^2 - \omega_0^2}\right) \end{cases} \quad (12)$$

où  $A(\omega)$  est l'amplitude d'oscillation et  $\varphi(\omega)$  le retard de phase (déphasage), à comparer aux valeurs du système libre.

Pour caractériser l'oscillateur, on introduit le facteur de qualité  $Q$ . Pour des fréquences d'excitation proches de celle de la résonance, il peut s'écrire :

$$Q = 2\pi \frac{E_{stockée}}{E_{dissipée}} \approx \frac{\omega_0}{2\beta_0} = \frac{\nu_0}{\Delta\nu} \quad (13)$$

où  $\Delta\nu$  est la largeur du pic de résonance à  $A_0/\sqrt{2}$ .

Typiquement, pour les leviers commerciaux utilisés au cours de cette thèse, en mode *tapping*, les fréquences de résonance varient, théoriquement, entre 150 et 300 kHz et les facteurs de qualité, à l'air, varient entre 350 et 500. Dans le cas de l'exemple présenté en Figure 26b, les paramètres suivant sont déterminés :  $\nu_0 = 170.2$  kHz,  $A_0 = 500$  mV et  $Q = 473$ .

Cette courbe de résonance nous permet de déterminer la fréquence et l'amplitude libres ( $\nu_{exc}$ ,  $A_{exc}$ ) qui sont celles de l'oscillateur libre sans interaction avec l'échantillon. Elle permet également de déterminer le facteur de qualité,  $Q$ . Enfin, elle permet de fixer l'amplitude *setpoint* et la fréquence de travail.

Lorsque la surface s'approche de la pointe, les forces d'interaction pointe-surface,  $F_{ps}$ , ne sont plus négligeables. Il convient d'en tenir compte dans la nouvelle équation du mouvement :

$$\ddot{z}(t) + 2\beta_0\dot{z}(t) + \omega_0^2z(t) = A_{exc}\omega^2\cos(\omega t) + \frac{F_{ps}}{m} \quad (14)$$

Ces forces d'interaction modifient la réponse en fréquence, en amplitude et en phase de l'oscillateur. La technique de la modulation d'amplitude permet, à une fréquence donnée ( $\nu_{exc}$ ) de suivre les modifications d'amplitude imposées par les propriétés de l'échantillon. La boucle d'asservissement permet de maintenir l'amplitude de travail constante, la hauteur entre l'échantillon et la pointe étant ajustée lors du balayage de la surface et permettant l'imagerie topographique de l'échantillon.

### Le mode spectroscopique - la courbe approche-retrait

Deux paramètres importants caractérisent donc le mode *tapping* : l'amplitude d'oscillation  $A$  et le déphasage  $\varphi$ . Leur dépendance respective vis-à-vis de la distance pointe-échantillon est traduite par une courbe approche-retrait (CAR). La Figure 27 décrit une CAR théorique réalisée sur une surface rigide (type silice).

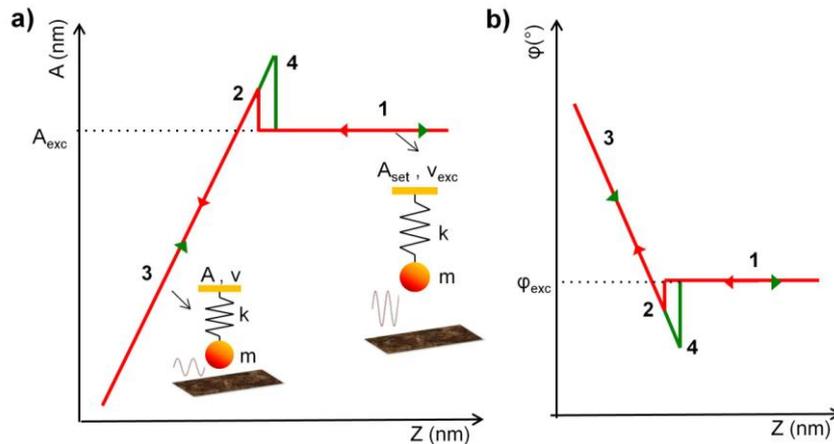


Figure 27. Représentation d'une CAR en amplitude (a) et en phase (b), réalisée sur une surface rigide, en fonction du déplacement en  $z$  de la céramique piézoélectrique.

Lorsque la pointe est loin de la surface (1), les interactions sont quasi inexistantes : l'amplitude, dite libre, d'oscillation et la phase sont constantes et égales aux valeurs fixées par l'utilisateur grâce à la courbe de résonance ( $A_{exc}$ ,  $\varphi_{exc}$ ). En revanche, lors de l'approche de l'échantillon, les forces attractives de Van der Waals conduisent à une augmentation d'amplitude (un « saut ») et une diminution de la phase (2). La pointe entre alors en contact intermittent avec la surface. Lorsque le contact intermittent est

établi, l'augmentation des forces répulsives induit une réduction de l'amplitude et une augmentation de la phase (3). Lors du retrait de l'échantillon, une hystérèse d'amplitude et de phase est observée due aux interactions visco-élastiques et adhésives entre la pointe et l'échantillon (4). Ces forces d'interaction ont été présentées précédemment pour le mode contact.

L'amplitude des oscillations et le déplacement du piezoélectrique peuvent être exprimés en mV (signal brut) ou en nanomètres. Cette calibration est présentée en Annexe – Calibration de l'AFM.

Au final, les informations liées à l'amplitude d'oscillation fournissent la cartographie topographique tandis que les informations liées au déphasage entre l'excitation et la réponse du levier nous renseignent sur les interactions pointe / surface, notamment sur les propriétés viscoélastiques et adhésives de l'échantillon. Les CAR ont, en effet, des allures différentes selon les propriétés du matériau sondé (mou/dur) [12], comme nous le verrons dans les chapitres suivants.

### Les régimes attractif et répulsif dominants

Le mode *tapping* se caractérise par l'oscillation du système au-dessus de la surface et ce, à amplitude et fréquence fixes. Le choix de l'amplitude libre de travail détermine le régime d'interaction de la pointe avec l'échantillon. En effet, plus cette amplitude diminue, plus les forces attractives dominantes sont importantes et inversement, plus l'amplitude est importante plus les forces répulsives dominantes sont importantes [13,14]. Aussi, en mode *tapping*, il est possible de travailler dans deux régimes différents (Figure 28) :

- **le régime répulsif dominant** : l'amplitude de travail est grande et la pointe entre en contact, de façon intermittente et pour des temps très courts, avec la surface. Excepté lors du contact intermittent, les interactions sont inexistantes. Ce régime permet donc d'obtenir un contraste majoritairement topographique.
- **le régime attractif dominant** : l'amplitude de travail est faible, et la pointe reste au voisinage de la surface. Les interactions de Van der Waals sont donc importantes et dominantes.

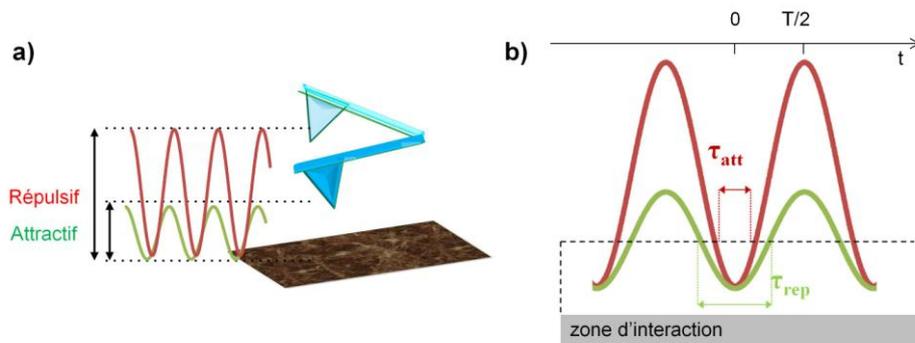


Figure 28. Schématisation a) des régimes attractif et répulsif dominant en AFM et b) du temps de résidence associé.

La fréquence étant fixée, il apparaît que le temps d'interaction, ou temps de résidence  $\tau$ , de la pointe avec la surface dépend de l'amplitude de travail. En effet, en considérant une période d'oscillation unique  $T$ , le fait de réduire l'amplitude d'oscillation conduit à l'augmentation du temps de résidence et inversement (l'augmentation de l'amplitude conduit à la diminution du temps de résidence) (Figure 28b). Ceci se comprend aisément lorsque l'on considère qu'à plus faible amplitude, les interactions attractives prédominent et « piègent » la pointe à la surface de l'échantillon. Ces deux régimes se manifestent par des CAR très différentes en termes de phase, celle-ci reflétant la prédominance des interactions attractives ou répulsives (Figure 29).

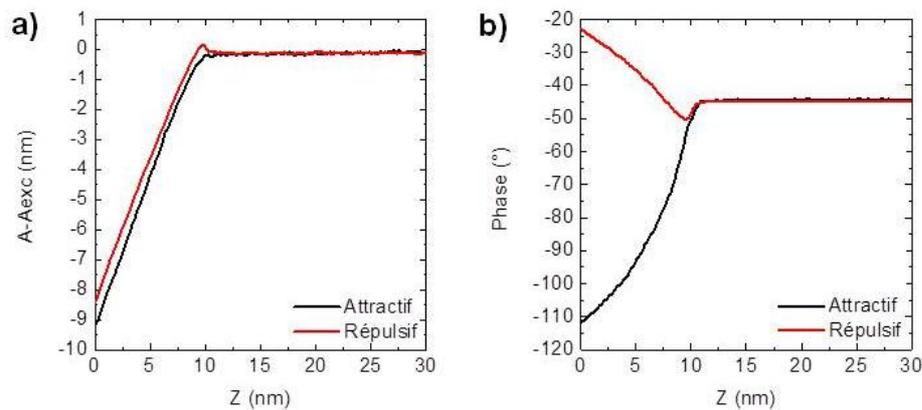


Figure 29. Courbes d'approche en (a) amplitude et en (b) phase réalisées sur une bactérie en mode attractif et répulsif dominant.

### Les informations utiles du mode *tapping*

Au regard des explications précédentes, il est possible d'extraire trois informations lors de l'imagerie AFM en mode *tapping* :

- **l'image de hauteur** contient majoritairement le contraste topographique de la surface étudiée. L'amplitude d'oscillation est constante, seul le système piézoélectrique se déplace selon  $z$ . Plus une zone est élevée plus sa couleur est claire sur l'image enregistrée et inversement, les zones moins élevées apparaissent plus sombres. L'image obtenue est représentative de la morphologie de l'échantillon en régime répulsif dominant, les interactions attractives étant négligeables. Toutefois, même dans ce régime, excepté dans le cas d'un matériau très dur, l'image de hauteur n'est jamais purement topographique. En régime attractif dominant, cette image mêle la topographie et les propriétés viscoélastiques de l'échantillon. L'image de hauteur dépend, par ailleurs, des paramètres de l'expérience (vitesse, PID).
- **l'image de phase** représente le déphasage existant entre le signal d'excitation (= consigne) et la réponse du système. Ce déphasage change lorsque la pointe rencontre des zones de propriétés surfaciques différentes. Les contrastes observés

sont alors dus aux propriétés viscoélastiques et adhésives de l'échantillon. De façon assez grossière, plus une zone est rigide, structurée ou organisée, plus le contraste est clair sur l'image enregistrée (phase élevée) et inversement, plus elle est molle ou désorganisée, plus elle apparaît sombre (phase faible).

- **l'image d'amplitude** représente la variation de la racine carrée de l'amplitude d'oscillation avant asservissement (ou erreur d'amplitude). Elle témoigne des changements importants de reliefs et souligne donc toutes les modifications topographiques de l'échantillon, qu'elles soient faibles ou importantes. Le contraste étant important aux bords des objets, cette image d'amplitude donne un effet 3D de la zone imagée.

## 2.1.4 Matériels et conditions d'imagerie

Deux montages AFM ont été utilisés au cours de cette thèse au LOMA :

- un multimode où deux types de scanner peuvent être utilisés selon les besoins et selon la résolution souhaitée : un scanner E et un scanner J avec des déplacements x, y et z maximum de 10  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  et 2.5  $\mu\text{m}$  et 125  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  respectivement ;
- un Bioscope doté d'un scanner G dont les déplacements maximaux x, y et z sont de 150  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$  et 12  $\mu\text{m}$  et d'une caméra permettant de le coupler à la microscopie optique.

Différentes pointes ont été utilisées, achetées chez Bruker (<http://www.brukerafmprobes.com/>) :

- les pointes *tapping* NCLV-A, possèdent une raideur de 48 N/m et une fréquence de résonance de 190 kHz ;
- les pointes contact, SNL-10, possèdent quatre leviers triangulaires dont les raideurs varient entre 0.06 et 0.35 N/m.

Le mode *tapping*, privilégié au cours de ces travaux, a été utilisé en régime répulsif dominant, *i.e.* pour des amplitudes de travail grandes, pour l'ensemble des images présentées dans ce manuscrit, à l'exception de mention contraire.

Une collaboration menée avec le Dr. Hassan Saadaoui du Centre de Recherche Paul Pascal (CRPP, Pessac) nous a également permis de travailler sur un AFM Icon, en mode *peakforce*. Ce mode opère de manière similaire au mode *tapping* dans le sens où il minimise les forces de frottement et de cisaillement en entrant, de façon intermittente, au contact de l'échantillon. Toutefois, contrairement au mode *tapping*, le *peakforce* opère dans un mode non-résonant, la fréquence de travail étant fixée, et strictement inférieure à la fréquence de résonance de l'oscillateur. Ce mode permet un contrôle précis des forces mises en jeu, sans endommager l'échantillon. En plus d'imager ce dernier d'un point de vue topographique mais également mécanique

(images d'élasticité, d'adhésion et de dissipation), ce mode garantit l'obtention de courbes de force simultanément à l'imagerie.

## 2.2 Synthèse et caractérisation des SiO<sub>2</sub>-NPs

Outre l'AFM, d'autres méthodes de caractérisation, notamment pour décrire les NPs de silice (SiO<sub>2</sub>-NPs), ont été utilisées au cours de la thèse. Elles sont décrites ci-après. Les protocoles de synthèse seront également décrits. Quant aux caractéristiques des SiO<sub>2</sub>-NPs, qu'elles soient commerciales ou synthétisées, elles feront l'objet du chapitre 3. La synthèse des SiO<sub>2</sub>-NPs ainsi que leur caractérisation ont été réalisées à l'ICMCB au sein du groupe « chimie des nanomatériaux ».

### 2.2.1 Protocoles de synthèse de SiO<sub>2</sub>-NPs

#### 2.2.1.1 La voie sol-gel

La voie sol-gel utilisée (Figure 30), qui par hydrolyse puis condensation d'un précurseur moléculaire conduit à la formation de silice, permet un excellent contrôle sur la morphologie des SiO<sub>2</sub>-NPs [15]. En effet, le contrôle de la compétition hydrolyse-condensation, en jouant sur les conditions expérimentales (nature du précurseur, pH, température, catalyseur...), permet de maîtriser les phénomènes de croissance et de densification des germes de silice. Une catalyse basique est notamment privilégiée pour s'assurer de l'obtention d'une suspension colloïdale stable de NPs, la silice étant chargée négativement dans cette gamme de pH et éviter la polymérisation en masse conduisant à un objet macroscopique (cas de la catalyse acide).

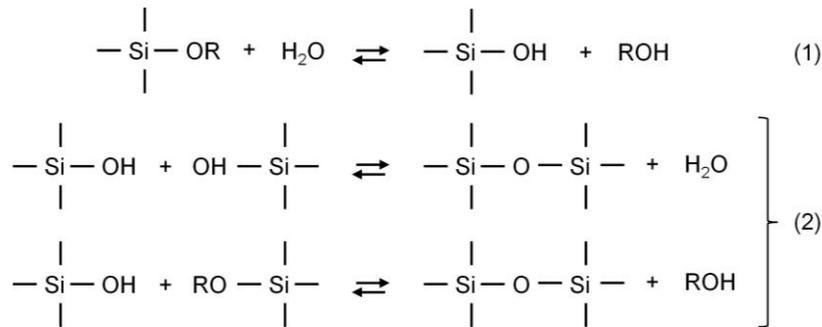


Figure 30. Réactions d'hydrolyse (1) et de condensation (2) d'un alcoxysilane conduisant à la formation de silice.

Stöber, Fink et Bohn ont été les premiers à synthétiser des NPs de silice sphériques, de taille contrôlée et de relativement faible dispersité [16]. L'hydrolyse-condensation de l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS – Si(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>), comme précurseur en milieu hydro-alcoolique (éthanol), est activée en milieu basique par ajout d'une quantité contrôlée d'ammoniaque, et conduit à des lots de particules faiblement dispersées d'un diamètre moyen d'une centaine de nanomètres à quelques microns. Ces tailles sont

obtenues en faisant varier, par exemple, la quantité de TEOS ou d'ammoniaque introduite.

Les protocoles, suivis lors de cette étude, sont tirés de la thèse de A. Désert [17], lui-même inspiré par les travaux de Hartlen *et al.*, qui ont montré l'avantage d'une synthèse en deux étapes [18] :

- étape 1 : synthèse de pré-germes de silice, en milieu diphasique sans alcool avec pour catalyseur un acide aminé ;
- étape 2 : croissance des pré-germes en SiO<sub>2</sub>-NPs de taille contrôlée.

### 2.2.1.2 Synthèse des pré-germes de silice

Un mélange diphasique de L-arginine et de conduit à des NPs de silice monodisperses de faible taille (environ 30 nm). Le TEOS constitue le précurseur moléculaire de la silice et la L-arginine, un acide aminé, garantit des conditions basiques douces (pH  $\approx$  9-10), réduisant ainsi la vitesse d'hydrolyse. Cette hydrolyse se déroule à l'interface entre la solution de TEOS et la solution aqueuse de L-arginine, limitant la concentration en pré-germes et générant ainsi une nucléation contrôlée. Le TEOS à divers stades d'hydrolyse diffuse alors lentement d'une phase dans l'autre, et la croissance des pré-germes est assurée par addition de matière. L'acide aminé introduit joue également le rôle de stabilisateur car il s'adsorbe à la surface des germes et en limite la croissance. Cette synthèse se déroule dans un récipient en verre à double paroi thermostaté à  $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  et sous agitation magnétique constante et faible (afin de ne pas perturber l'interface), jusqu'à consommation complète du TEOS (Figure 31-1).

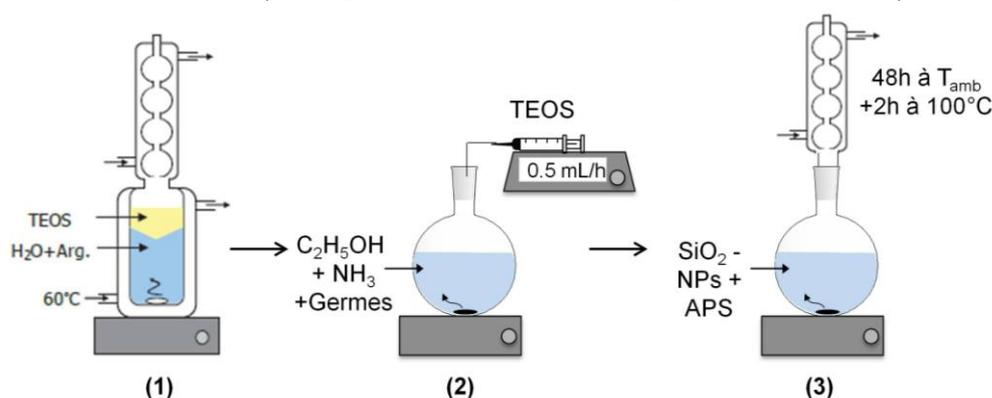


Figure 31. Protocole de synthèse des SiO<sub>2</sub>-NPs : 1) les pré-germes, 2) les SiO<sub>2</sub>-NPs de taille contrôlée et 3) les SiO<sub>2</sub>-NPs, fonctionnalisées, de charge positive.

### 2.2.1.3 Croissance ensemencée des germes de silice

Pour la croissance contrôlée des pré-germes, un milieu hydro-alcoolique contenant de l'éthanol et de l'ammoniaque est utilisé. Un petit volume de la suspension de pré-germes est introduit ainsi qu'un volume donné de TEOS.

Ce volume est déterminé en fonction de la taille finale souhaitée des NPs de silice, selon la formule suivante :

$$V_{TEOS} = \frac{M_{TEOS}\rho_{SiO_2}}{M_{SiO_2}\rho_{TEOS}} N_{Si} \frac{\pi}{6} (D_f^3 - D_i^3) \quad (15)$$

où  $M$  et  $\rho$  représentent respectivement les masses molaire et volumique,  $N_{Si}$  la concentration de la solution de pré-germes,  $D_f$  le diamètre final souhaité et  $D_i$  le diamètre initial des pré-germes.

Cette quantité est introduite de façon lente et continue via un pousse seringue automatique (à une vitesse de 0.5 mL/h) afin d'empêcher une nucléation secondaire (Figure 31-2).

### 2.2.1.4 Fonctionnalisation des SiO<sub>2</sub>-NPs

Afin d'étudier la dépendance de l'interaction NPs – bactéries vis-à-vis du paramètre charge, les NPs de silice, chargées négativement, ont été fonctionnalisées. La fonctionnalisation consiste à greffer sur les NPs un aminosilane, dont le groupement NH<sub>2</sub> confèrera à la NP une charge surfacique positive. L'aminopropyl triéthoxysilane (APS) a été choisi. Son taux de greffage maximal sur une NP de silice est estimé à 6 µmol/m<sup>2</sup>. Il est alors introduit en excès (six équivalents par rapport à la quantité de NPs disponibles) dans un volume de solution de NPs déjà synthétisées dans un mélange éthanol-ammoniaque. Le tout est agité dans un bain marie pendant 48 h à température ambiante, puis 2 h à 100 °C (Figure 31-3). La solution est, par la suite, centrifugée (8 000 g, 10 min.) au cours de 6 cycles, le surnageant étant remplacé 3 fois par de l'éthanol et 3 fois par de l'eau ultrapure [19].

## 2.2.2 Caractérisations des SiO<sub>2</sub>-NPs

Qu'elles soient commerciales ou synthétisées, les NPs ont été caractérisées par microscopie électronique à transmission (MET) et diffusion dynamique de la lumière (DLS pour *dynamic light scattering*), méthodes complémentaires pour la détermination précise du diamètre moyen des particules et de la dispersité de la solution. Elles sont également caractérisées par zétamétrie afin de déterminer leur charge surfacique.

### 2.2.2.1 Caractérisation par MET

#### Principe

Afin de repousser la limite de résolution des systèmes optiques classiques, due à la diffraction de la lumière visible, l'utilisation des électrons (dont la longueur d'onde n'est plus le facteur limitant) est suggérée au début du XX<sup>ème</sup> siècle. En 1932, le principe de la MET voit le jour, grâce aux travaux de Max Knoll et Ernst Ruska [20]. Le MET est basé sur l'interaction d'un faisceau d'électrons accélérés avec un

échantillon extrêmement mince (épaisseur inférieure à la centaine de nanomètres) sur lequel il est focalisé. L'image alors obtenue est fonction des différences de densité et/ou composition chimique au sein de l'échantillon et présente une résolution pouvant atteindre 0.2 nm.

Lorsque les électrons entrent en contact avec l'échantillon, ils peuvent être diffusés, absorbés, transmis ou diffractés. Le faisceau transmis est utilisé en mode « image » classique : seuls les électrons non diffractés sont mis à contribution, les zones diffractantes apparaissant alors sombres. Quant aux électrons diffractés, ils sont utilisés en mode « diffraction », permettant la caractérisation d'échantillons, cristallographiques notamment ; ce mode n'a pas été utilisé dans notre étude.

### Matériel et traitement des clichés

Le MET a été utilisé dans son mode « image » le plus simple afin de déterminer la distribution en taille des NPs. Les NPs, diluées dans de l'eau ultrapure à une concentration de 0.1 g/L, sont déposées ( $V = 5 \mu\text{L}$ ) sur une grille MET en cuivre recouverte d'un film de carbone (200 mesh), préalablement passée à l'UV-ozone afin de la rendre plus hydrophile. L'échantillon est observé avec un microscope JEOL JEM 1400 Plus de l'UMS Placamat.

Le diamètre moyen (Figure 32a) et la dispersité des NPs sont déterminés, à partir d'un ensemble de clichés MET, grâce au logiciel ImageJ, qui, par des traitements successifs, permet de filtrer, normaliser, segmenter par seuillage et binariser les clichés.

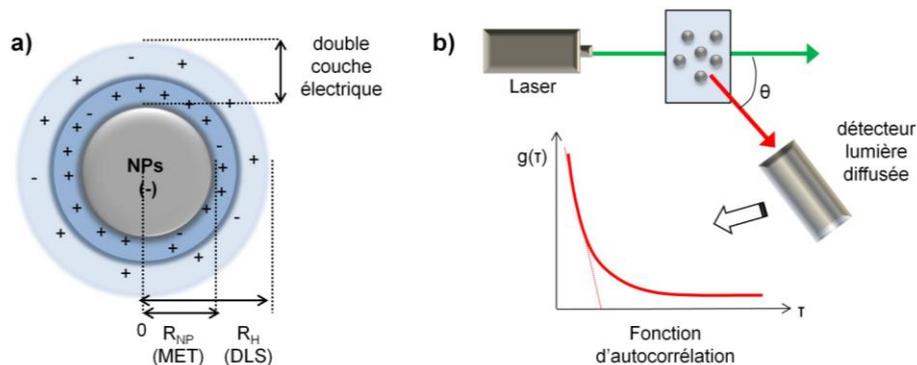


Figure 32. a) Représentation des rayons associés à la caractérisation MET et DLS pour une suspension colloïdale. b) Principe de fonctionnement de la DLS.

### 2.2.2.2 Caractérisation par DLS

#### Principe

La diffusion DLS donne accès au diamètre hydrodynamique<sup>4</sup>,  $D_H$ , des particules (Figure 32a) [21]. Un faisceau laser est dirigé à travers la solution colloïdale de NPs. Le mouvement aléatoire brownien des particules engendre alors la diffusion du faisceau à

<sup>4</sup> Le diamètre hydrodynamique représente la taille de la particule en suspension. Il tient donc compte des ions et contre-ions présents autour de la particule, formant la double couche électrique.

différentes intensités (Figure 32b). Le signal peut être interprété sous forme d'une fonction d'autocorrélation  $g$  qui pour un système relativement monodisperse s'écrit :

$$g(\tau) = \exp(-2Dq^2\tau) \quad (16)$$

$$\text{avec } q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (17)$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion,  $q$  le vecteur de diffusion,  $n$  l'indice de réfraction du solvant,  $\lambda$  la longueur d'onde du laser et  $\theta$  l'angle de diffusion.

Connaissant les propriétés de viscosité et de réfraction du solvant et des particules étudiées, il est possible de déterminer le diamètre  $D_H$  des NPs par la relation de Stokes Einstein :

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (18)$$

où  $\eta$  est la viscosité du solvant et  $T$  la température de mesure.

Les manipulations de DLS ont été réalisées sur un appareil Zetasizer Nano ZS de chez Malvern, à l'ICMCB. Certaines expériences de DLS ont également été réalisées au LOMA, dans l'équipe du Pr. Hamid Kellay ainsi qu'au CRPP, dans l'équipe du Dr. Jean-Paul Chapel.

### Distributions en taille des NPs

Les SiO<sub>2</sub>-NPs sont caractérisées par une distribution en taille,  $\Phi$ , témoignant d'un écart à la monodispersité « parfaite », comme mentionné précédemment. La DLS fournit cette distribution selon trois types :

- la **distribution en nombre** qui montre le nombre de particules dans un pas de taille donné ;
- la **distribution en volume** qui montre le volume ( $\propto \Phi^3$ ) total de particules dans un pas de taille donné ;
- la **distribution en intensité** qui montre l'intensité ( $\propto \Phi^6$ ) totale de lumière diffusée dans un pas de taille donné.

La distribution en intensité aura donc tendance à mettre en avant les particules de tailles importantes tandis que la distribution en nombre privilégiera les plus petites particules. Bien qu'illustrant une même réalité physique, ces distributions peuvent donner des résultats légèrement différents, d'autant plus si la solution est polydisperse. Il est donc pertinent et intéressant de croiser et confronter les résultats de la DLS et du MET, d'autant plus que la DLS fournit le rayon hydrodynamique (incluant les premières sphères de coordination) et non le rayon de la NP nue.

### 2.2.2.3 Caractérisation par zétamétrie

#### Principe

Le potentiel zêta,  $\zeta$ , représente la charge d'une particule au niveau de la double couche électrique entraînée avec elle lors de son déplacement en solution (Figure 33a). Il est donc un indicateur essentiel de la stabilité d'une solution de particules.

Expérimentalement, un champ électrique  $E$  est appliqué sur la solution de particules, qui se mettent alors en mouvement, leur mobilité électrophorétique,  $\mu$ , étant mesurée par DLS.

Le décalage de fréquence  $\nu$ , dû à l'effet Doppler, qui existe entre le faisceau de référence et le faisceau diffusé permet de déterminer la mobilité des particules (Figure 33b) :

$$\mu = \frac{2\pi\nu}{EK \cos \theta} \quad (19)$$

où  $K$  est l'amplitude du vecteur de diffusion et  $\theta$  l'angle de diffusion.

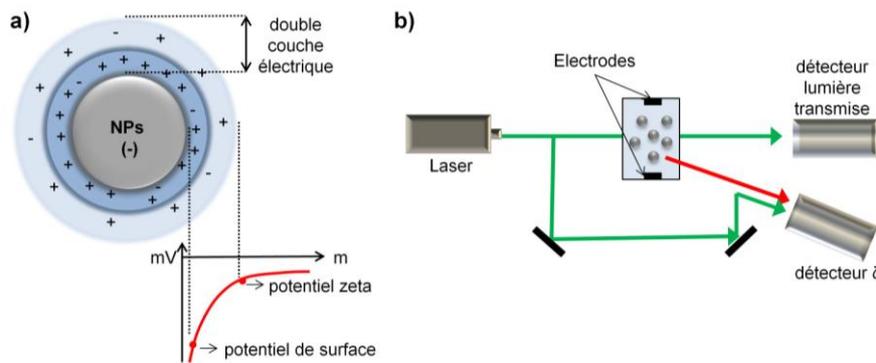


Figure 33. a) Représentation des potentiels associés aux couches d'ions entourant le cœur de la NP. b) Principe de fonctionnement de la zétamétrie.

Un modèle, généralement celui de Smoluchowski (double couche d'épaisseur faible devant la courbure de la particule), permet alors de calculer le potentiel zêta à partir de la mobilité électrophorétique, connaissant la constante diélectrique du milieu  $\epsilon_r$  et sa viscosité  $\eta$  :

$$\zeta = \frac{\eta}{\epsilon_0 \epsilon_r} \mu \quad (20)$$

Plus la valeur absolue de  $\zeta$  est élevée, plus les répulsions sont fortes et donc l'état d'agrégation minimal. Ces répulsions dépendent fortement du milieu, notamment de la présence de certains ions ( $H^+$ ,  $OH^-$  ...). Ainsi, afin de caractériser la stabilité d'une solution, il est usuel de mesurer son potentiel zêta en fonction du pH. En fonction de la nature des NPs, on distingue deux paramètres importants correspondant à la valeur du pH pour laquelle le potentiel zêta s'annule :

- le point isoélectrique (PIE) qui traduit un équilibre entre charges positives et charges négatives en surface des NPs ;

- le point de charge nulle (PCN) qui traduit l'absence complète de charges en surface. C'est le cas pour la silice où au PCN la sphère de coordination de chaque atome de silicium est complétée par des groupements OH (d'où l'absence de charge).

## 2.3 Préparation et caractérisation des systèmes bactériens

Les méthodes de caractérisation et les protocoles associés à l'étude de nos systèmes bactériens sont détaillés ici. Excepté l'étude AFM réalisée au LOMA, l'ensemble de ces caractérisations a été réalisé dans l'Unité Mixte de Recherche Université de Bordeaux – INRA Biologie du Fruit et Pathologie.

### 2.3.1 Souches

Deux bactéries modèles ont été étudiées : (1) *Escherichia coli*, *E. coli* (Gram négative) : la souche MRE 162 nous a été fournie par la DGA ; (2) *Bacillus subtilis*, *B. subtilis* (Gram positive) : BS 5262. Les détails sur la caractérisation propre à ces deux systèmes feront l'objet du chapitre 3.

### 2.3.2 Etude de viabilité des bactéries

Le protocole est ici décrit de manière générale, sans s'attacher aux caractéristiques propres à *E. coli* ou *B. subtilis*. Ainsi le solvant ne sera notamment pas mentionné (cf. chapitre 3).

#### 2.3.2.1 Préparation des suspensions de bactéries

Une culture fraîche de bactéries est réalisée en ensemençant au 100<sup>ème</sup> dans du milieu nutritif *Luria Broth* (LB)<sup>5</sup> des colonies obtenues auparavant sur milieu gélosé. La multiplication cellulaire est suivie en mesurant, en temps réel, la densité optique (DO) de la suspension à 600 nm (Figure 34a). L'évolution de cette DO se fait en trois étapes [22] :

- Une phase de latence (I) : il s'agit du temps nécessaire aux bactéries pour synthétiser les enzymes nécessaires à leur croissance dans le milieu. Ce temps, pendant lequel le taux de croissance est donc nul, dépend de la phase de croissance des bactéries initialement inoculées et de l'environnement.
- Une phase exponentielle (II) : le taux de croissance est maximal et le taux de mortalité quasi nul.

---

<sup>5</sup> Le milieu LB se compose de 10 g de peptone, 5 g d'extraits de levure et 10 g de NaCl, le tout dilué dans un litre d'eau distillée.

- Une phase stationnaire (III) : le taux de croissance est nul, les bactéries se multiplient encore compensant celles qui meurent.

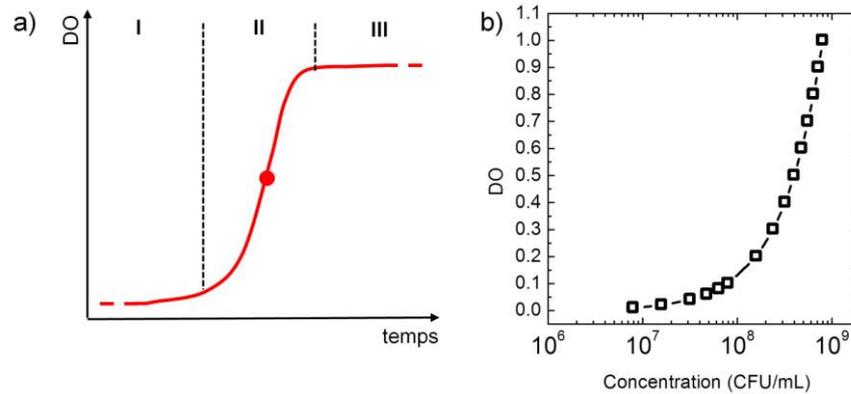


Figure 34. a) Courbe théorique de croissance d'une suspension bactérienne, suivie par mesure de DO. Les phases I, II et III correspondent aux phases de latence, exponentielle et stationnaire respectivement. b) Courbe d'étalonnage de *E. coli* montrant la correspondance entre la DO et la concentration cellulaire en CFU/mL ([www.genomics.agilent.com](http://www.genomics.agilent.com)).

Ces DO correspondent à une concentration cellulaire, propre à chaque bactérie et souche. La Figure 34b présente la courbe d'étalonnage d'une souche de *E. coli*. Notre souche ne présentant pas de caractéristique morphologique singulière, nous avons appliqué la correspondance entre DO et concentration, issue du site : [www.genomics.agilent.com](http://www.genomics.agilent.com).

Pour l'ensemble des expériences, les bactéries sont récupérées en phase exponentielle (DO  $\approx$  0.6) afin d'avoir un maximum de cellules viables. La suspension de bactéries est alors centrifugée (3000 g, 4 °C, 6 min.) et remise en suspension dans une solution aqueuse appropriée pour obtenir une DO finale de 0.01.

### 2.3.2.2 Principe de l'étude de viabilité

L'estimation du nombre de bactéries repose sur une technique simple et directe consistant à déterminer le nombre d'unités bactériennes formant des colonies (*colony forming units* ou CFU) à partir d'un prélèvement de la suspension bactérienne. Elle permet également d'estimer la viabilité des bactéries.

Expérimentalement, des dilutions successives au dixième d'une suspension bactérienne concentrée sont effectuées et 100  $\mu$ L de chaque dilution sont étalés sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB agar 1.5 %. Les boîtes sont mises à l'étuve à 37 °C pendant une nuit afin de permettre la multiplication des bactéries et la formation des colonies (Figure 35).

Une bactérie donne naissance, par divisions successives, à une colonie, comportant un très grand nombre de bactéries plus ou moins agrégées. Il suffit alors de compter le nombre de CFU,  $C$ , sur chacune des boîtes, à une dilution  $10^x$ , pour estimer le nombre,  $N$ , de bactéries présentes dans la suspension :

$$N = 10^x C \quad (21)$$

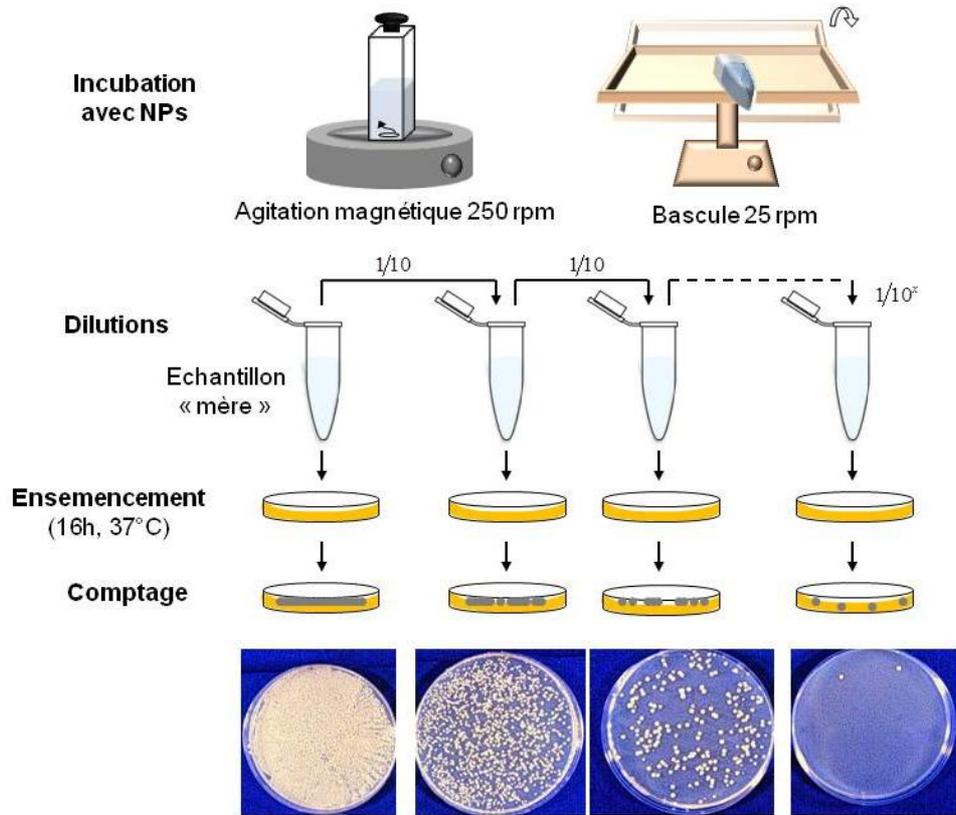


Figure 35. Illustration du protocole de mise en œuvre des études de viabilité d’une population de bactéries (traitée ou non par des NPs). Les images illustrent la culture sur boîtes de Pétri des suspensions bactériennes suivant leur dilution et mettent en évidence la formation des CFU (<http://technoquinscience.blogspot.fr>).

Dans le contrôle (suspension non traitée par des NPs),  $N_{\text{contrôle}}$  sera théoriquement égal au nombre de cellules initiales (à une  $DO = 0.01$ ) tandis que les suspensions traitées présenteront potentiellement un  $N$  différent de  $N_{\text{contrôle}}$ .

### 2.3.2.3 Test de susceptibilité vis-à-vis des NPs

Les NPs, précédemment traitées par ultra-sons (10 min. - afin de réduire la présence d’agrégats), sont introduites dans la suspension bactérienne ( $DO_{600} = 0.01$ ) à une concentration finale de 1 g/L, dans un volume final de 500  $\mu\text{L}$ . Aussi, les volumes de NPs introduits dépendent des concentrations initiales des suspensions colloïdales des diverses NPs. Les bactéries ainsi traitées sont incubées à température ambiante (20 °C) pendant 2 h ou 24 h. Ces temps d’incubation ont été choisis afin d’estimer (i) le moment d’apparition de potentiels effets cytotoxiques des NPs et (ii) la potentielle modification temporelle de ces dits effets. L’interaction peut être étudiée :

- **sans agitation** : les suspensions dans des microtubes sont placées sur une bascule à 25 tours/min. (mouvements selon x et z) ;
- **avec agitation** : les suspensions dans des cuves en verre sont placées sous agitation magnétique à 250 tours/min.

A la fin de la période d'incubation, le pouvoir bactéricide des NPs est estimé par dénombrement des bactéries, selon la méthode exposée ci-avant (Figure 35).

Deux à trois expériences indépendantes sont réalisées et deux réplicats techniques sont effectués sur chacune des dilutions, servant au comptage.

### **2.3.3 Observations en champ noir**

En fond noir, seule la lumière déviée produit l'image. Le support de préparation, ne diffusant généralement pas la lumière, apparaît noir et seuls les objets présents sur l'échantillon apparaissent lumineux. Ainsi, la microscopie en fond noir permet une exacerbation du contraste alors que ce dernier est, parfois, un facteur limitant en microscopie classique à fond clair.

Cette technique a été utilisée, au cours de ces travaux, afin de déterminer rapidement l'état des bactéries avant et après incubation avec les NPs, notamment lors des tests de viabilité. En effet, sa résolution nous permet de connaître l'état général de la population, de distinguer la forme des bactéries et les NPs quand leur diamètre le permet. Mais elle est insuffisante pour obtenir davantage de détails sur les conséquences de l'interaction.

Ces observations sont réalisées à l'INRA avec un microscope Eclipse Ni (Nikon) équipé d'un condenseur et d'un objectif Achromat 40x/0.65 (Nikon). Les images sont acquises par une caméra Nikon DS-Qi1Mc et traitées par le logiciel NIS Elements.

### **2.3.4 Préparations pour l'étude AFM**

La résolution de l'AFM et les informations à la fois morphologiques et rhéologiques auxquelles elle donne accès (cf. section 1), sont autant d'atouts pour étudier les bactéries et leurs interactions avec des NPs. Ci-après est décrit le protocole de préparation des différents systèmes pour leur observation par AFM.

#### **2.3.4.1 Suspension bactérienne ( $\pm$ NPs)**

Les bactéries sont issues de cultures sur milieu gélosé dans des boîtes de Pétri. Après une nuit à 37 °C, quelques colonies de bactéries sont dispersées dans 1 mL de solvant approprié (déterminé selon la souche bactérienne - cf. chapitre 3). La suspension est utilisée dans la journée : pour chaque expérience, une nouvelle suspension est effectuée.

Afin d'étudier l'interaction NPs-bactéries, une suspension est préparée en mélangeant un volume équivalent de bactéries et de suspension de NPs (à la concentration désirée). Une agitation manuelle est exercée 3 à 4 fois durant l'incubation de 2 h (Figure 36).

### 2.3.4.2 Dépôts des suspensions bactériennes ( $\pm$ NPs)

#### Dépôt sur mica nu

Si les observations sont réalisées à l'air, il n'est pas nécessaire d'immobiliser les bactéries qui sont alors directement déposées sur le substrat de mica nu. Plus précisément, 5  $\mu$ L de la suspension bactérienne ( $\pm$  NPs) sont déposés sur la surface de mica nu, préalablement clivé (Figure 36).

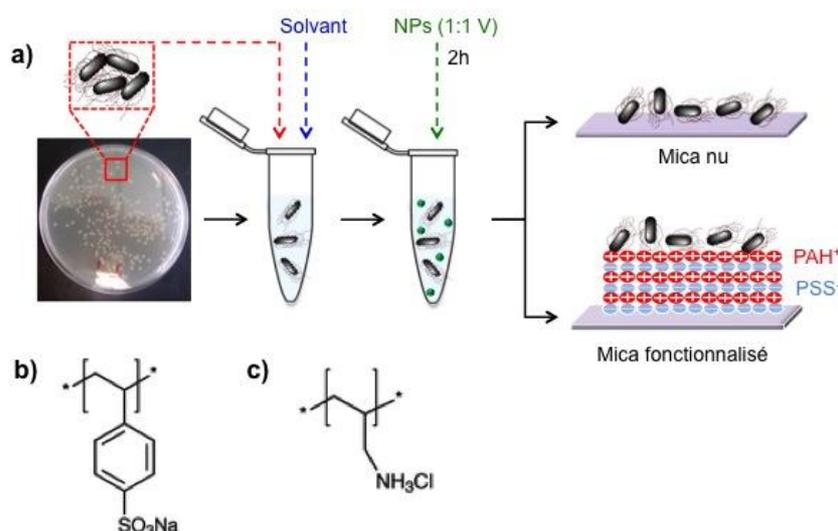


Figure 36. a) Protocoles de dépôts des suspensions bactériennes (avec ou sans NPs) sur mica nu ou fonctionnalisé par une multicouche de polyélectrolytes (PEM) selon la nécessité d'immobiliser les systèmes ; b-c) formules chimiques des polyélectrolytes PSS et PAH respectivement.

#### Dépôt sur mica fonctionnalisé – Immobilisation requise

Dans le cas d'observations dans un milieu liquide, les bactéries doivent être immobilisées afin de prévenir tout mouvement éventuel de "flottaison". 5  $\mu$ L de la suspension bactérienne ( $\pm$  NPs) sont déposés sur du mica fonctionnalisé préalablement par des polyélectrolytes (Figure 36). En effet, Gammoudi *et al.* ont montré l'efficacité d'une multicouche de polyélectrolytes (PEM) pour l'immobilisation de *E.coli*, dans le cadre de la conception d'un biocapteur pour la détection de métaux lourds [23]. La fonctionnalisation du support consiste à déposer alternativement, par la méthode *Layer by Layer*, des couches de poly-allylamine hydrochloride, PAH (chargée positivement), et de polystyrène-sulfonate, PSS (chargée négativement), les deux solutions de polyélectrolytes ayant une concentration de 0.5 g/L. Les étapes d'adsorption et de rinçage sont répétées trois fois. Une dernière couche de PAH est déposée afin de garantir l'immobilisation des bactéries, par interaction électrostatique, les bactéries étant chargées négativement et le PAH positivement.

L'inconvénient majeur de cette méthode réside dans la hauteur de la PEM. En effet, ces polyélectrolytes forment un ensemble d'agrégats d'une hauteur non négligeable (plusieurs dizaines de nanomètres), gênant quand il s'agit d'étudier l'interaction de NPs

de faible taille avec les bactéries ou d'obtenir des contrastes nets en phase. Aussi, avons-nous optimisé le protocole de dépôt de la PEM par *spin coating* (cf. chapitre 5).

## 2.4 Elaboration du biocapteur

Outre l'étude fondamentale de l'interaction NPs / bactéries, cette thèse vise également à concevoir un biocapteur, pour la détection de bactéries *via* la méthode d'amplification par des NPs. Afin de répondre à cet objectif, notre choix s'est porté sur l'immobilisation d'anticorps (biorécepteur) à la surface de NPs fixées sur un transducteur électrochimique (Figure 37).

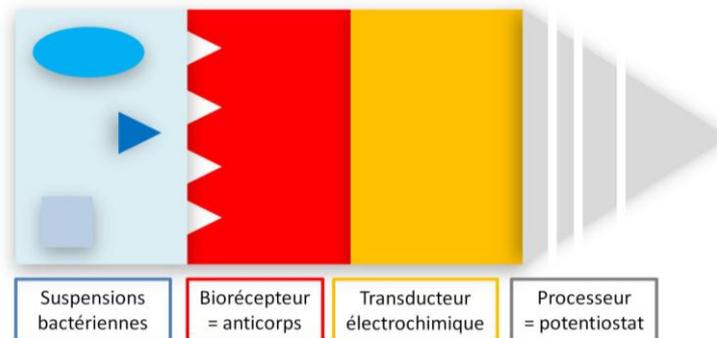


Figure 37. Vue générale du biocapteur.

Les techniques utilisées (électrochimie, voltamétrie cyclique et microbalance à quartz) pour la validation de cette conception sont décrites ci-après. De plus, le protocole de mise en œuvre du biocapteur est également succinctement présenté.

### 2.4.1 Notions d'électrochimie

Dans cette partie, les bases nécessaires à la compréhension de la détection par le biocapteur des bactéries, par électrochimie, issues du livre de Bard et Faulkner [24], seront détaillées. L'électrochimie s'intéresse aux processus de transfert d'électron à l'interface électrolyte / électrode au cours desquels le transport de charge inverse est assuré par le mouvement des ions constituant le sel de fond.

#### 2.4.1.1 Les réactions chimiques

Considérons une solution contenant un couple oxydo-réducteur, Ox/Red, se comportant de façon idéale, telle que, lors du transfert d'électron, nous ayons :



où  $k_a$  et  $k_c$  sont les constantes de vitesse de transfert de charges pour les processus d'oxydation et de réduction respectivement. L'oxydation se déroulant à l'anode et la réduction à la cathode, il est usuel d'utiliser les indices  $a$  et  $c$  pour les deux processus.

Le potentiel  $E$  de la solution est défini par la loi de Nernst :

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \log \frac{C_{Ox}^{Sol}}{C_{Red}^{Sol}} \quad (23)$$

où  $E^0$  est le potentiel normal apparent caractéristique du système,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température (en Kelvin),  $F$  la constante de Faraday,  $C_{Ox}^{Sol}$  et  $C_{Red}^{Sol}$  les concentrations en solution des espèces Ox et Red respectivement.

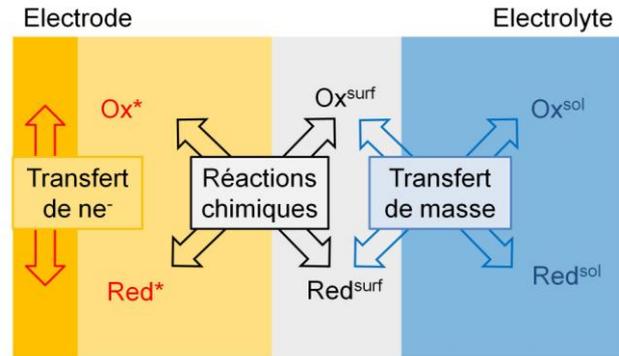


Figure 38. Transport de masse et de charge lors d'une réaction électrochimique à l'interface électrode / électrolyte.

Lorsqu'une électrode est plongée dans cette solution, elle adopte le potentiel d'équilibre déterminé ci-dessus,  $E = E_{eq}$ . Si un surpotentiel  $\eta$ , tel que  $\eta = E - E_{eq}$ , lui est appliqué alors un courant traverse l'électrode et une réaction électrochimique se produit (Figure 38), issue :

- du transfert de charge, ayant lieu à l'interface électrode / électrolyte,
- d'un transfert de masse entre les espèces présentes à l'interface et celles en solution.

### Transfert électronique

Le courant  $I$  résultant de la réaction électrochimique entre l'oxydant (ou le réducteur) présent à la surface de l'électrode et l'électrode traduit la vitesse globale de la réaction. Il est défini par l'expression :

$$\frac{I}{nFA} = \frac{j}{nF} = k_a C_{Red}^* - k_c C_{Ox}^* \quad (24)$$

où  $A$  est l'aire de l'électrode,  $j$  la densité de courant,  $C_{Ox}^*$  et  $C_{Red}^*$  les concentrations à la surface de l'électrode des espèces Ox et Red respectivement.

Sachant que les constantes de vitesse de transfert de charge obéissent à la loi d'Arrhenius<sup>6</sup> et en tenant compte de l'activité faradique et de l'imposition d'une

<sup>6</sup> Cette loi décrit la variation de la vitesse d'une réaction chimique,  $k$ , en fonction de la température,  $T$ , selon la relation :  $k = A e^{\frac{-E}{RT}}$  où  $A$  est un facteur pré-exponentiel,  $E$  l'énergie d'activation et  $R$  la constante des gaz parfaits.

surtension  $\eta$ , la relation entre le courant  $I$  et le potentiel  $E$ , peut être déterminée. Plus précisément, la loi de Butler-Volmer lie la densité de courant à la surtension :

$$j = j^0 \left[ \left( \frac{C_{Red}^*}{C_{Red}^{Sol}} \exp \left( \frac{(1-\alpha)nF}{RT} \eta \right) - \frac{C_{Ox}^*}{C_{Ox}^{Sol}} \exp \left( \frac{-\alpha nF}{RT} \eta \right) \right] \quad (25)$$

où  $j^0$  est la densité de courant à l'équilibre et  $\alpha$  le coefficient de transfert de charge ( $0 < \alpha < 1$ ), deux constantes pouvant être obtenues expérimentalement.

Les concentrations  $C_{Ox}^*$  et  $C_{Red}^*$  sont, ici, inconnues mais peuvent être obtenues par analyse du transport de matière qui s'effectue entre l'électrode et l'électrolyte.

### Transfert de matière

Dans le cas d'une solution immobile et en présence d'un électrolyte support<sup>7</sup>, la migration et la convection sont négligeables, seule la diffusion est à prendre en compte pour le transport de masse. Dans ce cas, et considérant une variation de concentration en espèces uniquement perpendiculaire à l'électrode (axe  $x$  ci-après), les équations de Fick s'appliquent :

$$\frac{j}{nF} = -D_{Ox} \left( \frac{\partial C_{Ox}}{\partial x} \right)_{x=0} = D_{Red} \left( \frac{\partial C_{Red}}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (26)$$

$$\frac{\partial C(x)}{t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (27)$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) de l'espèce électroactive (Ox ou Red).

Les conditions aux limites, valables pour l'oxydant et le réducteur, sont :

$$\begin{aligned} C(x, 0) &= C^{Sol} \\ C(\infty, t) &= C^{Sol} \end{aligned} \quad (28)$$

Après intégration, le profil de concentration (Ox ou Red) s'écrit :

$$C^* = C^{Sol} - \frac{1}{nF(\pi D)^{1/2}} \int_0^t \frac{j(\tau)}{(t-\tau)^{1/2}} d\tau \quad (29)$$

Ainsi les lois de Butler-Volmer et de Fick permettent de déterminer la loi  $I=f(E)$  et les concentrations à proximité de l'électrode.

<sup>7</sup> Un électrolyte support est un sel ajouté en quantité suffisante pour négliger le courant de migration des espèces étudiées en solution.

### 2.4.1.2 La voltamétrie cyclique

#### Rappel sur la voltamétrie linéaire

Les caractéristiques des courbes courant-potential sont obtenues, en voltamétrie linéaire, en appliquant au système électrode-solution un potentiel variant linéairement avec le temps :

$$E = E_i \pm vt \quad (30)$$

où  $v$  est la vitesse de balayage (mV/s) du potentiel à partir du potentiel initial  $E_i$ .

Dans le cas d'un système rapide où la vitesse de diffusion de l'espèce considérée est négligeable devant la vitesse standard d'échange d'électrons, l'équation de Nernst donne :

$$\frac{C_{Ox}^*}{C_{Red}^*} = \exp\left(\frac{nF}{RT}(E - E^0)\right) \quad (31)$$

Si Ox est seul présent en solution, l'intégration des équations de Fick conduit à l'expression de la densité de courant :

$$j = -nFC_{Ox}^{Sol}(\pi D_{Ox})^{\frac{1}{2}} \left(\frac{nF}{RT}v\right)^{\frac{1}{2}} \chi(\sigma t) \quad (32)$$

où  $\chi$  est une fonction de  $E$ , calculée numériquement pour des valeurs de  $(E-E_{1/2})$  avec  $E_{1/2}$  le potentiel de demi-vague<sup>8</sup>.

La variation de  $j$  selon  $(E-E_{1/2})$  se présente sous la forme d'un pic dont le potentiel,  $E_p$ , et l'intensité,  $j_p$ , sont :

$$\left|E_p - E_{1/2}\right| = \frac{28}{n} \text{ mV à } 25^\circ\text{C} \quad (33)$$

$$j_p(\text{rap}) = -(2,69 \times 10^5)n^{3/2}D_{Ox}^{1/2}v^{1/2}C_{Ox}^{Sol} \quad (34)$$

Dans le cas d'un système quasi-rapide<sup>9</sup>, si Ox est seul présent en solution, la réaction inverse de réduction doit être prise en compte dans la loi de Butler-Volmer.

La relation  $j = f(E)$  fait alors intervenir un paramètre adimensionnel  $\Lambda$  :

$$\Lambda = \frac{k^0}{\left(D_{Ox}^{1-\alpha}D_{Red}^{\alpha}\left(\frac{nF}{RT}\right)v\right)^{1/2}} \quad (35)$$

où  $k^0$  est la constante standard d'échange électronique.

<sup>8</sup> Le potentiel de demi-vague,  $E_{1/2}$ , correspond au potentiel où  $j = j_{\text{max}}/2$ .

<sup>9</sup> Un système quasi-rapide est un système intermédiaire entre le système rapide, où la vitesse de diffusion d'une espèce est négligeable devant celle des échanges d'électrons, et le système lent, où la vitesse d'échange électronique est négligeable devant la diffusion de l'espèce.

La densité de courant du pic s'écrit alors :

$$j_p = j_p(\text{rap}) K(\Lambda, \alpha) \quad (36)$$

où  $K$  est une fonction de  $\alpha$  et  $\Lambda$ . Il en résulte que  $j_p$  varie avec la vitesse de balayage du potentiel mais n'est plus proportionnelle à  $v^{1/2}$ .

### La voltamétrie cyclique

En voltamétrie cyclique, un cycle de potentiel triangulaire est effectué : les balayages aller et retour se font entre les mêmes bornes de potentiel  $[E_i ; E_f]$ , à la vitesse  $v$  et  $-v$  respectivement (Figure 39a).

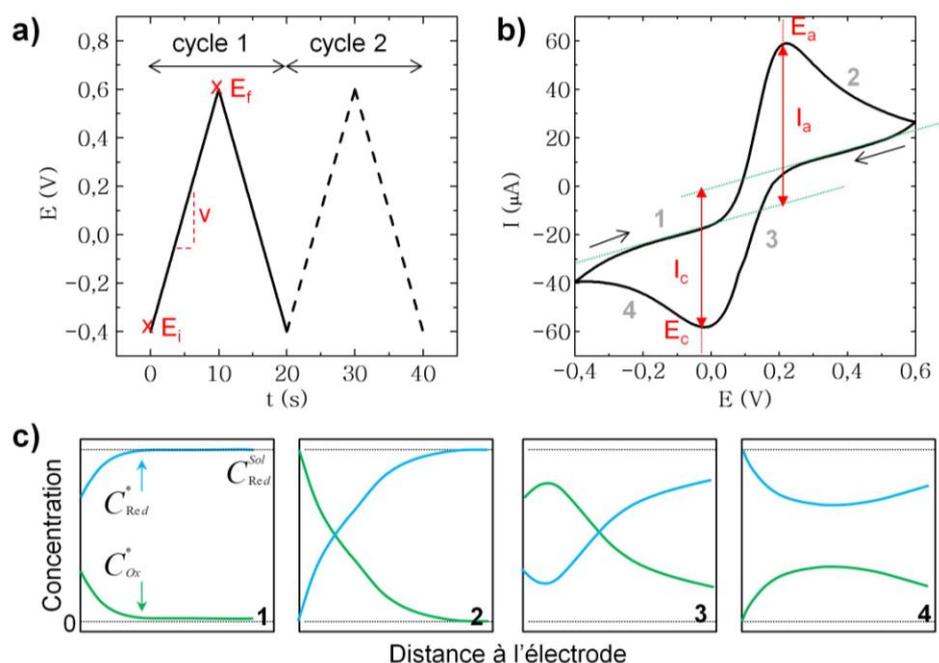


Figure 39. La voltamétrie cyclique. a) Variation linéaire du potentiel dans le temps suivant un aller-retour. b) Courbe typique de voltamétrie cyclique, mentionnant la détermination des intensités et potentiels des pics d'oxydation ( $E_a$ ,  $I_a$ ) et de réduction ( $E_c$ ,  $I_c$ ). c) Variation des concentrations  $C_{Ox}^*$  et  $C_{Red}^*$  en fonction de la distance à l'électrode aux points 1 à 4 mentionnés en (b).

La théorie présentée ci-dessus pour un balayage linéaire s'applique. Toutefois, le balayage « aller » modifie la composition de l'électrolyte en espèces Ox et Red : les flux de diffusion sont tributaires du temps écoulé depuis le début du balayage et de la capacité du système à transformer complètement ou non les espèces oxydées en espèces réduites. Ainsi, le balayage « retour » est dépendant de l'état de la solution au potentiel d'inversion,  $E_f$  ; son allure peut alors être différente de celle du balayage « aller ».

La courbe  $I = f(E)$ , ou voltamogramme cyclique (CV), décrit un cycle présentant un pic d'oxydation et un pic de réduction pour le balayage « aller et retour » respectivement (Figure 39b). Le pic d'oxydation est décrit par un couple ( $I_a$ ,  $E_a$ ) tandis

que le pic de réduction l'est par le couple ( $I_c$ ,  $E_c$ ), ces couples étant définis en Figure 39b.

La Figure 39c présente les profils de concentration des espèces électroactives dans la couche de diffusion en différents points du voltamogramme cyclique. Au départ, seule l'espèce Ox est présente en solution, l'espèce Red étant absente (1). Lorsque le potentiel appliqué est augmenté, la réaction de réduction se produit et induit une inversion des profils de concentration : l'espèce Red est majoritaire à l'électrode et peu présente dans la solution (2). Lors du balayage retour, les espèces coexistent à l'électrode et dans la solution (3) jusqu'à ce que le potentiel initial soit atteint et que Ox redevienne l'espèce majoritaire à l'électrode (4). Les caractéristiques d'un tel voltamogramme sont reportées dans le Tableau 3 pour des systèmes rapide et quasi-rapide. Elles permettent, en pratique, de déterminer la réversibilité des réactions électrochimiques et la rapidité du système étudié.

Tableau 3. Caractéristiques des voltamogrammes cycliques, en termes de densité de courant et de potentiel, pour un système rapide ou quasi-rapide.

	$j$	$j_a / j_c$	$E$	$\Delta E = E_a - E_c$
Système rapide	Varie avec $v^{1/2}$	$= 1$	Indépendant de $v$	$= 56,5/n$ mV Indépendant de $v$
Système quasi-rapide	Augmente avec $v$	$\neq 1$	$E_c$ se déplace vers les valeurs négative lorsque $v$ augmente	$> 56,5/n$ mV Augmente avec $v$

## 2.4.2 La microbalance à quartz

Outre la voltamétrie cyclique, la conception de notre biocapteur pour la détection de bactéries a nécessité la validation de certaines étapes de fonctionnalisation par un capteur gravimétrique, la microbalance à cristal de quartz (QCM).

La QCM est un outil basé sur les propriétés piézoélectriques du quartz [25]. Lorsqu'un champ électrique alternatif est appliqué convenablement (fréquence et orientation appropriées) à la lame de quartz, celle-ci se met à vibrer dans un mode de résonance mécanique. L'amplitude maximale de vibration est obtenue pour une fréquence,  $f_0$ , appelée fréquence de résonance du quartz. En pratique, les deux faces de la lame de quartz sont recouvertes par un dépôt conducteur, les électrodes. Celles-ci permettent l'application d'une différence de potentiel alternative qui maintient le quartz en vibration. Le comportement électromécanique du résonateur, plongé dans une solution, peut alors être représenté par le schéma de la Figure 40a.

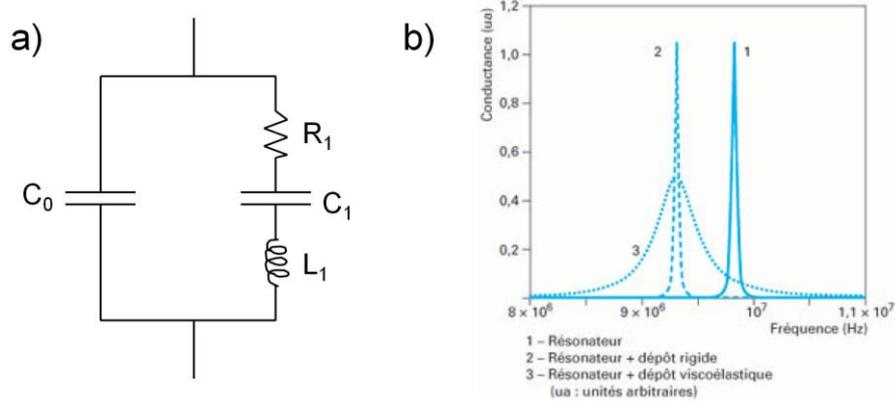


Figure 40. a) Schéma électrique simplifié du comportement électromécanique de la QCM lorsqu'elle est plongée dans une solution. b) Effet de la présence d'un dépôt rigide (courbe 2) ou viscoélastique (courbe 3) sur le comportement fréquentiel et conductif du résonateur (courbe 1) [25].

La capacité  $C_0$  traduit la réponse diélectrique du quartz tandis que le circuit  $R_1L_1C_1$  traduit les propriétés électromécaniques du quartz en contact avec un milieu donné. Ce circuit tient compte (i) des propriétés du quartz seul, (ii) des propriétés du dépôt réalisé en surface et (iii) des propriétés de la solution dans laquelle le résonateur est plongé. La fréquence de résonance du quartz est liée à ces caractéristiques par la relation :

$$f_0 = \frac{1}{2\pi\sqrt{L_1C_1}} \quad (37)$$

Ainsi, la présence d'un dépôt rigide à la surface du résonateur se traduit par un décalage du pic de résonance (Figure 40b). Dans le cas d'un dépôt viscoélastique, des pertes d'énergie surviennent à la surface du résonateur et se manifestent, outre le décalage en fréquence, par un amortissement et un élargissement du pic.

L'étroitesse de ce pic est traduite par le facteur de qualité,  $Q$  :

$$Q = \frac{2\pi f_0 L_1}{R_1} \quad (38)$$

Sauerbrey fut le premier à lier les variations de fréquence de résonance,  $\Delta f$ , à celles de la masse déposée à la surface du quartz,  $\Delta m$ , suivant la relation :

$$\Delta f = -N \frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \frac{\Delta m}{S} \quad (39)$$

où  $N$  est le rang de l'harmonique,  $f_0$  la fréquence de résonance du quartz,  $\rho_q$  la masse volumique du quartz ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ),  $\mu_q$  son module de cisaillement ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et  $S$  est l'aire de l'électrode ( $\text{cm}^2$ ). Cette relation ne s'applique que si les dépôts réalisés sont peu épais, *i.e.* si les variations de fréquence n'excèdent pas 2 % de  $f_0$ . Le facteur de proportionnalité entre ces deux variations est appelé sensibilité et vaut  $56.6 \text{ Hz}\cdot\text{cm}^2/\mu\text{g}$  pour une fréquence de résonance de 5 MHz.

La QCM permet donc de mesurer une prise ou perte de masse à la surface d'une des électrodes associée au quartz. Elle possède une haute sensibilité, en deçà du microgramme, qui lui vaut son nom. De plus, contrairement aux balances classiques qui ne permettent que des mesures à l'air, la QCM permet également des mesures en milieu liquide, et donc des suivis en temps réel de dépôt ou dissolution de masse en solution. Toutefois, cette technique est également sensible à son environnement ; il convient donc de maîtriser certains paramètres, tels que la température, la viscosité de la solution, la pression et les contraintes exercées sur le quartz.

### 2.4.3 Elaboration du biocapteur

Afin de détecter les bactéries en suspension, un protocole de fonctionnalisation du transducteur a été élaboré. Les principales étapes sont illustrées sur la Figure 41 :

- dépôt d'une PEM :  $(PAH-PSS)_n$  pour l'immobilisation des NPs ;
- dépôt de la couche d'amplification du signal de détection, *i.e.* les NPs ;
- fonctionnalisation des NPs par fixation des anticorps spécifiques à la bactérie cible.

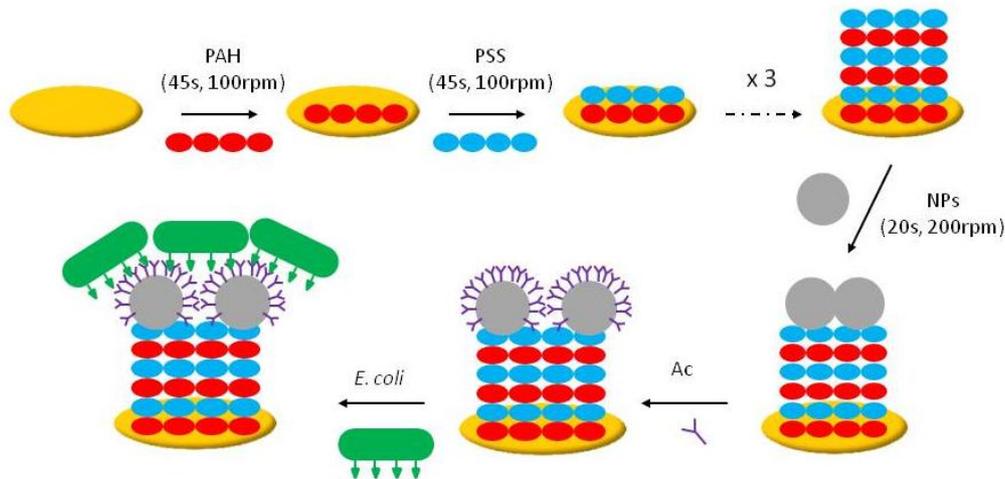


Figure 41. Etapes de la fonctionnalisation du transducteur, constitué par l'électrode de travail en or, pour la détection des bactéries *E. coli* en suspension.

Les polyélectrolytes sont en solution (eau ultrapure) et concentrés à 5 g/L. Les NPs sont également en solution d'eau ultrapure, concentrées à 10 g/L. Les anticorps ainsi que les bactéries à détecter, sont, quant à eux, suspendus dans un milieu tampon, le PBS (phosphate buffer saline).

La description exhaustive du protocole d'élaboration et d'optimisation du biocapteur fera l'objet du chapitre 5.

Après chaque étape, et donc avant chaque mesure (électrochimique ou QCM), le dépôt est rincé (i) par de l'eau ultrapure ou (ii) par du PBS 1x<sup>10</sup> une fois les anticorps et bactéries fixés.

Expérimentalement, la détection des bactéries est principalement quantifiée par l'intermédiaire des courbes  $I = f(E)$ , en voltamétrie cyclique (cf. section 2.4.1.2), obtenues au sein d'une cellule électrochimique (Metrohm, France).

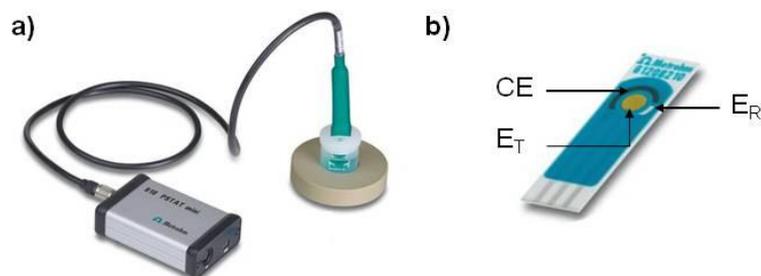


Figure 42. Potentiostat (a) et électrodes (b), de chez Metrohm ( $L = 3.4$  cm,  $l = 1$  cm), utilisés pour les expériences d'électrochimie.

Le capteur de chez Metrohm est composé de trois électrodes (Figure 42) :

- une électrode de travail ( $E_T$ ) en or, de type disque plan, de diamètre 4 mm. L'or est choisi car c'est un métal inerte ne présentant pas de courant résiduel important (contrairement au platine ou au carbone) ;
- une électrode de référence ( $E_R$ ) Ag/AgCl dont le potentiel est constant et connu, permettant de contrôler le potentiel à l'électrode de travail ;
- une électrode auxiliaire, ou contre-électrode (CE), en carbone, permettant la mesure du courant dans la cellule.

Un potentiostat permet de contrôler la différence de potentiel entre l' $E_T$  et l' $E_R$ . L'électrolyte support est constitué d'un sel, couramment utilisé dans l'étude des bactéries, le PBS 1x dont le pH est ajusté à 7.4. A ce sel est ajouté le couple redox  $Fe(CN)_6^{3-} / Fe(CN)_6^{4-}$ .

L'ensemble des techniques (AFM, DLS, MET, comptage des CFU) présenté dans ce chapitre nous permettrons (i) de caractériser, indépendamment, les NPs et les bactéries mais également (ii) d'étudier d'un point de vue macroscopique, microscopique et même nanométrique l'interaction entre NPs et bactéries. Nous insistons sur l'intérêt primordial de l'AFM dans cette étude, permettant l'investigation à la fois topographique et mécanique de cette interaction.

<sup>10</sup> La composition du PBS 1x est la suivante : 137 mM de NaCl, 10 mM de  $Na_2HPO_4$ , 2.7 mM de KCl et 1.76 mM de  $KH_2PO_4$

## Bibliographie

- [1] García R, Pérez R. Dynamic atomic force microscopy methods. *Surf Sci Rep* 2002;47:197–301.
- [2] Nony L. Analysis of the dynamic force microscopy: application to the study of D.N.A. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2000.
- [3] Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Appl Phys Lett* 1982;40:178–80. doi:10.1063/1.92999.
- [4] Binnig, Quate, Gerber. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 1986;56.
- [5] Simon A, Cohen-Bouhacina T, Porté MC, Aimé JP, Amédée J, Bareille R, et al. Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy: Osteoblast Adhesion by Atomic Force Microscopy. *Cytometry A* 2003;54A:36–47. doi:10.1002/cyto.a.10052.
- [6] Hugel T, Seitz M. The Study of Molecular Interactions by AFM Force Spectroscopy. *Macromol Rapid Commun* 2001;22:989–1016. doi:10.1002/1521-3927(20010901)22:13<989::AID-MARC989>3.0.CO;2-D.
- [7] Henry CR. Morphology of supported nanoparticles. *Prog Surf Sci* 2005;80:92–116. doi:10.1016/j.progsurf.2005.09.004.
- [8] Pyrgiotakis G, Blattmann CO, Demokritou P. Real-Time Nanoparticle?Cell Interactions in Physiological Media by Atomic Force Microscopy. *ACS Sustain Chem Eng* 2014;2:1681–90. doi:10.1021/sc500152g.
- [9] Simon A, Cohen-Bouhacina T, Porté MC, Aimé JP, Amédée J, Bareille R, et al. Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy: Osteoblast Adhesion by Atomic Force Microscopy. *Cytometry A* 2003;54A:36–47. doi:10.1002/cyto.a.10052.
- [10] Bouhacina T, Aime JP, Gauthier S, Michel D, Heroguez V. Tribological behavior of a polymer grafted on silanized silica probed with a nanotip. *Phys Rev B* 1997;56:7694.
- [11] Faye N rokhaya. Study by atomic force microscopy and fluorescence microscopy of the interaction of silica nanoparticles with supported lipid films. Université de Bordeaux, 2014.
- [12] Leclère P, Dubourg F, Kopp-Marsaudon S, Brédas JL, Lazzaroni R, Aimé JP. Dynamic force microscopy analysis of block copolymers: beyond imaging the morphology. *Proc 4th Int Conf Noncontact At Microsc* 2002;188:524–33. doi:10.1016/S0169-4332(01)00966-7.
- [13] Nony L, Boisgard R, Aimé J-P. DNA Properties Investigated by Dynamic Force Microscopy. *Biomacromolecules* 2001;2:827–35. doi:10.1021/bm0100209.
- [14] Aimé JP, Boisgard R, Nony L, Couturier G. Influence of noncontact dissipation in the tapping mode: Attempt to extract quantitative information on the surface properties with the local force probe method. *J Chem Phys* 2001;114:4945–54. doi:10.1063/1.1349179.

- [15] Brinker CJ, Scherer GW. Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. 2013.
- [16] Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. J Colloid Interface Sci 1968;26:62–9.
- [17] Desert A. Colloïdes hybrides silice/polystyrène de morphologie contrôlée. 2011.
- [18] Hartlen KD, Athanasopoulos APT, Kitaev V. Facile Preparation of Highly Monodisperse Small Silica Spheres (15 to >200 nm) Suitable for Colloidal Templating and Formation of Ordered Arrays. Langmuir 2008;24:1714–20. doi:10.1021/la7025285.
- [19] Simon M, Barberet P, Delville M-H, Moretto P, Sez nec H. Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an *in vitro* explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. Nanotoxicology 2011;5:125–39. doi:10.3109/17435390.2010.502979.
- [20] Knoll M, Ruska E. Das Elektronenmikroskop. Z Für Phys 1932;78:318–39. doi:10.1007/BF01342199.
- [21] Chu B, Liu T. Characterization of nanoparticles by scattering techniques. J Nanoparticle Res 2000;2:29–41.
- [22] Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. Seventh Edition. McGraw-Hill Higher Education, 2008; 2008.
- [23] Gammoudi I, Blanc L, Moroté F, Grauby-Heywang C, Boissière C, Kalfat R, et al. High sensitive mesoporous TiO<sub>2</sub>-coated love wave device for heavy metal detection. Biosens Bioelectron 2014;57:162–70.
- [24] Bard AJ, Faulkner LR. Electrochimie - Principes, méthodes et applications. Masson; 1983.
- [25] Pauporté T, Lincot D. Microbalance à cristal de quartz. Ed. Techniques Ingénieur; 2006.

## Annexes – Calibration de l'AFM

### La céramique piézoélectrique

La céramique piézoélectrique utilisée pour le balayage de l'échantillon se déplace par l'application d'une tension. Sa réponse en termes de déplacement est liée au voltage appliqué par une sensibilité qui est propre à la céramique choisie. Celle-ci doit donc être calibrée régulièrement (environ deux fois par an). Pour ce faire, un échantillon de calibration, composé d'un réseau lithographié avec des pas périodiques, est imagé par AFM. Celui-ci est constitué de trous dont la période en x et en y, ainsi que la hauteur sont connues précisément.

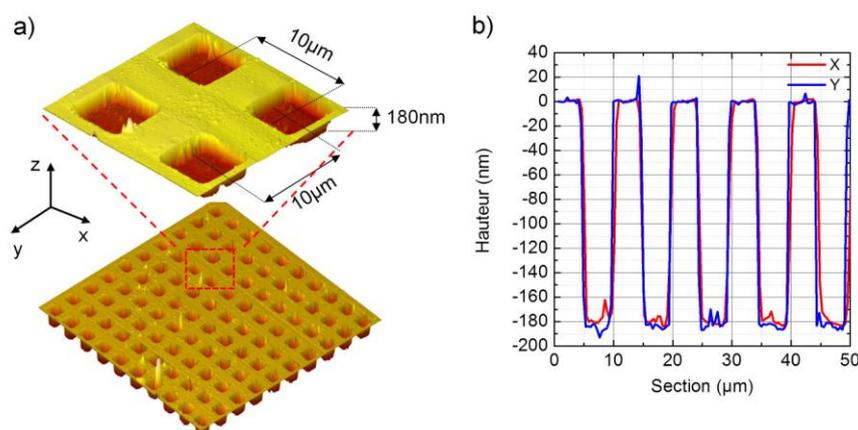


Figure 43. Calibration de la céramique piézoélectrique grâce à un échantillon étalon dont les dimensions sont précisément connues. a) Images AFM de cet échantillon. b) Sections réalisées selon les axes x et y montrant la bonne calibration de la céramique : périodes de 10 µm et hauteur de 180 nm.

Si, lors du balayage de l'échantillon, ces dimensions sont incorrectes alors l'utilisateur devra régler différents paramètres du logiciel afin de rectifier les erreurs constatées et de s'assurer de la linéarité et de la « précision dimensionnelle » de l'AFM.

### Les photodiodes

Le signal différentiel, dû à la déflexion du levier lorsque celui-ci rencontre l'échantillon, est obtenu en volt. Afin de connaître les déplacements (mode contact) ou amplitudes (mode *tapping*) en nanomètres, une calibration des photodiodes est nécessaire. Cela revient à déterminer le paramètre appelé sensibilité en déflexion. Pour ce faire, la pointe est engagée sur une surface rigide, type verre ou mica. Une CF est réalisée traduisant la déflexion du levier en fonction du déplacement suivant l'axe z de la céramique piézoélectrique. Pour un tel matériau, la déflexion du levier reflète simplement le déplacement de la céramique. Ainsi, la pente de la partie « contact » de cette CF,  $p = \Delta V / \Delta z$ , doit être égale à 1. C'est ce que calcule automatiquement le logiciel lorsque l'utilisateur lui demande de mettre à jour la sensibilité en déflexion, en normalisant la CF. Ce faisant, la déflexion en V est traduite en nanomètres et permet, ensuite, de déduire les grandeurs des forces utilisées (Figure 44).

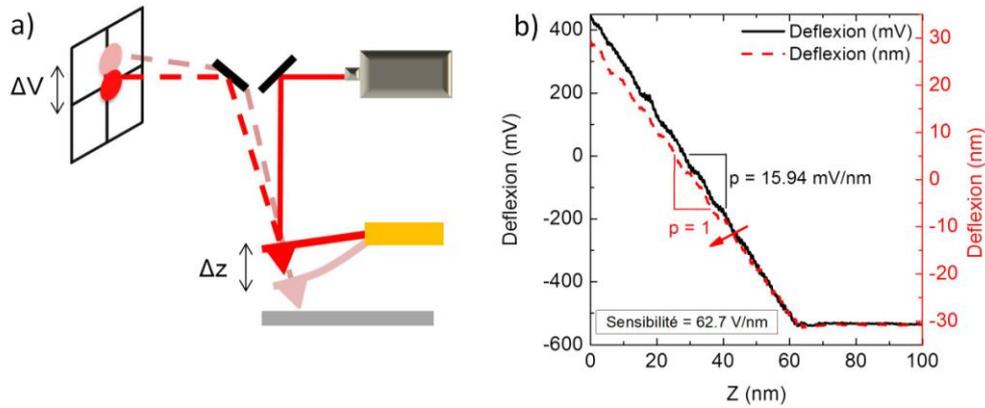


Figure 44. Détermination de la sensibilité en déflexion du levier : a) représentation schématique de la déflexion d'un levier sur une surface rigide (mica), b) CF (approche) sur cette même surface de mica illustrant le passage de la déflexion en Volt à la déflexion en nanomètres.

Une même calibration est réalisée pour des leviers *tapping*, en effectuant une courbe d'approche retrait au lieu de la CF. Ainsi les amplitudes en V sont-elles traduites en nm.

### Le système levier-pointe

Afin de mesurer et contrôler correctement les forces appliquées lors de l'imagerie AFM, il est nécessaire de connaître la raideur  $k$  du levier utilisé. En effet, ces deux éléments sont liés par la loi de Hooke :

$$F = k z \quad (40)$$

Où  $z$  est la déflexion que subit le levier lorsqu'une force  $F$  lui est appliquée.

Cette raideur est propre au levier et ne change donc pas selon l'environnement de travail (vide, air, liquide). Sa calibration se fait grâce à la fonction « *thermal tune* ». Cette méthode, proposée par Hutter et Bechhoefer<sup>11</sup>, consiste à lier la constante de raideur du levier à son énergie thermique :

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}k \langle z_c \rangle^2 \quad (41)$$

Où  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température en K et  $z_c$  le déplacement du levier dû à l'agitation thermique. Les déplacements sont moyennés au cours du temps afin d'estimer une puissance,  $P$ , des fluctuations thermiques :

$$k = \frac{k_B T}{P} \quad (42)$$

En pratique, la méthode du bruit thermique nous fournit la densité spectrale de puissance (PSD) en fonction de la fréquence. Le fit de cette courbe autour du pic de

<sup>11</sup> Hutter JL, Bechhoefer J. Calibration of atomic-force microscope tips. Rev Sci Instrum 1993;64:1868-73. doi:10.1063/1.1143970.

résonance permet de déterminer la constante de raideur,  $k$ , du levier. Un exemple de calibration d'un levier est présenté Figure 45.

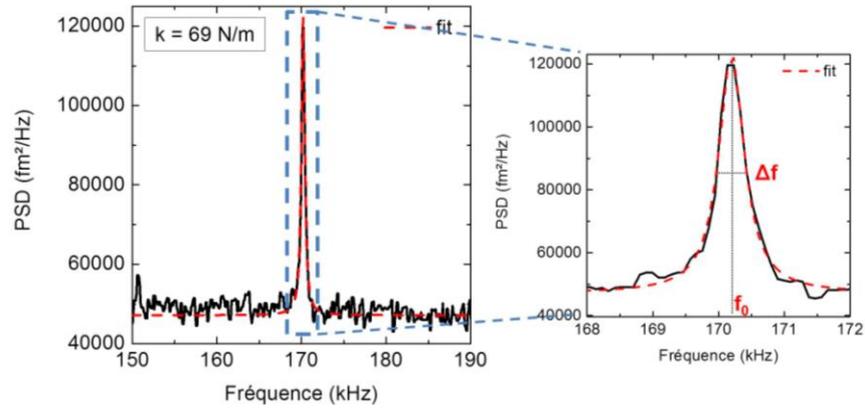


Figure 45. Détermination de la raideur d'un levier par la méthode du bruit thermique (ou *thermal tune*).

Cela nous permet également de déterminer la fréquence de résonance du levier,  $f_0$ , ainsi que la largeur du pic de résonance à mi-hauteur,  $\Delta f$  (le facteur de qualité peut ainsi être déduit).

# Chapitre 3 Caractérisation des acteurs de l'interaction

## Sommaire

---

3.1	Des NPs de taille et charge contrôlées .....	94
3.1.1	SiO <sub>2</sub> -NPs sous forme commerciale.....	94
3.1.2	Synthèse de SiO <sub>2</sub> -NPs de taille contrôlée.....	96
3.1.3	Des SiO <sub>2</sub> -NPs d'état de surface contrôlé.....	97
3.2	<i>E. coli</i> , une bactérie à l'organisation « type cerveau » .....	98
3.2.1	Une eau...de vie .....	98
3.2.2	Caractérisation morphologique d' <i>E. coli</i> .....	100
3.2.3	Une structure de surface de « type cerveau ».....	102
3.2.3.1	Caractérisation topographique.....	102
3.2.3.2	Caractérisation rhéologique .....	103
3.2.3.3	L'organisation de la membrane externe.....	108
3.2.4	Vieillessement du biofilm bactérien d' <i>E. coli</i> .....	110
3.3	<i>B. subtilis</i> , une bactérie « sans cerveau ».....	113
3.3.1	Survie des bactéries <i>B. subtilis</i> .....	113
3.3.1.1	Effet du milieu de resuspension des bactéries.....	113
3.3.1.2	Effet de la centrifugation.....	114
3.3.2	Caractérisation par AFM.....	115
3.3.2.1	Un protocole adapté .....	115
3.3.2.2	Caractérisation morphologique et rhéologique.....	115
3.3.2.3	Vieillessement de la population <i>B. subtilis</i> .....	117
	Bilan.....	121
	Bibliographie.....	122

---

Les problématiques de cytotoxicité soulevées en chapitre 1 montrent l'importance de parfaitement connaître les systèmes interagissant, notamment les propriétés des NPs susceptibles de modifier le comportement bactérien. Aussi, après avoir décrit et caractérisé la synthèse de NPs de taille et charge contrôlées, ce chapitre s'intéressera à la caractérisation biologique (CFU), morphologique et rhéologique (AFM) de deux modèles bactériens : *E. coli* et *B. subtilis*. Cette description exhaustive est indispensable à la compréhension et l'analyse du comportement de ces systèmes en interaction, présentées en chapitre 4.

## 3.1 Des NPs de taille et charge contrôlées

Afin d'étudier leurs interactions avec les bactéries, des NPs commerciales (c-SiO<sub>2</sub>-NPs) et synthétisées (s-SiO<sub>2</sub>-NPs) en laboratoire ont été caractérisées seules dans un premier temps.

### 3.1.1 SiO<sub>2</sub>-NPs sous forme commerciale

Comme mentionné précédemment, les NPs sont aujourd'hui omniprésentes dans l'environnement, au sein de produits manufacturés de la vie courante, émises dans les gaz d'échappement ou encore synthétisées par des industriels pour diverses applications incluant les activités de recherche. Ainsi, des NPs commerciales ont, dans un premier temps, été privilégiées pour l'étude, étant à l'image de celles trouvées dans l'environnement. Avant toute caractérisation, les NPs commerciales sont redispersées dans de l'eau ultrapure au cours de trois cycles de centrifugation (10 000 tour/min., 20 min.), qui permettent également de les nettoyer d'éventuels résidus industriels. Ce protocole ne s'applique toutefois pas aux NPs de 4 nm et 10 nm, qui déjà dispersées dans l'eau par le fournisseur, sont trop petites pour sédimenter et sont donc utilisées sans traitement particulier.

La caractérisation par MET montre que, quelle que soit leur taille, les NPs commerciales sont relativement polydisperses avec des formes non parfaitement sphériques (Figure 46 et Figure 47). De plus, les images montrent un phénomène d'agrégation, d'autant plus important que le diamètre des NPs est faible (Figure 46). Outre l'imagerie, le MET a permis d'estimer, lorsque l'agrégation était suffisamment faible, le diamètre moyen des NPs et l'écart type associé, reportés en Tableau 4.

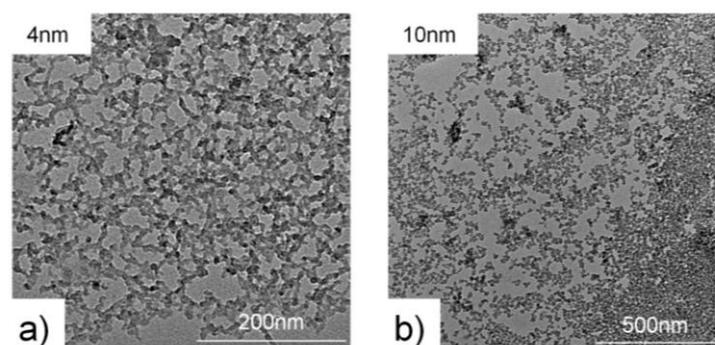


Figure 46. Caractérisation des c-SiO<sub>2</sub>-NPs par MET: a) 4 nm, b) 10 nm.

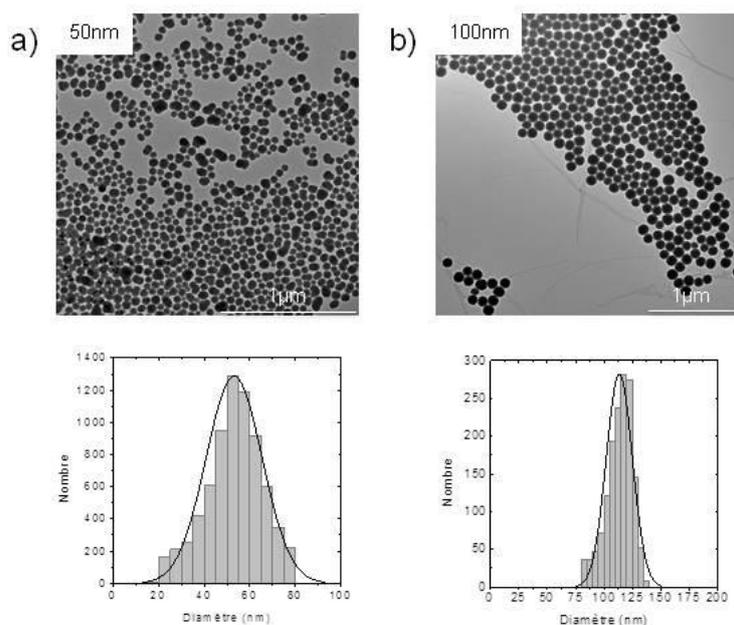


Figure 47. Caractérisation des c-SiO<sub>2</sub>-NPs par MET (clichés : haut, distributions : bas): a) 50 nm et b) 100 nm.

Des mesures de DLS ont également été réalisées sur ces NPs afin de les confronter aux mesures obtenues par MET et d'évaluer l'influence de la présence du solvant sur l'état d'agrégation des NPs. L'outil utilisé donne accès directement au diamètre hydrodynamique moyen (Tableau 4). Ces mesures ont montré que le diamètre hydrodynamique donne une valeur surestimée du diamètre des NPs de taille importante ( $\geq 50$  nm), cohérent avec la présence d'un grand nombre de contre-ions autour de la particule. Ceci montre l'importance du solvant dans la caractérisation des NPs et souligne un effet hydrodynamique, déjà bien connu [1]. Pour les plus petites NPs, les mesures de DLS sont en accord avec les diamètres attendus.

Les valeurs obtenues par MET, DLS sont cohérentes entre elles et en accord avec les données du fournisseur. Le phénomène d'agrégation observé par MET est probablement dû à une concentration trop élevée de NPs et au séchage sur la grille MET puisque celui-ci ne survient pas lors des mesures de DLS.

Tableau 4. Caractéristiques des c-SiO<sub>2</sub>-NPs obtenues par MET, DLS et zétamétrie.

Nom	Diamètre (nm)			Potentiel zêta (mV)
	MET	DLS	Fournisseur	
c-SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> 4	agrégées	3	4 (distribution large)	-53 (pH = 6.5)
c-SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> 10	agrégées 12 ± 4	7	10 ± 5	
c-SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> 50	53 ± 12	68	50 ± 10	
c-SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> 100	113 ± 11	124	100 ± 30	

Enfin, la charge surfacique des NPs est évaluée par des mesures de potentiel zêta et reportée dans le Tableau 4. Un potentiel autour de -50 mV est obtenu, dans de l'eau

ultrapure ( $\text{pH} = 6.5$ ), pour l'ensemble des  $\text{c-SiO}_2\text{-NPs}$ , cohérent avec les groupements surfaciques  $\text{Si-OH}$  exhibant une charge négative nette, et en accord avec la littérature [2]. L'étude du potentiel zêta n'a pas été menée en fonction du diamètre des NPs, ce paramètre dépendant uniquement, dans cette gamme de taille, du procédé de synthèse opposant chimie douce et chimie haute température.

### 3.1.2 Synthèse de $\text{SiO}_2\text{-NPs}$ de taille contrôlée

Les NPs commerciales ne sont pas parfaitement sphériques, et présentent une certaine polydispersité et agrégation. Ceci peut, parfois, compliquer l'étude de leurs interactions avec les systèmes bactériens, puisque l'agrégation et la polydispersité peuvent modifier leur disponibilité dans le milieu de culture. Aussi, des NPs ont été synthétisées ( $\text{s-SiO}_2\text{-NPs}$ ) au laboratoire afin de maîtriser l'ensemble des paramètres de ces interactions. Très brièvement (cf. détails chapitre 2), la synthèse de NPs consiste en deux étapes [3] :

- la synthèse de pré-germes de faible dimension ( $\approx 30$  nm) ;
- la croissance de ces pré-germes en des NPs de dimension plus importante, grâce à l'ajout contrôlé d'un précurseur de la silice, le TEOS ( $\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4$ ). Cette croissance se déroule en milieu éthanol-ammoniaque (13 :1 en volume).

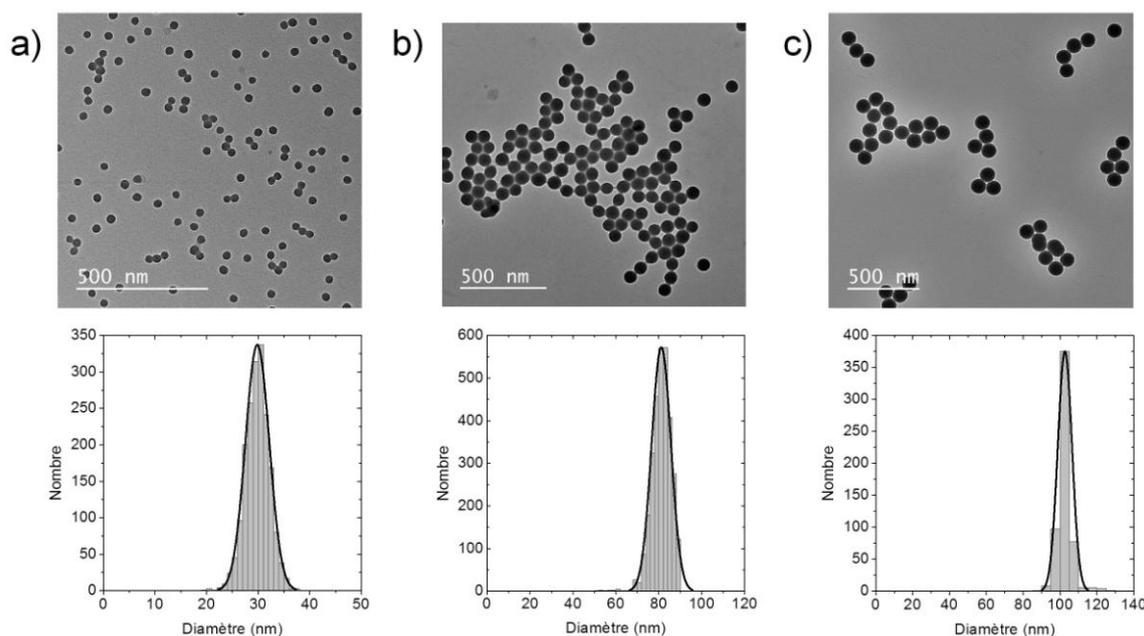


Figure 48. Caractérisation par MET des  $\text{s-SiO}_2\text{-NPs}$  : a) pré-germes, b) 80 nm et c) 100 nm.

Cette synthèse garantit une forme parfaitement sphérique aux NPs et une monodispersité dont témoignent les caractérisations MET (Figure 48, Tableau 5). Les diamètres obtenus, au cours des différentes synthèses, sont en accord avec ceux attendus. Par ailleurs, les réactifs étant connus, la charge surfacique obtenue, dans de l'eau ultrapure ( $\text{pH} = 6.5$ ), est celle de la silice pure :  $-42$  mV. Cette valeur est très négative comme celle obtenue pour les  $\text{c-SiO}_2\text{-NPs}$  dans les mêmes conditions. Une étude systématique de l'évolution du potentiel zêta en fonction du pH a été réalisée

(Figure 49). Le potentiel zéta des NPs décroît avec une augmentation du pH. Toutefois, dans la gamme de pH [6 ; 10] le potentiel est constant ( $\sim -50$  mV), témoignant de la stabilité colloïdale de la suspension.

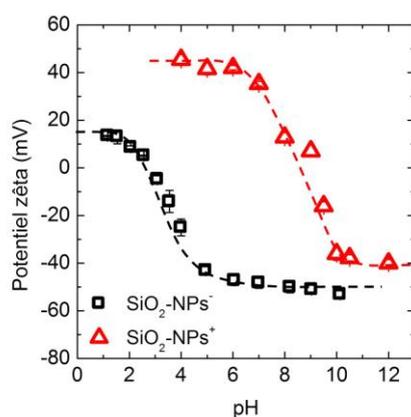


Figure 49. Evolution du potentiel zéta avec le pH de la suspension colloïdale de SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 et SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100.

Ces synthèses satisfont donc nos attentes quant à l'obtention de NPs de taille définie et dispersité contrôlée pour une étude maîtrisée et quantifiable de leurs interactions avec des bactéries. Toutefois, il n'a pas été possible de synthétiser des NPs en deçà du diamètre des pré-germes ( $\approx 30$  nm), les c-SiO<sub>2</sub>-NPs de taille inférieure ont donc été conservées pour l'étude et ce malgré les inconvénients présentés précédemment.

Tableau 5. Caractéristiques des s-SiO<sub>2</sub>-NPs obtenues par MET.

Nom	Pré-germes		Croissance en NPs		
	Diamètre (nm)	Concentration (g/L)	TEOS (mL)	Diamètre attendu (nm)	Diamètre obtenu (nm)
s-SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> 30	30 ± 2	20.5	4.48	80	81 ± 4
s-SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> 80	30 ± 2				
s-SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> 100	27 ± 1				
s-SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> 200	102 ± 4				
		26.2	5.56	100	102 ± 4
		27.5	6.58	200	188 ± 10

### 3.1.3 Des SiO<sub>2</sub>-NPs d'état de surface contrôlé

Les NPs obtenues ci-dessus ont une charge de surface négative. Elles peuvent être modifiées afin de rendre cette surface positive. Un volume donné (200 mL) de suspension colloïdale de NPs dans un milieu éthanol-ammoniaque (37%) (13 :1) est additionné, sous faible agitation, d'une quantité prédéfinie d'APS, selon les caractéristiques (taille, concentration) des NPs initiales. L'ensemble est laissé sous agitation, et ce pendant 48 h à température ambiante puis 2h à 100°C, sous air (cf. chapitre 2). Des s-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> de 100 nm ont ainsi été synthétisées et serviront pour le greffage des anticorps spécifiques de *E. coli* pour la partie détection du futur biocapteur

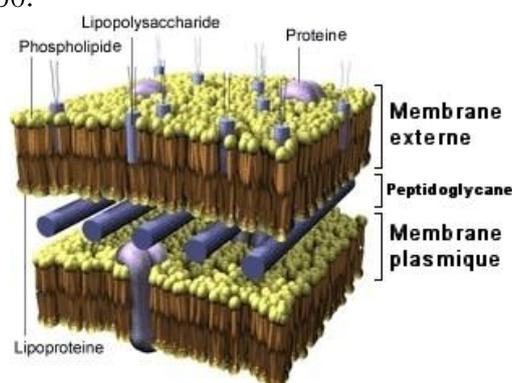
de bactéries (cf. chapitre 5). De la même manière que précédemment, une étude systématique de l'évolution du potentiel zêta en fonction du pH a été réalisée sur cette suspension (Figure 49). Par ailleurs, des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  commerciales de faible diamètre ( $< 30$  nm) ont été également fonctionnalisées par l'APS (aminopropyl triéthoxy silane) et étudiées, dans la partie fondamentale de cette thèse (cf. chapitre 4). Les caractéristiques de ces  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  sont reportées en Tableau 6.

Tableau 6: Caractéristiques des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  obtenues par MET et zétamétrie.

Nom	Diamètre (nm)	Potentiel Zêta (mV)
s- $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$ 100	$94 \pm 4$	+ 45.4
c- $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$ 30	$15 \pm 4$	Non déterminé

## 3.2 *E. coli*, une bactérie à l'organisation « type cerveau »

Les bactéries *E. coli*, parfois pathogènes, sont omniprésentes dans l'environnement et très souvent utilisées comme modèles de bactéries à Gram négatif. En tant que telles, elles possèdent, outre la membrane cytoplasmique et une couche de peptidoglycane, une membrane externe (OM pour *outer membrane*) composée entre autres d'une bicouche phospholipidique et de molécules de lipopolysaccharides (LPS) [4], comme représenté sur la Figure 50.

Figure 50. Structure de la paroi d'une bactérie à Gram négatif, tel *E. coli* (www.sirtin.fr).

Dans cette partie, l'ensemble des images AFM présentées a été obtenu en mode *tapping*, à l'air, excepté mention contraire.

### 3.2.1 Une eau...de vie

Toute bactérie possède un milieu nutritif dans lequel elle se développe correctement ; citons pour *E. coli* le *Luria Broth* (LB). Ces milieux, souvent complexes en raison de la présence de nombreux sels et de nutriments, ne sont pas forcément appropriés ni nécessaires pour une étude fondamentale comme la nôtre. Ainsi, des milieux tampons simplifiés, comme le *Phosphate Buffer Saline solution* (PBS), suffisent

à la viabilité et la préservation de *E. coli* pendant le temps nécessaire aux mesures [5]. Ils sont donc couramment utilisés dans les études, notamment de viabilité cellulaire.

La Figure 51a montre que le taux de survie (et donc le nombre de CFU, en insert) de *E. coli* dans du PBS  $1x^{12}$  et de l'eau ultrapure sont similaires, au bout de 2 h. Ce taux est rapporté au milieu le plus favorable, *i.e.* le PBS, à l'instant  $t_0$ . Il est inchangé dans un milieu a priori plus défavorable, *i.e.* l'eau ultrapure.

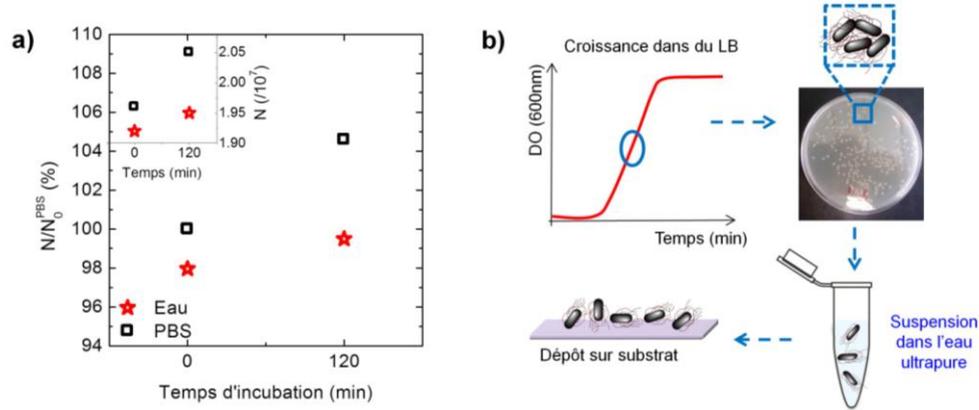


Figure 51. a) Survie de *E. coli* dans le PBS et l'eau ultrapure,  $N$  représentant le nombre de CFU. b) Protocole d'incubation et de dépôt direct de *E. coli* pour les observations AFM.

Aussi, pour des questions purement pratiques, nous avons choisi ce solvant simple, l'eau ultrapure, qui, bien que dépourvu de sels et de beaucoup d'ions, convient à la survie de *E. coli*. En effet, l'eau est particulièrement bien adaptée pour la caractérisation AFM à suivre, puisqu'elle permet de s'affranchir de la présence de cristaux de sels formés lors du séchage préliminaire des échantillons, garantissant une meilleure accessibilité à la morphologie et à la structure du système étudié. Bien qu'inhabituelle pour des expériences de viabilité, l'eau, dans nos conditions, n'induit pas de mortalité, en accord avec la résistance de *E. coli* dans des eaux diverses et variées, aux diverses conditions de température, pH, stress...[6–8].

Ainsi, pour l'étude des bactéries seules et celle de leurs interactions avec des NPs, les bactéries *E. coli*, sont récupérées en phase exponentielle après croissance en milieu LB, re-suspendues dans de l'eau ultrapure puis incubées 2 h avant leur dépôt sur substrat et leur observation (Figure 51b). Bien que ces bactéries, dans l'eau, puissent présenter un métabolisme différent d'une bactérie saine en milieu nutritif optimal, les résultats présentés dans ce manuscrit sont constamment confrontés à une expérience contrôle – la bactérie non traitée dans l'eau – si bien que les modifications observées seront, effectivement, dues au traitement par les NPs.

<sup>12</sup> Pour rappel, la composition du PBS  $1x$  est : 137 mM de NaCl, 10 mM de  $Na_2HPO_4$ , 2.7 mM de KCl et 1.76 mM de  $KH_2PO_4$ .

### 3.2.2 Caractérisation morphologique d'*E. coli*

Nous rappelons, ici, que l'ensemble des images AFM présenté ci-après a été obtenu, après séchage de l'échantillon, à l'air, en mode *tapping* et en régime répulsif dominant, excepté mention contraire.

Déposées sur une surface de mica nu et observées à l'air par microscopie optique ou AFM, les bactéries *E. coli* forment des agrégats relativement denses et homogènes (Figure 52). Ces agrégats sont plus ou moins gros, selon les zones balayées, le séchage induisant inévitablement une agrégation plus importante sur les bords de la goutte.

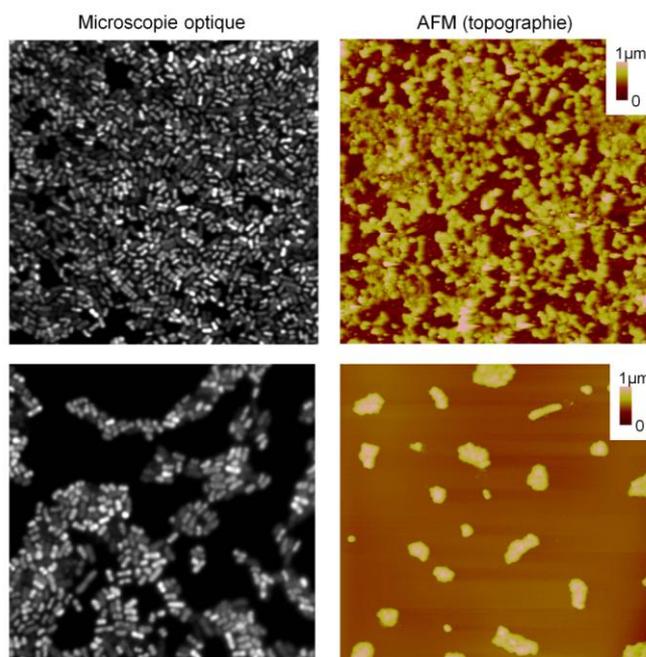


Figure 52. Formation d'agrégats d'*E. coli*, plus ou moins denses et homogènes, observés par microscopie optique et AFM (échelle : 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ ).

Outre la formation d'agglomérats positionnés de façon aléatoire (Figure 53a-b), l'état d'agrégation des *E. coli* peut être lié à des processus cellulaires tels que la division. Celle-ci est révélée par la présence d'un septum<sup>13</sup>, qui semble « couper » en deux pôles la bactérie, et induire un resserrement des bords sur la partie centrale (Figure 53c) [9]. La cellule semble s'être figée au moment de la division et avoir été déposée alors que cette dernière ne s'était pas encore produite. Dans le cas où la division cellulaire advient effectivement, elle peut engendrer des architectures spécifiques : les cellules filles issues de plusieurs divisions à partir d'une cellule mère s'organisent en groupe de type "palissades" ou "files" (Figure 53d). Quelle que soit l'organisation, les bactéries peuvent être jointes par des frontières nettes plus rigides et compactes que celles observées lors du simple contact entre cellules (Figure 53). Bien que non quantifiable lors de cette étude, les frontières observées dépendent probablement de l'origine du mode d'attachement des cellules (simple accollement ou processus cellulaire de type adhésion).

<sup>13</sup> Il s'agit d'une paroi transversale mise en place lors de la division des bactéries.

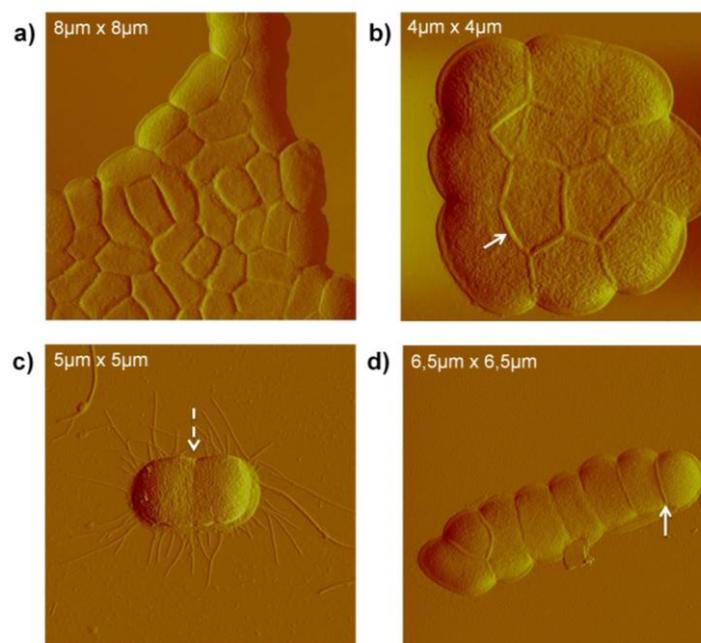


Figure 53. Images AFM d'amplitude montrant l'organisation des bactéries *E. coli* (a-b, d) aléatoire et (c) dictée par un processus de division cellulaire. Les flèches pleines indiquent la présence de « frontières » compactes et la flèche en pointillée la présence d'un septum.

Les bactéries *E. coli* possèdent une forme allongée et bombée (Figure 53) dont les caractéristiques<sup>14</sup> sont présentées en Tableau 7 et Figure 54.

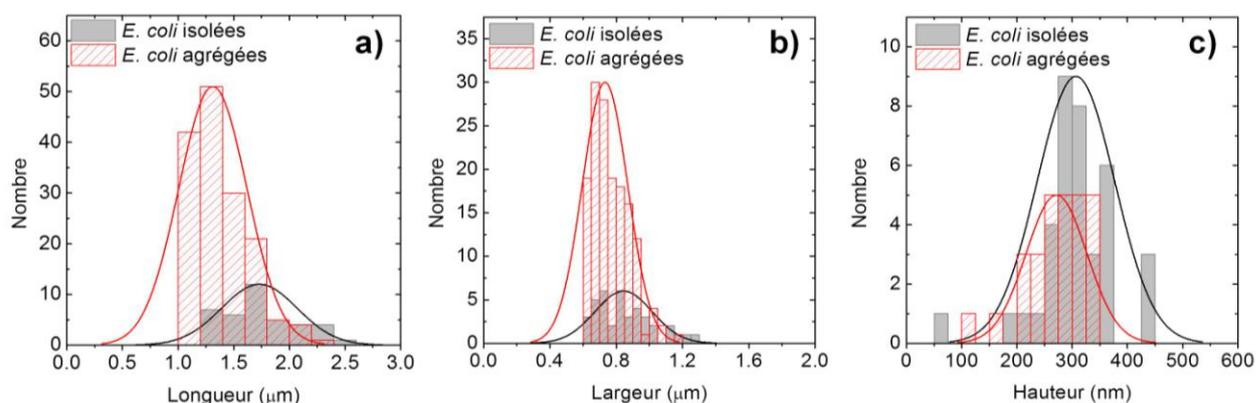


Figure 54. Distribution en taille des (a) longueur, (b) largeur et (c) hauteur des bactéries *E. coli* déposées sur mica, isolées et agrégées.

Tableau 7. Caractéristiques morphologiques des bactéries *E. coli* isolées (statistiques réalisées sur  $N = 40$  bactéries) ou agrégées ( $N = 150$ ).

Dimension ( $\mu\text{m}$ )	<i>E. coli</i> isolées	<i>E. coli</i> agrégées
Longueur	$1.7 \pm 0.3$	$1.3 \pm 0.3$
Largeur	$0.8 \pm 0.2$	$0.7 \pm 0.1$
Hauteur	$0.3 \pm 0.1$	$0.3 \pm 0.1$

<sup>14</sup> Ces statistiques ont été réalisées sur des images obtenues par AFM ( $< 100 \mu\text{m}^2$ ), post-traitées par le logiciel Gwydion. Aussi les longueurs et largeurs estimées sont-elles celles observées et non évaluées à mi-hauteur, comme c'est souvent le cas en AFM (pour des raisons de convolution de la pointe).

Les dimensions des cellules isolées sont en accord avec les nombreuses études menées sur ce modèle, notamment en microscopie optique et AFM [10–12]. Elles sont toutefois sujettes à des variations relativement faibles<sup>15</sup> en comparaison des études précédemment citées. Ces variations peuvent être dues à la souche étudiée et à l'état de croissance des bactéries au moment du prélèvement.

L'état d'agrégation des bactéries influe également sur leurs dimensions. Il contribue notamment à la compacité des systèmes bactériens au sein de l'agrégat (Figure 53a-b), et donc à la diminution de leurs dimensions (Tableau 7 et Figure 54). Les cellules au centre de l'agrégat s'approchent d'une forme pentagonale tandis que les autres adoptent des formes moins géométriques, voire arrondies en périphérie, similaire à celles des bactéries isolées. Cette géométrie / distribution particulière a été mise en évidence également pour les cellules épithéliales et a été attribuée à un mécanisme de division où les cellules adhèrent les unes aux autres sans se réorganiser [13].

### 3.2.3 Une structure de surface de « type cerveau »

#### 3.2.3.1 Caractérisation topographique

Des « *zoom* » successifs en AFM révèlent la structure particulière de la surface d'*E. coli* qui n'avait, jusqu'alors, jamais été imagée, du moins avec autant de précision, dans la littérature. En topographie, la surface n'est pas lisse et régulière, des sillons et des bourrelets en forme de serpentins coexistent (Figure 55). Bien que cette structure puisse être plus ou moins étirée ou compactée (comparer pour cela les Figure 55 b et c), la forme en serpentins est toujours visible. Par la suite, le terme *ripples* fera référence à cette structure particulière, les *ripples* étant les bourrelets et les *inter-ripples* les sillons. Ce motif n'est pas sans rappeler l'image de la surface d'un cerveau.

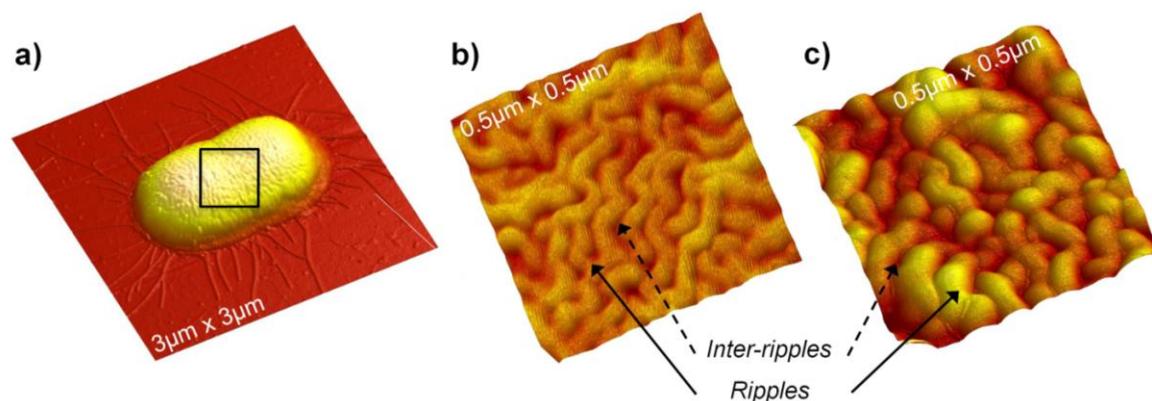


Figure 55. Caractérisation topographique en AFM de la surface d'*E. coli*. a) Une bactérie représentative de l'ensemble de la population dont on souhaite imaginer la surface; b-c) « *Zoom* » sur la surface d'*E. coli* montrant un relief particulier incluant *ripples* et *inter-ripples*.

La hauteur moyenne entre le sommet du bourrelet et la base du sillon est estimée à  $4 \pm 2$  nm et les largeurs moyennes du bourrelet à  $40 \pm 7$  nm (Figure 56a-b),

<sup>15</sup> La variation est déterminée par la déviation standard associée à l'estimation de la moyenne des dimensions.

estimations obtenues par des profils de hauteur. Ce relief s'entend donc à l'échelle nanométrique et les incertitudes associées à (i) la zone observée, (ii) l'état des différentes bactéries et (iii) le fait même qu'il s'agisse d'un système vivant sont, en conséquence, parfois importantes.

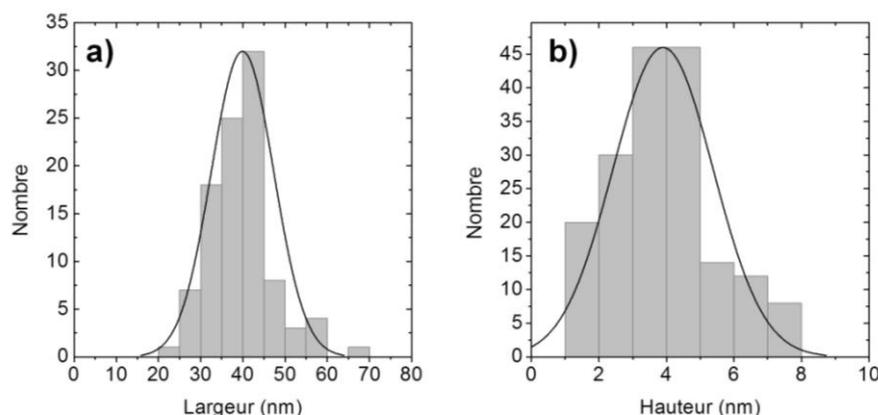


Figure 56. Caractérisation dimensionnelle de la structuration en surface d'*E. coli* : distributions en taille de (a) la largeur ( $N = 100$ ) et (b) la hauteur des *ripples* ( $N = 180$ ).

### 3.2.3.2 Caractérisation rhéologique

#### En mode *tapping*

Cette structure est également visible en image de phase : la surface de la bactérie apparaît comme hétérogène (Figure 57a-b).

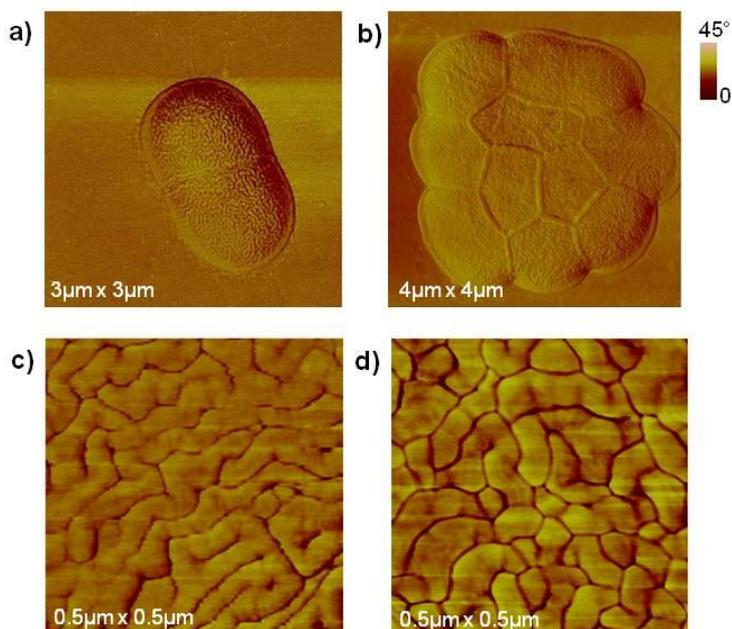


Figure 57. Caractérisation en image de phase AFM de la surface d'*E. coli*. a-b) bactéries isolées ou agrégées représentatives de l'ensemble des bactéries ; c-d) Grossissements obtenus sur deux bactéries distinctes, également représentatifs de l'ensemble des échantillons, de la surface d'*E. coli* montrant une séparation de phase particulière avec des nanodomains (zones claires délimitées par des zones sombres).

Une séparation de phase est observée, mettant en exergue la coexistence de nanodomains, illustrée par les zones claires et foncées (Figure 57c-d). Ces nanodomains semblent intrinsèquement homogènes : chaque domaine possède une phase homogène, celle-ci différant légèrement entre deux domaines adjacents. Cette séparation de phase est similaire à la structure en serpentins observée précédemment en topographie. A quelques variations près sur le rapport d'aspect de ces serpentins (comparer les Figure 57 c et d) cette structure est observée pour l'ensemble des bactéries saines analysées.

Par ailleurs, la séparation de phase est en adéquation avec la topographie précédemment décrite : la phase dans les zones *ripples* (zones hautes et claires) est associée à un comportement du système plus rigide que celui des zones *inter-ripples* (zones creuses et sombres), qui, elles, sont caractérisées par une phase moins élevée associée à une dissipation un peu plus élevée (Figure 58).

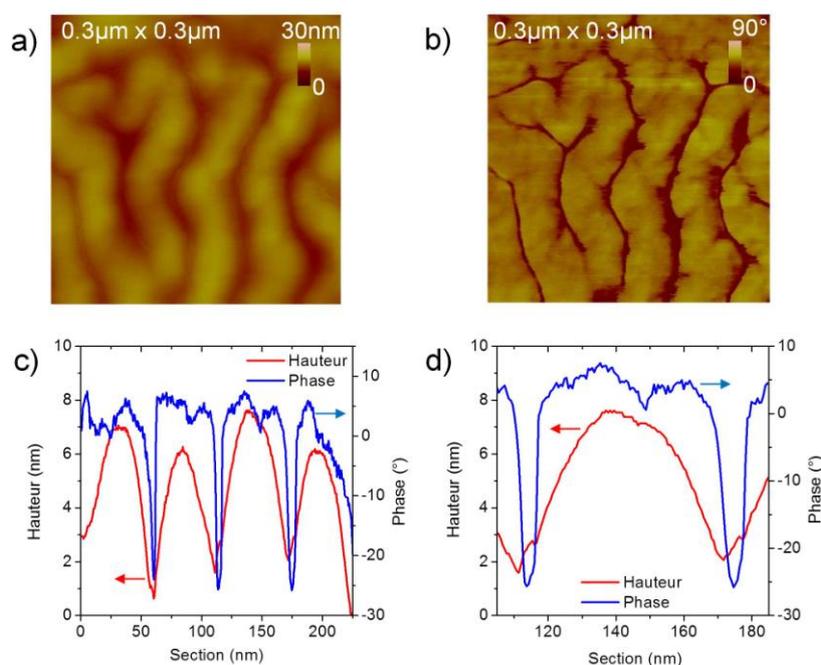


Figure 58. Caractérisation AFM en images de (a) topographie et de (b) phase de la surface d'*E. coli*. c-d) Sections montrant la corrélation entre (i) les *ripples* et leur phase élevée, témoignant d'un comportement répulsif lié à une structuration rigide et (ii) les *inter-ripples* et leur phase plus faible, témoignant d'un comportement moins organisé ou plus fluide.

Les courbes d'approche-retrait (CAR), en mode *tapping*, constituent une approche, complémentaire des images de phase, pour mieux décrire les propriétés mécaniques de la membrane bactérienne et de ses *ripples*. Elles peuvent aussi nous renseigner sur (i) la raideur et le module élastique de l'échantillon *via* les courbes d'amplitude et (ii) son caractère visco-élastique *via* les courbes de phase. Le mode répulsif dominant (amplitude de travail élevée et phase proche de  $\pi/4$ ) est, ici, privilégié afin de simplifier le message et de s'affranchir au maximum des interactions attractives de courte portée (cf. chapitre 2). Les CAR sont réalisées en zoomant sur la zone désirée (environ  $50\ \text{nm}^2$ ) et sont effectuées sur différentes zones, *ripples* et *inter-ripples*, afin de s'assurer de

l'homogénéité de leurs comportements respectifs. La Figure 59 présente des CAR représentatives des résultats obtenus.

Quelle que soit la zone imagée, *ripple* ou *inter-ripple*, l'allure des courbes d'amplitude est quasiment inchangée : la partie linéaire possède la même pente que celle obtenue sur le mica, matériau rigide de référence (Figure 59a). Toutefois, des différences émergent sur les courbes de phase (Figure 59b).

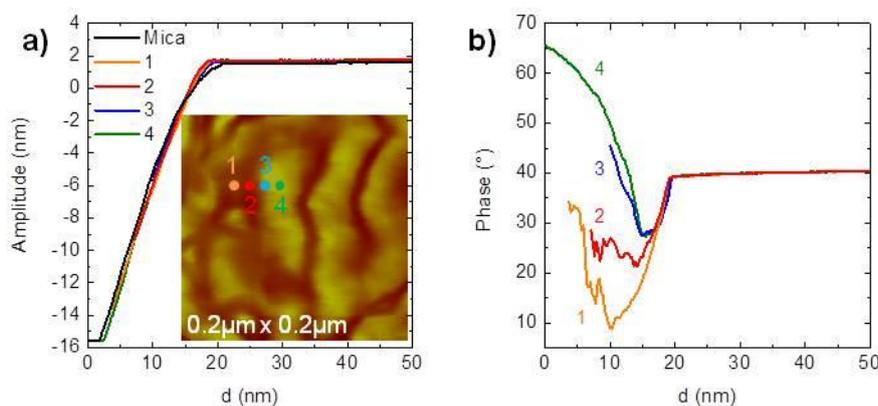


Figure 59. Courbes d'approche réalisées en mode tapping, à l'air, sur la structure *ripples* d'*E. coli* : a) courbes d'amplitude, b) courbes de phase. Les courbes 1 à 4 ont été réalisées dans l'ordre énoncé.

Loin de la surface, la phase de la sonde est celle fixée au départ. Dès l'approche de la surface, et suite aux interactions attractives entre la pointe et l'échantillon, la phase diminue pour ensuite remonter après le contact, suite aux interactions répulsives. Ce type de courbe (4) est habituellement obtenu sur une zone plus ou moins rigide et/ou plus ou moins structurée, en mode répulsif dominant. Elle a été obtenue sur les *ripples*. A mesure que l'on s'éloigne des *ripples* (1 à 3), le minimum de la CAR en phase est plus bas et la remontée « répulsive » tarde à venir. Ceci suggère que les *inter-ripples* (1) sont moins répulsifs ou plus dissipatifs donc moins organisés et plus fluides que les *ripples*.

Malgré la tendance dégagée, ces CAR sont peu reproductibles sur diverses zones d'un échantillon et souvent bruitées pour diverses raisons, notamment la pollution de la pointe. Le peu de différences notées en amplitude suggère également que, en raison de la nature de l'échantillon (mou), les leviers *tapping* utilisés sont trop raides ( $k = 45$  N/m). Nous avons, donc, décider d'étudier cette structure *ripples*, en mode contact, avec des leviers plus souples, afin de voir si des différences émergeaient.

### En mode contact

Une caractérisation nanomécanique de la structure *ripples* a donc été entreprise grâce au mode *peakforce*<sup>16</sup>, avec des leviers contacts plus souples ( $k = 0.12$  N/m) que

<sup>16</sup> Ces expériences ont été menées en collaboration avec Mr. Hassan Saadaoui, au Centre de Recherche Paul Pascal, équipé d'un AFM Icon. Le mode *peakforce* permet de distinguer les propriétés mécaniques de l'échantillon (module de Young, adhésion, déformation, dissipation) tout en l'imaginant

ceux utilisés en mode *tapping*. Une cartographie de la structure montre, comme mentionné précédemment, des nanodomains aux propriétés nanomécaniques diverses (Figure 60a-b). Les *ripples* sont caractérisés par une adhésion (et une dissipation) faibles (contraste sombre) alors que le module de Young<sup>17</sup> est élevé (contraste claire). A l'inverse, au sein des *inter-ripples*, l'adhésion et la dissipation sont élevées alors que le module de Young est faible. Les domaines *ripples* semblent donc plus organisés et donc « rigides » comparés aux zones *inter-ripples*, relativement et mécaniquement parlant.

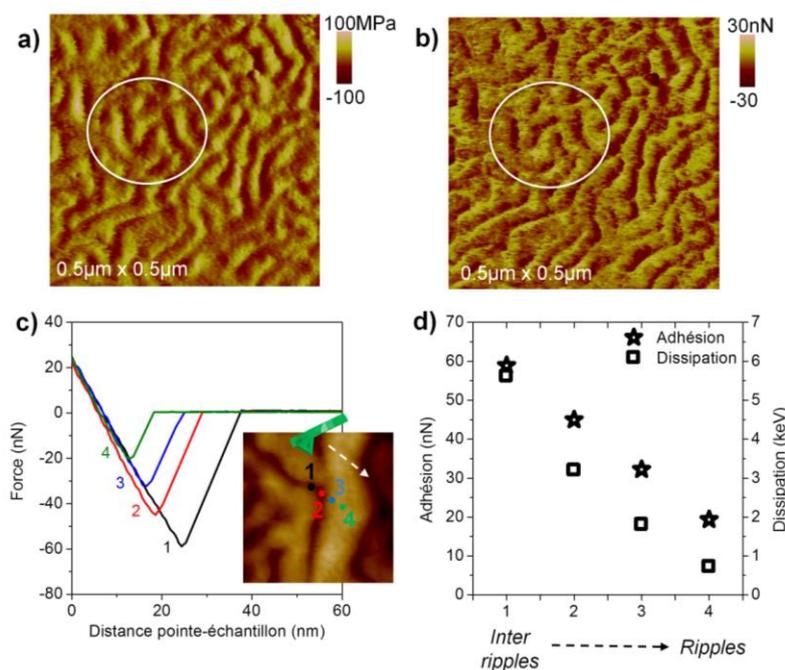


Figure 60. Caractérisation nanomécanique de la structure *ripples* d'*E. coli* en mode AFM *peak force* : a) image du module de Young, b) image d'adhésion. Les cercles aident à la visualisation des différences de contraste au sein des *ripples*. Quantification des propriétés d'adhésion et de dissipation au sein des *ripples* : c) courbes de force (retrait), d) adhésion et dissipation lors du passage d'un *inter-ripple* vers un *ripple*.

Une quantification de ces propriétés est envisageable grâce aux CF (Figure 60c-d). Lors du retrait, au moment où la sonde se détache de la surface de la cellule, un saut est observé dont (i) le minimum témoigne de la force nécessaire à la pointe pour se défaire de l'échantillon, *i.e.* la force d'adhésion et dont (ii) l'aire sur la courbe permet d'avoir accès à la dissipation au sein de l'échantillon. Ces CF montrent que l'adhésion et la dissipation diminuent lors du passage d'un *inter-ripple* (1) vers un *ripple* (4). Elles confirment et confortent ainsi les informations obtenues à partir des images : les *ripples* possèdent une structure plus dense et/ou organisée comparés aux *inter-ripples* qui semblent plus fluides et/ou moins organisés.

simultanément. Il permet également de contrôler précisément la force appliquée et de minimiser les forces latérales, garantissant ainsi le balayage non-destructif de l'échantillon.

<sup>17</sup> Le module de Young est la constante qui relie la contrainte de traction (compression) et la déformation d'un matériau élastique isotrope. Plus il est élevé, plus le matériau est dit rigide.

## Analogie avec les lipides et les polymères

L'ensemble des résultats obtenus en modes *tapping* et contact suggère que les domaines *inter-ripples* sont plus mous et viscoélastiques que les domaines *ripples*. Il est envisageable de faire une analogie avec les transitions de phase observées au sein de copolymères tribloc [14]. L'assemblage de deux polymères aux propriétés élastiques (poly(butadiène)) et thermoplastiques (PMMA) conduit à des transitions vitreuses au sein du copolymère. Diverses organisations des domaines vitreux (sphérique, cylindrique et lamellaire) sont observées suivant le taux de PMMA introduit dans le poly(butadiène). Ainsi, plus le taux de PMMA est important plus la structure lamellaire s'approche des serpentins que nous observons avec les *ripples* d'*E. coli* (Figure 61a). Ces séparations de phase sont attribuées aux ratios des poids moléculaires et des longueurs des chaînes carbonées des polymères en jeu : des microdomaines rigides de PMMA (de différentes formes) sont formés au sein d'une matrice plus viscoélastique. Par ailleurs, des CAR réalisées sur de tels matériaux montrent également des réponses diverses en phase selon l'organisation moléculaire et donc selon les propriétés visco-élastiques de la structure sondée, de façon similaire au comportement de la surface d'*E. coli* (cf. Figure 59) [15].

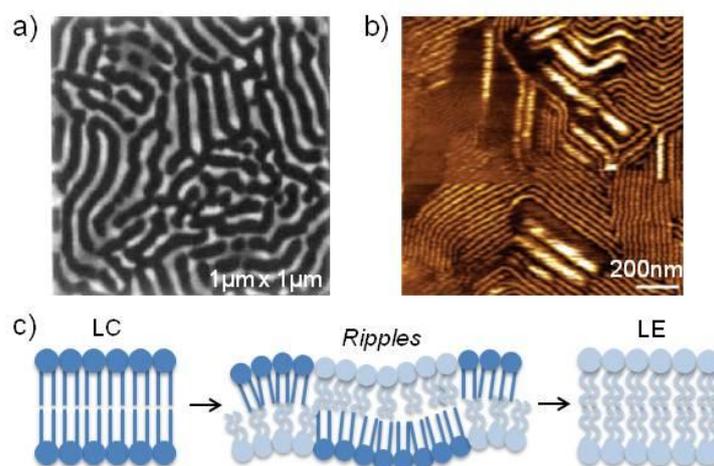


Figure 61. Analogie de la structure *ripples* d'*E. coli* avec (a) la transition de phase observée pour un copolymère tribloc (PMMA-b-poly(butadiène)-b-PMMA, 50% PMMA) [14] et (b) la transition de phase observée pour une bicouche lipidique de DMPC/DSPC (1 :1) [16]. c) Schéma illustrant la formation de ripples au sein d'une bicouche lipidique lorsque des lipides en phase liquide condensé (LC) et liquide expansé (LE) sont combinés.

De même, des transitions entre des phases « gel » et « fluide » surviennent pour les lipides : le premier état est appelé liquide condensé (LC) et le second liquide expansé (LE). Lors d'études sur les bicouches lipidiques, ces transitions LE-LC peuvent survenir en diminuant la température mais également en comprimant la membrane à des pressions plus ou moins élevées [17]. Cette transition principale LE-LC est précédée par une pré-transition pour certains lipides, qui se caractérise par la formation de *ripples* de largeur allant de 10 à 30 nm selon les cas [18]. Tout particulièrement, les bicouches contenant du DMPC présentent une pré-transition *ripples* (Figure 61b) [16].

Elle est due à la création de défauts locaux au sein de la couche lipidique durant la transition LE-LC, qui entraînent la courbure locale de la membrane suivant un motif périodique dépendant de la répartition des défauts (Figure 61c) [19].

### 3.2.3.3 L'organisation de la membrane externe

La littérature fait parfois état de cette irrégularité surfacique pour *E. coli*, principalement en image de topographie, sans y prêter un quelconque intérêt et sans en expliquer l'origine [20–22]. Toutefois, la majorité des publications ne la mentionne même pas, s'en tenant à la forme en bâtonnet et l'aspect régulier bien connu de cette bactérie. Nous reportons, ici, pour la première fois à notre connaissance, une « analyse » de cette structuration surfacique d'*E. coli*.

Afin de comprendre l'origine de ce motif et d'écartier l'éventualité d'artefacts liés à l'AFM, une étude parallèle a été menée sur une bactérie à Gram positif, *Bacillus subtilis*. Très brièvement – les détails sont donnés au paragraphe suivant – ni séparation de phase ni relief n'ont été observés sur *B. subtilis*. Or, le protocole étant inchangé, seule l'existence d'une membrane externe différenciant les bactéries à Gram négatif (*E. coli*) des bactéries à Gram positif (*B. subtilis*) permet de justifier la différence de comportements. Ainsi, c'est bien la membrane externe (OM) d'*E. coli* qui lui confère sa structure en *ripples*. Le feuillet de la OM étant majoritairement composé de lipopolysaccharides (LPS) [4], il est probable que ces molécules soient elles-mêmes majoritairement responsables de cette structuration (Figure 62a-c).

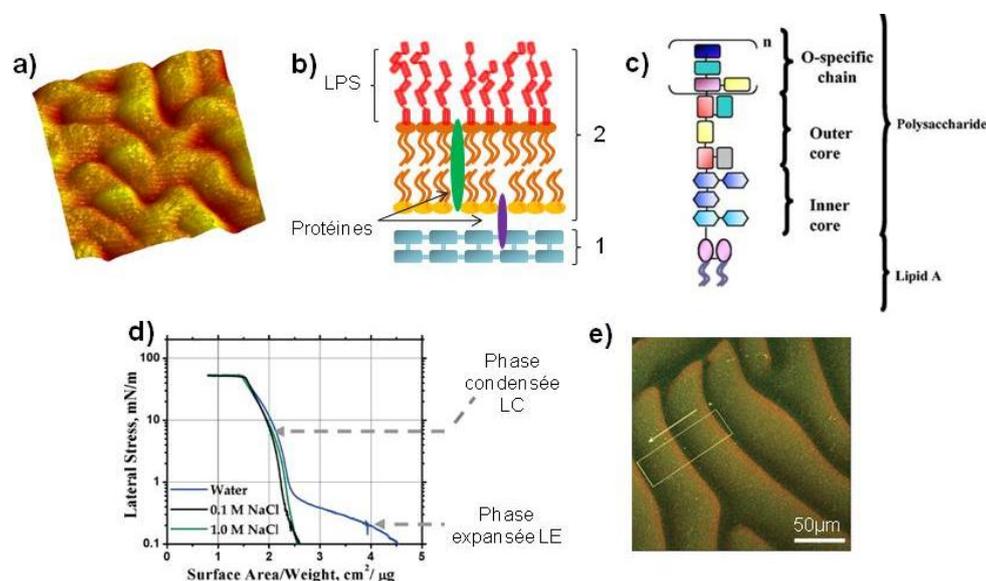


Figure 62. Hypothèses sur l'origine de la structure *ripples* de la surface d'*E. coli*. a) Image AFM 3D de cette structure. b) Représentation schématique de la membrane externe supposée conférer à la bactérie cette structuration particulière. c) Schéma de la structure d'un LPS [23]. d) Comportement de type polymérique d'une monocouche de LPS à l'interface air-eau [24]. e) Image confocale du réseau de protéines Min<sup>18</sup> formant des ondulations, type *ripples*, à la surface d'une membrane lipidique [25].

<sup>18</sup> Le réseau de protéines Min (MinC, MinD et MinE) est utilisé par *E. coli* pour localiser la région du septum avant la division cellulaire.

Par ailleurs, celle-ci n'est pas sans rappeler les séparations de phases observées pour certains polymères, mentionnés ci-dessus. Les molécules de LPS étant amphiphiles, certaines ont été étudiées par des mesures de pression de surface sous forme de monocouches de Langmuir déposées à l'interface air-eau. Les isothermes de compression<sup>19</sup> obtenues montrent une transition de phase attribuée au comportement polymérique de ces molécules [24] (Figure 62d). De plus, une étude réalisée sur des monocouches de LPS, à l'interface air-eau ou déposées sur mica, a montré la coexistence de domaines en phase LE et en phase LC dont les propriétés topographique et rhéologique (phase en AFM) sont en accord avec celles mises en évidence dans nos travaux [26]. Ainsi, les contrastes de hauteur et de phase existant à la surface d'*E. coli* (Figure 58) s'expliqueraient soit par la conformation latérale des chaînes de LPS soit par l'hétérogénéité des chaînes « O » à l'extrémité de ces molécules (Figure 62c), comme l'ont souligné Kotra *et al.* [27].

Les LPS sont, certes, les composants majoritaires de la OM et apparaissent donc comme la clé de cette structure *ripples*. Toutefois, le rôle joué par certaines protéines présentes dans la OM ou à l'interface de la OM et du peptidoglycane n'est pas à écarter. En effet, le système de protéines Min, impliqué dans la division cellulaire des bactéries, oscille afin de sélectionner le plan de division. Ces oscillations conduisent, selon un mécanisme de diffusion, à une auto-organisation ondulée du réseau de protéines, proche de la structure *ripples* observée chez *E. coli* [25] (Figure 62e). Toutefois, ces oscillations présentent une période ( $\approx 50 \mu\text{m}$ ) beaucoup plus importante que celle observée pour la structure *ripples* d'*E. coli*.

Enfin, la bactérie *E. coli* étant observée à l'air, des phénomènes de déshydratation ne sont pas, non plus, à écarter pour expliquer cette structuration particulière. En effet, la dessiccation pourrait éventuellement modifier les propriétés de la OM d'*E. coli* puisque, hydratées, ces bactéries exhibent une surface, certes rugueuse, mais dépourvue de la structure *ripples* (cf. Annexe B). Malgré tout, cette structure implique des organisations ou compositions moléculaires différentes entre les nanodomains observés, qui selon leur degré d'hydratation, interagissent différemment avec la sonde AFM (Figures 59-60).

De nombreuses études s'attachent à modéliser cette membrane bactérienne par une simple mono- ou bicouche lipidique [28–31]. Toutefois, le rôle crucial des molécules de LPS est ici mis en évidence et a fait l'objet de travaux préliminaires reposant sur des monocouches à l'interface air-eau et des films de Langmuir-Blodgett, développés en annexe de ce manuscrit (cf. Annexe A).

---

<sup>19</sup> Relation entre l'aire moléculaire moyenne et la variation de tension de surface au cours de la compression.

### 3.2.4 Vieillessement du biofilm bactérien d'*E. coli*

Le vieillissement de la population de *E. coli* a été caractérisé sur une PEM (cf. chapitre 2) afin que les bactéries restent immobilisées au cours du temps. Le processus repose sur le dépôt alterné de couches de polyélectrolytes chargés positivement et négativement, la dernière couche étant positive pour immobiliser les bactéries chargées négativement. L'optimisation du dépôt de la PEM, réalisée dans le cadre de la conception du biocapteur, est présentée en chapitre 5.

L'intérêt de cette étude sur le vieillissement est double :

- Suivre l'évolution temporelle de la population bactérienne ;
- Distinguer les effets temporels de ceux induits par un agent externe tel que des NPs (cf. chapitre 4).

Les caractérisations morphologiques et rhéologiques (structure de la OM) ayant fait l'objet d'une attention particulière précédemment, l'étude des effets du vieillissement a porté sur ces deux éléments. Quatre échantillons indépendants ont été étudiés pendant un mois, et sur diverses zones, pour s'assurer de la reproductibilité et de la répétabilité des effets observés. Lorsqu'ils ne sont pas imagés, les échantillons sont conservés dans un dessiccateur. La Figure 63 présente des images d'une population immobilisée d'*E. coli* sur pour des surfaces relativement larges, prises à différents temps J0, J7, J15 et J30.

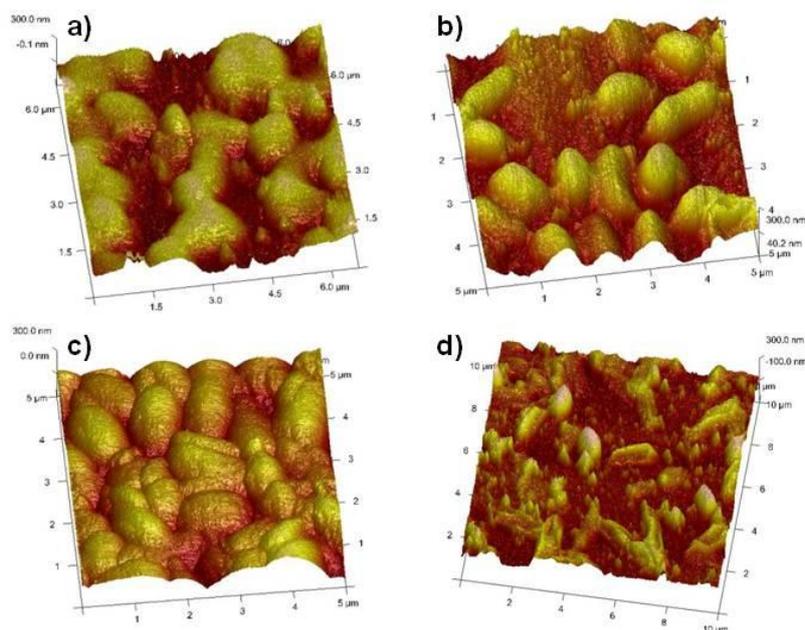


Figure 63. Images AFM de topographie montrant l'évolution de la population des bactéries *E. coli* déposée sur une PEM au cours d'un mois : J0 (a), J7 (b), J15 (c) et J30 (d).

Le jour du dépôt, des agrégats plus ou moins denses couvrent le substrat (J0 - Figure 63a). L'immobilisation préalable des bactéries implique, en effet, une densité plus importante qu'un simple dépôt sur mica, comme déjà mentionné. Les cellules observées sont majoritairement des bâtonnets, organisés dans l'ensemble de manière

assez compacte, du fait de l'état d'agrégation. Après 7 jours, le taux de recouvrement du substrat semble similaire à J0, parfois légèrement plus faible (J7 - Figure 63b). Après 15 jours, le taux de recouvrement atteint un maximum, le substrat n'étant plus visible (J15 - Figure 63c). Après un mois, la majorité des bactéries présentes sont mortes et vides de contenu (J30 - Figure 63d).

En conséquence, il semble que malgré l'absence d'une source externe de nutriments, certaines bactéries réussissent à survivre, voire même à croître, à la surface du substrat. Ceci est envisageable si l'on considère que certaines bactéries sont toutefois affaiblies voire lysées et peuvent expulser certains composés intracellulaires, servant de sources nutritives alternatives pour les bactéries encore capables de se multiplier. Toutefois, cela est à relativiser, en considérant qu'après un mois, la majorité des cellules est morte vraisemblablement essentiellement par manque de nutriments, ou par déshydratation.

D'un point de vue morphologique, à échelle plus locale, des différences apparaissent après 7 et 15 jours. Initialement, *E. coli* présente une forme de bâtonnet (cf. sections précédentes). Aux temps  $t = 7 - 15$  jours, une fraction de la population présente une forme davantage sphérique. Il est à noter que, pour ces deux temps, les formes en bâtonnets et sphériques coexistent dans la population (Figure 64a-b). Certaines exhibent même des affaissements plus ou moins prononcés aussi bien en bordure qu'au centre (Figure 64c-d).

Ces dégradations montrent que, quelques jours après leur dépôt, les bactéries n'ont plus leur état physiologique de départ. Elles subissent des altérations allant jusqu'à la lyse cellulaire précédemment décrite pour J30, qui se caractérise par une bactérie vide de tout contenu (Figure 64e).

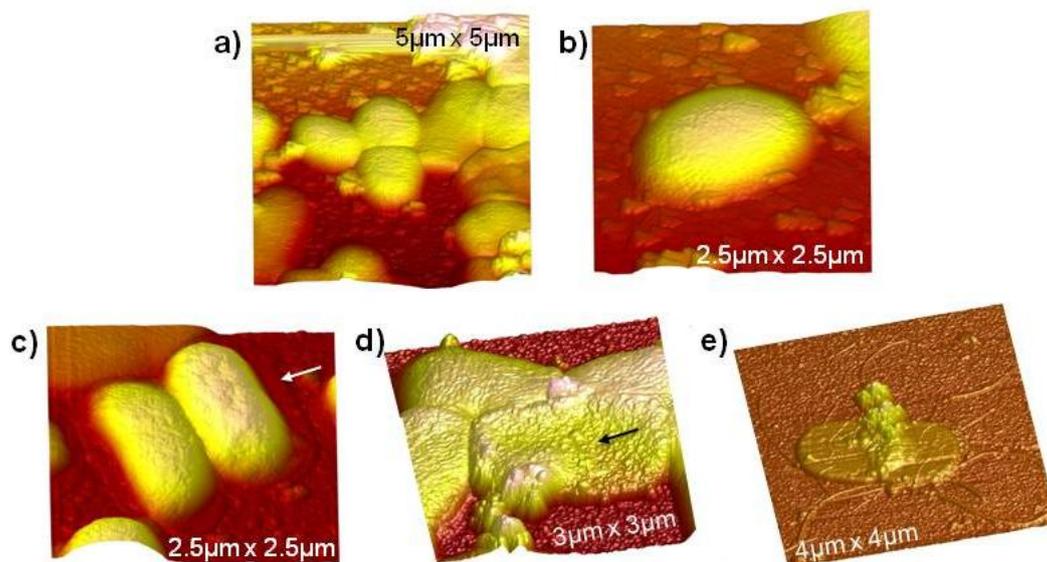


Figure 64. Changements morphologiques suite à l'évolution temporelle des bactéries *E. coli*. a-b) Coexistence de bactéries de forme bâtonnets et ovoïdes à J15. c-d) Affaissement partiel de bactéries à J15 et J17 respectivement (flèches). e) Lyse cellulaire observée à J30.

Outre cet aspect morphologique, la structure *ripples* de la OM d'*E. coli* (cf. sections précédentes) est particulièrement affectée au cours du temps. Après 7 jours, certaines

bactéries conservent cette organisation tandis que d'autres adoptent une organisation de type agrégats (Figure 65a).

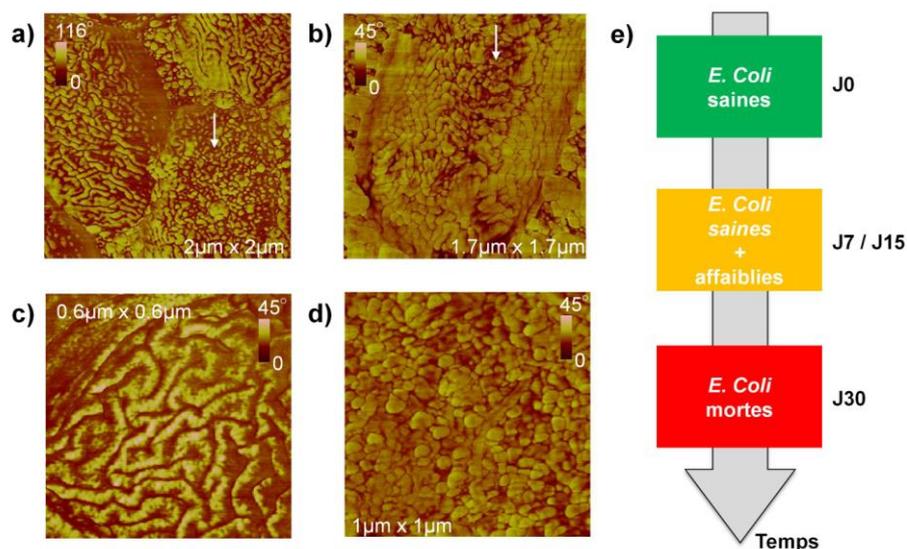


Figure 65. Evolution temporelle de la structure externe membranaire d'*E. coli*. Images AFM de phase montrant une structure *ripples* altérée par endroits après (a) 7 et (b) 15 jours. c-d) Comparaison, à échelle réduite, de la structure *ripples* observée à J0 et de la structure altérée de type agrégats sphériques observée à J7. e) Représentation en frise chronologique de l'évolution des bactéries *E. coli*.

Celle-ci se caractérise par des petits agrégats sphériques couvrant la surface de la bactérie à la place des serpentins, de façon plus hétérogène et moins compacte. De plus, certaines bactéries sont également associées à une phase faible (zones sombres), reflet d'une dissipation plus importante au sein de la OM (Figure 65b). Cette réorganisation de la OM est probablement due à la restructuration des molécules de LPS sous l'effet du vieillissement.

Ce travail a fait l'objet d'un article présenté en annexe. Elle montre l'importance de caractériser les échantillons bactériens d'*E. coli* dès le premier jour (ce qui sera le cas pour l'ensemble de ces travaux), afin d'éviter des effets de vieillissement et de dégradations temporelles qui pourraient se combiner aux effets potentiellement antibactériens des NPs à évaluer.

### 3.3 *B. subtilis*, une bactérie « sans cerveau »

Les bactéries *B. subtilis* sont des bactéries à Gram positif, qui possèdent donc une membrane plasmique et une couche épaisse de peptidoglycane mais sont dépourvues de membrane externe (Figure 66) [4]. Elles constituent donc un modèle d'étude pour ce groupe de bactéries.

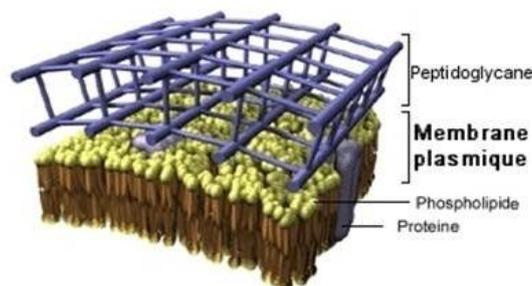


Figure 66. Structure d'une bactérie à Gram positif : *B. subtilis* ([www.sirtin.fr](http://www.sirtin.fr)).

De la même manière que pour *E. coli*, l'ensemble des images AFM présenté ci-dessous a été obtenu en mode *tapping*, à l'air, excepté mention contraire. Les leviers utilisés sont les mêmes que pour *E. coli* ( $f = 190$  kHz et  $k = 48$  N/m).

#### 3.3.1 Survie des bactéries *B. subtilis*

Nombre d'études microbiologiques se sont intéressées à *B. subtilis* et à ses conditions de survie dans divers milieux, un milieu nutritif classique (type *Nutrient Broth*) étant majoritairement utilisé pour sa caractérisation [32,33]. Pour des questions pratiques, nous avons souhaité, comme pour *E. coli*, trouver un milieu « plus favorable » pour l'étude de cette bactérie par AFM.

##### 3.3.1.1 Effet du milieu de resuspension des bactéries

Le protocole de resuspension dans l'eau ultrapure (utilisé pour *E. coli*) a, a priori, donné des résultats convaincants en imagerie AFM : les bactéries ont la forme bâtonnet attendue, un aspect bombé et ne présentent aucun signe de lyse ou de dégradation apparente (Figure 67a-b). Malgré cette apparence « saine », les tests de viabilité montrent que la survie de *B. subtilis* dans l'eau est compromise dès 30 min. d'incubation (Figure 67c). La diminution de la population est telle (de l'ordre d'un facteur  $10^3$  en 30 min.) qu'il est impossible d'envisager une étude sur l'interaction avec des NPs pendant 2 h. Un milieu plus complexe, déjà mentionné et souvent utilisé pour les systèmes bactériens, a donc été envisagé, le PBS 1x. Dans ce milieu, les bactéries survivent plus longtemps (Figure 67c).

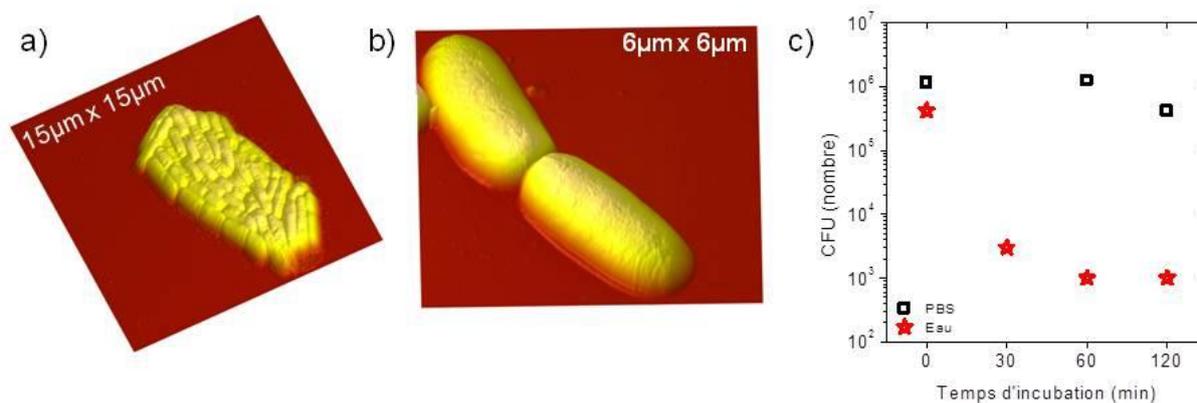


Figure 67. a-b) Images AFM de topographie montrant l'aspect de la bactérie *B. subtilis* après 2h d'incubation dans de l'eau ultrapure. c) Influence du temps d'incubation et du solvant sur la viabilité de *B. subtilis*.

### 3.3.1.2 Effet de la centrifugation

Dans un protocole d'expérience de viabilité, il est usuel de récupérer les bactéries en culture puis de les centrifuger afin de les redisperser dans le milieu tampon adéquat (en l'occurrence le PBS – cf. chapitre 2). Or, la viabilité de *B. subtilis* s'est révélée être très affectée lors d'étapes de centrifugation (Figure 68). En effet, à l'état initial, aucune bactérie ne survit à une centrifugation à 5000 tour/min. pendant 5 min. Des paramètres moins rudes, 3000 tour/min pendant 3 min, permettent une survie plus importante. Cependant, la population bactérienne chute drastiquement après 2 h d'incubation dans le PBS 1x, avec un taux de survie de 15 % (Figure 68a). Aussi est-il impossible de travailler avec un si faible pourcentage de bactéries viables, bien qu'issues d'une culture fraîche.

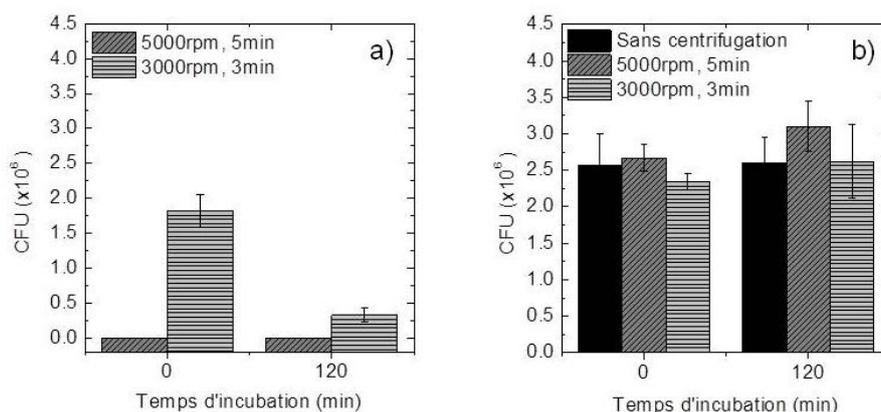


Figure 68. Viabilité de bactéries *B. subtilis* dispersées dans du PBS, issues (a) d'une culture fraîche et (b) de colonies sur boîte de Petri.

Pour pallier ce problème, des cellules issues de boîtes de Pétri, donc en phase stationnaire, ont subi les mêmes traitements. Ces dernières ne sont pas affectées par le degré de centrifugation, et le taux de survie est proche de 100 % (Figure 68b).

### 3.3.2 Caractérisation par AFM

Contrairement à *E. coli*, *B. subtilis* est une souche très peu étudiée d'un point de vue imagerie (morphologique et mécanique), la majorité de la littérature se focalisant sur les spores que peuvent former ces bactéries [34,35]. Aussi a-t-il fallu optimiser le protocole pour leur observation par AFM, sans le soutien d'études déjà publiées.

#### 3.3.2.1 Un protocole adapté

Le milieu tampon PBS 1x, déposé seul sur mica, présente l'inconvénient de laisser en surface des cristaux formés par les sels qu'il contient, raison pour laquelle nous l'avons abandonné dans le cas d'*E. coli*. Les bactéries suspendues dans le PBS et imagées à l'air après séchage sont donc masquées par ces cristaux qui couvrent une grande partie du substrat (Figure 69 haut). Il est donc nécessaire d'éliminer ces cristaux afin de caractériser correctement *B. subtilis*. Un simple rinçage suffit, a priori, à évacuer les cristaux faiblement liés à la surface du mica. Mais pour que les bactéries demeurent sur l'échantillon, il faut procéder à leur immobilisation préalable. Les bactéries *B. subtilis* suspendues dans le PBS sont donc fixées sur une PEM, comme mentionné précédemment pour l'étude du vieillissement d'*E. coli*. Après séchage l'échantillon est rincé à l'eau ultrapure, le contact entre la bactérie et le solvant étant trop court pour induire la lyse cellulaire (Figure 69 bas).

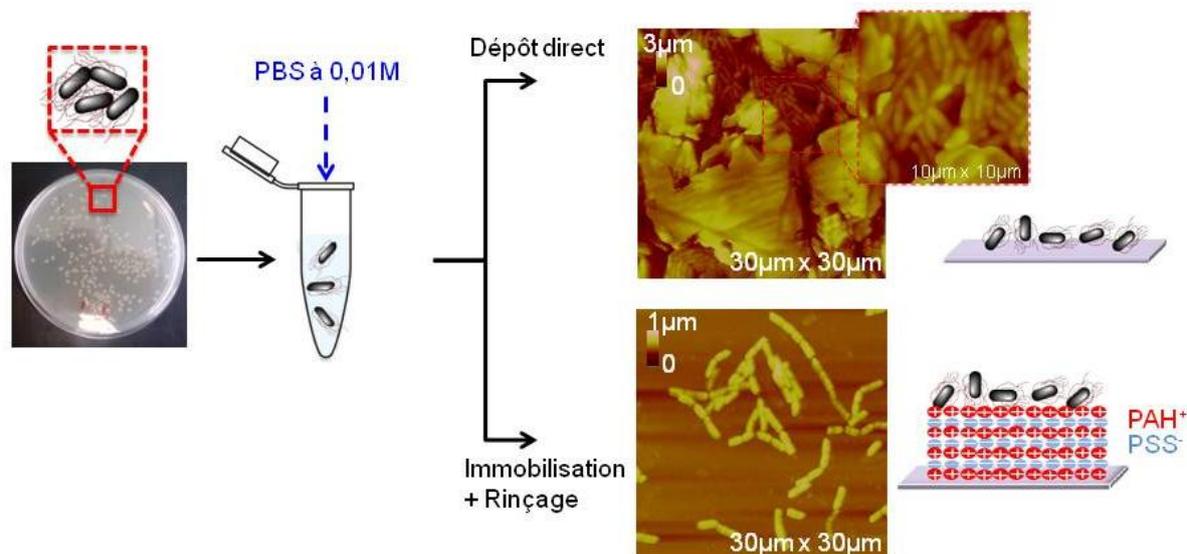


Figure 69. Optimisation du protocole d'incubation et de dépôt de *B. subtilis* pour les observations par AFM.

#### 3.3.2.2 Caractérisation morphologique et rhéologique

Observées à l'air, les bactéries *B. subtilis* forment des chaînettes plus ou moins allongées et agrégées, observées en microscopie optique et AFM (Figure 70). Des bactéries plus ou moins isolées sont également observées. La comparaison du comportement de *B. subtilis* avec celui d'*E. coli* (Figure 52) souligne (i) un degré

d'isolement moindre de *B. subtilis*, dû au protocole d'immobilisation mais également à l'organisation en chaînettes classiquement observée pour ce bacille et (ii) une réduction du degré de recouvrement du substrat par le biofilm bactérien, due à l'étape de rinçage.

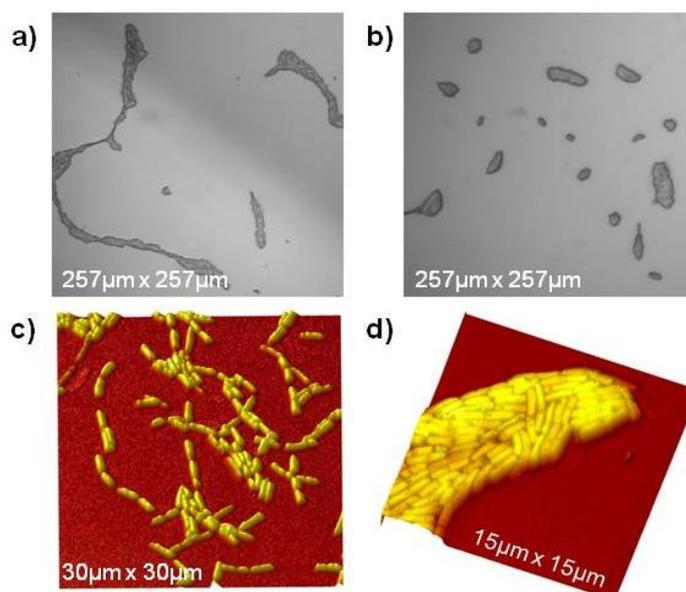


Figure 70. Organisation de la population bactérienne de *B. subtilis*, en chaînettes et agrégats observée par (a-b) microscopie optique et (c-d) AFM.

Par ailleurs, les bactéries *B. subtilis* possèdent une forme allongée et bombée caractéristique des bacilles et très similaire à celle observée pour *E. coli*. Leur caractérisation dimensionnelle, proche de celle d'*E. coli*, est reportée dans le Tableau 8. Des faibles différences sont à nouveau observées selon que la bactérie est isolée ou se trouve au sein d'un agrégat.

Tableau 8. Comparaison des dimensions de *B. subtilis* et *E. coli*, selon leur état d'isolement (N = 43) et d'agrégation (N = 20).

		Longueur (µm)	Largeur (µm)	Hauteur (µm)
<i>B. subtilis</i>	Isolées	$2.1 \pm 0.5$	$0.7 \pm 0.1$	$0.28 \pm 0.03$
	Agrégés	$2.2 \pm 0.9$	$0.7 \pm 0.1$	$0.27 \pm 0.03$
<i>E. coli</i>	Isolées	$1.7 \pm 0.3$	$0.8 \pm 0.2$	$0.31 \pm 0.07$
	Agrégés	$1.3 \pm 0.3$	$0.7 \pm 0.1$	$0.27 \pm 0.06$

Des « zoom » successifs sur *B. subtilis* révèlent une structure surfacique régulière, sans relief particulier (Figure 71b,d). Les images de phase montrent également une structure homogène de cette surface : aucune séparation de phases n'est observée, uniquement quelques aspérités probablement dues à du bruit de fond (Figure 71c-d). Ceci confirme notre hypothèse selon laquelle la séparation de phases chez *E. coli* (Figure 71d insert) est attribuée à l'organisation des molécules de la OM, propre aux bactéries à Gram négatif. La couche de peptidoglycane exposée à la surface de *B.*

*subtilis*, et imagée ici, présente donc, quant à elle, une organisation structurale et des propriétés rhéologiques homogènes.

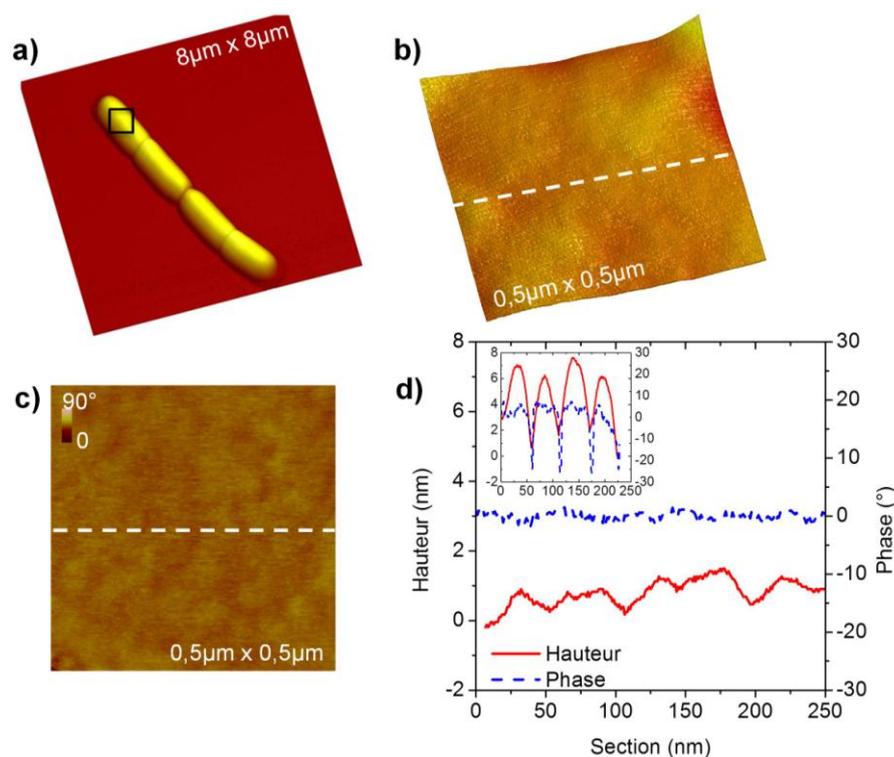


Figure 71. a) « Zoom » de la bactérie *B. subtilis* en chaîne. b-c) « Zoom » sur la surface de cette bactérie en (b) topographie et (c) phase. d) Sections AFM réalisées selon les pointillés indiqués sur les images (b-c) montrant l'homogénéité de la surface en termes de relief et rhéologie. L'insert rappelle les profils de hauteur et de phase obtenus à la surface d'*E. coli*.

### 3.3.2.3 Vieillessement de la population *B. subtilis*

De la même manière que pour *E. coli*, le vieillissement de la population de *B. subtilis*, déposée sur une PEM, a été caractérisé. L'étude s'attache essentiellement à montrer de potentiels effets sur la mortalité de la bactérie et sur la structure de peptidoglycane qui la recouvre (images de phase).

La Figure 72 présente l'évolution temporelle de la population immobilisée de *B. subtilis*. Le jour du dépôt (J0), des agrégats plus ou moins denses couvrent le substrat, du fait de l'immobilisation préalable des bactéries, comme mentionné ci-dessus. Les cellules observées sont majoritairement des bâtonnets, organisés en agrégats mais également en chaînettes. Après 8 jours (J8), le taux de recouvrement du substrat est similaire à J0. Après 20 et 30 jours (J20, J30), le taux de recouvrement apparaît légèrement plus faible, même s'il est zone dépendante, du fait, une nouvelle fois, du procédé d'immobilisation. Après 8, 20 et 30 jours, les bactéries ont une morphologie identique aux bactéries fraîchement déposées. Par ailleurs, à cette échelle, le nombre de bactéries lysées (vides de contenu) ne semble pas augmenter significativement au cours du temps. En conséquence, et comme pour *E. coli*, il semble que malgré l'absence d'une source de nutriments externe, les bactéries *B. subtilis* réussissent à survivre à la surface du substrat.

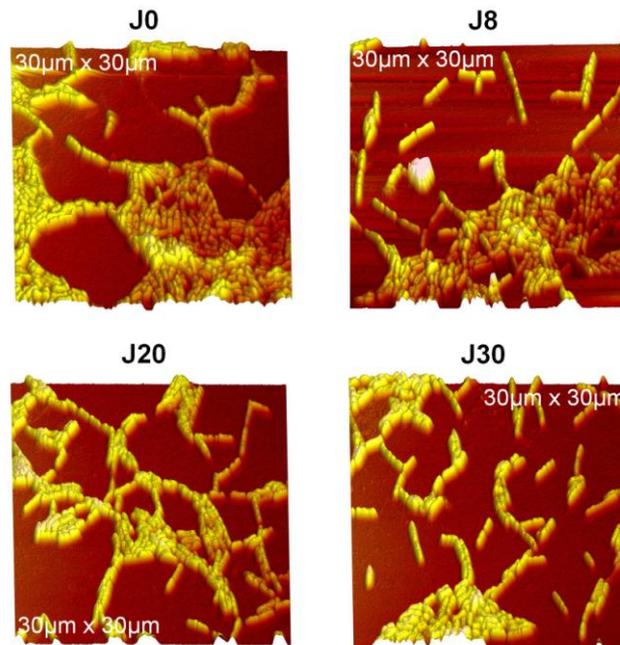


Figure 72. Images AFM de topographie montrant l'évolution de la population de *B. subtilis* déposée sur une PEM au cours d'un mois.

D'un point de vue purement morphologique, contrairement à *E. coli*, aucune modification de la forme bombée et en bâtonnet de *B. subtilis* ne survient lors sa conservation au cours d'un mois. En revanche, la structure de la couche de peptidoglycane subit quelques altérations après 8 jours (Figure 73).

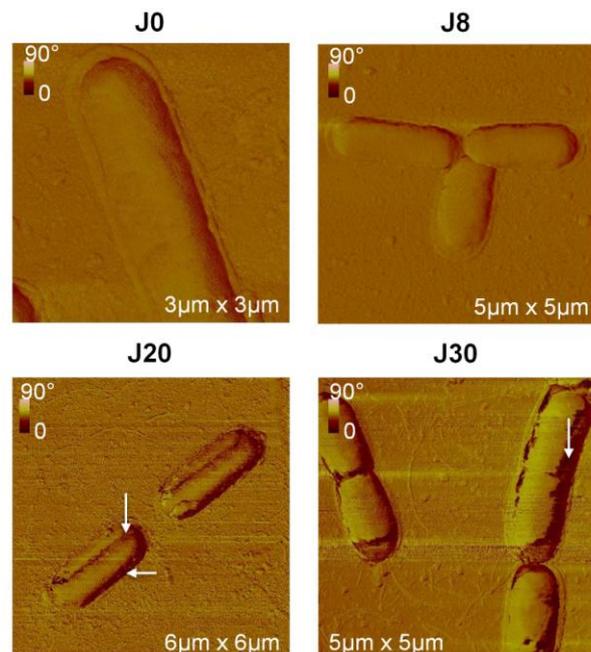


Figure 73. Images AFM de phase montrant l'évolution de la structure de la couche de peptidoglycane de *B. subtilis*, au cours du temps. Les flèches pointent sur les zones altérées de la bactérie.

En effet, l'organisation homogène décrite en section 3.3.2.2, constatée sur les bactéries à J0 et J8, ne l'est plus à J20 et J30. Des zones présentant une phase moins élevée que le reste de la bactérie sont observées, notamment sur les bords et la partie

longitudinale et centrale. Ce contraste de phase témoigne d'une organisation moins rigide / organisée au sein de ces zones.

Cette étude montre, une nouvelle fois, l'importance d'imager les échantillons bactériens dès les premiers jours (ce qui sera le cas pour l'ensemble de ces travaux), afin d'éviter des effets de vieillissement et de dégradations temporelles qui pourraient se combiner aux effets potentiellement antibactériens des NPs à évaluer.

---

Au cours de ce chapitre, nous avons caractérisé, de manière indépendante, les acteurs de l'interaction, *i.e.* les NPs de silice ainsi que les deux modèles bactériens, *E. coli* et *B. subtilis*.

Des NPs de 4, 10, 30, 50, 80 et 100 nm, chargées négativement, ainsi que des NPs de 30 et 100 nm, chargées positivement, sont étudiées et nous permettront, par la suite, d'étudier l'influence de la charge et de la taille des NPs sur leurs interactions avec les bactéries. Parmi elles, les NPs commerciales (4, 10, 50 et 100 nm) présentent l'inconvénient majeur d'être polydisperses, de forme non parfaitement sphérique et de chimie de surface indéfinie. Toutefois, ces NPs commerciales nous permettent d'accéder à des tailles (4 et 10 nm) qu'il est difficile d'obtenir aisément en laboratoire. A l'inverse, les synthèses effectuées à l'ICMCB, dérivées du procédé Stöber, garantissent la monodispersité, la sphéricité et la chimie de surface contrôlée des NPs « *home-made* ». L'ensemble des NPs a été caractérisé par MET et DLS, afin d'obtenir leur dimension exacte, ainsi que par zétamétrie afin d'obtenir leur charge surfacique.

La bactérie *E. coli*, suspendue dans de l'eau ultrapure, déposée sur du mica puis observée à l'air, présente une forme bâtonnet dont les dimensions moyennes sont de 1.7  $\mu\text{m}$  de long, 0.8  $\mu\text{m}$  de large et 0.3  $\mu\text{m}$  de haut. Elle exhibe, à sa surface, un relief particulier associé à une séparation de phase faisant coexister des nanodomains de forme serpentin (« bourrelets » et « sillons »). Cette structure, par la suite nommée structure *ripples*, présente des propriétés différentes, interprétées grâce aux images de phase et aux CAR en mode *tapping*, aux CF en mode contact et au mode *peakforce* : les *ripples* sont associés à des zones hautes, relativement rigides comparées aux *inter-ripples*, associés à des zones moins élevées, plus dissipatives et adhésives. Cette structure *ripples* est imputée à la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, et plus précisément à la présence importante de molécules de LPS dans son feuillet externe. Des monocouches de LPS, observées dans les mêmes conditions, présentent, en effet, une structure similaire et une transition de phase, en accord avec les études précédemment reportées dans la littérature.

La bactérie *B. subtilis*, ne survivant pas dans l'eau, a été suspendue dans du PBS, déposée sur une multicouche de polyélectrolytes garantissant son immobilisation, rincée puis observée à l'air. Dans ces conditions, elle présente une forme bâtonnet dont les dimensions moyennes sont de 2.1  $\mu\text{m}$  de long, 0.7  $\mu\text{m}$  de large et 0.3  $\mu\text{m}$  de haut. Elle n'exhibe, à sa surface, ni relief ni séparation de phase. Cette bactérie à Gram positif,

étant dépourvue de membrane externe, présente une couche de peptidoglycanes dont les propriétés topographiques et mécaniques sont donc homogènes.

Une étude du vieillissement sur un mois des biofilms, notamment formés par *E. coli*, indique des dommages morphologiques et membranaires après 7 jours. La structure *ripples*, caractéristique des bactéries saines, transite vers une structure moins lamellaire de type agrégats. A terme, la lyse cellulaire est observée par des bactéries vides de contenu et la présence de débris cellulaires à la surface du substrat. Aussi, les bactéries traitées par des NPs, au cours du chapitre suivant, seront observées le jour même ou le lendemain du dépôt afin de découpler l'effet propre des NPs et celui de l'évolution temporelle.

## Bilan

- ❖ Des NPs de taille et charge contrôlées :
  - ✓ Des NPs commerciales, présentes dans l'environnement, et permettant l'accès à des diamètres très faibles (4 et 10 nm)
  - ✓ Des NPs synthétisées, permettant un contrôle et une maîtrise de leurs caractéristiques (taille et charge)
  
- ❖ Un modèle de bactérie à Gram-négatif, *E. coli* :
  - ✓ Forme bâtonnet :  $L = 1.7 \mu\text{m}$ ,  $l = 0.8 \mu\text{m}$  et  $h = 0.3 \mu\text{m}$
  - ✓ Une structure surfacique particulière avec séparation de phase (*ripples*), due à l'organisation de la membrane externe, notamment des LPS
  - ✓ Une raideur relativement faible :  $k = 0.24 \text{ N/m}$
  
- ❖ Un modèle de bactérie à Gram-positif, *B. subtilis* :
  - ✓ Des conditions de survie difficiles (PBS, état « colonies »)
  - ✓ Forme bâtonnet :  $L = 2.1 \mu\text{m}$ ,  $l = 0.7 \mu\text{m}$  et  $h = 0.3 \mu\text{m}$
  - ✓ Une structure surfacique homogène (topographie et phase), due à l'absence d'une membrane externe et exposant la couche de peptidoglycane

## Bibliographie

- [1] Jiang J, Oberdörster G, Biswas P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanoparticle Res* 2009;11:77–89. doi:10.1007/s11051-008-9446-4.
- [2] An SSA, Kim K, Kim HM, Lee W, Lee C, Kim T, et al. Surface treatment of silica nanoparticles for stable and charge-controlled colloidal silica. *Int J Nanomedicine* 2014;29. doi:10.2147/IJN.S57922.
- [3] Hartlen KD, Athanasopoulos APT, Kitaev V. Facile Preparation of Highly Monodisperse Small Silica Spheres (15 to >200 nm) Suitable for Colloidal Templating and Formation of Ordered Arrays. *Langmuir* 2008;24:1714–20. doi:10.1021/la7025285.
- [4] Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. Seventh Edition. McGraw-Hill Higher Education, 2008; 2008.
- [5] Liao C-H, Shollenberger LM. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Lett Appl Microbiol* 2003;37:45–50.
- [6] Rozen Y, Belkin S. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol Rev* 2001;25:513. doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00589.x.
- [7] Vital M, Hammes F, Egli T. Escherichia coli O157 can grow in natural freshwater at low carbon concentrations. *Environ Microbiol* 2008;10:2387–96. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01664.x.
- [8] Blaustein RA, Pachepsky Y, Hill RL, Shelton DR, Whelan G. Escherichia coli survival in waters: Temperature dependence. *Water Res* 2013;47:569–78. doi:10.1016/j.watres.2012.10.027.
- [9] Stewart EJ, Madden R, Paul G, Taddei F. Aging and Death in an Organism That Reproduces by Morphologically Symmetric Division. *PLoS Biol* 2005;3:e45. doi:10.1371/journal.pbio.0030045.
- [10] Pierucci O. Dimensions of Escherichia coli at various growth rates: model for envelope growth. *J Bacteriol* 1978;135:559–74.
- [11] Bolshakova A., Kiselyova O., Filonov A., Frolova OY, Lyubchenko Y., Yaminsky I. Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy* 2001;86:121–8. doi:10.1016/S0304-3991(00)00075-9.
- [12] Osiro D, Bernardes Filho R, Assis OBG, Jorge LA de C, Colnago LA. Measuring bacterial cells size with AFM. *Braz J Microbiol* 2012;43:341–7.
- [13] Gibson MC, Patel AB, Nagpal R, Perrimon N. The emergence of geometric order in proliferating metazoan epithelia. *Nature* 2006;442:1038–41. doi:10.1038/nature05014.
- [14] Rasmont A, Leclère P, Doneux C, Lambin G, Tong JD, Jérôme R, et al. Microphase separation at the surface of block copolymers, as studied with atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2000;19:381–95.

- 
- [15] Leclère P, Dubourg F, Kopp-Marsaudon S, Brédas JL, Lazzaroni R, Aimé JP. Dynamic force microscopy analysis of block copolymers: beyond imaging the morphology. *Proc 4th Int Conf Noncontact At Microsc* 2002;188:524–33. doi:10.1016/S0169-4332(01)00966-7.
- [16] Leidy C, Kaasgaard T, Crowe JH, Mouritsen OG, Jørgensen K. Ripples and the formation of anisotropic lipid domains: imaging two-component supported double bilayers by atomic force microscopy. *Biophys J* 2002;83:2625–33.
- [17] Binder WH, Barragan V, Menger FM. Domains and Rafts in Lipid Membranes. *Angew Chem Int Ed* 2003;42:5802–27. doi:10.1002/anie.200300586.
- [18] Janiak MJ, Small DM, Shipley GG. Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin. *J Biol Chem* 1979;254:6068–78.
- [19] Heimburg T. A Model for the Lipid Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition. *Biophys J* 2000;78:1154–65. doi:10.1016/S0006-3495(00)76673-2.
- [20] Greif D, Wesner D, Regtmeier J, Anselmetti D. High resolution imaging of surface patterns of single bacterial cells. *Ultramicroscopy* 2010;110:1290–6. doi:10.1016/j.ultramic.2010.06.004.
- [21] Lebedev N, Strycharz-Glaven SM, Tender LM. High Resolution AFM and Single-Cell Resonance Raman Spectroscopy of *Geobacter sulfurreducens* Biofilms Early in Growth. *Front Energy Res* 2014;2. doi:10.3389/fenrg.2014.00034.
- [22] Li A, Lee PY, Ho B, Ding JL, Lim CT. Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2007;1768:411–8. doi:10.1016/j.bbamem.2006.12.010.
- [23] Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 2003;338:2431–47. doi:10.1016/j.carres.2003.07.010.
- [24] Abraham T, Schooling SR, Beveridge TJ, Katsaras J. Monolayer Film Behavior of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* at the Air–Water Interface. *Biomacromolecules* 2008;9:2799–804. doi:10.1021/bm800562r.
- [25] Loose M, Fischer-Friedrich E, Ries J, Kruse K, Schwille P. Spatial regulators for bacterial cell division self-organize into surface waves in vitro. *Science* 2008;320:789–92. doi:10.1126/science.1154413.
- [26] Roes S, Seydel U, Gutschmann T. Probing the Properties of Lipopolysaccharide Monolayers and Their Interaction with the Antimicrobial Peptide Polymyxin B by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 2005;21:6970–8. doi:10.1021/la048218c.
- [27] Kotra LP, Golemi D, Amro NA, Liu G-Y, Mobashery S. Dynamics of the Lipopolysaccharide Assembly on the Surface of *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc* 1999;121:8707–11. doi:10.1021/ja991374z.
- [28] Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:112–24. doi:10.1038/nrm2330.
- [29] Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 2010;327:46–50.

- [30] Goksu EI, Vanegas JM, Blanchette CD, Lin W-C, Longo ML. AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2009;1788:254–66. doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.021.
- [31] Binder WH, Barragan V, Menger FM. Domains and Rafts in Lipid Membranes. *Angew Chem Int Ed* 2003;42:5802–27. doi:10.1002/anie.200300586.
- [32] Daniel RA, Errington J. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* 2003;113:767–76.
- [33] Demchick P, Koch AL. The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1996;178:768–73.
- [34] Chada VGR, Sanstad EA, Wang R, Driks A. Morphogenesis of *Bacillus* Spore Surfaces. *J Bacteriol* 2003;185:6255–61. doi:10.1128/JB.185.21.6255-6261.2003.
- [35] Zolock RA, Li G, Bleckmann C, Burggraf L, Fuller DC. Atomic force microscopy of *Bacillus* spore surface morphology. *Micron* 2006;37:363–9. doi:10.1016/j.micron.2005.11.006.

# Chapitre 4 Etude de l'interaction nanoparticules – bactéries

## Sommaire

---

4.1	La taille des SiO <sub>2</sub> -NPs, un paramètre critique de l'interaction.....	126
4.1.1	Survie et organisation de la population bactérienne .....	126
4.1.1.1	Etude de la viabilité .....	126
4.1.1.2	Organisation de la population bactérienne .....	130
4.1.1.3	Effet de la concentration en NPs.....	132
4.1.1.4	Limites des tests de viabilité .....	134
4.1.2	De potentiels changements morphologiques.....	134
4.1.2.1	Un contact non privilégié entre SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> et <i>E. coli</i> .....	135
4.1.2.2	Une morphologie d' <i>E. coli</i> variable lors de l'exposition aux SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> .....	135
4.1.2.3	Dommmages morphologiques à l'échelle nanométrique .....	139
4.1.3	Un seuil de taille pour la transition dans l'organisation membranaire.....	144
4.1.4	Des dommages membranaires à la lyse cellulaire.....	146
4.1.5	Existence d'un diamètre critique dans l'interaction NPs - <i>E. coli</i> .....	148
4.2	La charge des SiO <sub>2</sub> -NPs, un paramètre secondaire de l'interaction.....	148
4.2.1	Des attractions électrostatiques favorisées.....	149
4.2.1.1	Etude de la viabilité .....	149
4.2.1.2	Une agrégation des bactéries .....	151
4.2.2	De potentiels changements morphologiques.....	153
4.2.3	Préservation de la structure membranaire.....	155
4.2.4	Dommmages membranaires .....	157
4.2.5	Les SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>+</sup> , sources de dommages cellulaires indépendamment de leur taille ..	159
4.3	La membrane externe de la bactérie, première cible des NPs .....	160
4.3.1	Etude de la viabilité de <i>B. subtilis</i> .....	160
4.3.2	<i>B. subtilis</i> , une morphologie résistante .....	162
4.3.2.1	Une forme et une organisation de la population conservées.....	162
4.3.2.2	Une absence de dégradations morphologiques .....	163
4.3.3	La structure du peptidoglycane .....	165
4.3.4	L'activité antibactérienne des « petites » SiO <sub>2</sub> -NPs sur <i>B. subtilis</i> .....	169
4.3.5	La membrane externe, cible privilégiée des SiO <sub>2</sub> -NPs.....	170
	Bilan.....	173
	Bibliographie.....	174
	Annexes – Chapitre 4.....	177

---

Les caractéristiques propres à chaque système étant désormais connues, nous nous intéresserons dans ce chapitre aux interactions entre NPs et bactéries. Plus particulièrement, ces travaux s'attacheront à montrer l'influence de la taille et de la charge des SiO<sub>2</sub>-NPs sur la viabilité, les propriétés morphologiques et nanomécaniques des bactéries *E. coli*. L'influence de la présence d'une membrane externe chez la bactérie sur sa résistance face aux NPs fera également l'objet de notre attention, en comparant les résultats obtenus sur *E. coli* et sur *B. subtilis*.

## 4.1 La taille des SiO<sub>2</sub>-NPs, un paramètre critique de l'interaction

La littérature fait mention de l'influence notable de la taille des NPs dans leur interaction avec des cellules humaines ou bactériennes (cf. chapitre 1). Ainsi, nous chercherons à déterminer s'il existe ou non une taille critique de NPs chargées négativement (SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup>) pour la génération d'éventuels dommages en termes morphologiques et mécaniques sur la bactérie *E. coli*. Les c-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> de 4, 10, 50 et 100 nm et les s-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> de 30 et 80 nm sont ici étudiées en interaction avec *E. coli*<sup>20</sup>, selon le protocole décrit dans le chapitre 2. Il faut, en effet, pouvoir discriminer entre les tailles de NPs, celles qui contribueront, au sein du biocapteur, à la détection des bactéries sans engendrer de toxicité.

### 4.1.1 Survie et organisation de la population bactérienne

#### 4.1.1.1 Etude de la viabilité

La première question à se poser dans le cadre de notre étude sur l'interaction NPs – bactéries est la suivante : les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> sont-elles associées à des phénomènes de toxicité vis-à-vis des bactéries, entraînent-elles leur mort ? Afin d'y répondre, les bactéries (DO = 0.01) sont soumises à un traitement en présence de NPs, concentrées à 1 g/L dans la suspension finale de volume 500 µL. Aussi, les volumes de NPs introduits dépendent de la concentration initiale des diverses suspensions colloïdales. L'incubation des deux systèmes se fait à température ambiante (20 °C) pendant 2 h ou 24 h. La viabilité des cellules bactériennes, dans l'eau ultrapure, en présence et en absence de NPs, est estimée par comptage des CFU (cf. chapitre 2). Les CFU obtenues suite aux divers traitements sont normalisées par rapport à leur contrôle respectif<sup>21</sup>, *i.e.* *E. coli*

<sup>20</sup> Par simplicité, les préfixes correspondant à l'origine des NPs seront enlevés dans la suite du chapitre.

<sup>21</sup> A chaque traitement correspond un contrôle. Ainsi, les CFU obtenues suite à l'exposition aux NPs au bout de 2 h seront normalisées par les CFU obtenues sur *E. coli* seules à 2 h ; celles obtenues suite au traitement au bout de 24 h le seront par *E. coli* à 24 h. De la même façon les contrôles différeront pour

seules (incubées en l'absence de NPs). Deux modes d'interaction sont étudiés : (i) le mode dynamique où la suspension *E. coli* + NPs est mise sous agitation magnétique à 250 tours/min. et (ii) le mode statique où elle est placée sur une bascule à 25 tours/min (agitation quasi inexistante d'où le terme statique).

Trois expériences indépendantes sont réalisées et trois réplicats techniques sont effectués sur chacune des dilutions (*i.e.* trois boîtes étalées pour une même dilution), servant au comptage (cf. chapitre 2). Les barres d'erreur présentées tiennent compte de l'ensemble de ces réplicats. Par exemple, pour une série d'expérience, *i.e.* un temps d'incubation et une agitation donnés, prenant en compte les six tailles de NPs, il nous faudra étaler et compter environ 130 boîtes de Pétri. Ce nombre est à multiplier par le nombre d'expériences indépendantes et le nombre de conditions (agitation, temps, concentration, charge des NPs ...).

### Sous conditions statiques

Les résultats des expériences de viabilité, sous conditions statiques, sont reportés sur la Figure 74. Dans la littérature, la toxicité est avérée lorsque le nombre de CFU obtenu après exposition aux NPs est significativement inférieur à celui du contrôle. Or, après 2 h d'incubation, il semble que les SiO<sub>2</sub>-NPs, quel que soit leur diamètre, n'induisent pas de diminution du nombre de CFU (Figure 74).

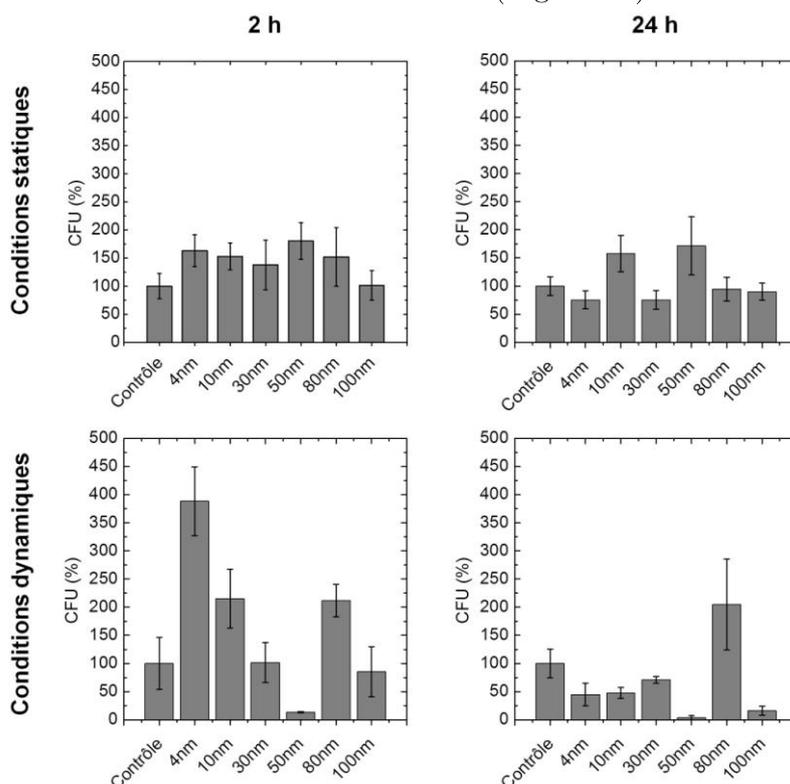


Figure 74. Tests de viabilité, par comptage des CFU, des bactéries *E. coli* exposées à des SiO<sub>2</sub>-NPs de tailles diverses ( $C = 1$  g/L), sous conditions statiques et dynamiques, au bout de 2 h et 24 h d'incubation. Les barres d'erreur présentées tiennent compte de l'ensemble des trois réplicats biologiques et techniques.

les conditions statiques et dynamiques. Cette normalisation permet de décorréliser les divers effets (temps d'incubation, agitation, taille des NPs).

Nous observons même le phénomène inverse dans certains cas. Alors que les SiO<sub>2</sub>-NPs 100 n'impliquent aucun changement par rapport au contrôle, les SiO<sub>2</sub>-NPs de diamètre inférieur ou égal à 80 nm conduisent, elles, à une augmentation du nombre de CFU pouvant atteindre 180 % pour les SiO<sub>2</sub>-NPs 50.

Afin de déterminer si les effets des SiO<sub>2</sub>-NPs observés à 2 h étaient à leur terme, le temps d'incubation a été augmenté à 24 h (Figure 74). Ce temps d'incubation important n'influence que très peu la viabilité d'*E. coli* en l'absence de NPs (cf. Annexe - Chapitre 4 A), une majorité des cellules de la population bactérienne étant vivantes (et donc générant des colonies après étalement sur LB agar) après une telle période. Pour les SiO<sub>2</sub>-NPs 10, 50 et 100, un temps d'incubation de 24 h n'a pas d'influence sur les effets déjà observés à 2 h : les NPs de 10, 50 et 80 nm engendrent toujours une augmentation du nombre de CFU tandis que les NPs de 100 nm n'ont toujours aucune influence. Ceci suggère que l'effet intrinsèque des SiO<sub>2</sub>-NPs sur la viabilité d'*E. coli* est atteint en 2 h au plus et que peu de changements surviennent au-delà. En revanche, pour les SiO<sub>2</sub>-NPs 4 et 30, les effets sont significativement différents : après 24 h, elles induisent une diminution du nombre de CFU, de l'ordre de 25 %, opposée à l'augmentation constatée à 2 h. Ceci suggère qu'une activité antibactérienne de ces NPs nécessiterait, pour être détectée, un temps d'incubation suffisamment long (2 h < t < 24 h).

Dans la littérature, peu d'études témoignent de l'activité potentiellement antibactérienne des NPs de silice [1–5]. La comparaison de nos résultats avec ceux des autres travaux s'avère d'autant plus difficile que les méthodologies diffèrent et que le diamètre, la concentration et/ou le temps d'incubation varient d'une publication à l'autre. Le Tableau 9 regroupe les résultats obtenus dans ces travaux, en soulignant la diversité des paramètres utilisés. Nos résultats recourent partiellement les études de Lee *et al.* et Wehling *et al.* qui ont montré un taux de survie intact après traitement d'*E. coli* par des SiO<sub>2</sub>-NPs 50 [1,2]. Les SiO<sub>2</sub>-NPs 100 ont également été jugées inoffensives en deçà d'une concentration de 1 g/L [3]. En revanche, nos résultats sont en contradiction avec les travaux de Jiang *et al.* et Capeletti *et al.* qui ont montré un taux de survie inférieur à 50 % pour les NPs de 50 nm [4,5].

Tableau 9. Influence de divers paramètres (taille, concentration, temps d'incubation) sur les effets potentiellement toxiques de SiO<sub>2</sub>-NPs sur les bactéries *E. coli*.

Taille des NPs (nm)	Concentration des NPs (g/L)	Temps d'incubation (h)	Mortalité	Référence
4 - 100	1	2, 24	Non / faible	Nos travaux
50	10	1	Non	[1]
50	0.02	2	Non	[2]
100	< 1	Non précisé	Non	[3]
100	5	Non précisé	50 %	[3]
50	0.02	24	< 50 %	[4]
50	2	5	< 50 %	[5]

Ces accords et désaccords avec la littérature s'expliquent probablement par les conditions expérimentales d'exposition aux NPs différentes (temps, concentration) mais également par le traitement de la suspension bactérienne, notamment l'agitation importante appliquée dans certaines études précédemment citées.

### Sous conditions dynamiques

De nombreuses études sur les CFU sont menées en appliquant une étape d'agitation importante à l'aide d'un vortex aux échantillons, afin d'homogénéiser la suspension avant de l'étaler sur boîte de Pétri pour comptage. L'influence potentielle du contact physique forcé entre les bactéries et les SiO<sub>2</sub>-NPs a donc également été étudiée ici, en appliquant une agitation magnétique de 250 tours/min. lors de l'incubation. Dans ces conditions, le comportement d'*E. coli* en présence de SiO<sub>2</sub>-NPs est similaire à celui observé en conditions statiques, après 2 h d'incubation (Figure 74) : les SiO<sub>2</sub>-NPs 4, 10 et 80 induisent une augmentation du nombre de CFU (plus importante que sous conditions statiques) tandis que les SiO<sub>2</sub>-NPs 100 n'engendrent aucune modification. Les variations du nombre de CFU reportées peuvent être dues à des phénomènes physiques, probablement à des agitations différentes, compte tenu de la largeur du barreau aimanté, de la taille de la cuve et des systèmes micro- et nanoscopiques étudiés. Toutefois, deux exceptions sont à remarquer : (i) les SiO<sub>2</sub>-NPs 30 n'induisent aucun changement des CFU et (ii) les SiO<sub>2</sub>-NPs 50 induisent une forte diminution du nombre de CFU. Pour ces dernières, l'effet est opposé à celui observé en conditions statiques, suggérant que l'interaction des SiO<sub>2</sub>-NPs 50 avec *E. coli* est gouvernée par un mécanisme potentiellement dépendant d'une agitation externe, comme des collisions.

Au bout de 24 h de traitement, l'influence de l'agitation est, en revanche, notable (Figure 74) : excepté pour les SiO<sub>2</sub>-NPs 80 pour lesquelles une augmentation du nombre de CFU est observée, l'agitation mène à une réduction des CFU, parfois drastique (SiO<sub>2</sub>-NPs 50 et 100). Une agitation prolongée conduit donc à des dommages cellulaires, la synergie entre l'agitation et un temps d'incubation important engendrant probablement une mortalité plus importante. Cendrowski *et al.* ont également reporté une toxicité accrue, par rapport à des conditions statiques, des nanotubes de TiO<sub>2</sub> pour des agitations allant jusqu'à 500 tour/min. [6]. Toutefois la comparaison s'avère difficile, car le TiO<sub>2</sub> est un matériau bien connu pour son activité antibactérienne intrinsèque.

Il est, enfin, important de noter que l'agitation joue un rôle important dans la mortalité des bactéries seules, en absence de NPs (cf. Annexe – Chapitre 4 A). Or, cet effet est très rarement, voire pas du tout, étudié dans les protocoles de viabilité communément admis et utilisés. Les résultats précédemment obtenus, sous conditions dynamiques, sont donc à interpréter au regard d'une population initialement déjà affaiblie. Dans de telles conditions, les effets de taille des NPs, de temps d'incubation et d'agitation se combinent et rendent difficile l'interprétation des CFU et la décorrélation des divers paramètres.

### 4.1.1.2 Organisation de la population bactérienne

Pour la majorité des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$ , l'augmentation du nombre de CFU observée n'a jamais été relevée ou du moins expliquée dans la littérature, probablement à cause de son caractère surprenant. Comment est-il possible d'obtenir plus de cellules suite à un traitement, a priori potentiellement néfaste, que dans le contrôle ?

Pour expliquer ce phénomène, il est important de rappeler que le nombre de CFU dépend essentiellement de deux contributions :

- la distribution initiale des bactéries, *i.e.* l'organisation de la population bactérienne (cellules isolées ou agrégées),
- la nature de l'environnement, *i.e.* la capacité d'un traitement à induire des changements au sein de cette distribution.

Les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  peuvent jouer un rôle dans ces deux contributions. Afin d'élucider cela, des observations en microscopie en champ noir ont été réalisées, qui, à l'échelle microscopique, nous permettent d'avoir des informations sur l'organisation de la population des bactéries *E. coli* (DO = 1) et son état de viabilité (Figure 75).

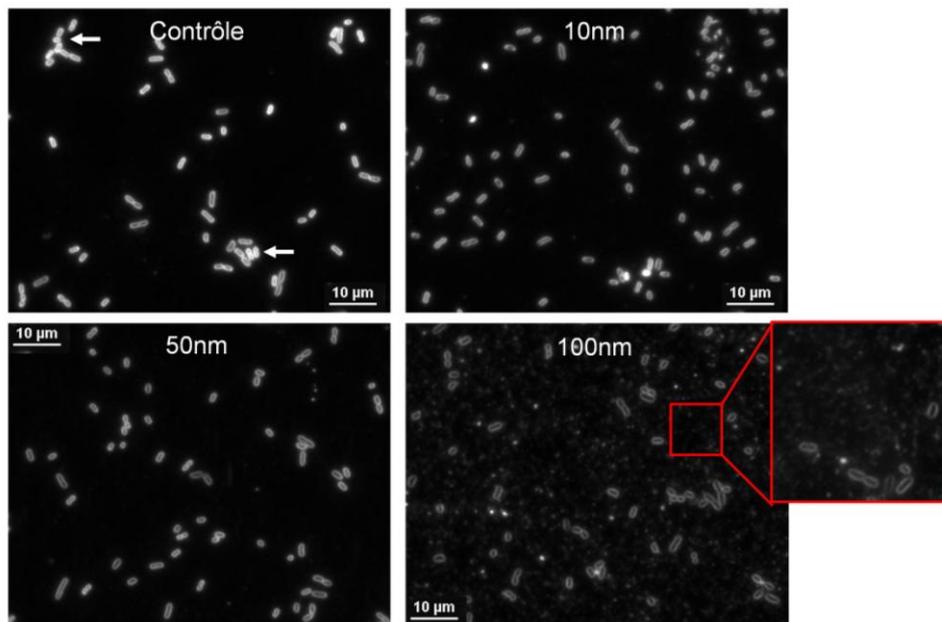


Figure 75. Clichés de microscopie optique en champ noir montrant l'organisation et la morphologie de la population de bactéries *E. coli*<sup>22</sup>, exposées pendant 2 h sous conditions statiques à des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  de tailles diverses. Les flèches indiquent la présence d'agrégats au sein du contrôle. L'agrandissement présenté pour *E. coli* + 100 nm montre « un brouillard » dû à la présence de NPs non attachées aux bactéries.

Le contrôle présente des cellules en forme de bâtonnets, isolées ou organisées en petits agrégats (Figure 75 flèches). L'incubation avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  100 et les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$

<sup>22</sup> Le fait que certaines bactéries apparaissent pleines et d'autres creuses, sur ces clichés, est dû au fait que les bactéries peuvent se fixer à la lamelle lors de l'observation et sont donc dans des plans d'observation différents.

80 conduit aux mêmes observations en termes d'organisation et de morphologie. L'ensemble des clichés de l'exposition aux  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-100$  (représentatif également des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-80$ ) montre également un nombre de bactéries similaires à celui du contrôle. A noter, la présence d'un « brouillard » de particules, rendant l'image relativement floue et blanchâtre, dû à la diffusion de la lumière par les NPs de 100 nm non attachées aux bactéries. Les observations faites suite à l'incubation avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  de plus petites tailles (4 à 50 nm) révèlent, quant à elles, une morphologie différente pour une proportion plus importante de cellules bactériennes que dans le contrôle. La forme bâtonnet laisse place à une forme plus sphérique pour la majorité des bactéries, qui sont également davantage isolées, les agrégats lorsqu'ils sont présents étant de plus petite taille que dans le contrôle.

Or, si initialement la présence d'un agrégat d'*E. coli* mène à la croissance d'une colonie, la dissociation de celui-ci en  $x$  cellules plus isolées mènera à la croissance de  $x$  colonies indépendantes (Figure 76).

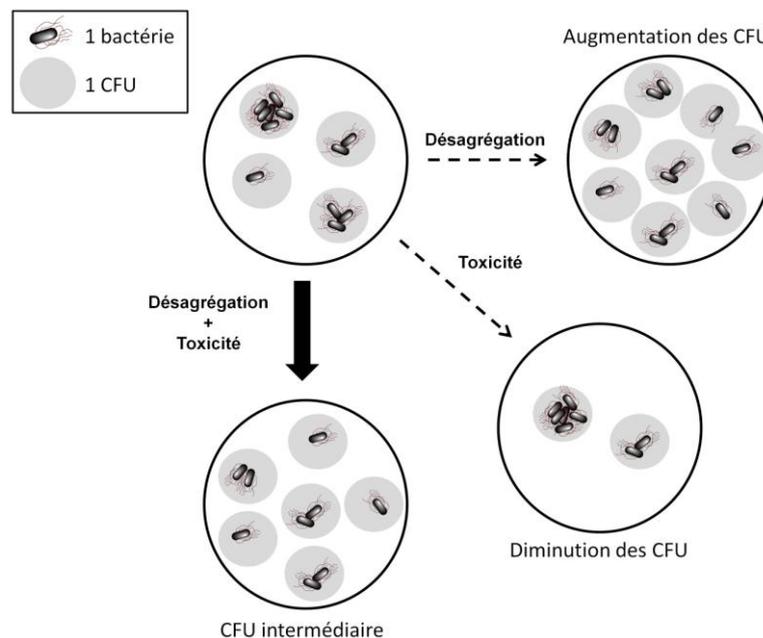


Figure 76: Schématisation des effets potentiellement combinés des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  sur l'organisation des bactéries *E. coli* et donc de leurs impacts sur le nombre de CFU.

En conséquence, cette dissociation des agrégats de bactéries observée en présence de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  de diamètre inférieur à 80 nm pourrait expliquer l'augmentation du nombre de CFU, notée ci-avant. Ce phénomène de désagrégation laisse supposer que l'interaction avec ces NPs est plus forte que l'interaction cellule-cellule. Sans expliquer la présence d'un seuil lié à la dimension des NPs autour de 80 nm, cette interaction NPs-cellule est possible par des interactions de type hydrogène entre les fonctions OH des sucres des LPS, présents dans la OM d'*E. coli*, et les groupements oxo-hydroxo présents à la surface des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$ .

### 4.1.1.3 Effet de la concentration en NPs

Afin de confirmer et comprendre le seuil observé dans le phénomène de désagrégation, regardons les caractéristiques des NPs dans la suspension bactérienne. A concentration constante (dans nos tests, 1 g/L), le nombre de NPs disponibles par cellule diminue lorsque le diamètre augmente, selon une loi en  $\phi^{-3}$  où  $\phi$  est le diamètre de la NP (Figure 77a).

Il est possible de définir un taux d'occupation surfacique par :

$$\tau_s = \frac{\text{Surface de l'ensemble des NPs en suspension}}{\text{Surface d'une cellule}}$$

Considérons une cellule *E. coli*, de dimensions théoriques :  $L = 2 \mu\text{m}$ ,  $l = 1 \mu\text{m}$  et  $h = 0.3 \mu\text{m}$  et assimilons la à un parallélépipède rectangle. Le taux d'occupation surfacique, directement lié au nombre de NPs disponibles par cellule, diminue donc également avec l'augmentation du diamètre (Figure 77a).

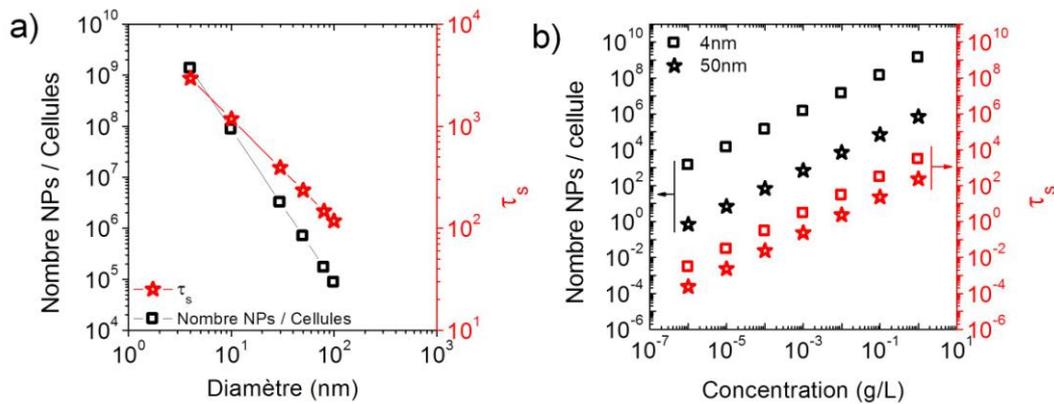


Figure 77. a) Disponibilité des NPs, concentrées à 1 g/L, pour les cellules *E. coli* lors des tests de viabilité : influence du diamètre des NPs sur le nombre de NPs disponibles par cellule et le taux d'occupation surfacique. b) A diamètre fixe (4 et 50 nm), variations du nombre de NPs disponibles par cellule et du taux surfacique d'occupation en fonction de la concentration en NPs.

Il est envisageable de penser que la désagrégation observée ne pourrait être le résultat que d'un nombre trop important de NPs de diamètre strictement inférieur à 100 nm présentes à la surface de la bactérie. Ce surplus empêcherait l'association de bactéries entre elles et favoriserait donc leur isolement, *i.e.* une augmentation du nombre de CFU.

Afin de vérifier cela, il est possible de se placer à un taux d'occupation fixe, *i.e.* un nombre de NPs disponibles par cellules fixe, pour différents diamètre de NPs. L'effet de la taille des NPs sur la viabilité d'*E. coli*, dans ces conditions, permettra de valider ou non notre hypothèse. En pratique, ces expériences reviennent à examiner l'influence de la concentration des NPs sur la viabilité d'*E. coli* (Figure 77b). Le phénomène de désagrégation des bactéries étant observé pour  $\Phi \leq 80$  nm, les  $\text{SiO}_2$ -NPs 4 et 50 ont été choisies comme représentatives.

La Figure 78 présente les résultats bruts de l'influence de la concentration des SiO<sub>2</sub>-NPs 4 et 50 sur la viabilité des bactéries *E. coli*, sous conditions statiques et après 2 h d'incubation. Quelle que soit la concentration, aucune diminution significative du nombre de CFU n'est observée ni pour les NPs de 4 nm ni pour celles de 50 nm. Ces NPs, quelle que soit leur concentration, n'ont donc, *a priori*, pas d'effets toxiques significatifs vis-à-vis des bactéries *E. coli*.

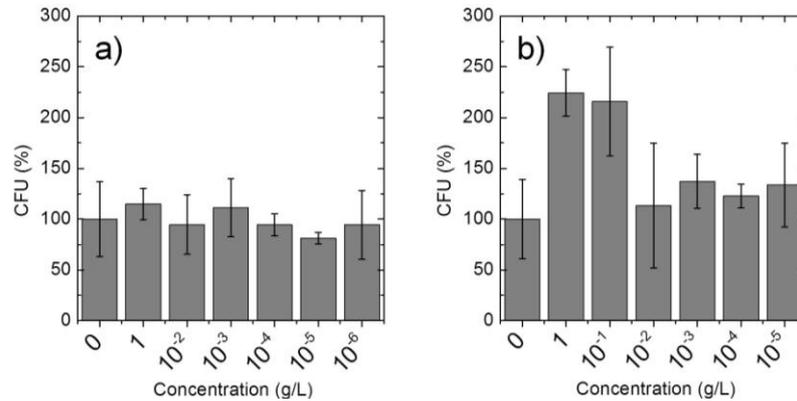


Figure 78. Tests de viabilité des bactéries *E. coli* exposées aux SiO<sub>2</sub>-NPs de (a) 4 nm et (b) 50 nm, pour diverses concentrations, sous conditions statiques et au bout de 2 h d'incubation.

En revanche, selon le diamètre des NPs, deux tendances se distinguent quant à l'influence de la concentration d'exposition :

- les SiO<sub>2</sub>-NPs 4, quelle que soit leur concentration, engendrent le même comportement des CFU, aux barres d'erreurs près : un nombre inchangé ou en légère hausse par rapport au contrôle ;
- les SiO<sub>2</sub>-NPs 50 conduisent à une forte augmentation du nombre de CFU lorsqu'elles sont fortement concentrées ( $> 10^1$  g/L) et à une légère augmentation en deçà de cette concentration ( $\leq 10^2$  g/L).

La concentration n'a donc pas d'effet drastique sur la toxicité (diminution significative du nombre de CFU) des SiO<sub>2</sub>-NPs. Elle semble, également, peu altérer l'impact des SiO<sub>2</sub>-NPs 4 sur *E. coli*. En revanche, elle joue un rôle dans l'augmentation des CFU, *i.e.* du phénomène de désagrégation des clusters de bactéries, dans le cas des SiO<sub>2</sub>-NPs 50.

Que cela traduit-il en termes d'occupation des NPs ? Que la bactérie soit entièrement ( $\tau_s > 1$ ) ou partiellement ( $\tau_s < 1$ ) recouverte de NPs, les SiO<sub>2</sub>-NPs 4 et 50 présentent le même effet : elles induisent un phénomène, plus ou moins prononcé, de désagrégation des clusters initialement présents (Figure 79). Ce phénomène est plus important pour un diamètre de 50 nm, et d'autant plus marqué à forte occupation surfacique, *i.e.* concentration.

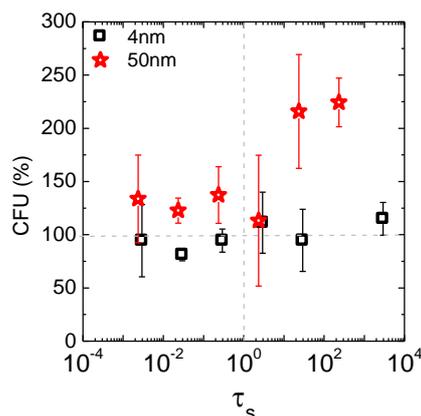


Figure 79. Influence du taux d'occupation surfacique des SiO<sub>2</sub>-NPs 4 et 50 vis-à-vis d'*E. coli* sur sa viabilité.

En conséquence, l'augmentation des CFU, initialement observée pour  $\Phi \leq 80$  nm, apparaît uniquement liée au diamètre des NPs, et non à leur disponibilité / occupation vis-à-vis des bactéries. Toutefois, ce dernier paramètre influe sur l'intensité du phénomène de désagrégation : plus la concentration est importante plus le phénomène semble prononcé.

#### 4.1.1.4 Limites des tests de viabilité

Bien que nombre de travaux sur la toxicité des nanomatériaux se concentrent sur l'estimation de la viabilité cellulaire par comptage du nombre de CFU, les résultats précédents montrent que cette technique est insuffisante pour estimer la potentielle toxicité des SiO<sub>2</sub>-NPs. En effet, la combinaison de (i) l'organisation isolée ou en agrégats des bactéries *E. coli* et (ii) du caractère bactéricide des NPs conduit à des biais dans l'interprétation des données, ces deux phénomènes se compensant plus ou moins (Figure 76). Bien qu'une diminution à proprement parler de la viabilité ne soit pas observée, il est ainsi possible que des phénomènes de toxicité « se cachent » malgré tout dans ces données. Toutefois, l'estimation de la viabilité couplée à la microscopie en champ noir nous renseigne, dans un premier temps, sur l'impact, à l'échelle microscopique, des SiO<sub>2</sub>-NPs sur l'organisation de la population des bactéries *E. coli* et sur leurs caractéristiques morphologiques.

#### 4.1.2 De potentiels changements morphologiques

Afin d'éviter les effets cumulés de friction et de temps d'incubation, les observations AFM à suivre ont été réalisées sur des colonies de bactéries soumises à des conditions statiques et après 2 h d'incubation. De plus, pour des questions purement expérimentales (observation correcte à la fois des bactéries et des NPs), la concentration finale en SiO<sub>2</sub>-NPs a été réduite à 0.1 g/L.

L'intérêt de cette technique, pour cette étude, est évident, en tenant compte des points mentionnés ci-dessus : les dommages potentiellement induits par les NPs sont observés à l'échelle nanométrique.

#### 4.1.2.1 Un contact non privilégié entre SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> et *E. coli*

Quel que soit leur diamètre, les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> tendent à s'agréger autour et sur les bactéries mais également sur le substrat de mica (Figure 80). Dans ce dernier cas, elles sont organisées de la même manière que lorsqu'elles sont déposées seules, *i.e.* sous forme de particules isolées ou en agrégats organisés. Il n'existe donc pas d'affinité spécifique entre les bactéries et les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup>. La charge négative des deux systèmes favorise, en effet, davantage les répulsions que les attractions électrostatiques. La charge négative des bactéries *E. coli* lui est conférée en majorité par les LPS de sa OM. Son potentiel zêta, reflet de cette charge, peut varier entre -5 et -35 mV selon les souches et les conditions environnementales [7,8].

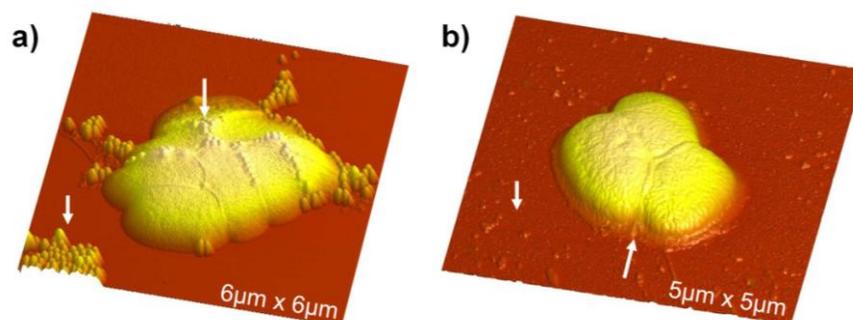


Figure 80. Images AFM de topographie montrant la localisation des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> (flèches) de (a) 100 nm et (b) 4 nm lors de leur incubation avec *E. coli* après dépôt et séchage.

Bien que peu d'études sur l'interaction NPs-LPS aient été réalisées, il a été montré que des NPs chargées négativement ne s'associent que très peu aux LPS, chargés également négativement [9]. Ces études suggèrent donc que l'association entre NPs et LPS est contrôlée par les interactions électrostatiques, l'association étant favorisée pour des NPs chargées positivement dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* [10]. Elles confortent ainsi nos observations précédentes, montrant des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> n'ayant pas d'affinité particulière pour les *E. coli*.

Bien que les attractions électrostatiques ne soient pas favorisées, les phénomènes de capillarité, dus probablement à l'étape de séchage de l'échantillon, sont suffisamment importants pour amener les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> au contact d'*E. coli*. Un côté des bactéries est alors privilégié, *E. coli* jouant le rôle d'obstacle dans l'écoulement du flux des NPs. Les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> sont alors présentes sur les bactéries ou piégées à l'interface entre plusieurs cellules (Figure 80a).

#### 4.1.2.2 Une morphologie d'*E. coli* variable lors de l'exposition aux SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup>

Grâce aux images AFM de hauteur, il est également possible d'estimer l'influence des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> sur la morphologie des bactéries *E. coli*, (cf. chapitre 3 pour les bactéries *E. coli* observées en l'absence de traitement par les NPs).

## La population bactérienne isolée

En présence de SiO<sub>2</sub>-NPs de taille importante, 80 et 100 nm, la forme bâtonnet ainsi que la hauteur (et donc le volume) des bactéries *E. coli* ne sont pas altérées (Figure 81a-b). A l'opposé, en présence de SiO<sub>2</sub>-NPs de taille strictement inférieure à 80 nm, les cellules sont davantage sphériques (Figure 81c-e). Ceci confirme les observations faites à plus grande échelle en champ noir.

Afin de confirmer ces premières observations, des statistiques ont été réalisées sur l'ensemble des images AFM (surfaces sondées < 100 μm<sup>2</sup>) des divers échantillons traités. Le Tableau 10 présente les résultats "bruts" obtenus. Il apparaît que la longueur des cellules d'*E. coli* est affectée différemment selon le diamètre des NPs : (i) si  $\Phi \geq 80$  nm alors la longueur reste intacte tandis que (ii) si  $\Phi < 80$  nm, elle diminue de 12 à 35 % selon les cas. Il est, en revanche, plus difficile de conclure quant à l'influence du diamètre sur la largeur et la hauteur de *E. coli*, les variations observées n'étant pas significatives au vu des écarts types reportés. Il est à noter que nous distinguons, ici, la hauteur et la largeur de la cellule, normalement identiques, en raison d'un effet d'étalement (ou d'applatissage) de *E. coli* lors de son dépôt sur mica.

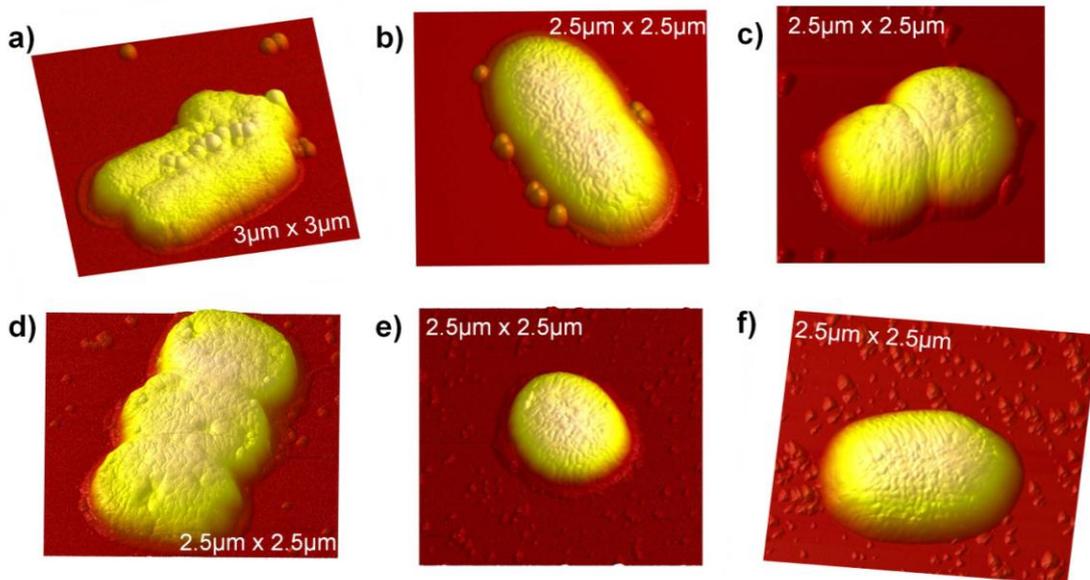


Figure 81. Images AFM de topographie montrant l'influence des SiO<sub>2</sub>-NPs de (a) 100 nm, (b) 80 nm, (c) 50 nm, (d) 30 nm, (e) 10 nm et (f) 4 nm sur la morphologie d'*E. coli*.

Aussi, il semble pertinent de regarder, non pas ces dimensions "brutes", mais davantage le rapport d'aspect (longueur / largeur) de la bactérie traitée, également reporté en Tableau 10 et Figure 82. Par souci de clarté, les déviations standard, présentées dans le tableau, ne sont pas reportées sur le graphe. L'évolution du rapport d'aspect montre deux impacts différents des SiO<sub>2</sub>-NPs selon leur diamètre. Lorsque le diamètre est supérieur ou égal à 80 nm, l'aspect de *E. coli* est conservé (zone grise). En revanche, lorsqu'il est strictement inférieur à 80 nm, l'aspect d'*E. coli* est modifié pour une forme plus sphérique, le rapport diminuant entre 25 et 35 % (zone rose). La transition morphologique bâtonnet / sphère complète de la bactérie, correspondant à

un rapport d'aspect de 1 (zone verte), n'a été observée que rarement dans notre étude. Ces statistiques confirment, quantitativement, les observations faites en champ noir et en AFM.

Tableau 10. Caractéristiques morphologiques (L : longueur, l : largeur et h : hauteur) des bactéries *E. coli* isolées en présence ou non de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  (statistiques réalisées sur  $N = 25$  à 50 bactéries).

	L ( $\mu\text{m}$ )	l ( $\mu\text{m}$ )	h ( $\mu\text{m}$ )	L/l
<i>E. coli</i>	$1.7 \pm 0.3$	$0.8 \pm 0.2$	$0.31 \pm 0.07$	$2.1 \pm 0.5$
4nm	$1.4 \pm 0.3$	$0.9 \pm 0.2$	$0.27 \pm 0.04$	$1.5 \pm 0.5$
10nm	$1.5 \pm 0.5$	$1.0 \pm 0.2$	$0.25 \pm 0.06$	$1.5 \pm 0.3$
30nm	$1.1 \pm 0.3$	$0.8 \pm 0.1$	$0.26 \pm 0.04$	$1.4 \pm 0.3$
50nm	$1.3 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.1$	$0.30 \pm 0.04$	$1.6 \pm 0.3$
80nm	$1.7 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.1$	$0.29 \pm 0.03$	$1.9 \pm 0.3$
100nm	$1.7 \pm 0.3$	$0.8 \pm 0.1$	$0.28 \pm 0.06$	$2.2 \pm 0.5$

Par ailleurs, le changement d'aspect s'accompagne souvent d'une perte de volume de la bactérie tandis qu'un aspect inchangé s'accompagne d'un volume intact (cf. Annexe – Chapitre 4 B). Ceci suggère une dégradation des bactéries, potentiellement physiologique ou métabolique, lorsqu'elles sont exposées aux  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  de diamètre inférieur à 80 nm.

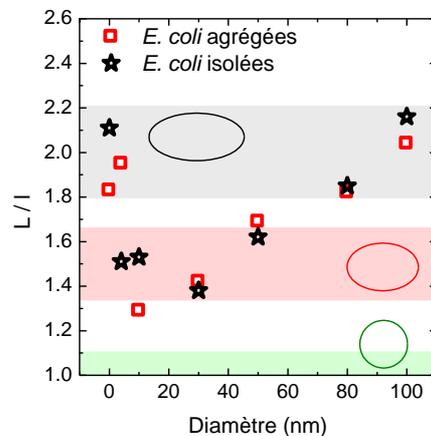


Figure 82. Influence du diamètre des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  sur le rapport d'aspect des bactéries *E. coli* isolées et agrégées. Les zones sont définies par estimation de la moyenne des points concernés et en intégrant une erreur arbitraire de 10 % sur cette moyenne.

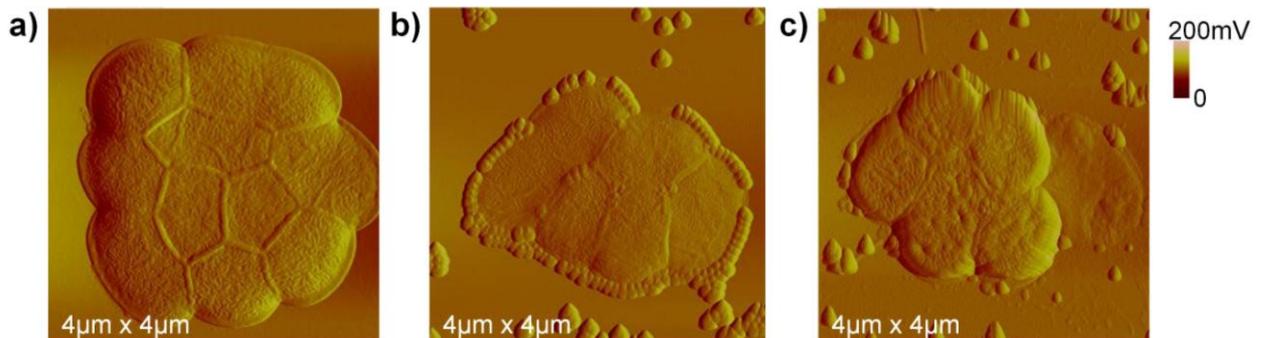
### La population bactérienne agrégée

Les bactéries observées au sein d'agrégats sont également plus sphériques en présence de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  de diamètre compris entre 4 et 80 nm (Tableau 11 et Figure 82). Toutefois, lorsque les bactéries sont agrégées, leur morphologie ne semble pas affectée par les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  4, contrairement à leur état isolé. Le changement d'aspect se fait, par ailleurs, sans variation significative de volume (cf. Annexe – Chapitre 4 B).

Tableau 11. Caractéristiques morphologiques (L : longueur, l : largeur et h : hauteur) des bactéries *E. coli* agrégées en présence ou non de SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> (statistiques réalisées sur N = 40 à 200 bactéries).

	L (μm)	l (μm)	h (μm)	L/l
<i>E. coli</i>	1.3 ± 0.3	0.7 ± 0.4	0.27 ± 0.06	1.8 ± 0.5
<b>4nm</b>	1.3 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.30 ± 0.05	1.9 ± 0.6
<b>10nm</b>	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.34 ± 0.04	1.3 ± 0.3
<b>30nm</b>	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.30 ± 0.04	1.4 ± 0.3
<b>50nm</b>	1.3 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.26 ± 0.04	1.7 ± 0.5
<b>80nm</b>	1.5 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.30 ± 0.05	1.8 ± 0.4
<b>100nm</b>	1.6 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.26 ± 0.02	2.0 ± 0.4

Il est important de souligner que l'organisation en agrégats engendre certaines contraintes (cf. chapitre 3) qui impliquent un changement d'aspect de *E. coli* (seules) relativement faible mais présent (Figure 82, Figure 83a). Aussi, cette forme davantage sphérique ne peut être, dans ces conditions, attribuée uniquement à la présence des NPs. Des formes similaires ont pu être, à certaines occasions, observées pour les bactéries contrôles ou incubées avec des SiO<sub>2</sub>-NPs de taille plus importante, supposées laisser intacte la morphologie d'*E. coli* (Figure 83).

Figure 83. Images AFM d'amplitude montrant la morphologie plus ou moins contrainte des bactéries *E. coli* (a) seules (contrôle) et exposées aux (b) SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 80 et (c) SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 50, au sein d'agrégats.

### Origines de ce changement morphologique

La forme de la bactérie est essentiellement maintenue grâce à la présence de la couche de peptidoglycane sur la membrane plasmique. Cette structure contraint la bactérie et lui confère sa rigidité et sa forme [11,12]. Il est donc probable qu'elle puisse être endommagée par l'action des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> de diamètre strictement inférieur à 80 nm :

- de façon directe si les NPs entrent à son contact et, potentiellement, y pénètrent. Le maillage du réseau de peptidoglycane est de l'ordre de 70 à 120 angströms, rendant plausible cette hypothèse uniquement pour les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 4 et 10.

- de façon indirecte si elles induisent un stress externe (mécanique ou chimique) responsable d'une réponse générale de la cellule, plus probable pour l'ensemble des NPs. Un champ externe (pression, magnétique, viscosité...) peut en effet conduire à des déformations élastiques et/ou plastiques de la paroi bactérienne [13,14].

#### 4.1.2.3 Dommages morphologiques à l'échelle nanométrique

A une échelle plus locale, outre ces changements morphologiques microscopiques, des défauts nanométriques peuvent être induits par la présence de SiO<sub>2</sub>-NPs, selon leur diamètre ( $\Phi > 80$  nm ou  $\Phi \leq 80$  nm). Ces défauts seront mis en évidence par des profils de hauteur mais également de phase sur des images AFM de faibles dimensions (de l'ordre du  $\mu\text{m}^2$ ).

##### $\phi \geq 80$ nm

Dans le cas des SiO<sub>2</sub>-NPs dont le diamètre est supérieur ou égal à 80 nm, deux situations sont à distinguer au niveau des profils de hauteur :

- les NPs en contact avec les bactéries (autour et/ou sur la bactérie) présentent une hauteur comparable au diamètre de la NP nue ;
- les NPs en contact avec les bactéries sont piégées entre deux membranes et présentent une variation de hauteur apparente inférieure au diamètre de la NP nue.

La Figure 84 illustre ces deux situations dans le cas des SiO<sub>2</sub>-NPs 100, de diamètre  $102 \pm 4$  nm (cf. chapitre 3).

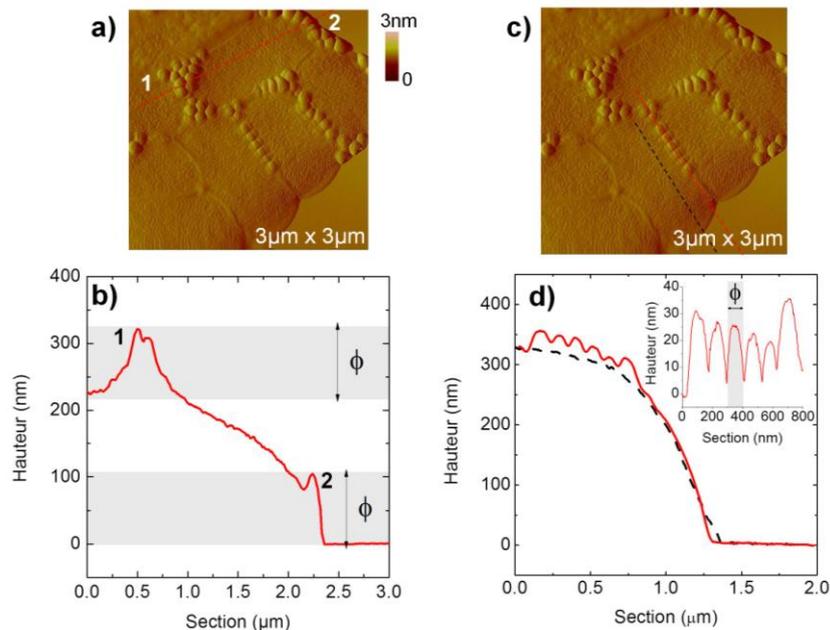


Figure 84. Images d'amplitude et profils de hauteur de SiO<sub>2</sub>-NPs 100 (a-b) déposées sur (NP 1) ou à côté (NP 2) des bactéries *E. coli* ou (c-d) piégées entre deux bactéries. L'insert en (d) montre le profil des NPs dont la hauteur est inférieure à 100 nm mais dont la largeur, égale au diamètre, confirme qu'il s'agit bien de NPs. Le profil en pointillés noirs est réalisé sur la bactérie seule, jouxtant les NPs.

Dans la première configuration, il n'y a aucun doute sur l'attribution du profil à des NPs présentes sur le substrat (Figure 84a-b - NP 2) ou sur la bactérie (Figure 84a-b - NP 1), le diamètre étant celui attendu. Dans ce cas, la bactérie à proximité immédiate de la NP (sous ou à côté) présente un signal de phase, en AFM, identique à celui observé lorsqu'elle n'est pas exposée aux NPs : aucun changement dans l'organisation membranaire n'est à noter (Figure 85).

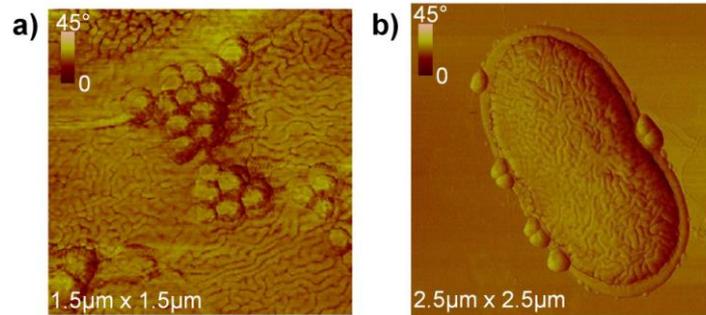


Figure 85. Images AFM de phase soulignant le comportement inchangé de la bactérie *E. coli*, à proximité des NPs de (a) 100 nm et (c) 80 nm.

La seconde configuration, quant à elle, est observée à l'interface entre deux bactéries où les NPs sont logées (Figure 84c-d, Figure 86). Le profil apparent des NPs donne une hauteur d'environ 30 nm mais le profil de largeur des dits objets fournit un diamètre d'environ 100 nm et argumente donc en fortement en faveur du fait qu'il s'agit bien de NPs (insert de la Figure 84c-d). Dans cette seconde configuration, les images de topographie montrent que la particule est comme encapsulée dans un cocon, une partie de l'enveloppe de la bactérie l'encerclant en quelque sorte. Ce cocon est plus ou moins prononcé comme l'indiquent les images et profils observés sur la Figure 86.

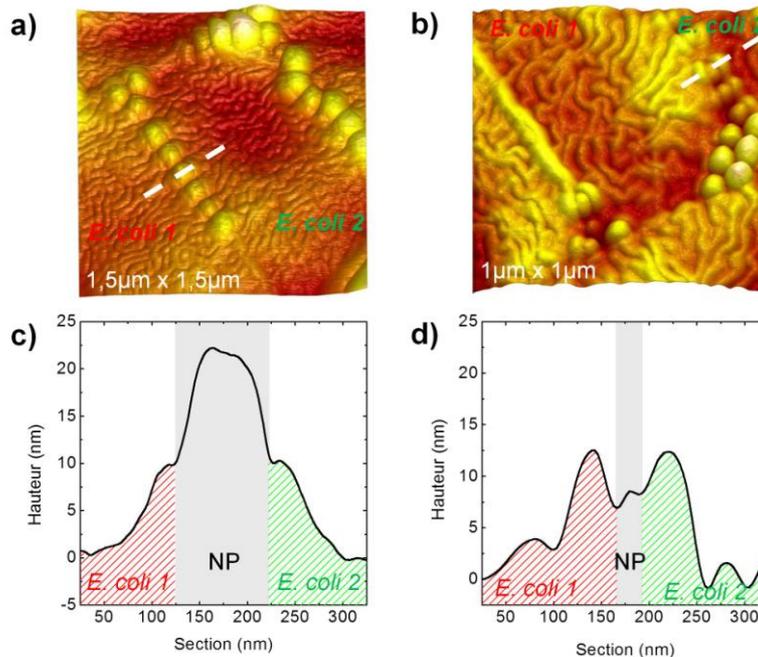


Figure 86. Encapsulations observées après l'incubation d'*E. coli* avec (a) les SiO<sub>2</sub>-NPs 100 et (b) les SiO<sub>2</sub>-NPs 80. a-b) Images AFM topographiques. c-d) Profils de hauteur correspondant au trait pointillé des images a et b respectivement. Les couleurs rouge et vert servent à dissocier les deux bactéries à la frontière desquelles la NP, en gris, est piégée.

Au vu des images AFM de phase, ce « cocon » semble être le prolongement de la structure présente à la surface d'*E. coli* (Figure 87a,c). Il est donc vraisemblablement constitué par la OM d'*E. coli* qui prolonge sa structure *ripples* de manière particulière à l'approche de la NP. Ces encapsulations sont probablement dues à l'adaptation de cette OM d'*E. coli* à la présence de la NP (Figure 87b,d). Les images et schémas présentés en Figure 87 le sont à titre représentatif. En effet, le taux d'encapsulation n'est pas corrélé avec la taille de la NP. Nos observations sont en accord avec l'enveloppement (ici partiel) des NPs, de diamètre supérieur à 22 nm, déjà évoqué, expérimentalement et théoriquement, dans une étude sur un modèle membranaire [15]. De plus, dans une approche mécanique-statistique, Livadaru *et al.* ont étudié l'invagination d'une particule par une membrane modèle, menant, sous certaines conditions, à la formation d'un tel « cocon » [16]. Dans cette étude, les auteurs affirment que la formation du « cocon » nécessite un équilibre entre les énergies libre et d'adhésion des deux systèmes. Cet équilibre dépend du diamètre de la NP, bien qu'une taille critique ne soit pas déterminée ou explicitée dans leurs travaux. Toutefois, Livadaru *et al.* notent que ce « cocon » est formé avant la translocation de la particule au sein d'une membrane unique, ce qui n'est pas le cas dans notre étude où les NPs sont présentes à l'interface entre deux membranes.

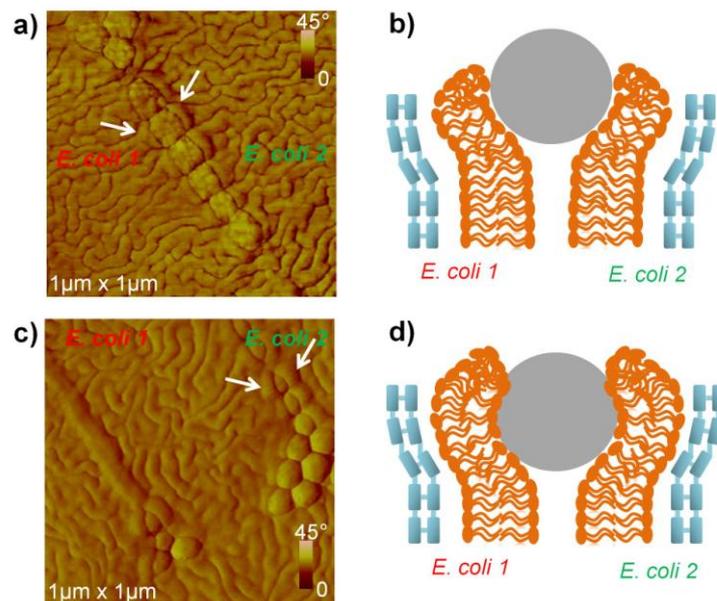


Figure 87. Images AFM de phase (correspondant aux images de hauteur présentées en Figure 86) montrant les encapsulations, observées après l'incubation de *E. coli* avec (a) les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 et (c) les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 80. b-d) Schémas illustrant l'hypothèse de l'adaptation de la OM autour de la NP pour les NPs de 100 et 80 nm respectivement. L'encapsulation est plus ou moins prononcée, comme observée en Figure 86. La couche bleue représente la couche de peptidoglycane et la couche orange la bicouche lipidique de la OM (les LPS ne figurent pas dans ce schéma par souci de clarté).

#### $\varphi < 80\text{nm}$

Lorsque le diamètre des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> est strictement inférieur à 80 nm, outre le changement d'aspect de *E. coli*, des invaginations sont réparties de façon aléatoire sur certaines bactéries (Figure 88). Elles sont davantage présentes lors de l'incubation avec

les SiO<sub>2</sub>-NPs 30 et 50 que lors du traitement en présence des SiO<sub>2</sub>-NPs 4 et 10. Ces invaginations peuvent aller jusqu'à plusieurs dizaines de nm de profondeur (< 100 nm). Bien que des statistiques n'aient pas été réalisées, il semble que leur profondeur ne dépende pas du diamètre des NPs, les déformations étant plus ou moins profondes que le diamètre des NPs (Figure 88e).

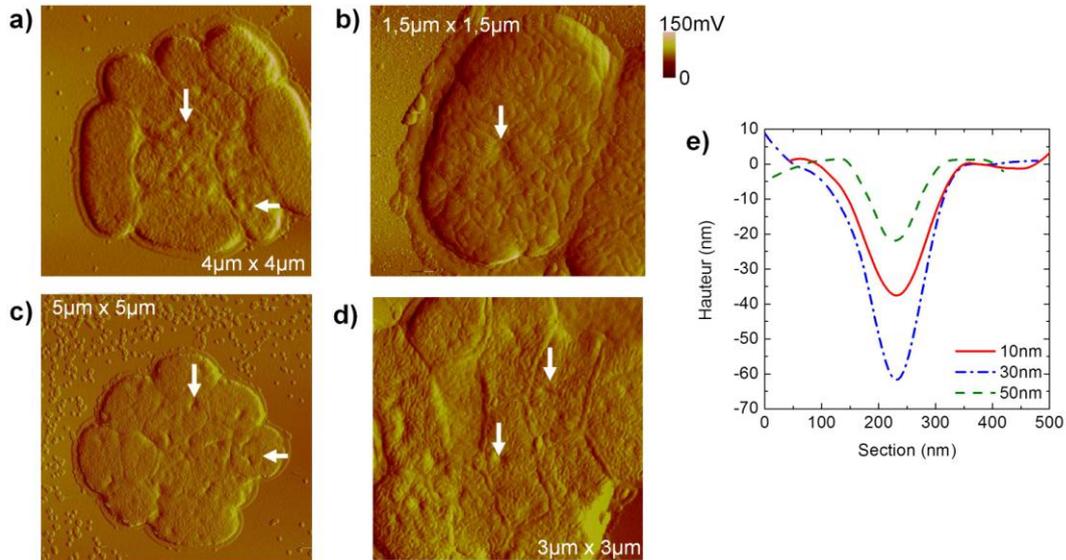


Figure 88. Images AFM d'amplitude montrant les déformations membranaires d'*E. coli*, de type invaginations, causées par (a) les SiO<sub>2</sub>-NPs 4, (b) les SiO<sub>2</sub>-NPs 10, (c) les SiO<sub>2</sub>-NPs 30 et (d) les SiO<sub>2</sub>-NPs 50. Les flèches indiquent la présence de ces invaginations. e) Profils de hauteur des invaginations représentatives dans le cas des SiO<sub>2</sub>-NPs 10, 30 et 50.

Ces invaginations excèdent l'épaisseur de la OM d'*E. coli* ( $\approx 10$  nm) et atteignent donc si ce n'est la membrane plasmique au moins la couche de peptidoglycane. Deux comportements sont à distinguer :

- l'invagination présente un profil de hauteur régulier, tel un puits, associé à une signature identique à la surface d'*E. coli* en phase (Figure 89a, b, d);
- l'invagination présente un profil de hauteur, tel un puits avec un fond irrégulier, associé à une phase plus élevée que celle de la surface d'*E. coli* (Figure 89a, c, e).

Dans la première configuration, que ce soit en topographie ou en phase, la pointe AFM ne semble pas permettre de déceler autre chose que la bactérie et l'invagination qu'elle présente en surface : la profondeur de l'invagination est d'autant plus grande que le signal de phase est faible (Figure 89d). Il est, ici, impossible de distinguer la présence potentielle d'une NP. De plus, le contraste de phase au niveau de l'invagination est plus sombre que celui de la OM, suggérant une phase moins répulsive, donc moins organisée ou structurée. Deux hypothèses sont alors envisageables : (i) soit l'invagination est la conséquence indirecte d'une contrainte externe de la NP sur la paroi bactérienne sans que la NP soit présente au sein de l'invagination, soit (ii) la NP a pénétré au travers de la OM et potentiellement de la couche de peptidoglycane (Figure 90a,c).

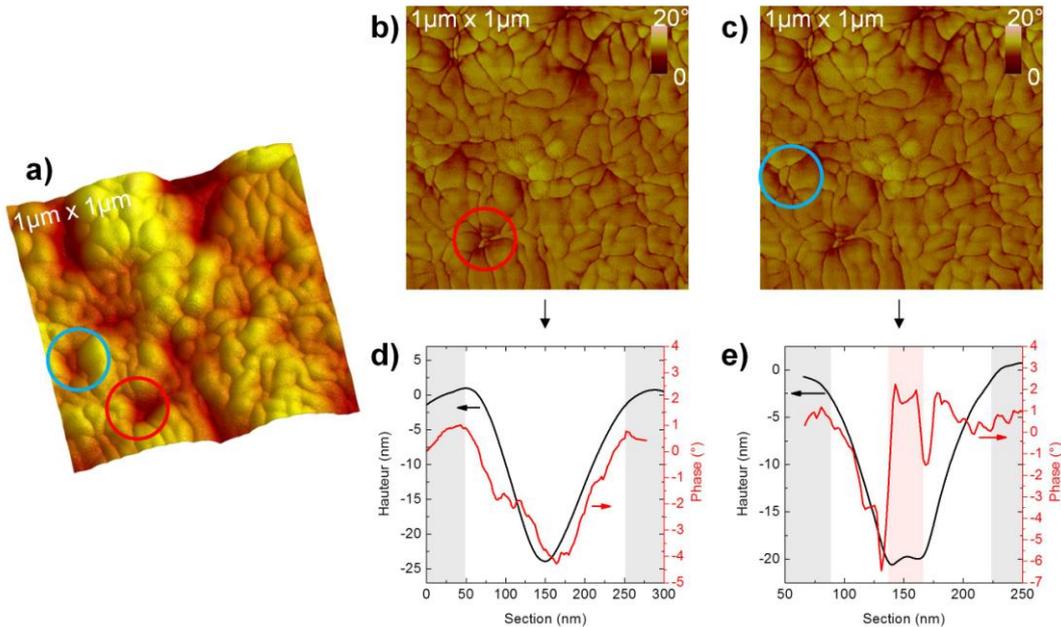


Figure 89. a) Image AFM de hauteur montrant deux invaginations dues à l'effet des  $\text{SiO}_2$ -NPs 50 sur *E. coli*. (b-c) Images AFM de phase correspondante, montrant deux comportements (cercles) des  $\text{SiO}_2$ -NPs 50 (représentatives de  $\phi < 80$  nm) vis-à-vis des déformations membranaires d'*E. coli*. d-e) Profils de hauteur et de phase associés à ces comportements. Les zones grises représentent la surface de la bactérie et la zone rose, la présence potentielle d'une NP.

Dans la seconde configuration, le « fond irrégulier du puits » sur le profil de hauteur est associé à une phase plus élevée que dans la première configuration (Figure 89e). Ce contraste est légèrement supérieur à celui constaté sur la OM. Toutefois, il n'est pas exclu que cette variation de phase ne soit pas significative, certains *ripples* peuvent, en effet, présenter une phase plus ou moins élevée, en lien avec une organisation plus ou moins régulière et donc rigide. Toutefois, ce contraste laisse penser à la présence d'une NP ayant déformé la OM, et qui est alors plus ou moins piégée au sein de l'invagination (Figure 90a-b).

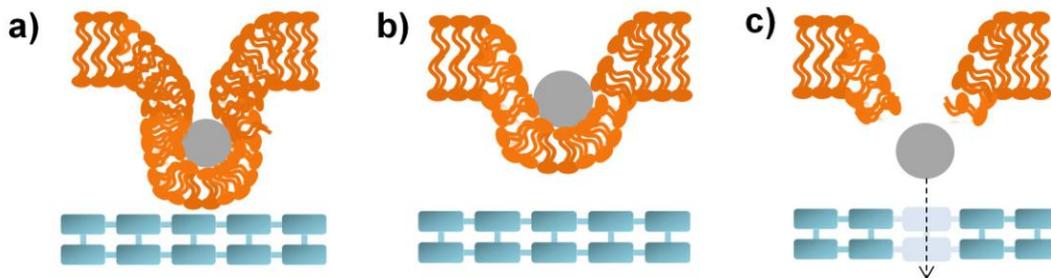


Figure 90. Schémas illustrant les trois hypothèses quant à l'action des NPs de diamètre inférieur à 80 nm, vis-à-vis de la OM (en orange) et de la couche de peptidoglycane (en bleu) des bactéries *E. coli* : (a) encapsulation totale de la NP au sein de la OM, (b) invagination de la OM autour de la NP et (c) pénétration de la NP au sein de la OM et de la couche de peptidoglycane.

Ces invaginations ne sont pas sans rappeler le réarrangement d'une bicouche lipidique, modèle de membrane, lors de son exposition à des NPs dont le diamètre est compris entre 1.2 et 22 nm [15]. Celles-ci engendrent la formation de pores dans la membrane, au sein desquels elles se logent. Ces observations expérimentales sont

confirmées par un modèle théorique et des simulations numériques. Ces derniers montrent l'incapacité d'une membrane lipidique à se conformer à un substrat dont la rugosité est supérieure à 3 nm, du fait de la compétition entre l'énergie d'adhésion au substrat et l'énergie libre de courbure de la membrane. La formation d'un pore, quant à elle, est énergétiquement favorable, dans leur cas, pour des NPs de diamètre inférieur à 13 nm.

Enfin, les conséquences des  $\text{SiO}_2$ -NPs dont le diamètre est inférieur à 80 nm sont similaires à celles observées lors du traitement d'*E. coli* par des peptides antimicrobiens ou des antibiotiques, telles la pénicilline ou l'amoxicilline [17]. Sans généraliser à l'action des dites NPs, il est intéressant de noter que ces deux dernières molécules engendrent des nano-pores à la surface de la bactérie, dont le mécanisme de formation met en jeu l'altération de l'activité de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane.

### 4.1.3 Un seuil de taille pour la transition dans l'organisation membranaire

La structure *ripples* de la OM d'*E. coli*, déjà évoquée au chapitre 3, a fait ici, à nouveau, l'objet d'une attention particulière suite à son exposition aux diverses  $\text{SiO}_2$ -NPs. Comme pour les altérations morphologiques globales des cellules, l'influence des  $\text{SiO}_2$ -NPs sur l'aspect de cette structure varie selon leur taille.

Lors de l'incubation des bactéries avec les  $\text{SiO}_2$ -NPs 80 et 100, la structure *ripples* est conservée. Les nanodomains présentent une forme de serpentins plus ou moins allongés, séparés par des *inter-ripples* très fins et de même allure que celle des bactéries *E. coli* du contrôle (Figure 91).

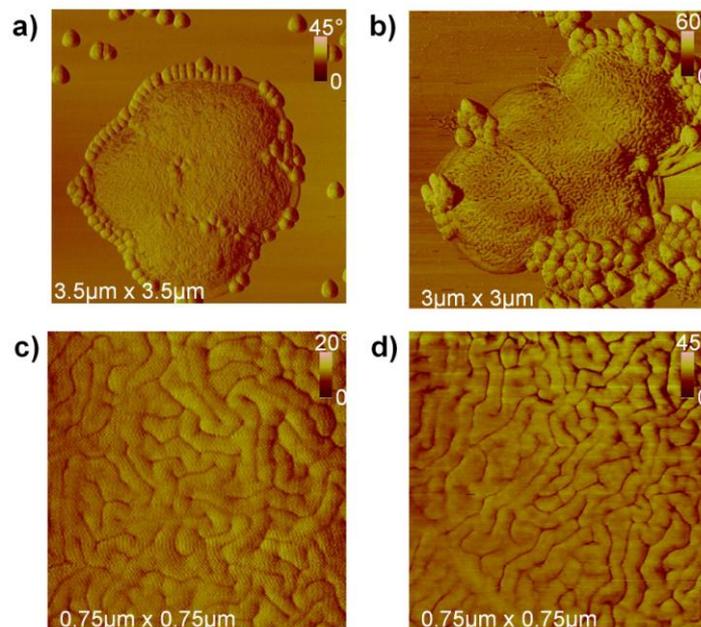


Figure 91. Images AFM de phase montrant la conservation de la structure *ripples* pour des bactéries *E. coli* exposées aux (a)  $\text{SiO}_2$ -NPs 80 et (b)  $\text{SiO}_2$ -NPs 100. c-d) Grossissement sur la OM des images a et b respectivement.

En revanche, l'incubation avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  50, 30, 10 et 4 conduit à une réorganisation de cette structure. Les nanodomains ont plutôt la forme d'agrégats plus ou moins sphériques (Figure 92). Il y a rupture de la continuité des *ripples* de la membrane et formation d'îlots bien séparés les uns des autres. Le signal de phase est toutefois conservé : des phases plus ou moins répulsives coexistent qui correspondent à celles du contrôle bien qu'elles n'aient plus la même forme. Les *ripples* ont une forme plus compacte. La proportion d'*inter-ripples*, dont la largeur est non altérée, est donc augmentée. Cette modification de la OM est, dans certains cas, drastique. En effet, pour les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  10 et 4, la structure en *ripples* est parfois quasi absente au profit d'une surface régulière, ne présentant pas de séparation de phase mais une phase relativement homogène. Ces zones homogènes peuvent présenter une phase relativement élevée (zones claires - Figure 92a) ou faible (zones sombres - Figure 92a-b). Ceci suggère que la structure de ces zones est plus désorganisée que celle des zones environnantes de la bactérie, présentant une séparation de phase, donc la coexistence de deux organisations.

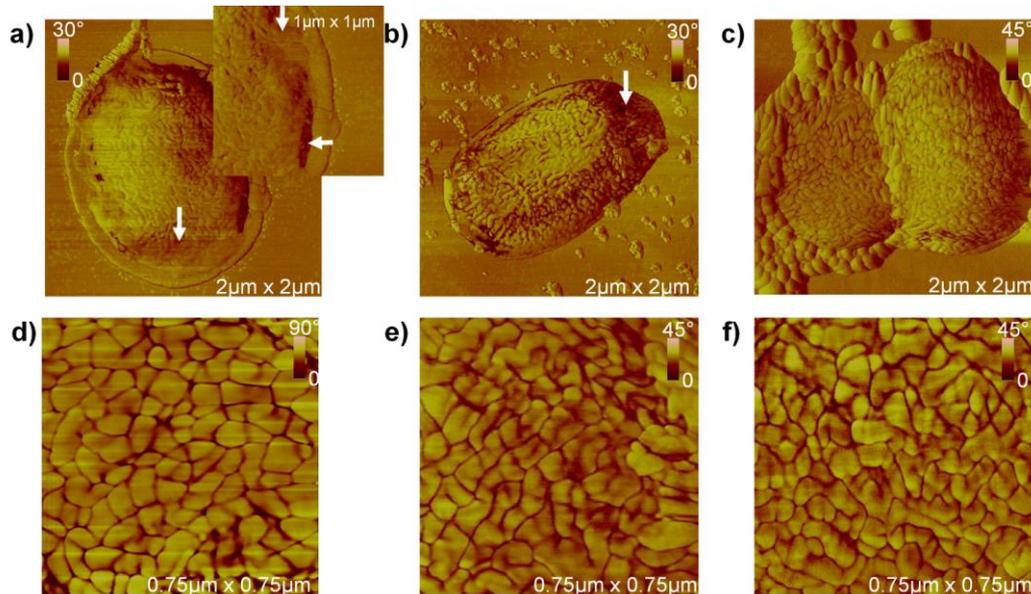


Figure 92. Images AFM de phase montrant la réorganisation de la structure *ripples* pour des bactéries *E. coli* exposées aux (a)  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  4, (b)  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  10 et (c)  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  50. d-f) « Zoom » sur la OM des images a-c respectivement. Les flèches indiquent les zones étant dépourvus d'une séparation de phase.

En conséquence, l'organisation des molécules de la OM, et principalement des LPS, auxquels nous avons imputé cette structure, est potentiellement altérée par la présence de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$ . Cette altération dépend du diamètre de la particule. Lorsque  $\phi \geq 80$  nm, elle est inchangée : les molécules de la OM, présentent une conformation étendue, déployant probablement l'ensemble des blocs les composant (Figure 93a,c). A l'inverse, lorsque  $\phi < 80$  nm, les molécules de la OM se réorganisent de façon plus compacte, potentiellement sous la forme de pelotes embobinées (Figure 93b,d).

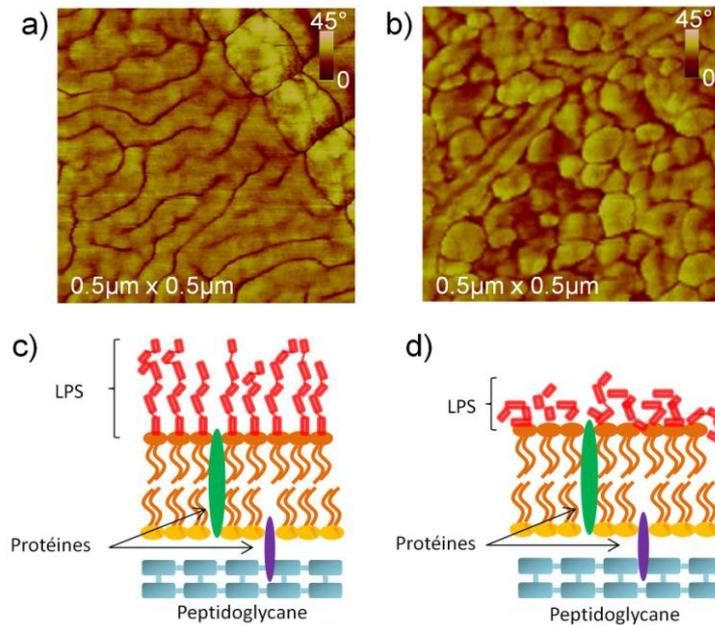


Figure 93. a-b) Images AFM de phase montrant la structure surfacique d'*E. coli* lors de son exposition aux  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  de 100 et 4 nm respectivement. c-d) Schémas illustrant le comportement des LPS pouvant expliquer la conservation de la structure *ripples* pour les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  dont  $\phi \geq 80$  nm (c) et la réorganisation de la structure *ripples* en présence de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  dont  $\phi < 80$  nm (d).

Les images AFM démontrent deux comportements distincts de la OM, qui présentent des similitudes avec le comportement de certains co-polymères tribloc. Ces derniers, sous l'effet d'un stress externe (température notamment), transitent entre une conformation vitreuse et une conformation gel, présentant ainsi des séparations de phase similaires à la structure *ripples* [18]. Ici, la transition observée confirme ainsi le comportement polymérique des LPS, mis en évidence lors d'expériences sur des monocouches de Langmuir [19]. La pression externe alors exercée est le reflet, dans nos conditions, de l'action des NPs de diamètre inférieur à 80 nm. Il n'est pas exclu, bien que sans preuve empirique, que les interactions hydrogènes liant les NPs aux groupements hydroxyles des LPS participent à leur réorganisation. Ces ponts briseraient l'organisation des LPS, qui perdrait alors leur organisation en *ripples*. Ce phénomène serait, de plus, favorisé par l'interaction avec des NPs de faible diamètre, comme le montrent nos résultats. Par ailleurs, il est intéressant de noter que cette transition dans l'organisation membranaire est similaire à celle constatée dans le cadre de notre étude sur le vieillissement d'*E. coli* (cf. chapitre 3) [20]. Ceci laisse supposer que l'exposition à certaines NPs provoquerait des dommages cellulaires assimilables à un vieillissement prématuré ou accéléré des bactéries.

#### 4.1.4 Des dommages membranaires à la lyse cellulaire

L'exposition aux  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  de diamètre inférieur à 80 nm engendre, outre les déformations morphologiques et membranaires, l'affaissement de certaines bactéries (Figure 94).

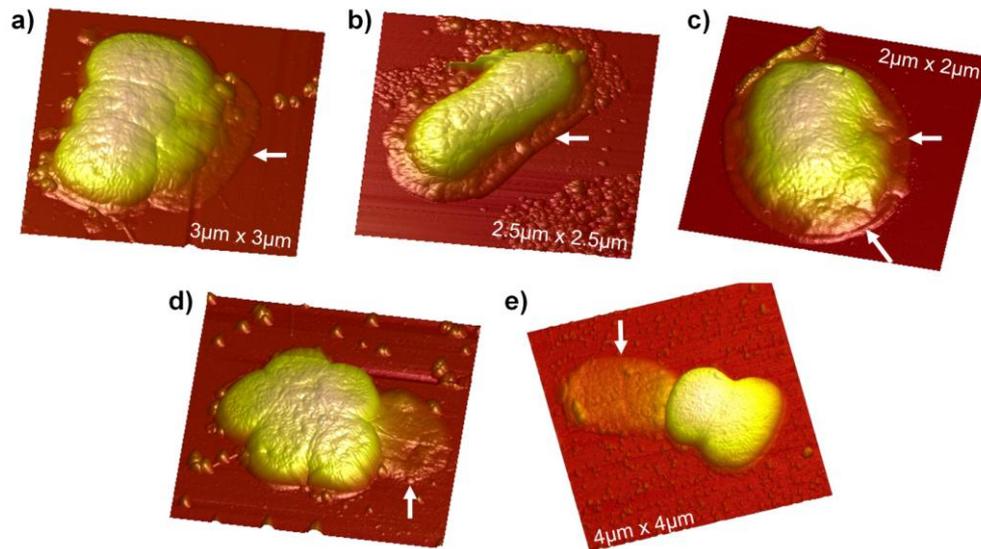


Figure 94. Phénomènes de toxicité associés aux SiO<sub>2</sub>-NPs dont  $\phi < 80\text{nm}$ . Images AFM de topographie montrant l'affaissement partiel ou total (flèches) des bactéries *E. coli*, lors de leur incubation avec les (a, d) SiO<sub>2</sub>-NPs 50, (b, e) les SiO<sub>2</sub>-NPs 10 et (c) les SiO<sub>2</sub>-NPs 4.

Certaines bactéries sont seulement en partie affaissées et exposent donc une alternance de "creux" et de « bosses » à leur surface, correspondant respectivement aux zones lésées et intactes. Les zones lésées sont généralement observées sur les bords de la cellule (Figure 94a-c). D'autres sont entièrement affaissées et apparaissent comme des sacs vides de contenu (Figure 94d-e).

Les conséquences de cette lyse sont parfois également visibles, notamment avec les SiO<sub>2</sub>-NPs 10 et 4. En effet, il est possible d'observer, sur le mica, de la matière organique composée des constituants intracellulaires d'*E. coli* qui sont libérés dans le milieu, et constituent une « traîne de débris » dans le prolongement de certaines bactéries (Figure 95).

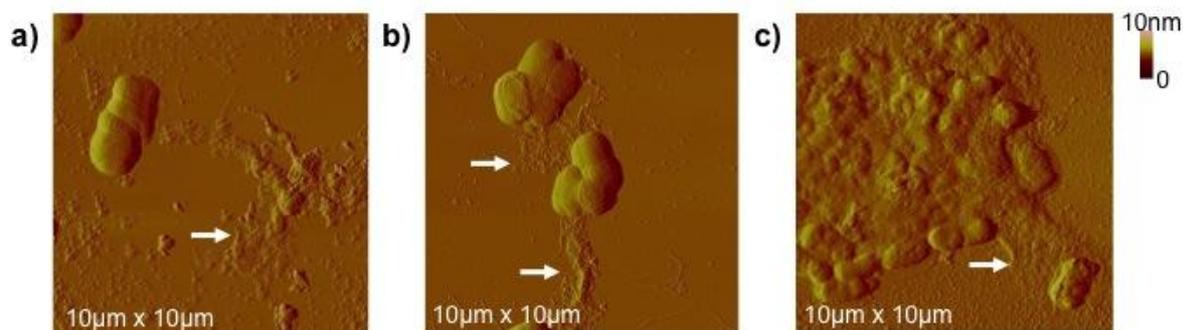


Figure 95. Images AFM d'amplitude montrant les conséquences de la lyse cellulaire à la surface du substrat. Des débris sont présents, signes de la libération des composants intracellulaires des bactéries *E. coli* lors de son traitement en présence des (a) SiO<sub>2</sub>-NPs 10 et (b-c) SiO<sub>2</sub>-NPs 4.

Les bactéries *E. coli* peuvent être (i) soit affaissées, les débris observés étant la conséquence directe de la lyse de ces bactéries, (ii) soit bombées, suggérant qu'elles sont encore saines avec une perte peu probable de composants intracellulaires. Les débris observés peuvent alors être issus de phénomènes de lyse, de bactéries différentes,

survenus lors de l'incubation et déposés aléatoirement lors de la préparation de l'échantillon sur mica.

### 4.1.5 Existence d'un diamètre critique dans l'interaction NPs - *E. coli*

En conséquence, considérant l'ensemble des observations faites lors des tests de viabilité, en microscopie optique en champ noir et en AFM, deux comportements distincts des bactéries *E. coli* sont révélés, liés au diamètre des SiO<sub>2</sub>-NPs auxquelles elles ont été exposées. Ainsi, il existe un diamètre critique,  $\Phi_c$ , compris entre 50 nm et 80 nm :

- Si  $\Phi > \Phi_c$ , les SiO<sub>2</sub>-NPs sont inoffensives vis à vis d'*E. coli*;
- Si  $\Phi < \Phi_c$ , les SiO<sub>2</sub>-NPs défont les interactions cellule-cellule et induisent des dommages morphologiques et membranaires drastiques au niveau de *E. coli*.

L'action délétère des SiO<sub>2</sub>-NPs dont le diamètre est inférieur à  $\Phi_c$  n'est, par ailleurs, pas due à un nombre plus important de NPs comparé à celui des NPs de diamètre plus important, effet déjà infirmé en section 4.1.1.3 (cf. Annexe – Chapitre 4 C).

De par les dégradations qu'elles causent, les NPs de diamètre inférieur à  $\Phi_c$  paraissent pouvoir (i) pénétrer l'enveloppe bactérienne en traversant la OM, (ii) s'enfouir dans la paroi de peptidoglycane voire (iii) interagir avec la membrane plasmique d'*E. coli*, comme le font les peptides antimicrobiens membranotropes [21,22]. La lyse serait facilitée par l'affaiblissement de ces membranes, en raison des dégradations (désorganisation de la OM, invaginations) provoquées par les dites NPs. En effet, la lyse observée suggère qu'elles peuvent (i) pénétrer la couche de peptidoglycane, action corroborée par la forme plus sphérique constatée lors d'un tel traitement, ou (ii) atteindre la membrane plasmique, induisant leurs effets toxiques. Bien qu'exposées à des NPs de  $\Phi < \Phi_c$ , certaines cellules conservent toutefois une apparence "saine".

## 4.2 La charge des SiO<sub>2</sub>-NPs, un paramètre secondaire de l'interaction

La charge des NPs semble également influencer sur les interactions avec la membrane bactérienne, chargée négativement (cf. chapitre 1) [23,24]. Qu'en est-il alors de l'interaction entre SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> et *E. coli* ? Pour cette étude, deux tailles de SiO<sub>2</sub>-NPs ont été choisies :

- $\Phi = 100 \text{ nm} > \Phi_c$  afin de décorrélérer les effets de taille et de charge ;
- $\Phi = 30 \text{ nm} < \Phi_c$  afin d'estimer une possible synergie entre les paramètres taille et charge.

La silice ayant un point de charge nulle à pH 2-3, il est impossible de jouer sur sa charge surfacique dans la gamme de stabilité en pH des bactéries. Il faut alors procéder à une modification chimique de surface en y greffant des groupements ammonium. Les NPs de 30 nm chargées négativement utilisées précédemment étaient les pré-germes synthétisés au laboratoire ; celles chargées positivement sont d'origine commerciale (Sigma Aldrich) (Tableau 12).

Tableau 12. Potentiel zéta, mesuré dans l'eau ultrapure (pH = 6,5), des SiO<sub>2</sub>-NPs utilisées pour l'étude de l'influence de la charge des particules sur leurs interactions avec *E. coli* (cf. chapitre 3).

	$\Phi = 30 \text{ nm} < \Phi_c$	$\Phi = 100 \text{ nm} > \Phi_c$
SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup>	-42,3 mV	-42.3 mV
SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>+</sup>	Non déterminé	+ 45.4 mV

Les NPs de 100 nm, chargées négativement et positivement, ont également été synthétisées au laboratoire (cf. chapitres 2 et 3 et Tableau 12)<sup>23</sup>. En conséquence, cette étude nous permet d'évaluer l'effet (i) de la charge dans le premier cas, mais également (ii) de la chimie de surface dans le second cas, en contrôlant les paramètres de la synthèse.

## 4.2.1 Des attractions électrostatiques favorisées

### 4.2.1.1 Etude de la viabilité

A diamètre équivalent, des tests de viabilité ont été réalisés afin de comparer l'effet de la charge sur la toxicité potentielle des SiO<sub>2</sub>-NPs. Les bactéries (DO = 0.01) sont traitées par une solution de NPs, concentrée à 1 g/L dans un volume final de 500 µL.

#### Sous conditions statiques

Afin d'évaluer l'influence de la chimie de surface des NPs sur la viabilité d'*E. coli*, les s-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100 sont comparées aux s-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 (Figure 96). Après un traitement de 2 h, les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100 n'induisent pas de comportement différent des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 : une augmentation d'environ 25 % du nombre de CFU est observée par rapport au contrôle (Figure 96a). A l'opposé, les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 30 induisent une forte diminution des CFU contrairement aux SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 30 (Figure 96a). Après 24 h d'incubation, quel que soit le diamètre, les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> induisent une diminution plus importante du nombre de CFU que celles chargées négativement (Figure 96b). Considérant uniquement les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>, l'effet des NPs de 30 nm semble atteint au bout de 2 h, le nombre de CFU étant inchangé après 24 h d'incubation (Figure 96c). Les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>100, quant à elles, poursuivent leur action jusqu'à 24 h, le nombre de

<sup>23</sup> Les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 synthétisées présentent le même effet vis-à-vis des bactéries *E. coli* que les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 commerciales présentées jusqu'à maintenant (cf. Annexe – Chapitre 4 D).

CFU diminuant drastiquement par rapport à celui du contrôle et celui observé après 2 h d'incubation (Figure 96c).

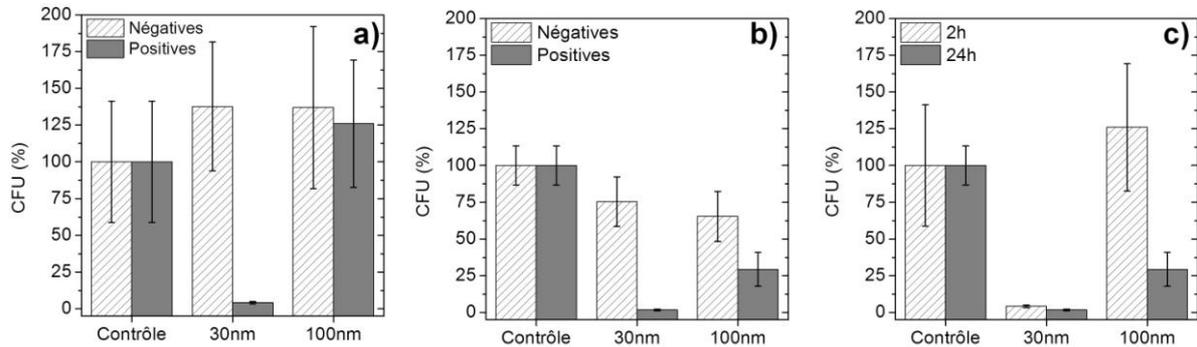


Figure 96. Influence de la charge de surface des NPs sur la viabilité des bactéries *E. coli* traitées par des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> et SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> après (a) 2 h et (b) 24 h d'incubation. c) Influence du temps d'incubation sur la viabilité d'*E. coli* en présence de SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>. Les barres d'erreur présentées tiennent compte de l'ensemble des trois réplicats biologiques et techniques.

### Sous conditions dynamiques

Comme pour le traitement en présence des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>, et afin de s'approcher des conditions de nombre de publications, les tests de viabilité ont été également effectués sous conditions dynamiques (agitation de 250 tours/min.).

La Figure 97 présente une comparaison des conditions statiques et dynamiques sur l'effet des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> sur *E. coli*. Au bout de 2 h et 24 h d'exposition, le contact forcé ne modifie pas l'effet des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>30 qui mènent à une forte diminution du nombre de CFU (Figure 97a-b). En revanche, il modifie totalement l'action des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>100 qui, après 2 h d'incubation, conduisent à une forte diminution du nombre de CFU et, après 24 h d'incubation, à une augmentation (à pondérer avec l'importante déviation standard) (Figure 97a-b). Si l'on considère uniquement les tests sous agitation (sans comparer aux conditions statiques), le temps d'incubation modifie donc uniquement le comportement d'*E. coli* en présence des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>100 (Figure 97c).

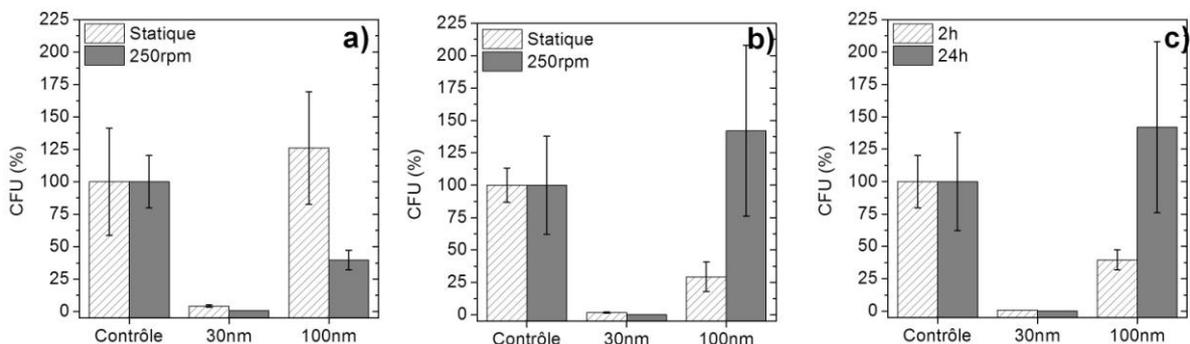


Figure 97. Influence de la vitesse d'agitation sur la viabilité d'*E. coli* en présence de SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> après (a) 2 h et (b) 24 h d'incubation. c) Influence du temps d'incubation sur la viabilité d'*E. coli* en présence de SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> et sous agitation (250 tours/min.). Les barres d'erreur présentées tiennent compte de l'ensemble des trois réplicats biologiques et techniques.

La Figure 98 présente, quant à elle, une comparaison de l'effet des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> et SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> sur *E. coli*, sous conditions dynamiques. La charge de surface a une influence

majeure pour les SiO<sub>2</sub>-NPs 30 : lorsqu'elles sont chargées positivement, une forte diminution du nombre de CFU est observée, après 2 h et 24 h d'exposition, à l'opposé de l'effet des NPs chargées négativement sur le nombre de CFU (Figure 98).

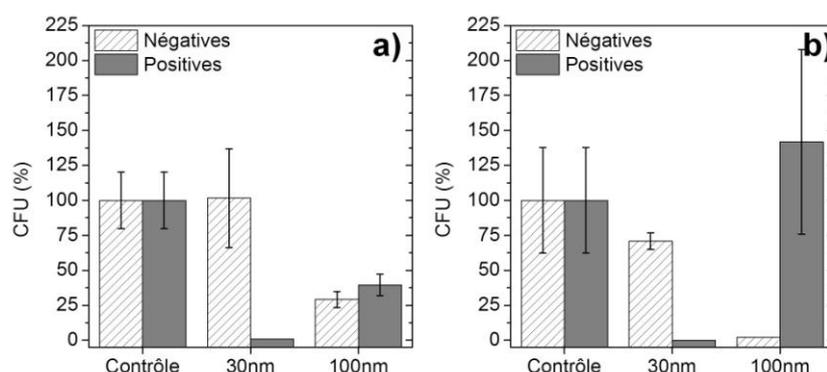


Figure 98. Sous agitation (250 tour/min.), influence de la charge superficielle des NPs sur la viabilité d'*E. coli* après (a) 2 h et (b) 24 h d'incubation.

De même, les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>100 mènent à une augmentation du nombre de CFU, opposée à la diminution engendrée par les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup>100, après 24 h d'incubation (Figure 98b).

D'autres études sur l'impact de la charge des NPs ont été menées, notamment dans le cas de NPs d'argent, connues pour leur activité antibactérienne. Elles induisent des observations similaires à nos résultats, qu'elles soient nues (chargées négativement) ou fonctionnalisées (chargées positivement) [25]. La diminution du nombre de CFU est attribuée à leur toxicité, fortement associée à leur dissolution en ions Ag<sup>+</sup> conduisant à la lyse cellulaire. En revanche, très peu d'études ont été menées sur l'influence de l'état de surface de NPs, supposées « inoffensives », sur leur potentielle toxicité. Citons, toutefois, Lee *et al.*, qui ont étudié l'interaction de bactéries à Gram négatif avec des NPs (de diamètre 50 - 60 nm) de silice fonctionnalisées par des polymères incluant des groupements amine [1]. Ils ont ainsi montré que des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> peuvent induire une diminution conséquente du nombre des CFU, qu'ils associent également à une activité antibactérienne, due aux groupements NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Cette diminution du nombre de CFU est en accord avec les résultats observés, dans notre étude, avec les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 30.

La diminution du nombre de CFU, observée sous certaines conditions en présence de SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>, est-elle associée à un phénomène de toxicité, comme le sous-entendent les études citées, ou, comme mentionné auparavant dans le cadre de l'étude sur l'influence de la taille, à un biais dû à l'organisation des bactéries entre elles ?

#### 4.2.1.2 Une agrégation des bactéries

Comme dans le cadre de l'étude des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup>, les bactéries traitées, pendant 2 h, par les diverses SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> sous conditions statiques, ont été observées en microscopie à champ noir. Les clichés, présentés en Figure 99 montrent l'organisation de la population des bactéries *E. coli* traitée ou non.

Dans le cas de l'incubation avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100, les *E. coli* sont à la fois isolées et en agrégats, comme dans le cas des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  100 et du contrôle. Toutefois, le « brouillard » de NPs observé précédemment avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  100, et attribué à leur présence en suspension, n'est plus observé avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100. Ceci implique que les ces dernières sont probablement associées aux bactéries et non en suspension (Figure 99).

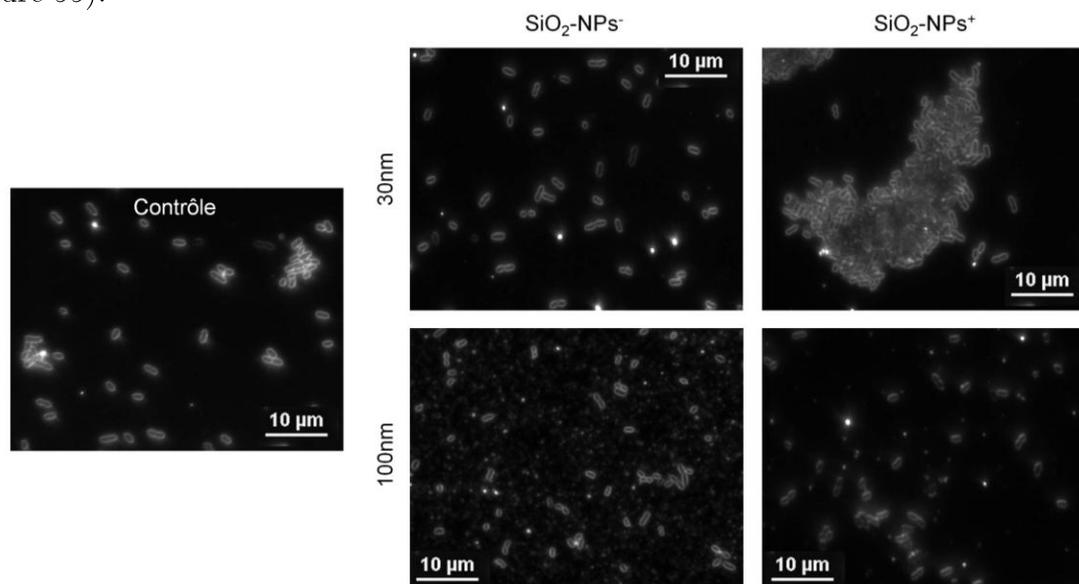


Figure 99. Clichés de microscopie en champ noir montrant l'organisation de la population d'*E. coli* ainsi que sa morphologie, en présence de NPs négatives et positives de 100 et 30 nm de diamètre.

Dans le cas des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  30, étant donné la forte diminution des CFU, s'il s'agit bien de lyse cellulaire, elle devrait être visible en microscopie optique. Or, les observations en champ noir montrent un tout autre phénomène : une agrégation importante des bactéries *E. coli* (Figure 99). Aucune bactérie n'est isolée, toutes forment des agrégats denses et étendus (jusqu'à plusieurs centaines de microns). Les particules chargées positivement servent, ici, de « colle » entre les bactéries facilitant leur tendance naturelle à s'agréger. Cette forte agrégation est probablement à l'origine de la diminution des CFU. Toutefois, des phénomènes de lyse ne peuvent être écartés car, à cette échelle, il est impossible de savoir si les cellules sont vivantes ou mortes au sein des agrégats.

Comme en champ noir, l'étude topographique en AFM révèle un phénomène d'agrégation lors du traitement des bactéries par les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  (Figure 100). Cette agrégation est beaucoup plus importante dans le cas des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  30. En effet, seules quelques rares cellules sont encore isolées, la majorité étant présente dans de larges agrégats. L'affinité entre les deux systèmes est illustrée par l'accumulation des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  exclusivement autour et sur les bactéries *E. coli* (Figure 100 flèches). Exceptés quelques rares cas, aucune  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  n'est présente sur le substrat. Ainsi, il est parfois impossible d'observer les bactéries, tout juste peut-on les « deviner » sous l'agglomération des particules, notamment lorsque le diamètre des NPs est élevé (100 nm). Pour un diamètre de 30 nm, le faible contraste topographique ne permet pas de

révéler la présence de NPs sur les bactéries, seulement autour. Toutefois, à échelle réduite, cette accumulation sur les cellules est observée (cf. section 4.2.3).

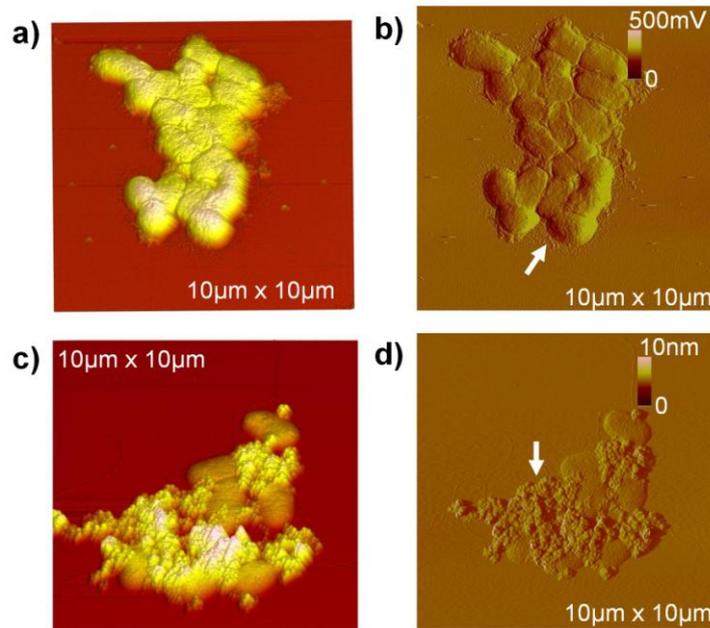


Figure 100. Images AFM de topographie (a,c) et d'amplitude correspondante (b,d) montrant l'affinité des bactéries *E. coli* pour (a-b) les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 30 et (c-d) les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100. Les flèches indiquent la présence de NPs.

Cette agrégation n'est pas surprenante compte tenu des attractions électrostatiques existantes entre les NPs chargées positivement et la surface des bactéries chargée négativement. Des NPs d'or fonctionnalisées par des groupements amine présentent le même comportement, pour des faibles diamètres (< 6 nm), comportement observé par tests colorimétriques, tests de viabilité [26] et MET [27]. Cette agrégation a également été démontrée par Jacobson *et al.* dans une expérience menée sur des bicouches supportées de LPS en interaction avec des NPs d'or fonctionnalisées [9]. Ces attractions électrostatiques se feraient donc, dans notre cas, essentiellement par l'association entre les NPs cationiques et les LPS de la OM.

## 4.2.2 De potentiels changements morphologiques

La Figure 101 et le Tableau 13 présentent les caractéristiques morphologiques des bactéries *E. coli* agrégées ou non après exposition aux SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>. Rappelons que les contraintes associées au phénomène d'agrégation entre bactéries conduisent, déjà dans le contrôle, à des rapports d'aspect réduits (cf. section 4.1.2.2 et Tableau 13). Comme lors des expositions aux SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> (cf. section 4.1.2.2 et Figure 101a), deux comportements dans la population des bactéries agrégées se distinguent :

- Si  $\Phi = 100 \text{ nm} > \Phi_c$ , le rapport d'aspect est inchangé et donc la forme bâtonnet d'*E. coli* est conservée ;
- Si  $\Phi = 30 \text{ nm} < \Phi_c$ , le rapport d'aspect diminue, et une forme plus sphérique est constatée.

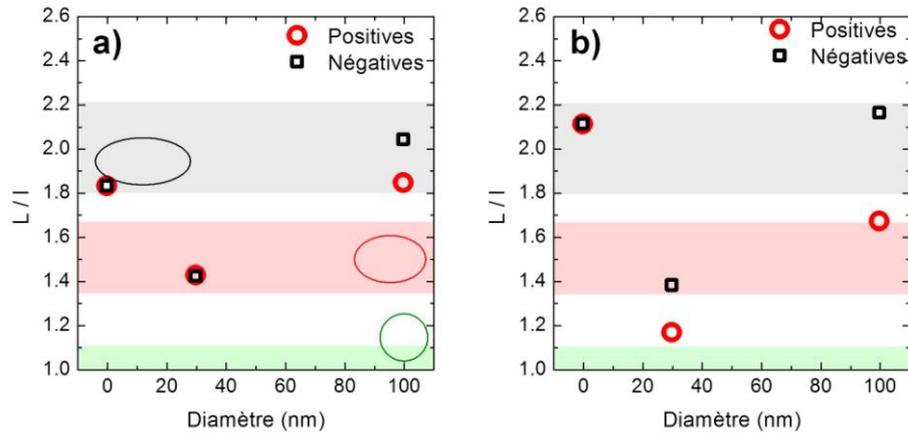


Figure 101. Influence de la charge des SiO<sub>2</sub>-NPs sur le rapport d'aspect des bactéries *E. coli* (a) agrégées et (b) isolées. Les zones sont définies par estimation de la moyenne des points concernés et en intégrant une erreur arbitraire de 10 % sur cette moyenne.

Le phénomène d'agrégation des bactéries est majoritaire lors de leur exposition aux SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>. Il est toutefois possible d'observer quelques bactéries isolées sur lesquelles des modifications d'aspect sont également observées. Il semble, d'ailleurs, que l'influence de la charge sur la morphologie soit plus sensible sur les quelques cellules encore isolées (Tableau 13, Figure 101b).

Tableau 13. Caractéristiques des bactéries *E. coli* agrégées (A) et isolées (I) en présence ou non de SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> (statistiques réalisées sur N = 80 à 100 bactéries).

	Agrégation	L (μm)	l (μm)	L/l
<i>E. coli</i>	A	1.3 ± 0.3	0.7 ± 0.1	1.8 ± 0.5
	I	1.7 ± 0.4	0.8 ± 0.2	2.1 ± 0.5
30 nm	A	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.1	1.4 ± 0.3
	I	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1
100 nm	A	1.4 ± 0.3	0.8 ± 0.1	1.8 ± 0.5
	I	1.5 ± 0.3	0.9 ± 0.1	1.7 ± 0.4

En effet, quel que soit leur diamètre, les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> engendrent une réduction du rapport d'aspect de la bactérie. Cette diminution, déjà observée pour les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 30, est d'autant plus marquée avec les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 30. Dans le cas des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100, le rapport d'aspect des *E. coli* isolées semble correspondre à « une frontière » entre la forme bâtonnet et la forme sphérique. La coexistence de ces deux formes, avec une prédominance pour le bâtonnet, est confirmée par des images AFM (Figure 102a-b). De la même manière, l'AFM confirme la transition morphologique bâtonnet → sphère des bactéries lors de leur exposition aux SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 30 (Figure 102c).

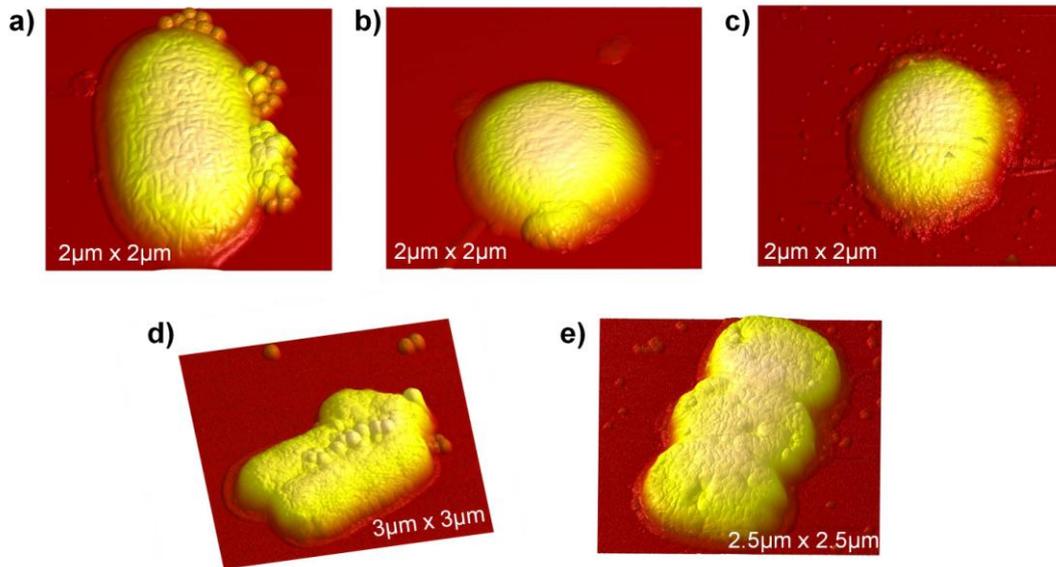


Figure 102. Influence des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  de (a-b) 100 nm et (c) 30 nm sur la morphologie d'*E. coli*. Sont également intégrées, pour rappel et comparaison, les images des bactéries *E. coli* exposées aux (d)  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  100 et (e)  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  30.

Considérant l'ensemble des populations agrégées et isolées d'*E. coli*, à diamètre fixe, la charge de surface des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  semble peu influencer sur le comportement morphologique de la bactérie : il existe une altération de forme majoritairement si  $\Phi < \Phi_c$ . Ces résultats montrent donc que le changement d'aspect des bactéries *E. coli* est principalement dû à la taille des NPs auxquelles elles sont exposées et non à leur charge surfacique, *i.e.* au champ électrostatique qu'elles créent autour d'elles.

### 4.2.3 Préservation de la structure membranaire

Les bactéries exposées aux  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100, tout comme aux  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  100, conservent la structure *ripples*, attribuée à l'organisation des molécules de la OM (Figure 103). Lorsque les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100 sont agrégées sur la surface de la bactérie, il est impossible d'observer simultanément la structure de la membrane (largeur d'un *ripple* :  $40 \pm 7$  nm, cf. chapitre 3) et les nombreuses NPs (cf. Figure 100b). La structure ne peut être observée que si les dites NPs sont faiblement agrégées et ne couvrent que partiellement la surface des bactéries ou si elles sont situées autour de la bactérie. Aussi ne sont présentées en Figure 103 que des images où la coexistence des deux systèmes est faible.

Les bactéries exposées aux  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  30 conservent également la structure *ripples* (Figure 104). De plus, les images AFM permettent de préciser la localisation des NPs au niveau de la membrane bactérienne. En effet, les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  30 isolées s'accumulent au niveau des *inter-ripples* tandis que les agrégats de NPs, plus gros, semblent occuper des espaces *ripples* et *inter-ripples*. Ce comportement est opposé à celui des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  30 qui induisent une structure différente des *ripples* (Figure 104c-d), comme les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  de diamètre inférieur à  $\Phi_c$  : des zones plus globulaires, type agrégats, sont

observées et des zones sont même dépourvues de toute organisation (cf. section 4.1.3). En conséquence, quel que soit leur diamètre, les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  n'induisent pas de changement structural de la OM : la structure membranaire est conservée.

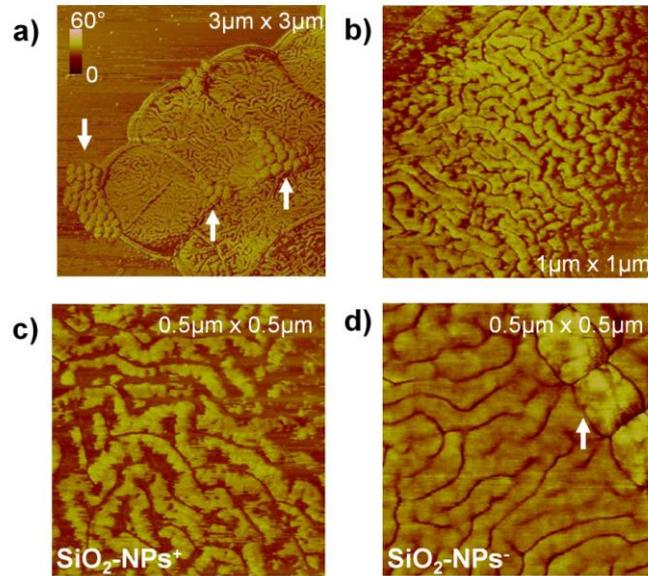


Figure 103. a-b) Images AFM de phase montrant la conservation de la structure *ripples* lors de l'incubation d'*E. coli* avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100. c-d) Images AFM de phase illustrant le fait que la charge de surface des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  100 n'influe pas sur la structure de la OM d'*E. coli*. Les flèches indiquent la présence de NPs.

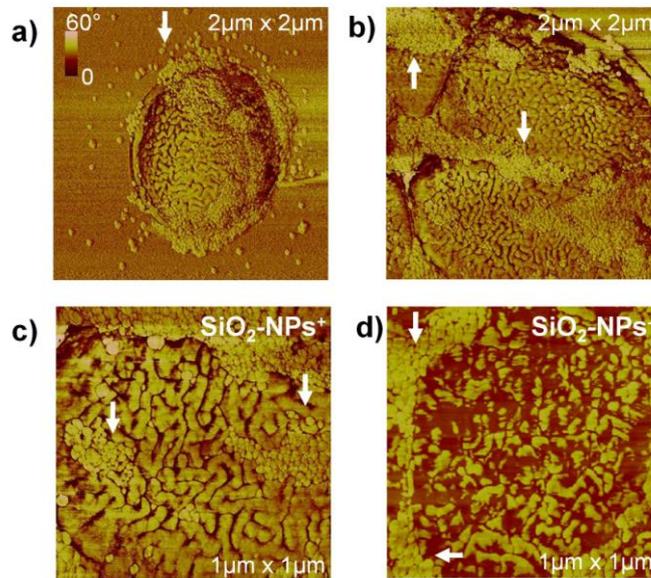


Figure 104. a-b) Images AFM de phase montrant la conservation de la structure *ripples* lors de l'incubation d'*E. coli* avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  30. c-d) Images AFM de phase illustrant le fait que pour un diamètre de 30 nm, une charge de surface négative des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  induit une restructuration de la OM d'*E. coli* (d), à l'inverse d'une charge de surface positive qui la laisse intacte (c). Les flèches indiquent la présence de NPs.

## 4.2.4 Dommages membranaires

Quel que soit le diamètre des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$ , des dommages similaires à ceux observés avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  dont le diamètre est inférieur au diamètre critique,  $50 \text{ nm} < \Phi_c < 80 \text{ nm}$ , sont révélés (Figure 105).

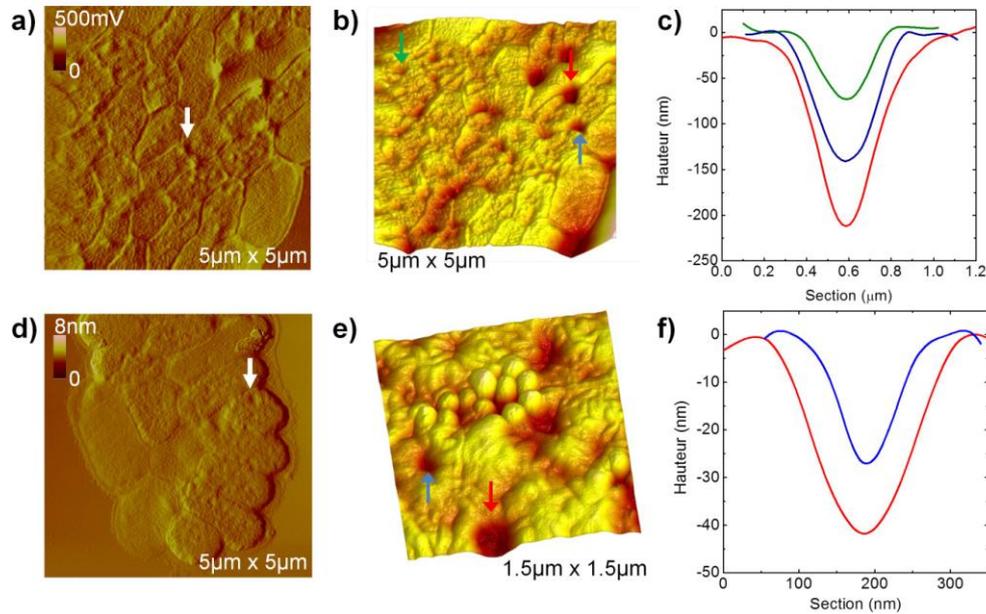


Figure 105. Invaginations (flèches) observées sur la OM d'*E. coli* dues à leur incubation avec les (a-c)  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  30 et (d-f)  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100. a,d) Images AFM d'amplitude. b,e) Images AFM de topographie. c,f) Profils de hauteurs d'invaginations pointées sur les images (b,e).

Des invaginations sont aléatoirement distribuées à la surface d'*E. coli*. La profondeur de ces invaginations varie de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres, et ce indépendamment du diamètre des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  (Figure 105c,f).

Des simulations et modèles théoriques ont démontré que des particules cationiques, dont le diamètre était proche de l'épaisseur d'une bicouche lipidique ( $< 10 \text{ nm}$ ), pouvaient engendrer des défauts au sein de la membrane, similaires à ceux observés dans le cadre de cette thèse [28]. Ces résultats théoriques ont été confirmés expérimentalement par Leroueil *et al.* dans une étude sur l'interaction entre une bicouche lipidique de DMPC et certaines NPs de compositions diverses (inorganique, polymérique et peptidique) [29]. Ils ont notamment constaté la formation de pores au sein de ces bicouches suite à leur traitement en présence des  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-NPs}$  de 50 nm de diamètre. Nos résultats, obtenus sur des systèmes vivants, sont en parfait accord avec cela et montrent que des diamètres plus importants peuvent également engendrer des déformations morphologiques au niveau de la membrane. De plus, ces dommages, observés sur des cellules humaines, sont également présents lors d'une exposition à des doses supposées non toxiques de NPs composées de polymères polycationiques [30]. Cela conforte l'apparente contradiction qu'il pouvait y avoir entre nos tests de viabilité, ne suggérant aucune activité lytique des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$ 100, et nos observations

AFM, montrant les dégradations cellulaires causées. Cela montre l'importance d'associer ces deux techniques pour une meilleure compréhension des phénomènes.

Par ailleurs, en présence de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100, des agrégats encerclent la bactérie (Figure 106a). Etant donné leur hauteur (Figure 106b), il est impossible qu'il s'agisse de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$ .

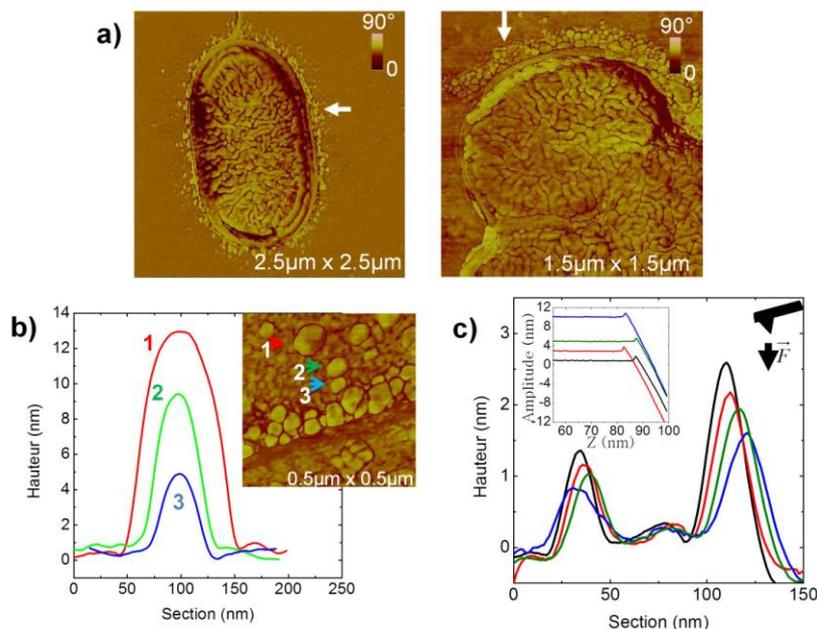


Figure 106. a) Images AFM de phase montrant les agrégats présents autour de bactéries *E. coli* lors de leur incubation avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100. b) Profils de hauteur de certains agrégats, pointés sur l'image de phase associée. c) Evolution des profils de hauteur réalisés sur deux agrégats lors de l'augmentation de l'amplitude de travail en AFM (*i.e.* de la force appliquée).

Des profils ont été réalisés en augmentant la force appliquée, *i.e.* l'amplitude de travail associée à la pointe AFM, afin d'estimer la rigidité de ces agrégats (Figure 106c). Ces profils montrent une diminution de la hauteur et un élargissement de l'agrégat avec l'augmentation de la force qui lui est appliquée. Ces agrégats, qui peuvent être « aplatis », sont donc probablement constitués d'un matériau relativement mou.

Les dégradations membranaires de type invagination, précédemment décrites, ont été attribuées, dans le cadre d'études sur des bicouches lipidiques supportées, à la capacité des NPs cationiques à arracher les lipides de la membrane et à former en conséquence des vésicules extracellulaires [31]. Il est donc envisageable que les agrégats observés soient des morceaux de la OM ou des « pelotes » de LPS détachées de la bactérie sous l'effet des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100.

Bien que des dommages aient été observés pour les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100, aucun débris cellulaire n'a été observé ; nous n'associons donc pas de pouvoir lytique vis-à-vis d'*E. coli* à ce traitement. A l'inverse, lors de leur incubation avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  30, ces dommages sont également accompagnés de débris présents autour des bactéries (Figure 107).

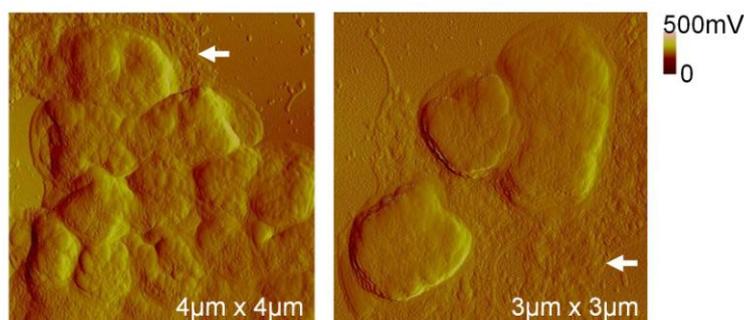


Figure 107. Images AFM d'amplitude montrant les résidus issus des phénomènes de lyse (flèches) associés à l'incubation des bactéries *E. coli* avec les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  30.

Ces débris probablement issus de la perte des composants intracellulaires de certaines cellules sont disposés autour de bactéries qui, elles, présentent encore un certain aspect bombé. Il est donc possible que les débris proviennent d'autres bactéries en solution et qu'ils se retrouvent dans cette zone, lors du dépôt sur mica.

#### 4.2.5 Les $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$ , sources de dommages cellulaires indépendamment de leur taille

La charge surfacique des NPs joue un rôle dans l'interaction avec les bactéries, comme attendu. Dans un premier temps, les attractions électrostatiques favorisent le contact entre les deux systèmes, et donc potentiellement une perturbation accrue des bactéries *E. coli* exposées aux  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$ . Cette activité, et ce quel que soit le diamètre, est plus délétère au regard de la OM, que celle des NPs chargées négativement, en termes de déformations membranaires (invaginations) et non de structure / organisation (*ripples*). Toutefois, considérant les diamètres 30 et 100 nm étudiés, la lyse cellulaire n'est observée que pour les petites NPs, comme pour les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$ . Aussi, semble-t-il raisonnable de penser que le facteur clé de l'activité antibactérienne des NPs est leur diamètre ; leur charge surfacique joue un rôle secondaire.

A notre connaissance, ces travaux sont les premiers à explorer, dans un même protocole, pour la silice, l'influence de la charge et de la taille des NPs sur leur activité antibactérienne. Les résultats observés lors de ce travail avec la silice permettent de généraliser ceux publiés sur les NPs d'argent, connues comme agents bactéricides. Ivask *et al.* ont, en effet, montré que (i) l'augmentation en taille des NPs diminuait leur éventuelle toxicité et (ii) qu'à taille équivalente (environ 20 nm), les NPs cationiques étaient plus toxiques que les NPs anioniques [32]. Ces auteurs n'ont, toutefois, pas étudié l'influence de la charge surfacique à des diamètres différents. Notre contribution tend à montrer que, malgré l'absence de relargage d'ions (cas de l'argent), les facteurs premiers de la toxicité induite par des NPs sont leur taille et leur charge.

## 4.3 La membrane externe de la bactérie, première cible des NPs

Bien qu'une pénétration des petites  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  ( $\Phi < \Phi_c$ ) au sein de la membrane interne ait été envisagée, les dommages observés l'ont été majoritairement sur la OM d'*E. coli*. C'est pourquoi, une étude avec une bactérie ne possédant pas de OM, dite à Gram positif, a été entreprise. Il s'agit de la bactérie *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) présentée dans les chapitres 2 et 3.

### 4.3.1 Etude de la viabilité de *B. subtilis*

Les tests de viabilité sont réalisés sur des colonies cultivées sur boîtes de Pétri (DO = 0.01), et exposées, pendant 2 h, en conditions statiques, à des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  concentrées à 1 g/L dans un volume finale de 500  $\mu\text{L}$ . Les bactéries et NPs sont suspendues dans du PBS 1x, *B. subtilis* ne survivant pas dans l'eau (cf. chapitre 3). La Figure 108 présente l'ensemble des tests de viabilité réalisés lors de l'exposition de *B. subtilis* aux diverses  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$ . Les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  4, 30, 80 et 100 n'induisent aucune modification significative du nombre de CFU par rapport au contrôle (Figure 108a). Le comportement des NPs est donc différent selon la présence ou non d'une OM (Figure 108b) : l'augmentation surprenante des CFU, observée avec *E. coli*, et attribuée à la désagrégation des agrégats de bactéries, n'est pas constatée dans le cas de *B. subtilis*.

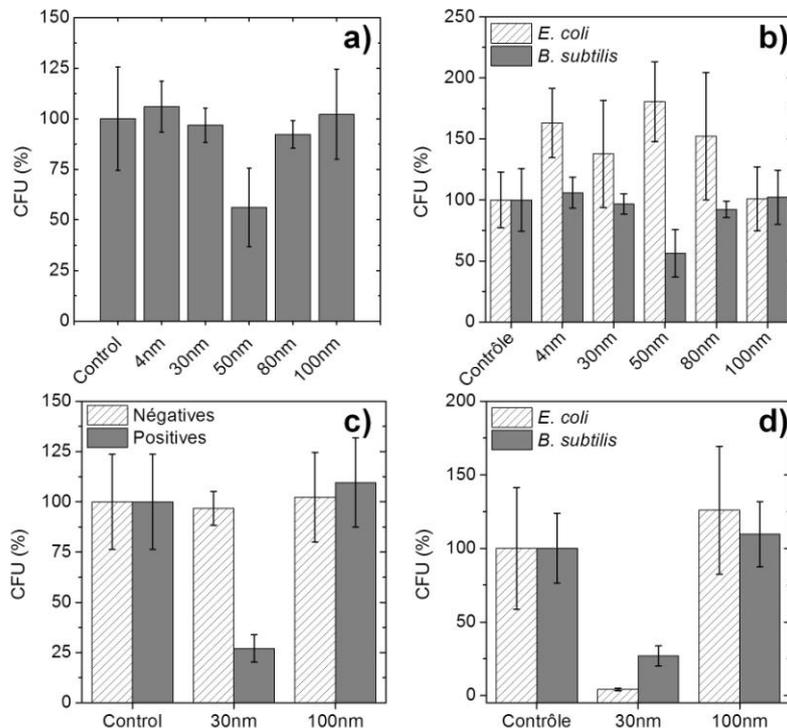


Figure 108. a) Tests de viabilité de *B. subtilis* exposées, pendant 2 h et sous conditions statiques, à des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  de diverses tailles. c) Influence de la charge surfacique des NPs sur la viabilité de *B. subtilis* exposées à des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  et  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  pendant 2 h sous conditions statiques. Comparaison de l'action de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  sur des bactéries à Gram négatif (*E. coli*) et à Gram positif (*B. subtilis*) lorsqu'elles sont chargées (b) négativement et (d) positivement.

Les observations en microscopie à champ noir montrent, en effet, une population de *B. subtilis* inchangée après exposition aux dîtes NPs : la forme bâtonnet est maintenue et la proportion de cellules agrégées et isolées conservée (Figure 109). Par ailleurs, une différence notable de comportement des bactéries est observée pour les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 50 : celles-ci conduisent à une baisse conséquente du nombre de CFU, d'environ 50 %, chez *B. subtilis* alors qu'elles conduisaient, chez *E. coli*, à une forte augmentation des CFU. Cette diminution du nombre de bactéries est également observée en champ noir, suggérant un effet lytique de ces SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 50 (Figure 109).

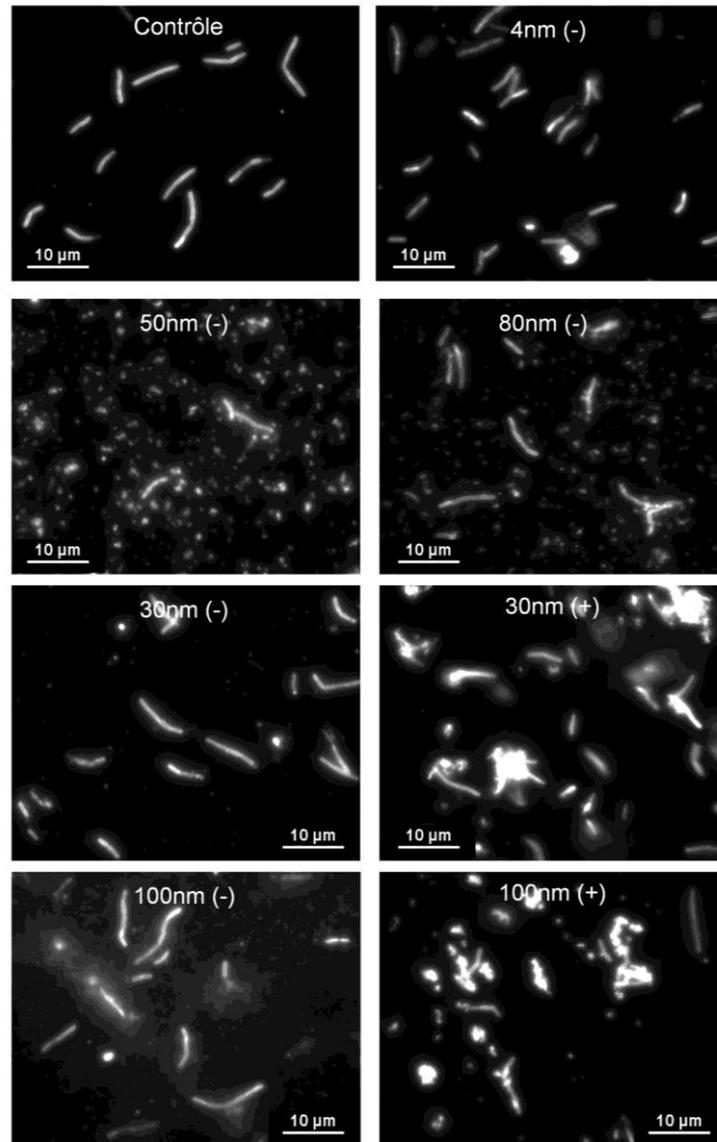


Figure 109. Clichés de microscopie optique en champ noir montrant l'organisation et la morphologie de la population de bactéries *B. subtilis*, exposées pendant 2 h sous conditions statiques à des SiO<sub>2</sub>-NPs de tailles et charges diverses.

Quant à la charge surfacique des NPs, elle n'influe pas sur l'activité des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100 mais induit une chute drastique du nombre de CFU pour les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 30 (Figure 108c). Cette diminution est ici associée à une agrégation importante de la population bactérienne (Figure 109). Ces comportements sont donc parfaitement similaires à ceux observés chez *E. coli* (Figure 108d).

### 4.3.2 *B. subtilis*, une morphologie résistante

Comme pour l'étude sur *E. coli*, une étude en AFM, à l'échelle nanométrique, a été réalisée sur *B. subtilis* afin de pallier les biais éventuels des comptages CFU (cf. section 4.1.1.2). Nous rappelons, ici, que la caractérisation AFM de *B. subtilis* n'est possible qu'après son dépôt sur une PEM et son rinçage, en raison du solvant (PBS) dans lequel elles sont initialement suspendues (cf. chapitre 3). Le protocole de dépôt de la PEM a été optimisé dans le cadre de la conception du biocapteur et sera donc décrit dans le chapitre 5.

#### 4.3.2.1 Une forme et une organisation de la population conservées

Les images AFM montrent que, quel que soit leur diamètre, les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  ne présentent pas d'affinité spécifique pour *B. subtilis* : elles sont présentes autour des bactéries mais également sur le substrat (Figure 110a-b).

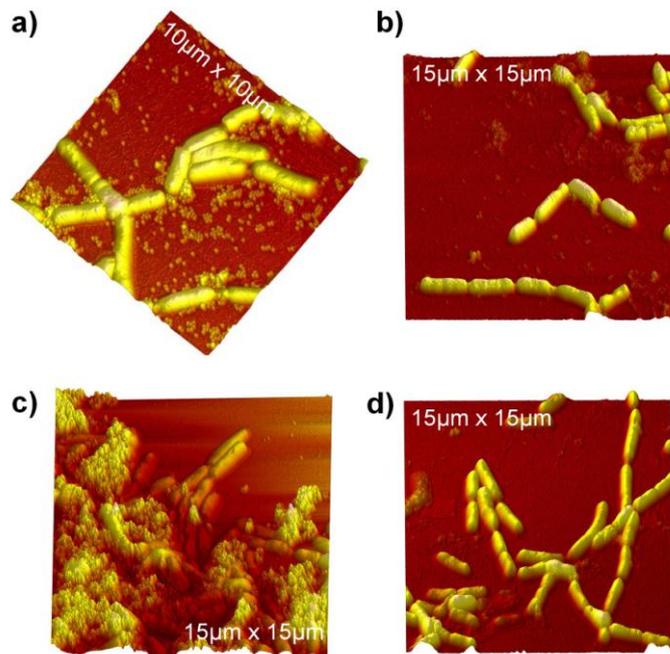


Figure 110. Images AFM de topographie montrant l'organisation des bactéries *B. subtilis* après leur exposition aux (a)  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  100, (b)  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  30, (c)  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100 et (d)  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  30. Les images obtenues pour  $\Phi = 100$  nm sont représentatives des observations faites pour  $\Phi > \Phi_c$  et les images obtenues pour  $\Phi = 30$  nm sont représentatives des observations faites pour  $\Phi < \Phi_c$ .

Il n'est toutefois pas possible de les distinguer pour les diamètres les plus faibles (4 et 10 nm) car la surface est également couverte par une PEM, formant des agrégats pouvant atteindre la dizaine de nanomètres. A cette échelle, les images montrent également que, quel que soit leur diamètre, le traitement en présence des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  conserve l'organisation de la population bactérienne, en chaînette et agrégats, et confirme les observations en champ noir.

Les interactions électrostatiques sont, à l'inverse, favorisées lors du traitement en présence des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  : celles-ci sont uniquement présentes autour et sur les bactéries (Figure 110c-d). *B. subtilis* est chargée négativement en surface comme *E. coli* ; il n'est donc pas surprenant qu'elle se comporte de la même manière. De plus, cette bactérie ne possédant pas de OM, l'association avec les NPs ne peut se faire *via* les LPS mais uniquement avec la couche de peptidoglycane par les interactions électrostatiques ou des liaisons hydrogène [10].

Par ailleurs, quel que soit le diamètre ou la charge des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$ , elles n'induisent pas de changement d'aspect de *B. subtilis*, qui conserve sa forme allongée et bombée (Figure 110, Figure 111).

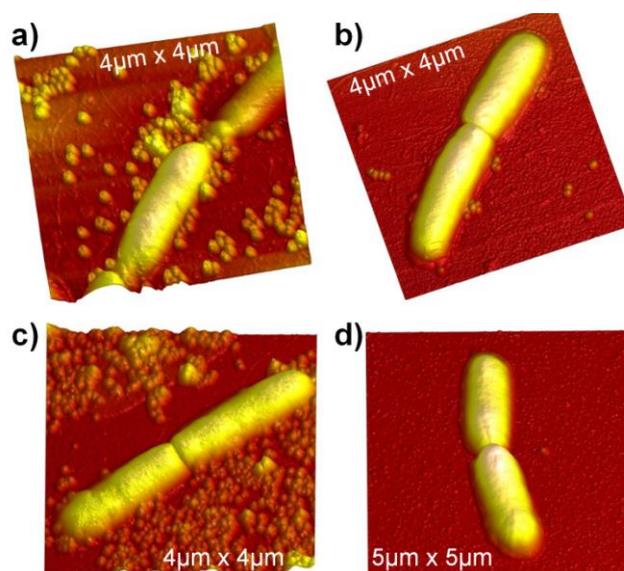


Figure 111. Images AFM de topographie montrant l'influence du traitement en présence des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}$  de diamètre (a) 100 nm, (b) 80 nm, (c) 50 nm et (d) 4 nm sur la morphologie de *B. subtilis*.

#### 4.3.2.2 Une absence de dégradations morphologiques

Le traitement en présence des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  80 et 100 ne conduit pas à la formation de dégradations morphologiques chez *B. subtilis*, absentes également lors du traitement de *E. coli*. La Figure 112 illustre ceci en prenant l'exemple des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  100. Celles-ci peuvent être piégées entre deux cellules, en plus ou moins grand nombre (Figure 112a) et de façon plus ou moins exposée (Figure 112b). Ainsi, certaines NPs présentent un profil de hauteur au dessus de celui de la bactérie voisine tandis que d'autres apparaissent à un niveau plus bas (Figure 112c). Considérant une hauteur moyenne de *B. subtilis* de 300 nm, ceci suggère que dans la première configuration, plusieurs couches de NPs soient présentes à l'interface des deux cellules. Par ailleurs, autour des NPs piégées, aucune irrégularité de la bactérie n'est observée : le profil de hauteur permet de distinguer clairement les NPs des bactéries, sans contraste topographique entre les deux, typique des cocons observés chez *E. coli* (cf. section 4.1.2.3 et Figure 86). Cette absence de « cocon » chez *B. subtilis* tend à confirmer que ce type d'encapsulation est effectivement dû à l'adaptation de la OM à la forme et la taille de

la NP. La OM n'étant pas présente chez *B. subtilis*, les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  80 et 100, piégées ou non entre les bactéries, présentent un comportement indépendant.

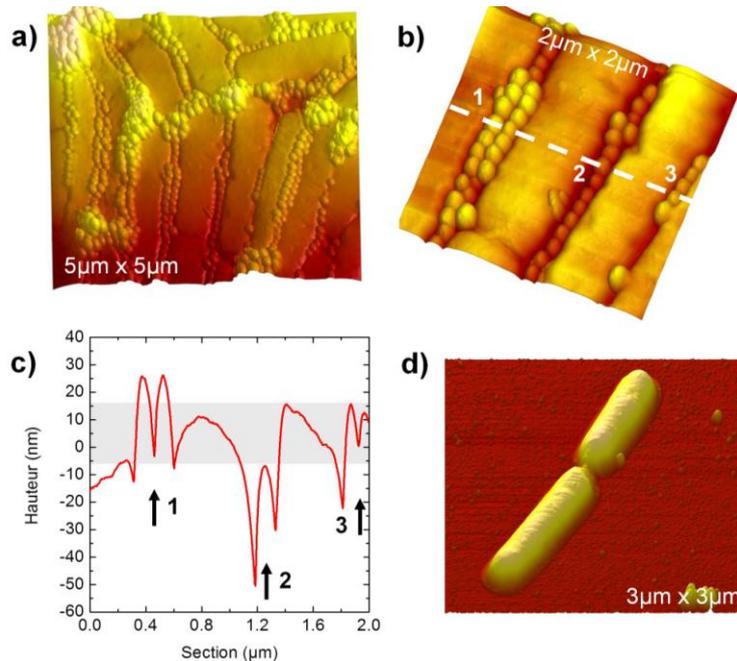


Figure 112. Absence de dégradation morphologique lors du traitement de *B. subtilis* par les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  100, représentatives de  $\Phi > \Phi_c$ . a-b) Images AFM de topographie montrant le piégeage de NPs à l'interface entre deux bactéries. c) Profil de hauteur correspondant à la section blanche en (b). La zone grise représente la surface des bactéries considérées sur l'image. d) Images AFM de topographie du traitement en présence des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100, montrant que, pour  $\Phi = 100$  nm, la charge de surface n'influe pas sur la morphologie de *B. subtilis*.

Par ailleurs, le traitement en présence des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  4, 30 et 50 n'engendre, chez *B. subtilis*, que très peu de dégradation morphologique, contrairement à leur action sur *E. coli* (cf. section 4.1.2.3 et Figure 88). En effet, les bactéries présentent une morphologie bombée, sans invaginations (Figure 113a-c).

L'absence de dégradation morphologique, quel que soit le diamètre des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  est également confirmé pour une charge de surface positive. Les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  possèdent le même comportement que les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  pour les diamètres considérés, 30 et 100 nm (Figure 112d et Figure 113d). Trois hypothèses peuvent expliquer cette différence d'activité :

- les invaginations observées, dans le cadre de l'étude sur *E. coli*, sont uniquement dues à la déformation de la OM ;
- le solvant utilisé (PBS *versus* eau ultrapure) joue un rôle dans la disponibilité des NPs vis-à-vis de la bactérie et donc sur leur action membranaire ;
- les invaginations observées chez *E. coli* sont effectivement dues à une pénétration de la couche de peptidoglycane par les NPs.

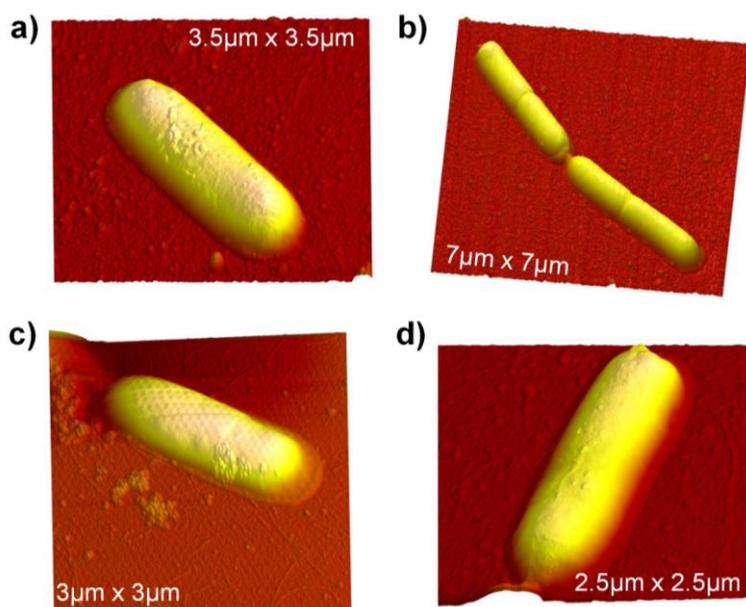


Figure 113. Images AFM de topographie montrant l'absence de dégradation morphologique, type invagination, lors du traitement de *B. subtilis* par (a) les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 50, (b) les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 4, (c) les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 30 et (d) les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 30.

La première hypothèse est certes cohérente, au vu des observations AFM : la OM est effectivement endommagée et invaginée. Toutefois la profondeur de ces invaginations laissait jusqu'alors supposer une action plus interne (couche de peptidoglycane atteinte) des NPs (cf. Figure 89).

La seconde hypothèse repose sur une capacité réduite des NPs à interférer avec les cellules en raison du solvant. En effet, du fait de la force ionique au sein du PBS, il existe une compétition entre les ions phosphates du milieu et les SiO<sub>2</sub>-NP pour accéder à la surface de la bactérie.

Enfin, la dernière hypothèse repose sur le fait que le réseau de peptidoglycane est différent selon la souche bactérienne. Il est, en effet, plus dense et plus épais chez une bactérie à Gram positif, telle que *B. subtilis*. Aussi, il est très probable que les NPs de diamètre inférieur à  $\Phi_c$  puissent pénétrer un réseau de peptidoglycane plus fin chez *E. coli*, induisant la formation d'invaginations, alors qu'elles ne peuvent le faire dans le cas de *B. subtilis*.

### 4.3.3 La structure du peptidoglycane

Bien que des déformations membranaires ne soient pas constatées, la structure homogène du peptidoglycane (cf. chapitre 3) a fait l'objet d'une attention particulière au cours de ce travail afin de comprendre si cette couche était ou non affectée par des SiO<sub>2</sub>-NPs et si oui par lesquelles. Lors du traitement en présence des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 et 80, les images AFM de phase montrent une structure homogène (une phase unique – zones claires) à la surface de *B. subtilis*, similaire à celle observée dans le cas du contrôle (Figure 114).

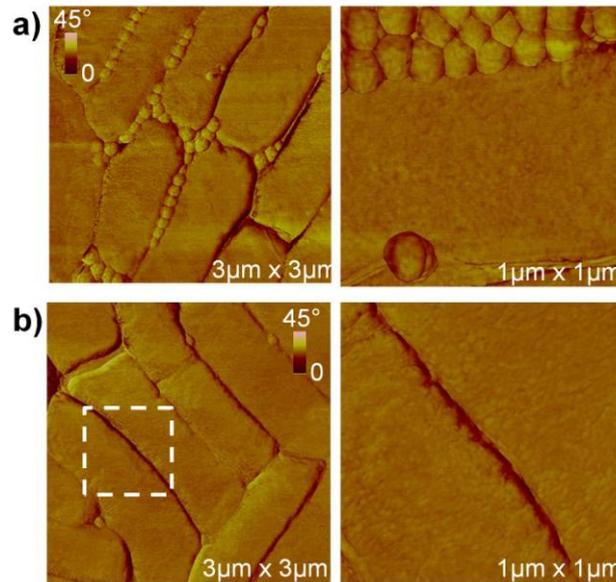


Figure 114. Images AFM de phase montrant la structure superficielle de *B. subtilis* inchangée après traitement en présence des (a) SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 et (b) SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 80.

En revanche, le traitement en présence des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 50, 30 et 4 conduit à des résultats plus variés. La structure peut, en effet, rester inchangée comme dans le cas précédent (Figure 115a-b) mais elle peut également être altérée (Figure 115c-d).

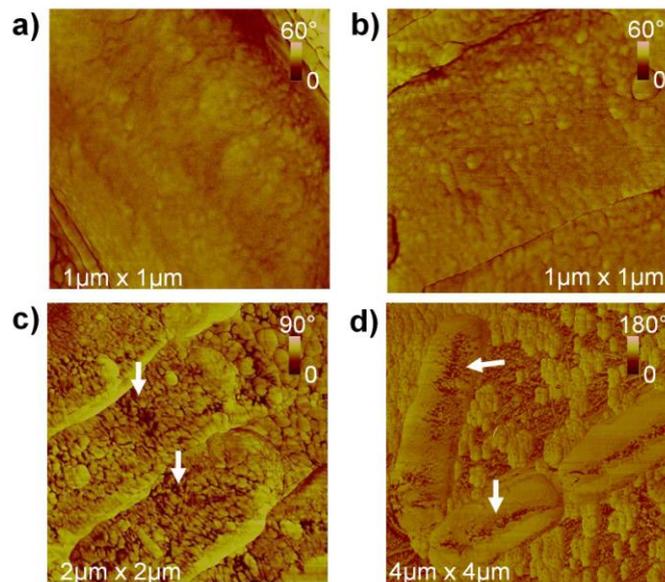


Figure 115. Images AFM de phase montrant la structure superficielle de *B. subtilis* lors du traitement en présence des (a,c) SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 4 et (b,d) SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 50. Cette structure peut être inchangée (a-b) ou altérée (c-d).

Dans ce cas il n'existe pas d'altération « typique », comme dans le cas d'*E. coli* (structure *ripples versus* agrégats). La dégradation peut affecter l'ensemble de la cellule, qui présente alors une surface hétérogène en phase, avec des zones qui semblent être plus ou moins rigides (zones claires *versus* zones sombres - Figure 115c). Elle peut également ne concerner que certaines parties de la cellule, notamment la partie longitudinale et centrale ou les bords (Figure 115d). Les zones altérées présentent un

comportement plus dissipatif (zone sombre), suggérant une structure plus fluide que le reste de la bactérie, qui paraît intact (Figure 115d). Dans cette configuration, les bactéries *B. subtilis* sont associées ou non à la présence de NPs : celles-ci sont présentes à proximité de la bactérie, l'encerclant (Figure 116a), sur la bactérie au niveau des zones intactes (Figure 116b-gauche) ou altérées (Figure 116b-droite). Les SiO<sub>2</sub>-NPs présentent alors un profil de hauteur apparente correspondant au diamètre attendu de la particule (Figure 116c).

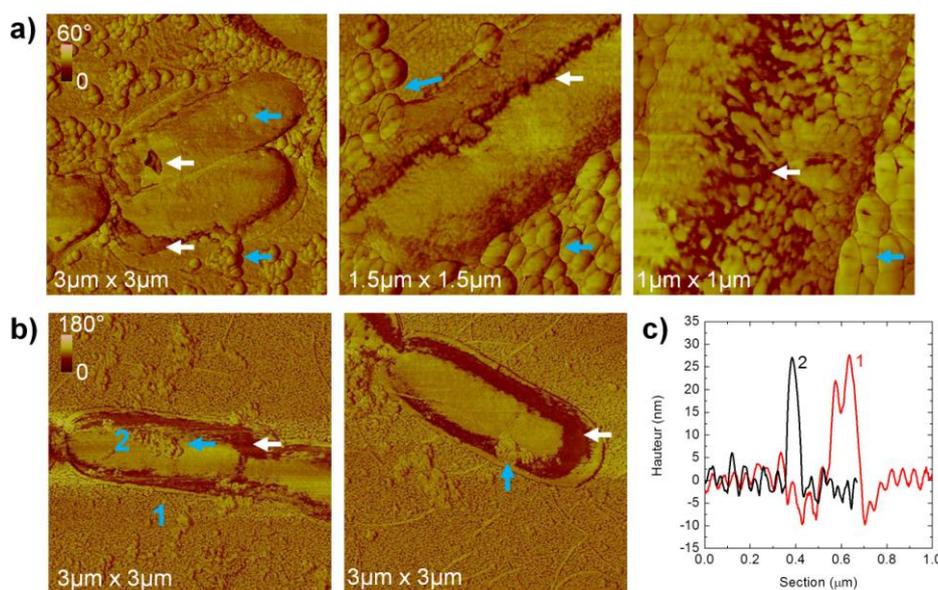


Figure 116. Images AFM de phase montrant les dégradations membranaires (flèches blanches), *i.e.* les zones sombres, de la surface de *B. subtilis*, suite à leur traitement en présence (a) des SiO<sub>2</sub>-NPs 50 et (b) des SiO<sub>2</sub>-NPs 30. Les flèches bleues indiquent la présence de NPs. c) Profils de hauteur des SiO<sub>2</sub>-NPs 30 mentionnés en (b).

Lors du traitement en présence des SiO<sub>2</sub>-NPs 50, 30 et 4, lorsque la partie longitudinale ou les bords de la bactérie sont dégradés, des endroits présentant des contrastes de phase plus importants sont observés au sein des zones dégradées (Figure 116a). Ceci est particulièrement observé dans le cas des SiO<sub>2</sub>-NPs 4 (Figure 117). Ces zones présentent parfois une signature en phase plus élevée que celle de la surface de *B. subtilis*. S'agit-il alors de NPs déposées - piégées au sein du peptidoglycane ? Lorsque la résolution nous le permet, un profil de hauteur renseigne sur la nature de ces zones. Dans certains cas, elles apparaissent comme des « patches » à la forme mal définie, pouvant aller d'agrégats circulaires à des zones plus étendues (Figure 117a). Elles ne sont alors associées à aucun relief particulier (Figure 117b), suggérant qu'il s'agit davantage de parties de la bactérie (et non de NPs), dont le comportement viscoélastique est modifié par l'action de ces dernières. Dans d'autres cas, ces zones claires apparaissent clairement comme des agrégats circulaires voire des « billes » (Figure 117c). Elles sont alors associées à un profil montrant une « protubérance » d'environ 4 nm de hauteur, suggérant qu'il s'agit effectivement de NPs (Figure 117d).

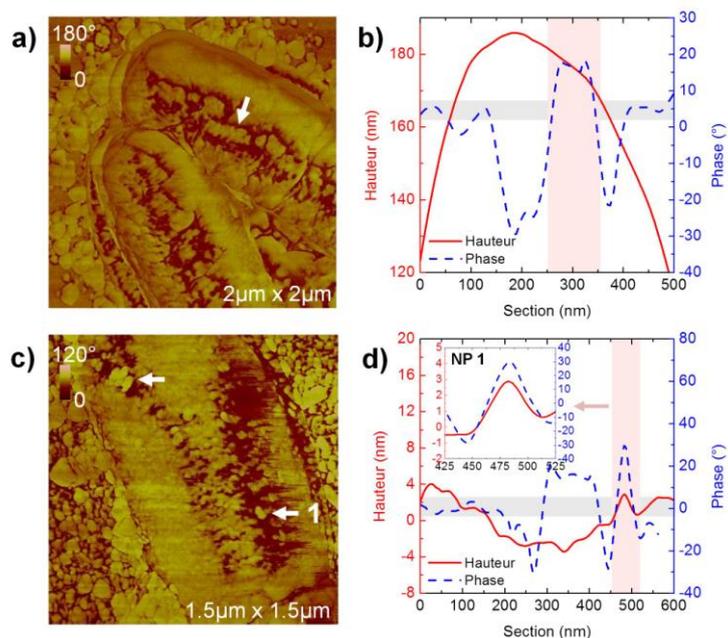


Figure 117. a,c) Images AFM de phase montrant la dégradation (zones sombres) de la surface de *B. subtilis*, suite à leur traitement en présence des SiO<sub>2</sub>-NPs 4. b,d) Profils de hauteur et de phase associés aux zones fléchées sur les images. Les zones grises représentent la signature de phase à la surface de la bactérie et les zones roses, celle au niveau des flèches.

L'ensemble de ces observations suggère, qu'absentes ou non de la surface de la bactérie, les SiO<sub>2</sub>-NPs 50, 30 et 4 peuvent modifier le comportement en phase de cette couche de peptidoglycane. Pour la majorité, les cellules sont atteintes dans leur zone longitudinale centrale et sur les bords, comme si elles étaient comprimées. Le réseau de glycanes grâce à ses chaînes térapeptidiques flexibles tend alors à s'adapter en s'étirant ou se comprimant ; ce phénomène est également suggéré par l'existence de « patches organisés » qui sont attribués à la bactérie elle-même et non aux NPs.

Enfin, les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100 et 30 se comportent de la même manière que les SiO<sub>2</sub>-NPs 100 et 30 (Figure 118).

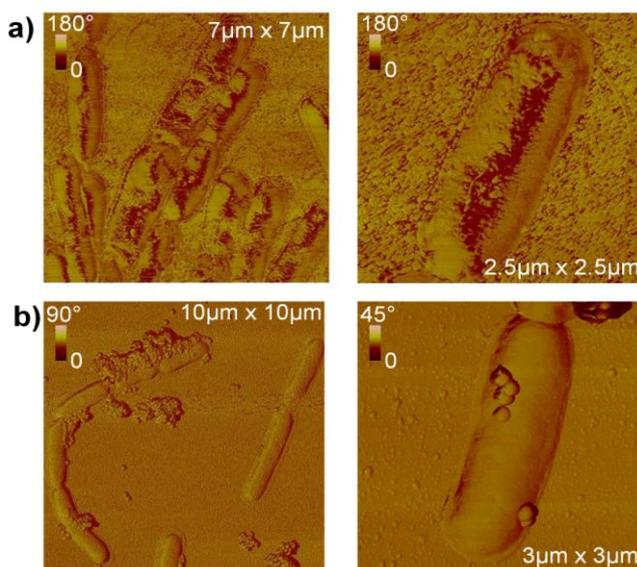


Figure 118. Images AFM de phase montrant la structure surfacique de *B. subtilis*, suite à leur traitement en présence (a) de SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 30 et (b) de SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100.

Ainsi, observons-nous des tendances récurrentes : les NPs de faible diamètre engendrent des altérations de la structure du peptidoglycane, susmentionnées, tandis que celles de diamètre important n'impliquent aucun changement de cette structure. La charge de surface ne semble donc pas modifier l'action des SiO<sub>2</sub>-NPs vis-à-vis de *B. subtilis*, contrairement à son effet lors du traitement de *E. coli* (cf. sections 4.2.3 et 4.2.4).

#### 4.3.4 L'activité antibactérienne des « petites » SiO<sub>2</sub>-NPs sur *B. subtilis*

Lors du traitement de *B. subtilis* en présence de NPs de faible diamètre, aucune invagination n'a été constatée (cf. section 4.3.2.2). Cela est probablement dû au fait que peu de cellules présentent encore un aspect bombé et « normal », rendant ces conclusions sur l'absence de dégradation morphologique hâtives. En effet, nombre de bactéries (non présentées dans les sections précédentes) sont mortes ou présentent des affaissements conséquents après leur exposition aux SiO<sub>2</sub>-NPs 50, 30 et 4 (Figure 119). Le phénomène est particulièrement visible lors du traitement de *B. subtilis* en présence des SiO<sub>2</sub>-NPs 4. En effet, environ 50% de la population est partiellement ou totalement lysé (Figure 119a). Cela se traduit par des cellules vides de contenu ou partiellement effondrées. Dans ce dernier cas, les bactéries présentent des zones encore bombées, notamment leur apex (Figure 119b), qui en phase, présentent une structure similaire à celle de la bactérie saine (Figure 119c). Les zones altérées présentent, à l'opposé, un contraste de phase hétérogène.

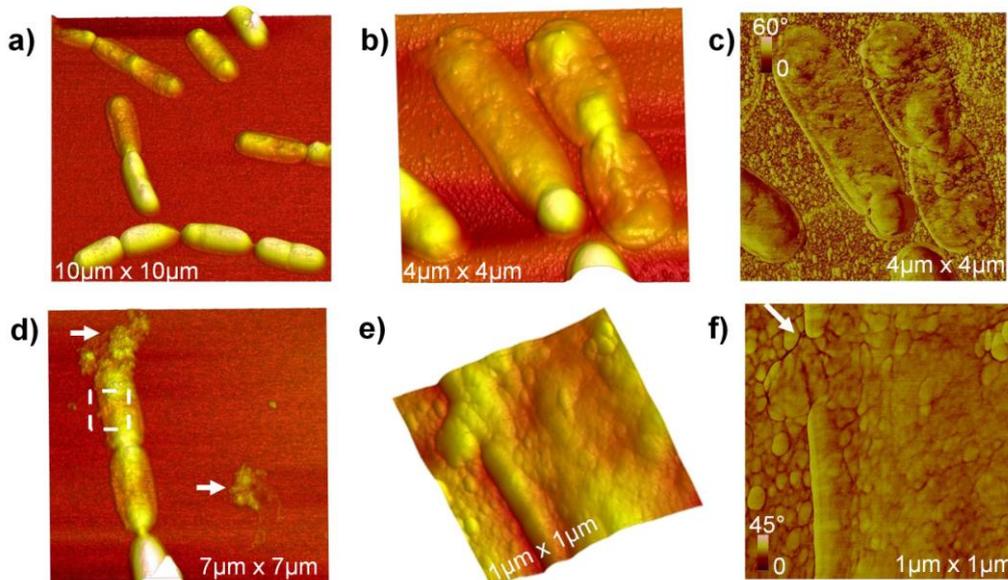


Figure 119. Phénomènes de lyse associés au traitement de *B. subtilis* en présence des SiO<sub>2</sub>-NPs 4. a) Images AFM de topographie montrant une majorité de cellules mortes au sein de l'échantillon. b-c) Images de hauteur et de phase montrant deux bactéries affaissées. d) Images topographique montrant la présence de lyse (flèches) à côté de bactéries altérées. e-f) « Zoom » de phase correspondante illustrant l'ouverture de la paroi bactérienne (flèches) lors de la fuite de ses composants intracellulaires.

Dans le cas de *B. subtilis*, contrairement à celui d'*E. coli*, nous avons pu observer la fuite des composants intracellulaires. La Figure 119d-f montre une bactérie exposée aux SiO<sub>2</sub>-NPs 4 et lysée, ayant libéré des débris autour d'elle. Les agrégats, présents sur le côté, ont un contraste de phase similaire au reste de la bactérie, confirmant leur nature de produits issus de la lyse (et non d'agrégats de NPs). Ceux-ci semblent s'être écoulés de la cellule par l'ouverture créée au niveau de sa paroi.

Par ailleurs, les cellules entièrement vidées présentent, en phase, des petits agrégats de type granules sphéroïdes, dont la phase est plus élevée que celle du reste de l'enveloppe (Figure 120). Le profil de hauteur montre que ces agrégats présentent une hauteur apparente d'environ 6 nm, cohérente avec le fait qu'il s'agisse de NPs piégées au sein du sacculus.

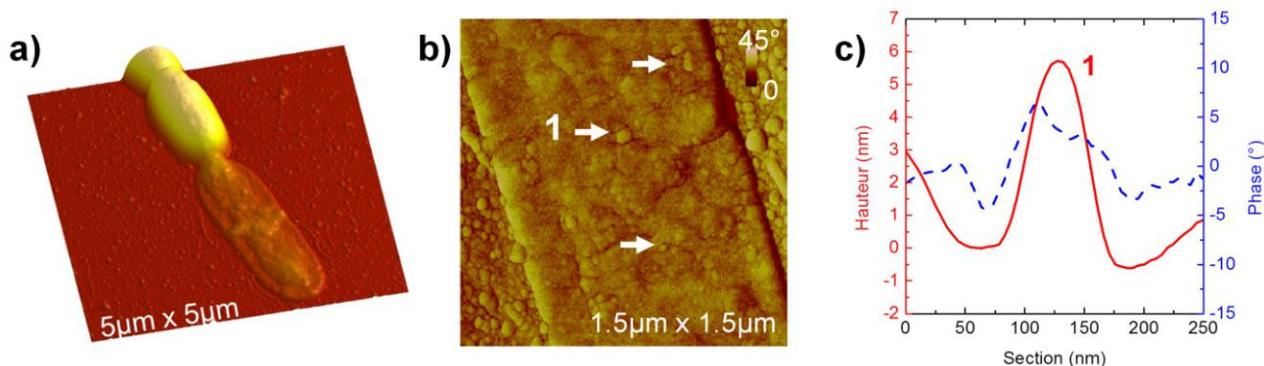


Figure 120. Images AFM de (a) hauteur et (b) de phase soulignant la présence de NPs de 4 nm (flèches) au sein du sacculus, *i.e.* de la bactérie vidée. c) Profils de hauteur et phase associés à la NP 1 de (b).

### 4.3.5 La membrane externe, cible privilégiée des SiO<sub>2</sub>-NPs

Cette étude comparative sur *B. subtilis* nous a donc permis de comprendre l'interaction des NPs avec, non pas la OM, mais la couche de peptidoglycane sous-jacente. Comme pour *E. coli*, un diamètre critique semble émerger pour une activité antibactérienne des NPs :

- Si  $\Phi > 80$  nm, les SiO<sub>2</sub>-NPs sont inoffensives vis à vis de *B. subtilis* ;
- Si  $\Phi < 80$  nm, les SiO<sub>2</sub>-NPs induisent des changements dans le comportement nanomécanique de la couche de peptidoglycane à la surface de *B. subtilis*.

En ce qui concerne leur activité antibactérienne, il faut être ici plus nuancé. Seules les SiO<sub>2</sub>-NPs 4 semblent clairement cytotoxiques, engendrant non seulement des dommages au niveau du peptidoglycane mais également la mort de la majorité des bactéries. Ceci tend à confirmer l'hypothèse de leur potentielle insertion, voire pénétration, au sein du maillage de peptidoglycane, évoquée en section 4.1.2.2. En conséquence, la toxicité des plus petites SiO<sub>2</sub>-NPs, envers *E. coli* et *B. subtilis*, advient très probablement par la perméabilisation de la couche de peptidoglycane et la pénétration des dites NPs au sein de la membrane plasmique. Comme observé pour *E. coli*, *i.e.* si une OM est présente, l'activité antibactérienne interne se fait également au

détriment de la OM (invaginations), celle-ci étant la première cible des dommages membranaires survenus.

Par ailleurs, aucune lyse n'a été observée, chez *B. subtilis*, pour des diamètres strictement supérieurs à 4 nm. Par exemple, les SiO<sub>2</sub>-NPs 50, qui étaient lytiques pour *E. coli*, n'ont envers *B. subtilis* qu'une activité perturbante sans pour autant être toxiques. Le réseau dense et épais de glycanes de *B. subtilis* les « protégerait » contre la pénétration de ces NPs jusqu'à la membrane plasmique. Concernant ces SiO<sub>2</sub>-NPs dont  $4 \text{ nm} < \Phi < 80 \text{ nm}$ , la lyse observée chez *E. coli* pourrait, elle, s'expliquer par la perméabilisation de la couche de peptidoglycane, son maillage étant plus fin et moins dense que chez *B. subtilis*. Elle pourrait également être due à un stress externe induit par ces NPs (mécanique ou chimique), responsable d'une réponse générale de la cellule.

Au cours de ce chapitre, nous avons mis en évidence que les tests de viabilité, couramment utilisés dans les études écotoxicologiques, étaient insuffisants pour détecter certains phénomènes de toxicité. En effet, l'organisation de la population bactérienne, notamment la présence d'agrégats, influence également le nombre de CFU. Aussi, des phénomènes de toxicité, généralement admis lors d'une diminution du nombre de CFU, peuvent être masqués par des phénomènes de dissociation des agrégats bactériens, conduisant à l'augmentation du nombre de CFU. L'AFM est donc tout particulièrement adaptée pour étudier cette potentielle toxicité, à l'échelle nanométrique.

La caractérisation AFM de l'interaction SiO<sub>2</sub>-NPs / *E. coli* a mis en évidence, un diamètre critique dans l'interaction,  $50 \text{ nm} < \Phi_c < 80 \text{ nm}$ . Au delà de ce diamètre  $\Phi_c$ , les SiO<sub>2</sub>-NPs 80 et 100 présentent un caractère inerte vis-à-vis de *E. coli* : elles n'altèrent ni la morphologie de la bactérie ni la structure *ripples* de sa OM. Toutefois, l'enveloppe bactérienne peut s'adapter à la présence de ces NPs en les encapsulant, de façon plus ou moins prononcée, au sein d'un « cocon ». A l'inverse, en deçà de ce diamètre  $\Phi_c$ , les SiO<sub>2</sub>-NPs 50, 30, 10 et 4 conduisent à diverses dégradations de la bactérie. Premièrement, une transition morphologique de la forme bâtonnet d'*E. coli* saine vers une forme davantage sphérique est reportée, qui implique une activité délétère des dites NPs sur la structure de la couche de peptidoglycanes, conférant sa forme à la bactérie. Egalement, des invaginations sont réparties aléatoirement sur les bactéries traitées par les SiO<sub>2</sub>-NPs dont le diamètre est inférieur à  $\Phi_c$ . Ces invaginations présentent une profondeur supérieure à l'épaisseur de la OM ( $> 10 \text{ nm}$ ) et des profils de hauteur et de phase suggérant l'absence ou la présence potentielle de la NP au sein de l'invagination. Ces dégradations pourraient être le signe (i) d'une pénétration des NPs au sein de la OM voire de la couche de peptidoglycanes sous-jacente, celle-ci présentant un maillage de l'ordre de 70-120 Å ou (ii) d'une action externe des NPs sur *E. coli* qui réagirait en conséquence. Les SiO<sub>2</sub>-NPs 50, 30, 10 et 4 induisent, enfin, une transition dans l'organisation de la OM d'*E. coli*. La structure *ripples* en serpentins, caractéristique de la bactérie saine, transite vers une forme plus compacte de type agrégat. Ceci est en accord avec des travaux précédemment publiés,

reportant la transition des molécules de LPS, auxquelles a été imputée la structure *ripples*, d'une conformation étendue vers une conformation en pelote compacte. Ces altérations de la OM voire du peptidoglycane conduit, à termes, à la lyse cellulaire caractérisée par des *E. coli* affaissées, vides de contenu et la présence de débris cellulaires à la surface du substrat.

Par ailleurs, une étude a été menée afin de déterminer l'influence de la charge des SiO<sub>2</sub>-NPs sur leur interaction avec *E. coli*. Les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 30 ( $< \Phi_c$ ) et 100 ( $> \Phi_c$ ) ont été choisies afin de décorrélérer l'effet de cette charge et du diamètre. La caractérisation AFM de cette interaction a montré que seules les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 30 induisaient une transition morphologique « bâtonnet  $\rightarrow$  ovoïde » et la lyse cellulaire d'*E. coli*. En conséquence, la taille des NPs semble être le paramètre clé pour leur toxicité : seules les petites NPs semblent être capables d'altérer, de façon permanente, l'enveloppe bactérienne voire sa membrane plasmique. En revanche, quelque soit leur diamètre, les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup>, au-delà ou en deçà de  $\Phi_c$ , engendrent (i) la formation d'invaginations aléatoirement réparties à la surface des bactéries, dont les caractéristiques sont similaires à celles évoquées ci-dessus, et (ii) la conservation de la structure *ripples* de la OM. Or, ces deux paramètres dépendaient précédemment du diamètre des NPs. En conséquence, bien que la toxicité ne soit avérée que pour des NPs de diamètre inférieur à  $\Phi_c$ , il existe une synergie d'effets entre le diamètre et la charge des SiO<sub>2</sub>-NPs dans leur interaction avec *E. coli*, notamment en termes de dommages potentiellement engendrés au niveau de l'enveloppe (OM et peptidoglycane).

Enfin, une souche de bactéries à Gram positif, *B. subtilis*, exhibant à sa surface la couche de peptidoglycane, a également été étudiée en interaction avec l'ensemble des SiO<sub>2</sub>-NPs, afin de déterminer le rôle potentiel de la OM, chez les bactéries à Gram négatif, pour lutter contre l'éventuelle toxicité des NPs. De la même manière que pour *E. coli*, les tests de viabilité se sont révélés insuffisants pour évaluer certains phénomènes de toxicité, excepté pour les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 50 qui ont conduit à une diminution significative du nombre de CFU. Contrairement à *E. coli*, quelque soit leur diamètre ou leur charge, les NPs n'ont conduit à aucune transition morphologique chez *B. subtilis*. La couche de peptidoglycane étant beaucoup plus épaisse et dense chez les bactéries à Gram positif que chez les bactéries à Gram négatif, il n'est pas surprenant que les NPs ne puissent la dégrader suffisamment, comme chez *E. coli*, de façon directe ou indirecte, pour observer une telle transition morphologique. Par ailleurs, l'étude AFM a, à nouveau, révélé l'existence d'un diamètre critique  $50\text{nm} < \Phi_c < 80\text{ nm}$ . Les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 80 et 100 présentent un caractère inerte vis-à-vis de *B. subtilis* : elles n'altèrent pas la structure homogène du peptidoglycane en surface. A l'opposé, les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 50, 30, 10 et 4 mènent à des dégradations de cette structure : des zones dissipatives, associées à la présence des NPs, sont observées au sein de l'enveloppe qui présente donc des propriétés non homogènes suite à son traitement. Toutefois, à termes, seules les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 4 se sont révélées toxiques pour *B. subtilis*, l'ouverture de la paroi, et la fuite des composants intracellulaires issue de cette ouverture, ayant même été observées.

## Bilan

Dans le cadre de ce chapitre, les résultats suivants ont été mis en évidence :

- ❖ Des tests de viabilité seuls sont insuffisants pour évaluer l'activité antibactérienne des SiO<sub>2</sub>-NPs, des phénomènes d'agrégation et de toxicité pouvant se combiner.
- ❖ Il existe un diamètre critique,  $50 \text{ nm} < \Phi_c < 80 \text{ nm}$ , lors de l'interaction SiO<sub>2</sub>-NPs - bactéries (*E. coli* et *B. subtilis*) tel que si :
  - ✓  $\Phi > \Phi_c$  : les SiO<sub>2</sub>-NPs sont inoffensives ;
  - ✓  $\Phi < \Phi_c$  : des dommages morphologiques, de type invaginations (pour *E. coli* seulement) et membranaires (réorganisation de la structure surfacique – OM ou peptidoglycane) conduisent à la lyse cellulaire.
- ❖ La charge surfacique a une influence moindre sur la toxicité des SiO<sub>2</sub>-NPs :
  - ✓ des dommages morphologiques, de type invagination, mais non membranaires, quel que soit leur diamètre chez *E. coli* ;
  - ✓ des dommages membranaires, mais non morphologiques, si  $\Phi < \Phi_c$  chez *B. subtilis* ;
  - ✓ une toxicité avérée uniquement si  $\Phi < \Phi_c$ , chez *E. coli* ;
- ❖ La membrane externe est la première cible des SiO<sub>2</sub>-NPs : les dommages morphologiques, précédemment décrits, semblent se concentrer principalement au niveau de cette structure.
- ❖ Les SiO<sub>2</sub>-NPs 4 sont les plus toxiques, capables de pénétrer jusqu'à la couche de peptidoglycane, d'atteindre et endommager la membrane plasmique, quelle que soit la souche bactérienne, Gram négative ou Gram positive.

## Bibliographie

- [1] Lee C, Kim JY, Lee WI, Nelson KL, Yoon J, Sedlak DL. Bactericidal Effect of Zero-Valent Iron Nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environ Sci Technol* 2008;42:4927–33. doi:10.1021/es800408u.
- [2] Wehling J, Volkmann E, Grieb T, Rosenauer A, Maas M, Treccani L, et al. A critical study: Assessment of the effect of silica particles from 15 to 500 nm on bacterial viability. *Environ Pollut* 2013;176:292–9. doi:10.1016/j.envpol.2013.02.001.
- [3] Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. *Water Res* 2006;40:3527–32. doi:10.1016/j.watres.2006.08.004.
- [4] Jiang W, Mashayekhi H, Xing B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ Pollut* 2009;157:1619–25. doi:10.1016/j.envpol.2008.12.025.
- [5] Capeletti LB, de Oliveira LF, Gonçalves K de A, de Oliveira JFA, Saito Â, Kobarg J, et al. Tailored Silica–Antibiotic Nanoparticles: Overcoming Bacterial Resistance with Low Cytotoxicity. *Langmuir* 2014;30:7456–64. doi:10.1021/la4046435.
- [6] Cendrowski K, Peruzynska M, Markowska-Szczupak A, Chen X, Wajda A, Lapczuk J, et al. Antibacterial performance of nanocrystallined titania confined in mesoporous silica nanotubes. *Biomed Microdevices* 2014;16:449–58. doi:10.1007/s10544-014-9847-3.
- [7] Lytle DA, Rice EW, Johnson CH, Fox KR. Electrophoretic mobilities of *Escherichia coli* O157: H7 and wild-type *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3222–5.
- [8] Li J, McLandsborough LA. The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. *Int J Food Microbiol* 1999;53:185–93.
- [9] Jacobson KH, Gunsolus IL, Kuech TR, Troiano JM, Melby ES, Lohse SE, et al. Lipopolysaccharide Density and Structure Govern the Extent and Distance of Nanoparticle Interaction with Actual and Model Bacterial Outer Membranes. *Environ Sci Technol* 2015;49:10642–50. doi:10.1021/acs.est.5b01841.
- [10] Feris K, Otto C, Tinker J, Wingett D, Punnoose A, Thurber A, et al. Electrostatic interactions affect nanoparticle-mediated toxicity to gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Langmuir* 2010;26:4429–36. doi:10.1021/la903491z.
- [11] Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* 2011. doi:10.1038/nrmicro2677.
- [12] Höltje J-V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:181–203.

- [13] Vermolen FJ, Gefen A. A phenomenological model for chemico-mechanically induced cell shape changes during migration and cell–cell contacts. *Biomech Model Mechanobiol* 2013;12:301–23. doi:10.1007/s10237-012-0400-0.
- [14] Amir A, Babaeipour F, McIntosh DB, Nelson DR, Jun S. Bending forces plastically deform growing bacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:5778–83. doi:10.1073/pnas.1317497111.
- [15] Roiter Y, Ornatska M, Rammohan AR, Balakrishnan J, Heine DR, Minko S. Interaction of Lipid Membrane with Nanostructured Surfaces. *Langmuir* 2009;25:6287–99. doi:10.1021/la900119a.
- [16] Livadaru L, Kovalenko A. Fundamental Mechanism of Translocation across Liquidlike Membranes: Toward Control over Nanoparticle Behavior. *Nano Lett* 2006;6:78–83. doi:10.1021/nl052073s.
- [17] Yang L, Wang K, Tan W, He X, Jin R, Li J, et al. Atomic Force Microscopy Study of Different Effects of Natural and Semisynthetic  $\beta$ -Lactam on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Anal Chem* 2006;78:7341–5. doi:10.1021/ac0604890.
- [18] Leclère P, Rasmont A, Brédas JL, Jérôme R, Aimé JP, Lazzaroni R. Phase-separated microstructures in “all-acrylic” thermoplastic elastomers. *Macromol Symp* 2001;167:117–37. doi:10.1002/1521-3900(200103)167:1<117::AID-MASY117>3.0.CO;2-1.
- [19] Abraham T, Schooling SR, Beveridge TJ, Katsaras J. Monolayer Film Behavior of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* at the Air–Water Interface. *Biomacromolecules* 2008;9:2799–804. doi:10.1021/bm800562r.
- [20] Gammoudi I, Mathelie-guinlet M, Morote F, Beven L, Moynet D, Grauby-heywang C, et al. Morphological and nanostructural surface changes in *Escherichia coli* over time, monitored by atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016;141:355–64. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.006.
- [21] Li A, Lee PY, Ho B, Ding JL, Lim CT. Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2007;1768:411–8. doi:10.1016/j.bbamem.2006.12.010.
- [22] Meincken M, Holroyd DL, Rautenbach M. Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4085–92. doi:10.1128/AAC.49.10.4085-4092.2005.
- [23] Cho EC, Xie J, Wurm PA, Xia Y. Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. *Nano Lett* 2009;9:1080–4. doi:10.1021/nl803487r.
- [24] Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353:26–32. doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.135.

- [25] Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci* 2009;145:83–96. doi:10.1016/j.cis.2008.09.002.
- [26] Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug Chem* 2004;15:897–900. doi:10.1021/bc049951i.
- [27] Hayden SC, Zhao G, Saha K, Phillips RL, Li X, Miranda OR, et al. Aggregation and Interaction of Cationic Nanoparticles on Bacterial Surfaces. *J Am Chem Soc* 2012;134:6920–3. doi:10.1021/ja301167y.
- [28] Ginzburg VV, Balijepalli S. Modeling the Thermodynamics of the Interaction of Nanoparticles with Cell Membranes. *Nano Lett* 2007;7:3716–22. doi:10.1021/nl072053l.
- [29] Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, Han G, Rotello VM, McNerny DQ, et al. Wide Varieties of Cationic Nanoparticles Induce Defects in Supported Lipid Bilayers. *Nano Lett* 2008;8:420–4. doi:10.1021/nl0722929.
- [30] Chen J, Hessler JA, Putchakayala K, Panama BK, Khan DP, Hong S, et al. Cationic Nanoparticles Induce Nanoscale Disruption in Living Cell Plasma Membranes. *J Phys Chem B* 2009;113:11179–85. doi:10.1021/jp9033936.
- [31] Mecke A, Majoros IJ, Patri AK, Baker, JR, Banaszak Holl MM, Orr BG. Lipid Bilayer Disruption by Polycationic Polymers: The Roles of Size and Chemical Functional Group. *Langmuir* 2005;21:10348–54. doi:10.1021/la050629l.
- [32] Ivask A, ElBadawy A, Kaweeteerawat C, Boren D, Fischer H, Ji Z, et al. Toxicity Mechanisms in *Escherichia coli* Vary for Silver Nanoparticles and Differ from Ionic Silver. *ACS Nano* 2014;8:374–86. doi:10.1021/nn4044047.

## Annexes – Chapitre 4

### A. Influence des conditions expérimentales sur la viabilité des bactéries *E. coli*

Lors de l'étude de la viabilité d'*E. coli* en présence de NPs, l'influence de l'agitation et du temps d'incubation a été étudiée. Ces deux paramètres, outre le rôle joué dans l'interaction des deux systèmes, peuvent également affecter le comportement de la bactérie seule.

#### Sous conditions statiques

Lorsque les bactéries sont laissées 24 h dans l'eau ultrapure, en conditions statiques, et en absence de NPs, le nombre de CFU diminue de 15 % par rapport au contrôle à 2 h, (Figure 121). Ceci se comprend facilement dans la mesure où l'eau n'est pas le milieu le plus favorable pour la survie des bactéries *E. coli*. Toutefois, ces changements sont faibles, la majorité de la population bactérienne étant toujours viable.

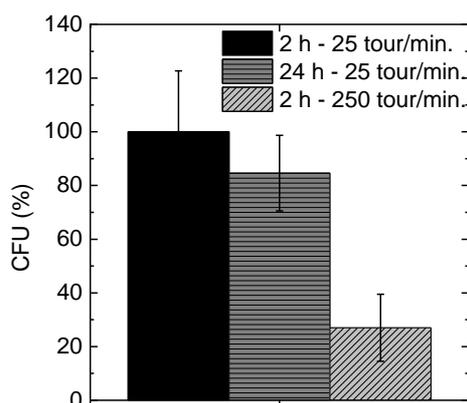


Figure 121. Influence du temps d'incubation et de l'agitation magnétique sur la viabilité des bactéries *E. coli* en l'absence de NPs. La normalisation est réalisée par rapport au contrôle d'*E. coli* au bout de 2 h.

#### En conditions dynamiques

Au bout de 2 h, une agitation magnétique de 250 tours/min. induit une diminution drastique du nombre de CFU au sein même du contrôle, suggérant son effet lytique sur les bactéries *E. coli* seules (Figure 121). Cet effet est également confirmé par l'absence de cellules viables observées en microscopie optique. Or ce protocole d'agitation avant étalement est communément admis et utilisé. Il s'avère que les dommages bactériens qu'il induit, notamment sur la viabilité, faussent les résultats, et n'ont cependant jamais été reportés à ce jour, excepté dans le cas d'une étude sur *Xanthomonas campestris*<sup>24</sup>. Garcia-Ochoa *et al.* ont alors montré que l'augmentation de l'agitation

<sup>24</sup> Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Alcon, A.; Santos, V. E. The Effect of Hydrodynamic Stress on the Growth of *Xanthomonas Campestris* Cultures in a Stirred and Sparged Tank Bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2013**, *36*, 911–925.

conduisait à un stress hydrodynamique et à un cisaillement plus important au sein de la culture, menant à terme à des dommages irréversibles (altération de la morphologie bactérienne, déformations et lyse). Notre étude est en accord avec ces conclusions et confirment ces résultats sur deux autres types de bactéries.

## B. L'effet des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> sur le volume d'*E. coli*, difficilement interprétable

Lors de l'étude de l'impact des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> sur la morphologie d'*E. coli*, le rapport d'aspect de la bactérie a fait l'objet d'une attention particulière. Or, les variations de celui-ci peuvent être ou non accompagnées d'une modification du volume de la bactérie, suggérant potentiellement des effets différents. Une diminution de volume, corrélée à une diminution du rapport d'aspect, évoquerait la perte de composants intracellulaires, si ce n'est la lyse de la bactérie tandis qu'une conservation voire une augmentation (par osmose) du volume tendrait à montrer des phénomènes de compression et de tension de surface. Le volume est estimé en assimilant grossièrement la bactérie à un parallélépipède. Les variations de volume sont définies par :

$$\Delta V = 100 \times \left| \frac{V_{E.coli+NPs} - V_{E.coli}}{V_{E.coli}} \right|$$

Ces volumes sont reportés en Tableau 14 et Figure 122. Par souci de clarté, les déviations standard, présentées dans le tableau, ne sont pas reportées sur le graphe.

Tableau 14. Caractéristiques des bactéries *E. coli* isolées et agrégées en présence ou non de SiO<sub>2</sub>-NPs.

	V (μm <sup>3</sup> )	
	Isolées	Agrégées
<i>E. coli</i>	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1
<b>4nm</b>	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
<b>10nm</b>	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1
<b>30nm</b>	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
<b>50nm</b>	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
<b>80nm</b>	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
<b>100nm</b>	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1

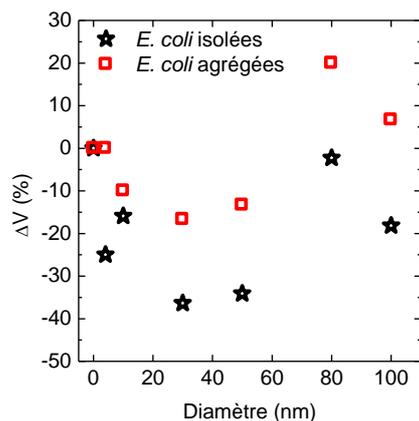


Figure 122. Influence du diamètre des SiO<sub>2</sub>-NPs sur les variations de volume des bactéries *E. coli* isolées et agrégées.

Alors que l'évolution du rapport d'aspect montrait deux impacts différents des SiO<sub>2</sub>-NPs selon leur diamètre (aspect conservé si  $\Phi > 80$  nm et sphérification si  $\Phi < 80$  nm), il est plus difficile de conclure et d'interpréter les variations de volume induites par ces mêmes SiO<sub>2</sub>-NPs. En effet, les biais, induits par la mesure de hauteur des bactéries, sur des profils AFM de hauteur<sup>25</sup>, font qu'il est difficile d'estimer un pourcentage acceptable au-delà duquel le volume change significativement. Toutefois, on peut considérer que les variations de hauteur de la bactérie n'excède pas 20 % ; cette limite sera donc établie comme significative pour les potentielles modifications observées suite à l'exposition aux NPs.

Dans le cas de la population des bactéries isolées, les SiO<sub>2</sub>-NPs 4, 30 et 50 modifient le volume de la bactérie, avec une variation supérieure à 20 %. Le changement d'aspect est donc associé à une perte de volume significative pour les dites NPs. Ce n'est pas le cas pour les SiO<sub>2</sub>-NPs 10 qui n'engendrent pas de variation de volume importante pour *E. coli*. Quant aux SiO<sub>2</sub>-NPs 80 et 100, elles n'affectent ni le rapport d'aspect ni le volume des bactéries exposées. En conséquence, excepté le cas des NPs de 10 nm, ces résultats semblent apporter un élément supplémentaire pour affirmer l'existence d'un diamètre en deçà duquel (< 80 nm) les SiO<sub>2</sub>-NPs affecteraient les bactéries *E. coli*.

Dans le cas de la population des bactéries agrégées, quel que soit le diamètre des SiO<sub>2</sub>-NPs, elles ne semblent pas modifier significativement le volume d'*E. coli*. Les cellules étant, déjà elles-mêmes, contraintes en terme d'aspect et de volume par ce phénomène d'agrégation, il n'est pas surprenant qu'on ne puisse conclure définitivement sur les effets des NPs, dans ces conditions.

<sup>25</sup> La bactérie n'a pas une hauteur constante sur toute sa superficie, l'endroit où est effectuée la mesure peut donc influencer sur la hauteur obtenue.

## C. Un effet lytique des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> avec $\varphi < \varphi_c$ non dose-dépendant

L'ensemble des observations réalisées sur les bactéries *E. coli* (morphologie, structure membranaire, invaginations ...) l'a été pour une concentration fixe (= 0.1 g/L) quel que soit le diamètre des NPs. Or, à concentration donnée, le taux d'occupation surfacique, lié au nombre de NPs disponibles par cellule, augmente lorsque le diamètre diminue. Aussi, comme pour les tests de viabilité, avons-nous souhaité comprendre si les effets délétères induits par les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> de diamètre inférieur à 80 nm étaient liés à cette augmentation.

En plus des expériences menées à C = 0.1 g/L, les bactéries *E. coli* ont été ici exposées aux SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 50 et 100, concentrées à 1 g/L. Les observations AFM correspondant à ces résultats sont reportées en Figure 123. Quelle que soit la concentration, (i) les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 50 induisent un changement d'aspect de *E. coli*, une réorganisation de sa structure membranaire (*ripples* vers agrégats) et des déformations morphologiques de type invagination tandis que (ii) les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 n'induisent aucune altération de la bactérie.

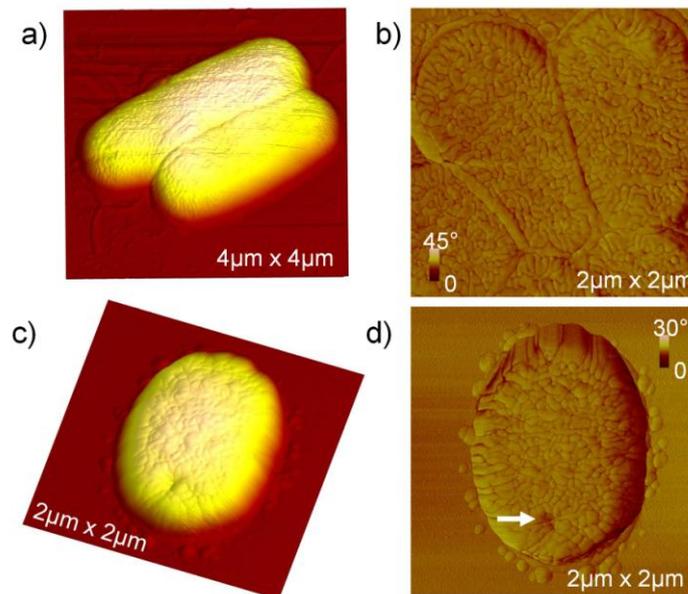


Figure 123. Observations AFM montrant l'effet des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> de (a-b) 100 nm et (c-d) 50 nm, concentrées à 1 g/L, sur les bactéries *E. coli*. Les effets morphologiques et membranaires observés à plus faible concentration (0.1 g/L) sont conservés : les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 laissent la morphologie (a) et la structure *ripples* (b) intactes tandis que les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 50 induisent un changement d'aspect (c) et une réorganisation de la structure *ripples* accompagnée d'invaginations (flèche) des bactéries *E. coli*.

La Figure 124 montre un bilan schématique bilan de l'action des NPs sur la bactérie *E. coli* au regard de leur diamètre et disponibilité surfacique. Deux comportements peuvent être distingués :

- A diamètre fixe ( $\varphi = 50$  ou 100 nm), l'augmentation de concentration (*i.e.* du nombre de NPs disponibles par cellule ou du taux d'occupation surfacique) n'a

engendré aucune modification quant aux effets propres à ces tailles (morphologie, membrane), déjà observés à une concentration plus faible de 0.1 g/L (Figure 124b);

- A nombre de NPs disponibles par cellule fixe, ou taux d'occupation surfacique fixe, une diminution du diamètre engendre une « sphérisation » d'*E. coli* et des dégradations membranaires de type invaginations, précédemment décrites (Figure 124b).

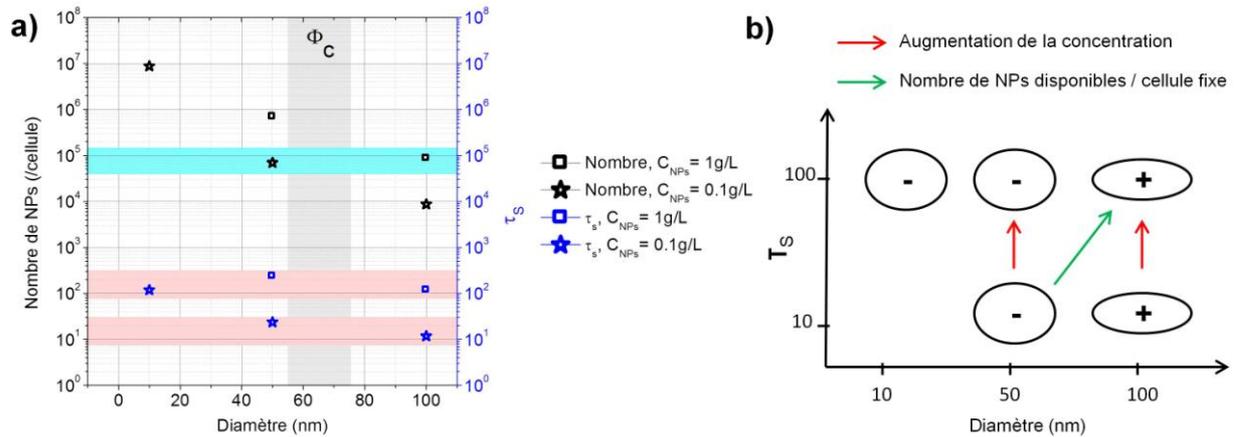


Figure 124. a) Taux d'occupation surfacique (bleu) et nombre de NPs disponibles par cellule (noir) en fonction du diamètre de certaines SiO<sub>2</sub>-NPs, concentrées à 0.1 g/L (étoiles) et 1 g/L (carrés). Les zones roses représentent un taux d'occupation surfacique constant pour les NPs étudiées et la zone bleue, un nombre de NPs / cellule constant. b) Graphe représentatif de la morphologie d'*E. coli* et des dommages membranaires (+ : bactérie saine, - : bactérie dégradée) en présence de NPs, de tailles diverses et introduites en différentes concentrations.  $\tau_s$  est le taux d'occupation surfacique défini en section 4.1.1.3.

Ces constatations mériteraient une étude plus approfondie, en élargissant les gammes de concentrations et de tailles des NPs, ce qui n'a pas été l'objet de cette thèse. Toutefois, dans nos conditions expérimentales, à diamètre fixe, nous pouvons conclure que les deux concentrations testées (0.1 et 1 g/L) n'affectent pas l'aspect morphologique d'*E. coli* ni son organisation membranaire. De plus, le changement d'aspect et les dommages membranaires, causés par des NPs de diamètre inférieur à 80 nm, ne sont dus ni au nombre de NPs ni à la surface qu'elles occupent sur la bactérie. Ces modifications s'opèrent donc plutôt par un mécanisme (pénétration / perturbation) qui dépend essentiellement du diamètre de la NP.

## D. Comparaison du comportement des s-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 et c-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 vis-à-vis d'*E. coli*

Pour les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100, nous avons à notre disposition des NPs commerciales (c-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup>) et synthétisées à l'ICMCB (s-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup>). Aussi avons-nous comparé le rôle de cette synthèse sur la viabilité des bactéries *E. coli* exposées aux NPs<sup>-</sup> de 100 nm. Celle-ci semble relativement peu affecter les tests de viabilité. Après 2 h de traitement, une hausse des CFU est observée pour les s-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 par rapport au traitement en présence des c-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100, à pondérer par l'écart type important obtenu lors de cette série d'expériences (Figure 125). Il n'y a donc pas de différence significative de comportement d'*E. coli* en présence de c-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100 et s-SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 100.

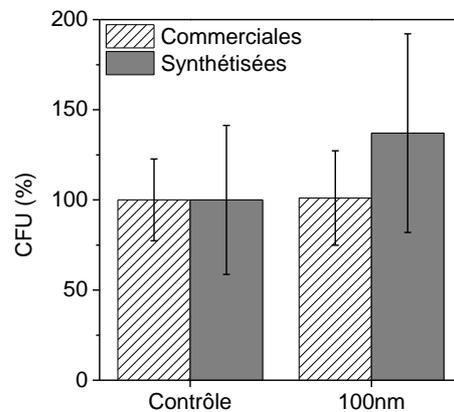


Figure 125. Comparaison du traitement des bactéries *E. coli* par des SiO<sub>2</sub>-NPs 100 commerciales et synthétisées au bout de 2 h d'incubation.

# Chapitre 5 Elaboration d'un biocapteur pour la détection de bactéries

## Sommaire

---

5.1	Fonctionnalisation du transducteur.....	184
5.1.1	Etude du transducteur seul.....	184
5.1.1.1	Caractérisations microscopiques.....	184
5.1.1.2	Caractérisation par voltamétrie cyclique.....	185
5.1.2	Dépôt d'un film de polyélectrolytes.....	188
5.1.2.1	Optimisation du protocole par AFM.....	189
5.1.2.2	Etude par QCM-D.....	191
5.1.2.3	Etude électrochimique.....	196
5.2	Immobilisation du biorécepteur.....	199
5.2.1	Dépôt d'un film de NPs positives sur une PEM 6.....	199
5.2.1.1	Optimisation du protocole par microscopie.....	200
5.2.1.2	Etude électrochimique.....	202
5.2.2	Dépôt du biorécepteur : NPs-Ac.....	203
5.3	Détection des bactéries.....	205
5.3.1	Contrôle en absence d'anticorps.....	206
5.3.2	Détection en présence de NPs.....	206
5.3.3	Les NPs sont-elles indispensables à la détection ?.....	208
5.3.4	Sensibilité et limite de détection du biocapteur.....	209
5.3.5	Spécificité du biocapteur.....	211
5.3.6	Un biocapteur en devenir.....	212
	Bilan.....	215
	Bibliographie.....	216
	Annexes – Chapitre 5.....	220

---

L'étude fondamentale menée précédemment a permis de déterminer un diamètre critique des NPs au-delà duquel l'interaction NPs-bactéries n'est pas nocive :  $50 \text{ nm} < \phi_c < 80 \text{ nm}$ . Aussi, les NPs, jugées non toxiques ( $\phi = 100 \text{ nm}$ ), serviront ici à la détection de bactéries, au sein d'un biocapteur électrochimique. L'élaboration de ce biocapteur est décrite ci-après. Les étapes de fonctionnalisation du transducteur font l'objet d'une attention particulière car elles garantissent l'obtention d'un signal optimal pour la future détection. Le biocapteur est constitué d'un potentiostat et de trois électrodes associées : une électrode de travail en or, une électrode de référence en argent et une contre électrode en carbone (cf. chapitre 2).

## 5.1 Fonctionnalisation du transducteur

### 5.1.1 Etude du transducteur seul

Avant (et après) chaque étape de fonctionnalisation du transducteur, *i.e.* de l'électrode d'or nue, sa caractérisation microscopique et électrochimique est réalisée afin de s'assurer de son bon fonctionnement. Les électrodes étant commerciales, leur comportement peut varier dans une certaine mesure (cf. Annexes – Chapitre 5 A), probablement parce que leur diamètre ou l'épaisseur de la couche d'or ne sont pas constants. Aussi connaître leur réponse individuelle permet une comparaison pertinente des diverses expériences menées pour des besoins de reproductibilité et de répétabilité. Ce comportement initial sera le signal contrôle pour l'estimation des variations après fonctionnalisation de l'électrode.

#### 5.1.1.1 Caractérisations microscopiques

Les électrodes d'or sérigraphiées de chez Metrohm présentent une surface très rugueuse, observée à la fois par microscopie optique et par AFM (Figure 126). Les images montrent, en effet, des agrégats de taille importante sur l'ensemble de la surface de travail, leur conférant une rugosité moyenne de  $340 \pm 100 \text{ nm}$ . Cette rugosité importante est un frein à la caractérisation des couches ultérieurement déposées pour la fonctionnalisation du transducteur, en particulier par AFM.

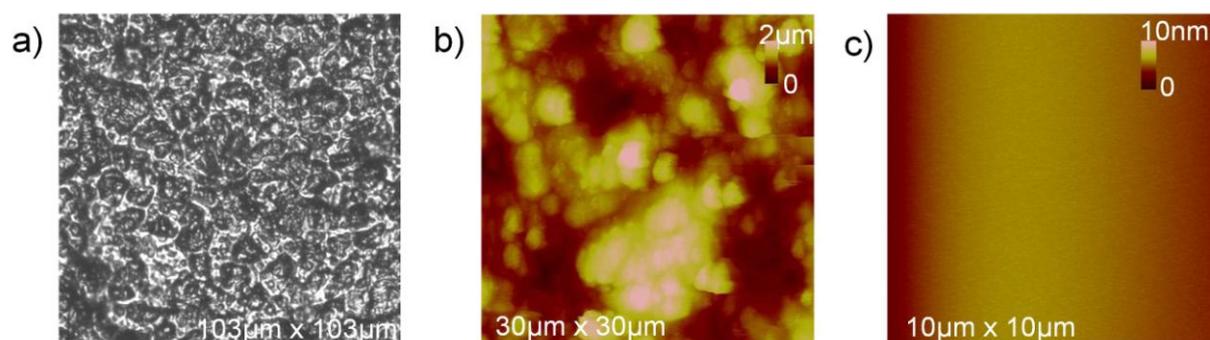


Figure 126. Caractérisation microscopique d'une électrode d'or nue de chez Metrohm. Images typiques obtenues en (a) microscopie optique et (b) AFM (image de hauteur). Pour comparaison, une image AFM de hauteur de la surface de mica est présentée en (c).

Aussi les étapes de fonctionnalisation décrites ci-après seront optimisées sur une surface moins rugueuse (rugosité  $< 1$  nm), le mica, permettant une caractérisation plus aisée (Figure 126c).

### 5.1.1.2 Caractérisation par voltamétrie cyclique

La caractérisation électrochimique du transducteur est réalisée dans une solution tampon de PBS, contenant ou non le couple ferricyanure/ferrocyanure de potassium ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ). Le PBS 1x a été choisi comme sel de fond car les sels qu'il contient sont, en concentration, compatibles avec l'utilisation de biomolécules (les anticorps) et la détection de bactéries : 137 mM de NaCl, 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.7 mM de KCl et 1.76 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . McAdams *et al.* ont également choisi ce milieu tampon pour caractériser le comportement de nano-électrodes d'or par des mesures d'impédance et de rapport signal/bruit, dans le cadre d'applications biologiques [1].

#### Le PBS, un milieu non-électroactif

La voltamétrie cyclique de la solution du sel de fond PBS 1x est représentée en Figure 127. Les courants observés sont très faibles, de l'ordre de quelques microampères, dans la gamme de potentiel sondée. De plus, l'absence de pic d'oxydation ou de réduction est significative de l'absence d'impuretés électroactives dans le milieu d'un sel de fond. Au vu de ces observations, le PBS est considéré comme un milieu non-électroactif, dans nos conditions. Cet électrolyte support, en quantité importante, électrochimiquement inerte, servira à faciliter la circulation des ions (suppression de la migration), à réduire la chute ohmique et à maintenir le pH constant dans la solution.

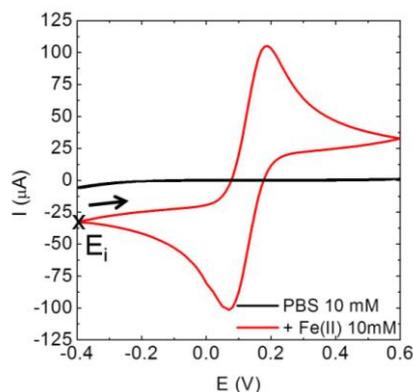


Figure 127. Voltamogramme enregistré<sup>26</sup>, à une vitesse de balayage de 50 mV/s, lors de l'immersion de l'électrode d'or nue dans une solution de PBS 1x contenant ou non du  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  à 10 mM.

<sup>26</sup> Les voltamogrammes présentés par la suite seront toujours enregistrés de la même manière : le potentiel de départ,  $E_i$ , est -0.4 V et le potentiel final,  $E_f$ , est 0.6 V. Le balayage en potentiel « aller » va donc de -0.4 V à 0.6 V et le balayage « retour » de 0.6 V à -0.4 V.

### Le couple ferricyanure/ ferrocyanure, un couple électroactif

Le couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  est un couple redox standard [2], couramment utilisé pour des études de fonctionnalisation d'électrodes et de conception de biocapteurs électrochimiques [3-5]. L'échange électronique est le suivant :



L'étude électrochimique de l'électrode d'or nue est menée dans une solution de PBS 1x contenant 10 mM de ferrocyanure de potassium,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Cette concentration a été optimisée afin d'obtenir des courants suffisamment importants sans saturation (cf. étude ci-après sur l'effet de la concentration en  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ). Le voltamogramme présente deux caractéristiques communes à l'ensemble des expériences (Figure 127) :

- des courants mesurés importants,
- des pics d'oxydation et de réduction correspondant à la réaction chimique (2).

A titre d'exemple, pour le voltamogramme présenté en Figure 127, le pic d'oxydation est observé à (0.19 V ; 105  $\mu\text{A}$ ) tandis que celui de réduction l'est à (0.07 V ; -102  $\mu\text{A}$ ). Aussi, nous estimons, dans nos conditions expérimentales, un potentiel normal du couple de 0.13 V par rapport à l'électrode d'argent de référence, estimé par la relation :

$$E_0 \approx E_{1/2} = \frac{E_a + E_c}{2} = 0.13 \text{ V} \quad (44)$$

La dépendance de l'intensité vis-à-vis de (i) la vitesse de balayage,  $v$ , et de (ii) la concentration en espèces électroactives introduite,  $C$ , caractérise la réversibilité et la vitesse d'une réaction électrochimique (cf. chapitre 2). Aussi, afin de connaître le comportement électrochimique du couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ , une étude a-t-elle été menée en faisant varier ces deux paramètres (Figure 128).

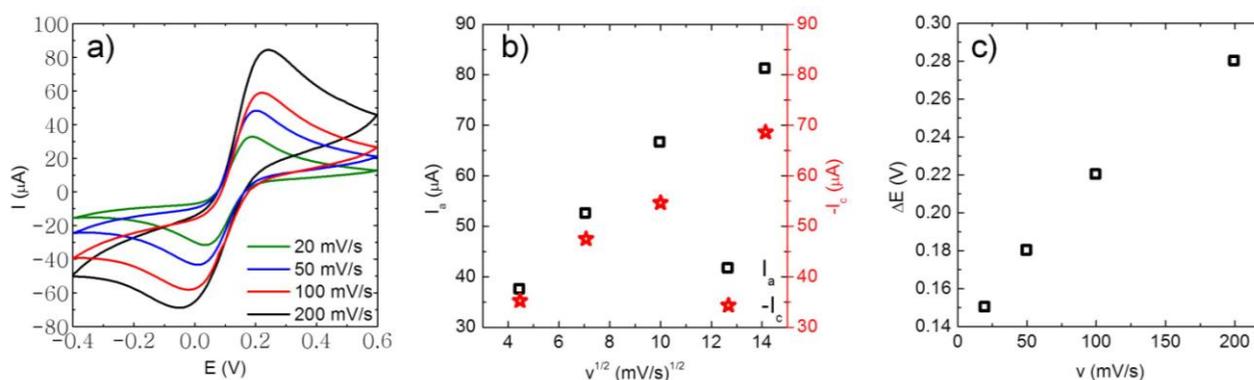


Figure 128. Voltamétrie cyclique du ferrocyanure de potassium (6 mM), à différentes vitesses de balayage, sur une électrode d'or nue plongée dans une solution de PBS 1x : a) voltamogrammes et b-c) variations des courants d'oxydo-réduction et de la différence de potentiel,  $\Delta E = E_a - E_c$ , en fonction de la vitesse<sup>27</sup>.

<sup>27</sup> L'oxydation se déroulant à l'anode et la réduction à la cathode, il est usuel d'utiliser les indices a et c pour les deux processus respectivement.

Expérimentalement, nous observons une augmentation du courant avec une augmentation de la vitesse de balayage (Figure 128a). Cette dépendance est linéaire en  $v^{1/2}$  pour les courants d'oxydation et de réduction (Figure 128b).

Il est également à noter que :

- les courants d'oxydation et de réduction ne sont pas équivalents ( $I_c/I_a \neq 1$ ) (Figure 128b) ;
- la différence de potentiel entre ces deux pics d'oxydation et de réduction dépend de la vitesse de balayage et diffère de la valeur attendue de 59 mV pour un échange mono-électronique (Figure 128c).

Par ailleurs, une augmentation du courant est observée lorsque la concentration en espèces électroactives (en l'occurrence  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ) est plus importante (Figure 129a). Cette dépendance est également linéaire (Figure 129b). De la même manière que pour les expériences à différentes vitesses de balayage, on note que (i)  $I_c/I_a \neq 1$  et (ii)  $\Delta E \neq 59$  mV.

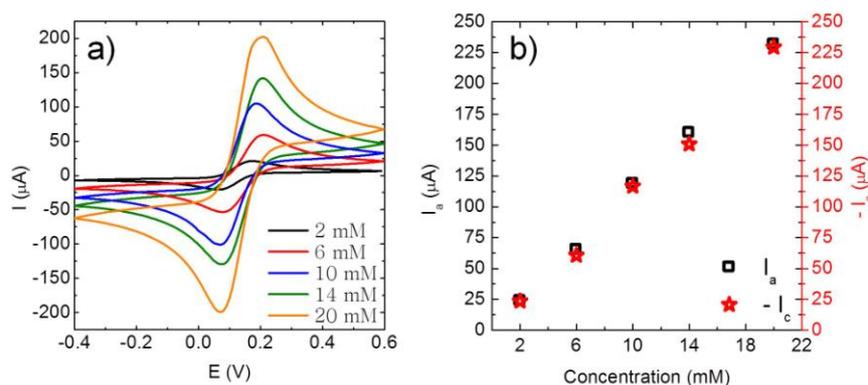


Figure 129. Voltamétrie cyclique du ferrocyanure de potassium à différentes concentrations sur une électrode d'or nue plongée dans une solution de PBS 1x : a) voltammogrammes réalisés à  $v = 50$  mV/s et b) variations linéaires des intensités des pics d'oxydo-réduction en fonction de la concentration.

Bien que la dépendance linéaire du courant avec  $v^{1/2}$  et  $C$  puisse tendre à montrer que le couple ferrocyanure / ferricyanure est un couple rapide, les écarts notés entre  $I_a$  et  $I_c$  ainsi que les variations de  $\Delta E$  avec  $v$  prouvent qu'il s'agit, dans nos conditions expérimentales, d'un couple quasi-rapide (cf. chapitre 2). Or, ce couple redox est un couple stable chimiquement, *i.e.*  $I_c/I_a \neq 1$ , et, généralement, présenté comme électrochimiquement réversible, *i.e.*  $\Delta E \approx 59$  mV. Cette apparente contradiction n'est pas si surprenante dans la mesure où les caractéristiques électrochimiques d'un couple oxydant / réducteur, notamment la vitesse de réaction, dépendent de la nature et de la concentration de l'électrolyte [6–8], de la concentration des espèces électroactives [9] et de la géométrie de la cellule de mesure. L'utilisation du PBS comme sel de fond, en concentration plus importante (10x) a conduit aux mêmes observations que précédemment. En revanche, l'utilisation d'un sel de fond différent, le NaCl, a confirmé

la réversibilité chimique et électrochimique du couple ferricyanure/ ferrocyanure (cf. Annexes – Chapitre 5 A).

### Paramètres choisis pour l'étude du capteur par voltamétrie cyclique

Au vu des résultats obtenus sur l'électrode d'or nue, et compte tenu de l'objectif fixé de détection de bactéries, nous avons choisi, pour les expériences à venir, les paramètres suivants, qui seront donc implicites si non mentionnés par la suite :

- Gamme de potentiel : [-0,4 V ; 0,6 V],
- Concentration en PBS 1x,
- Concentration en  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  : 10 mM,
- Vitesse de balayage : 100 mV/s.

### 5.1.2 Dépôt d'un film de polyelectrolytes

L'électrode de travail en or étant caractérisée, les étapes de sa fonctionnalisation, garantissant la détection finale des bactéries *E. coli* (Figure 130), sont décrites ci-après.

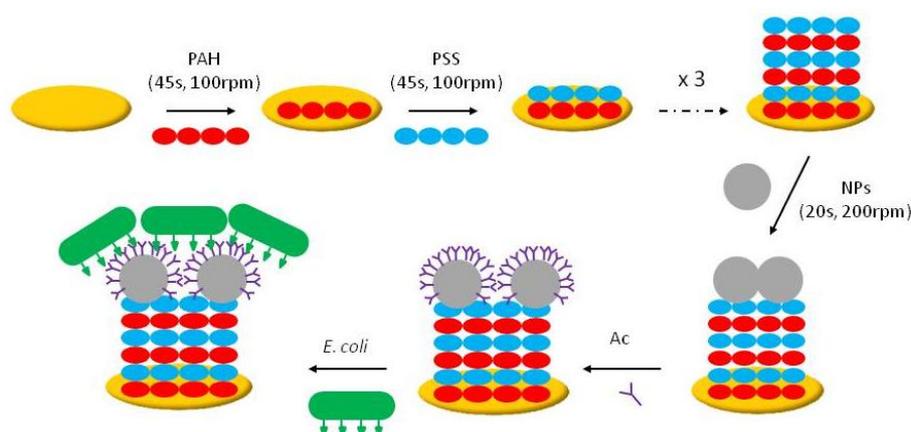


Figure 130. Schéma illustrant les étapes de la fonctionnalisation du transducteur, constitué par l'électrode de travail en or, pour la détection des bactéries *E. coli* en suspension.

La première étape de fonctionnalisation de l'électrode de travail consiste à déposer une PEM  $n$  (où  $n$  est le nombre de couches constituant la PEM) qui servira à l'immobilisation des NPs, biomolécules et bactéries au sein du biocapteur. Cette PEM a déjà été utilisée dans le protocole dédié à l'étude de l'interaction entre les NPs et *B. subtilis*. Toutefois, nous n'avons jusqu'alors pas présenté l'optimisation du protocole de formation de cette multicouche, optimisation qui a été entreprise dans le cadre de la conception du biocapteur. Cette PEM, intégrée au sein d'un biocapteur acoustique à ondes de Love pour la détection de métaux lourds, par l'intermédiaire de bactéries *E. coli* [10], a déjà montré son intérêt dans l'augmentation de la sensibilité de détection d'un tel biocapteur. Par ailleurs, les PEM ont également été étudiées, de façon fondamentale, par capteur gravimétrique (microbalance à quartz) ou électrochimique, études qui seront ci-après confrontées à nos résultats.

### 5.1.2.1 Optimisation du protocole par AFM

Comme précédemment mentionné, l'électrode d'or commerciale est trop rugueuse pour permettre de déceler la présence d'un film mince de polyélectrolytes, qui plus est en estimer l'épaisseur et la rugosité. Aussi, le protocole d'optimisation a été réalisé sur du mica, dont la rugosité, estimée à  $0.5 \pm 0.3$  nm, permet une caractérisation du dépôt par AFM.

Les dépôts *Layer by Layer* (LbL) de polyélectrolytes chargés alternativement positivement et négativement ont été développés par Decher *et al.* [11]. Ils tirent parti des forces électrostatiques qui existent entre les molécules de charges opposées [12]. Ces dépôts ont fait l'objet de nombreuses études, notamment pour l'élaboration de films minces recouvrant des capteurs électrochimiques [13]. Des travaux précédemment menés dans notre équipe, ont montré l'intérêt d'une PEM déposée par LbL dans la détection de bactéries [10]. Dans ce cadre, un film d'épaisseur certes contrôlée mais relativement élevée avait été obtenu. Nous avons donc souhaité, ici, améliorer un tel protocole en faisant appel à la méthode du *spin coating* (SC) potentiellement moins coûteuse en temps.

Cette étude n'a pas pour objectif d'être exhaustive mais de construire un film mince homogène pour le dépôt futur de NPs, biomolécules et/ou bactéries. Ainsi, de façon arbitraire, trois vitesses (100, 500 et 2000 tours/min.) et trois temps (45, 120 et 300 s) de SC ont été choisis suffisamment différents pour montrer un effet potentiel sur les caractéristiques du film déposé. Chaque échantillon est imagé par AFM sur diverses zones afin de s'assurer de l'homogénéité du dépôt. Trois échantillons indépendants sont également réalisés afin de garantir la reproductibilité et la répétabilité des dépôts.

#### Influence de la vitesse et du temps de SC sur la rugosité d'une PEM

L'influence des deux paramètres a été testée, dans un premier temps, sur une tricouche PAH-PSS-PAH, *i.e.* PEM 3, (Figure 131a). Quelles que soient les conditions du SC, la rugosité du film est très faible, comprise entre environ 1 et 5 nm, et inférieure à celle obtenue par LbL. Ceci confirme des études antérieures ayant montré l'intérêt du SC dans l'élaboration d'un film homogène et peu rugueux [14].

Les graphes de la Figure 131 montrent que quel que soit le temps de dépôt en SC la rugosité des films obtenus est plus faible que dans le cas des dépôts faits par LbL, et qu'un temps de 45 s est largement suffisant pour obtenir un film. C'est pourquoi nous avons choisi ce temps pour étudier l'impact de la vitesse de rotation sur la rugosité de films composés d'un nombre de couches variables.

A vitesse donnée, le temps de SC semble également peu influencer sur la rugosité du dépôt entre 45 et 300 s, excepté pour 500 tours/min., vitesse pour laquelle la barre d'erreur est très importante. Privilégiant un protocole rapide, le temps de SC a donc été fixé à 45 s. Des temps encore plus courts ( $< 20$  s) sont évoqués dans la littérature qui permettent une adsorption complète des polyélectrolytes, favorisée par la convection et les forces hydrodynamiques [15]. Toutefois, dans cette étude, les vitesses

utilisées sont beaucoup plus importantes (quelques milliers de tours/min.). Nous n'avons pas fait ce choix dans nos travaux par souci de protection des systèmes fragiles (quartz et électrodes).

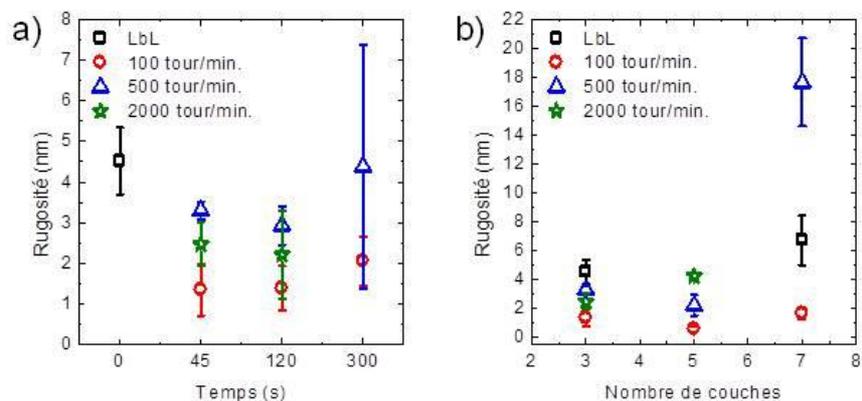


Figure 131. a) Influence du temps et de la vitesse de SC sur la rugosité d'une tricouche PAH-PAS-PAH. b) Influence de la vitesse de SC ( $t = 45$  s) et du nombre de couches déposées sur la rugosité du film obtenu.

Si nous considérons l'impact de la vitesse de SC sur la rugosité d'une tricouche, nous pouvons noter que la rugosité semble augmenter avec cette dernière, pour des vitesses de 100 et 500 tours/min. Une vitesse de 2000 tours/min. conduit, quant à elle, à une rugosité moindre que celle du dépôt effectué à 500 tours/min. Ceci peut se comprendre dans la mesure où, au-delà d'une vitesse seuil, les molécules sont « expulsées » du substrat, l'adsorption par diffusion des molécules est compromise et l'évaporation du solvant augmentée. Deux études ont ainsi montré qu'augmenter la vitesse de SC entre 3000 et 6000 tours/min. conduit à une réduction de la rugosité de la PEM formée et de la quantité d'espèces adsorbées [16,17].

Lorsque l'on augmente le nombre de couches déposées, une vitesse de 100 tours/min. conduit à la rugosité la plus faible ; elle a donc été choisie comme vitesse optimale pour nos dépôts.

### Influence de la méthode de dépôt sur l'épaisseur et la morphologie de la PEM

Sur chacun des échantillons réalisés par SC (45 s, 100 tours/min.) et par LbL, des expériences de grattage ont été menées pour estimer l'épaisseur du dépôt (cf. chapitre 2). Dans ce cadre, l'augmentation du nombre de couches engendre l'augmentation de la rugosité et de l'épaisseur du dépôt à la fois par SC et LbL, la première méthode garantissant toutefois un film plus mince et homogène (Figure 132a). Les épaisseurs déterminées sont en accord avec un taux de croissance de 1.65 nm par bicouche (PAH-PSS) évoqué par Lefaux *et al.*, en l'absence de sels et à 3000 tours/min. pendant 8 s [15].

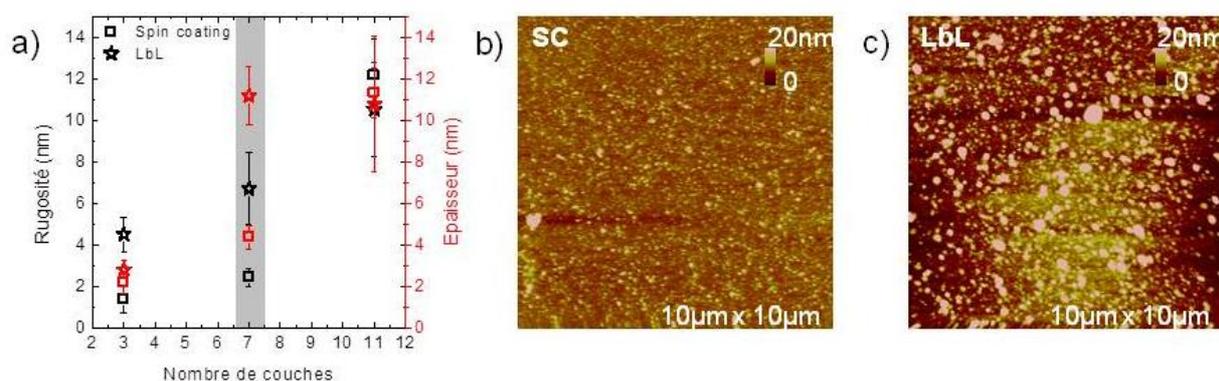


Figure 132. Influence du nombre de couches déposées par SC (45 s, 100 tours/min.) ou LbL sur l'épaisseur et la rugosité du film obtenu. b-c) Images AFM de hauteur montrant l'état de surface d'une PEM 7 par SC et LbL respectivement.

Par ailleurs, bien que l'étude ne soit pas réalisée à chaque couche, nous notons une dépendance non-linéaire de l'épaisseur avec le nombre de couches déposées. Cette tendance non-linéaire confirme les résultats de Elzbieciak *et al.* selon lesquels l'épaisseur des films dépend de la conformation des chaînes de polyélectrolytes, elle-même dépendante de leur charge [18]. Des polyélectrolytes fortement chargés adoptent des conformations linéaires et étirées conduisant à des films minces tandis que des polyélectrolytes faiblement chargés adoptent des conformations en bobine conduisant à des films plus épais lors de leur adsorption. Dans notre cas, travaillant dans l'eau ultrapure (pH = 6.5), le PSS est très fortement chargé (pKa = 1 [19]) contrairement au PAH dont le pKa (pKa = 8.5 [20]) est plus proche du pH de travail. Ceci donne lieu, selon les méthodes de dépôt à des conformations pouvant varier entre les deux précédemment décrites par Elzbieciak *et al.*

Enfin, des disparités importantes entre les deux méthodes de dépôt sont observées pour une PEM 7. La rugosité et l'épaisseur du film sont alors faibles par SC et élevées par LbL (augmentation d'un facteur trois environ). Aussi, cette PEM 7 a été considérée comme le dépôt optimal par SC, celui réalisé par LbL servant alors de référence pour préciser le rôle joué par l'épaisseur et la rugosité dans les résultats à venir en électrochimie. Des images AFM de hauteur sont reportées en Figure 132b-c pour montrer l'état de surface de cette PEM 7. La PEM est formée par la juxtaposition d'agrégats plus ou moins sphériques, distribués de façon aléatoire et homogène à la surface du film, en accord avec l'étude de An *et al.* comparant des dépôts PAH/PSS sur des substrats HfO<sub>2</sub> et silicone [21].

### 5.1.2.2 Etude par QCM-D

Une étude a été menée par microbalance à quartz (QCM-D) afin de s'assurer du dépôt des polyélectrolytes par SC et LbL et de quantifier les quantités déposées. Le quartz utilisé est recouvert d'un film mince d'or dont la rugosité est estimée par AFM à  $11 \pm 4$  nm (Figure 133).

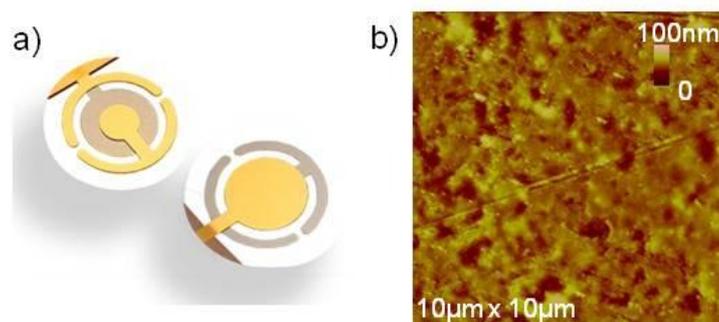


Figure 133. a) Image du quartz utilisé, recouvert par une fine couche d'or (diamètre = 1 cm). b) Image AFM de hauteur montrant l'état de surface d'un tel quartz.

## Méthode LbL

Dans le cadre de la QCM-D, la méthode LbL s'entend au sens d'un écoulement de la solution de polyélectrolytes jusqu'au quartz avec lequel elle reste en contact pendant 10 min. Le signal de mesure est alors enregistré en temps réel. Entre chaque dépôt de polyélectrolytes le quartz est rincé avec de l'eau ultrapure par le même procédé. Une courbe représentative d'une telle expérience est présentée en Figure 134.

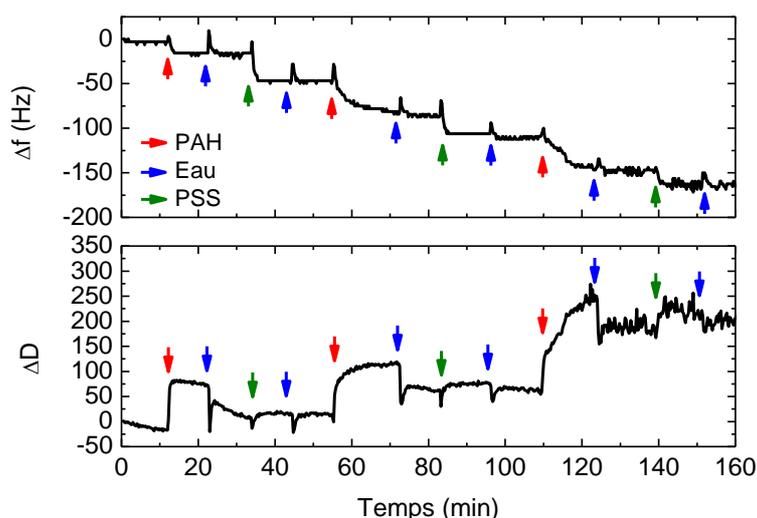


Figure 134. Expérience de QCM-D menée sur un dépôt de polyélectrolytes (PEM 3) par LbL : variations de la fréquence et de la dissipation en fonction du temps.

Avant tout dépôt, une ligne de base de la réponse du quartz est obtenue en utilisant l'eau ultrapure, avant injection du PAH (flèche rouge). L'introduction des différentes couches (PAH, PSS) conduit à une diminution de la fréquence, diminution d'autant plus marquée que le nombre de couches augmente. La variation de dissipation est, elle, grande lorsque le quartz est en contact avec la solution de PAH et plus faible lors du dépôt du PSS et du rinçage. Ceci est en accord avec l'idée que l'énergie dissipée est (i) importante lors de dépôts mous et/ou de molécules faiblement adsorbées et (ii) faible lors de dépôts plus rigides [22]. Ces variations de dissipation tendent à augmenter avec le temps, en lien avec le nombre de couches déposées. Les modifications de fréquence et de dissipation indiquent finalement un dépôt séquentiel effectif de polyélectrolytes.

Afin de mieux visualiser ces variations, celles-ci sont reportées en fonction du nombre de couches déposées, avant et après l'étape de rinçage, en Figure 135. On note qu'avant et après rinçage les variations de fréquence sont similaires, et cohérentes avec le fait qu'une fois l'échantillon rincé seules les molécules adsorbées à la surface du quartz « comptent ». Le dépôt de la première couche conduit à des variations de fréquence extrêmement faibles, qui, moyennées, conduisent à une variation quasi nulle. Ceci suggère que la masse déposée est très faible et donc difficilement quantifiable. Après cette première couche de PAH, la variation de fréquence dépend linéairement du nombre de couches déposées (Figure 135a).

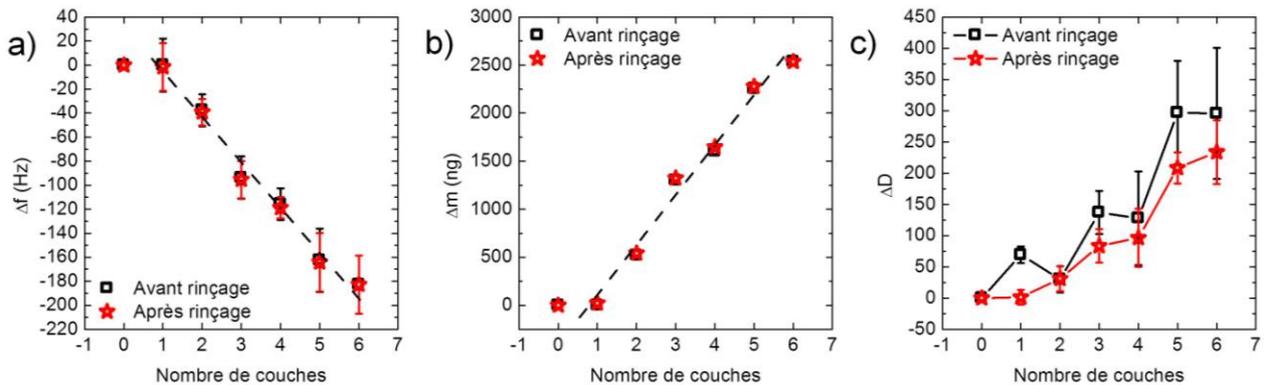


Figure 135. Expérience de QCM-D menée sur un dépôt de polyélectrolytes par LbL : variations de (a) la fréquence, (b) la masse et (c) la dissipation en fonction du nombre de couches déposées. Les couches impaires correspondent à l'introduction du PAH tandis que les couches paires correspondent au PSS. Les barres d'erreur, sur les données brutes, sont calculées en moyennant trois expériences.

Les dépôts étant minces (épaisseur de quelques nanomètres), les variations de fréquence,  $\Delta f$ , sont liées à la variation de masse déposée,  $\Delta m$ , suivant la relation de Sauerbrey :

$$\Delta f = -N \frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \frac{\Delta m}{S} \quad (45)$$

où  $N$  est le rang de l'harmonique,  $f_0$  la fréquence de résonance du quartz,  $\rho_q$  la masse volumique du quartz,  $\mu_q$  son module de cisaillement et  $S$  est l'aire de l'électrode.

Le facteur de proportionnalité entre ces deux variations est appelé sensibilité et vaut  $56.6 \text{ Hz.cm}^2.\mu\text{g}^{-1}$  pour une fréquence de résonance de 5 MHz, comme dans notre étude. Les variations de masse observées augmentent linéairement avec le nombre de couches, à l'instar des variations de fréquence (Figure 135b). La masse moyenne adsorbée après trois bicouches est de l'ordre de 2500 ng. Considérant la concentration importante (5 g/L) des solutions de polyélectrolytes, l'absence de sels et le pH de 5,5, ces masses sont cohérentes avec les données de la littérature [18,23].

Les variations de dissipation, avant rinçage, présentent un comportement « oscillant » avec le nombre de couches déposées (Figure 135c). En effet, le dépôt du PAH conduit à une variation importante de la dissipation, qui diminue suite à l'ajout successif du PSS, la dissipation restant alors plus importante que celle du quartz seul.

Ceci souligne le fait que les couches de PAH et PSS ne « s'empilent » pas simplement mais peuvent interagir, s'interpénétrer et se réorganiser, conduisant à des variations de dissipation. Ce type de comportement a également été proposé dans le cas de polyélectrolytes cationiques (poly[2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate], PDEM) et anioniques (PSS), qui s'interpénètrent [24]. Dans cette étude, Liu *et al.* montrent que :

- un dépôt plus dense lors de l'ajout de PSS (après le PDEM) conduit à une diminution de la dissipation,
- un dépôt moins épais dû à l'interpénétration PSS / PDEM conduit à une augmentation de la variation de fréquence.

### Méthode SC

L'étude QCM-D a également été réalisée sur des dépôts faits par *spin coating* (45 s, 100 tours/min.). Dans ce cadre, il est impossible de suivre en temps réel le dépôt, les deux installations (SC et QCM-D) étant indépendantes et non associables. Aussi après le dépôt de chaque couche, celle-ci est rincée puis amenée pour mesure. Les variations de la fréquence et de la dissipation en fonction du nombre de couches déposées sont présentées en Figure 136.

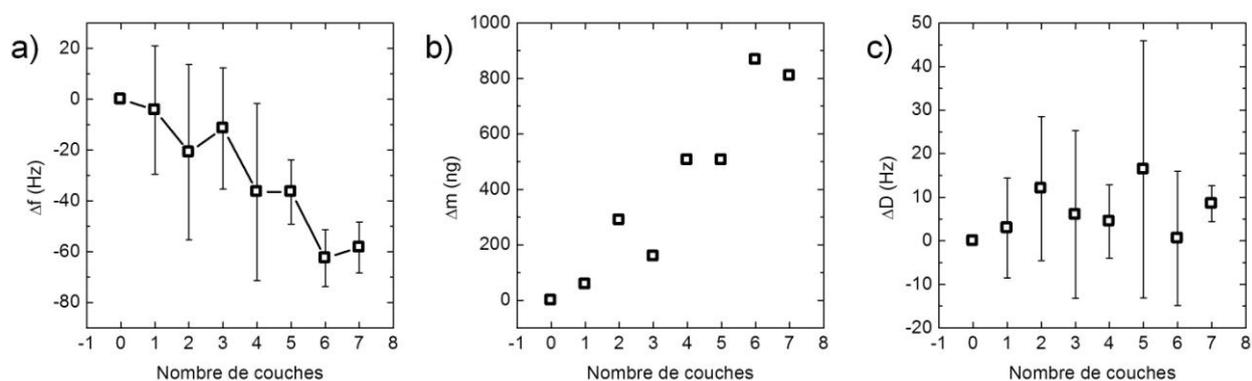


Figure 136. Expérience de QCM-D menée sur un dépôt de polyélectrolytes par SC (45 s, 100 tours/min.) : variations de la fréquence (a), de la masse (b) et de la dissipation (c) en fonction du nombre de couches déposées. Les couches impaires correspondent à l'introduction du PAH tandis que les couches paires correspondent au PSS. Les barres d'erreur, sur les données brutes, sont calculées en moyennant trois expériences.

Le comportement oscillant, précédemment mentionné, se retrouve ici dans les variations de fréquence. Celles-ci, tout comme les variations de masse qui en sont déduites, ne dépendent pas linéairement du nombre de couches. Ce comportement témoigne à nouveau de l'interpénétration possible des chaînes de polyélectrolytes, particulièrement visible par cette méthode de SC. Notamment, la perte de masse observée entre les couches 2/3 et 6/7, « contre-intuitive » lors de l'ajout de matière, montre que des réorganisations des polyélectrolytes entre eux, certains cédant potentiellement leur place aux autres, sont non-négligeables. Par ailleurs, pour la première bicouche, les variations de masse sont similaires à la méthode LbL. En revanche, le dépôt des couches suivantes par SC conduit à des variations moins importantes que celles obtenues par LbL ; il en résulte que la masse adsorbée estimée

est de 870 ng pour une PEM 6 finale ((PAH-PSS)<sub>6</sub>) (Figure 136a-b). Les variations de dissipation sont quant à elles très faibles avec cette méthode de SC, contrairement à celles observées par LbL (Figure 136c). En revanche, avec cette méthode, les barres d'erreur peuvent être particulièrement importantes. Ces variations sont probablement dues au protocole utilisé : la méthode de rinçage entre chaque couche ("jet" d'eau) et l'intervalle de temps laissé entre le dépôt et la mesure (deux installations indépendantes) peuvent contribuer à ces écarts type.

Ces comportements différents selon la méthode utilisée peuvent s'expliquer par les caractéristiques propres des dépôts obtenus par SC et LbL respectivement. En effet, le SC favorise la formation d'un dépôt plus mince que la méthode LbL, favorisant ainsi une masse adsorbée moins importante (Figure 137a). De plus, liées en partie à l'épaisseur du film, les modifications de dissipation s'entendent également au sens de l'organisation du film déposé. Plus la rugosité est importante (dépôt par LbL), plus la dissipation l'est également, suggérant une organisation moins structurée et moins dense dans le cas d'un dépôt par LbL (Figure 137b).

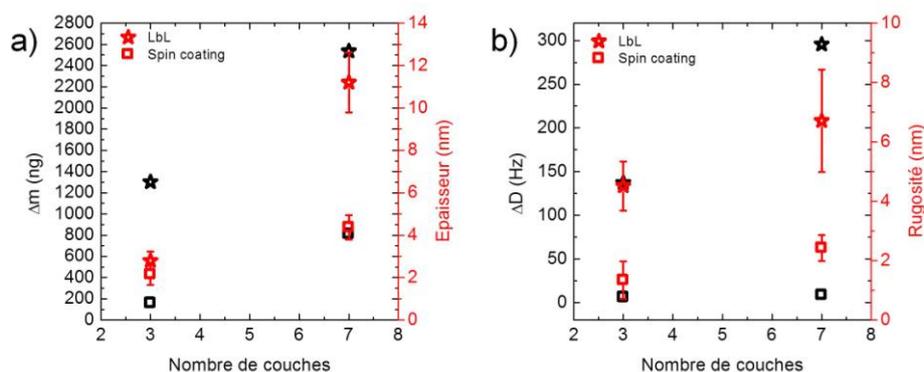


Figure 137. Corrélation entre les caractéristiques morphologiques des PEM et les variations obtenues en QCM-D : (a) variation de la masse et de l'épaisseur et (b) variation de la dissipation et de la rugosité des PEMn en fonction du nombre, n, de couches déposées. Les couches impaires correspondent à l'introduction du PAH tandis que les couches paires correspondent au PSS.

Enfin, des travaux antérieurs ont montré qu'il existe deux régimes de croissance d'un film de polyélectrolytes, un régime linéaire et un régime exponentiel, selon la méthode de dépôt utilisée (LbL ou SC). Ces travaux suggèrent que le régime exponentiel pourrait être lié (i) à une augmentation de la rugosité avec le nombre de couches déposées, plus probablement à (ii) la diffusion des polyélectrolytes au travers du film formé et (iii) à la présence d'un polyélectrolyte faiblement chargé [25]. Dans les études menées sur le système (PAH/PSS)<sub>n</sub>, seule une croissance linéaire est notée, excepté dans des conditions de solvatation particulière (présence de sels, mélange de solvants) [26,27]. Or, selon la méthode de dépôt nos travaux montrent un comportement différent, qui pourrait également s'expliquer par le faible nombre de couches déposées. Les travaux précédemment cités, s'intéressant à ce point unique de croissance d'une PEM, concernent des systèmes constitués de plusieurs dizaines de couches. Or, du fait de la proximité du substrat pour les premières couches déposées, et de la faible masse

adsorbée, des variations plus importantes selon les conditions de construction du film sont envisageables et mises en évidence ici.

### 5.1.2.3 Etude électrochimique

La PEMn garantissant l'immobilisation du système complexe de reconnaissance des bactéries (NPs-Ac), a fait l'objet d'une étude électrochimique. Les potentielles variations dans les voltamogrammes obtenus serviront de contrôle aux expériences futures de détection. En réalité chacune des étapes de fonctionnalisation du transducteur constitue le « résultat contrôle » de l'étape suivante. Les deux méthodes de dépôt ont été étudiées. Les voltamogrammes sont obtenus dans une solution de PBS 1x contenant du  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  à 10 mM, pour une vitesse de balayage de 100 mV/s.

#### Méthode LbL

Lorsque les polyélectrolytes sont déposés par LbL, les courbes d'oxydo-réduction présentent la même allure que l'électrode d'or nue. Toutefois, les intensités des pics augmentent légèrement tandis que la différence de potentiel diminue avec le nombre de couches déposées, par rapport à l'électrode d'or nue (Figure 138).

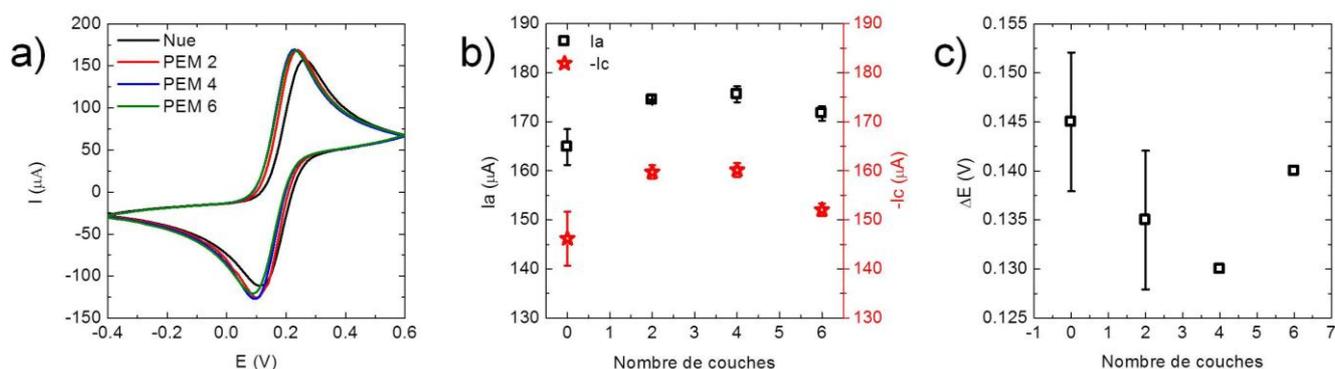


Figure 138. Expérience de voltamétrie cyclique réalisée sur des PEM déposés par la méthode LbL, représentative de l'ensemble des résultats obtenus. Sont présentés les voltamogrammes (a) ainsi que les intensités des pics d'oxydo-réduction (b) et la différence de potentiel entre ces pics (c).

Ces expériences ont été réalisées sur trois électrodes différentes et chaque mesure effectuée trois fois. Afin de comparer les électrodes entre elles, nous avons choisi de normaliser les intensités et les écarts de potentiel à ceux obtenus sur l'électrode d'or nue (qui est donc à 100%). Les résultats sont présentés en Figure 139. Une augmentation des intensités ainsi qu'une diminution de  $\Delta E$  n'excédant pas 15% sont obtenues. Le rapport  $I_c/I_a$  augmente quant à lui dans la même gamme. Toutefois, les écarts types constatés montrent qu'il existe une certaine incertitude sur les conséquences électrochimiques d'un dépôt par LbL.

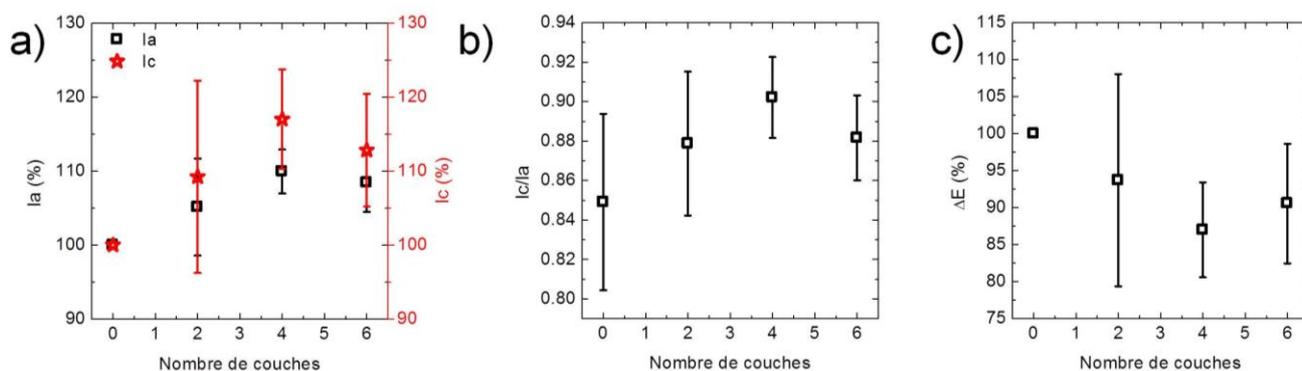


Figure 139. Répétabilité et reproductibilité des expériences de voltamétrie cyclique réalisées sur des PEM déposées par LbL. Influence du nombre de couches déposées sur (a) les intensités des pics d'oxydo-réduction, (b) le rapport de ces intensités et (c) la différence de potentiel entre ces pics. Les moyennes et les écarts types représentés sont issus de trois expériences indépendantes.

Les variations relativement faibles suggèrent que le dépôt des PEMn par LbL semble peu altérer le comportement du transducteur vis-à-vis des espèces électroactives : les ions  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  diffusent librement à l'interface électrolyte / électrode malgré la présence du film. Toutefois les légères augmentations d'intensité ainsi que la diminution de  $\Delta E$  suggèrent que certaines espèces pourraient être confinées au sein de la PEM, participant ainsi à des échanges électroniques plus nombreux et rapides (Figure 140a).

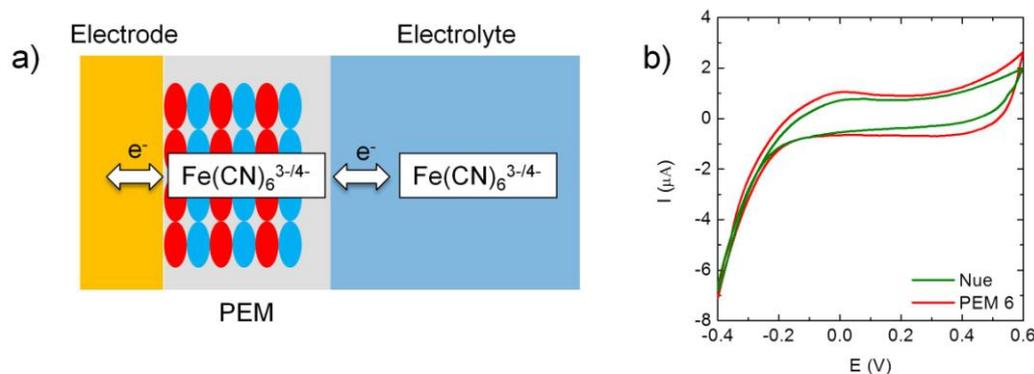


Figure 140. a) Schéma illustrant les réactions redox issues de la diffusion et du confinement des espèces électroactives au sein de la PEM déposée par LbL. b) Voltamogrammes réalisés dans du PBS 1x, en l'absence de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ , avant et après fonctionnalisation de l'électrode par une PEM 6 après un premier cyclage en présence de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ .

Ceci est en accord avec la formation d'un film non homogène, constitué d'agrégats plus ou moins importants à la surface : les zones non recouvertes garantissent le transfert de charges à la surface de l'électrode tandis que les agrégats piègent potentiellement les espèces électroactives. Cette hypothèse de confinement des espèces électroactives au sein d'un film déposé par LbL, s'ajoutant à la diffusion, a été vérifiée par les travaux de Takita *et al.* et Nogushi et Anzai [28,29]. Ils associent toutefois ce phénomène à l'émergence de nouveaux pics d'oxydo-réduction sur le voltamogramme qui persistent malgré l'absence d'espèces électroactives dans l'électrolyte.

Nous avons réalisé un test similaire. Une expérience de voltamétrie cyclique pour l'électrode fonctionnalisée par la PEM 6 est réalisée dans du PBS 1x contenant du  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  10 mM. Puis l'électrode est rincée et plongée dans une solution de PBS 1x

en absence de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . Un voltamogramme est alors enregistré. A l'exception de faibles variations de courants, aucun changement d'allure n'a été observé (Figure 140b). Dans les études de Anzaï *et al.*, le confinement est probablement dû au fort couplage existant entre les ions  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  et les charges positives des polyélectrolytes en surface. Dans nos conditions la dernière couche au contact de la solution étant le PSS, ceci est peu probable, excepté si l'on considère que le film n'étant pas parfaitement homogène, des chaînes de PAH sont encore accessibles pour les espèces électroactives. De plus, Wang et Anzaï ont montré que le confinement est d'autant plus important que le film est épais [30]. Notre PEM 6, présentant une épaisseur d'une dizaine de nanomètres, est beaucoup plus fine que celle étudiée par Wang et Anzaï (64 nm) et n'inclut pas de polysaccharides, ce qui pourrait expliquer les différences de comportement électrochimique.

### Méthode SC

Lorsque les polyélectrolytes sont déposés par SC, les courbes d'oxydo-réduction présentent également la même allure que sur l'électrode d'or nue. Contrairement aux dépôts par LbL, les intensités des pics diminuent légèrement tandis que la différence de potentiel augmente avec le nombre de couches déposées (Figure 141).

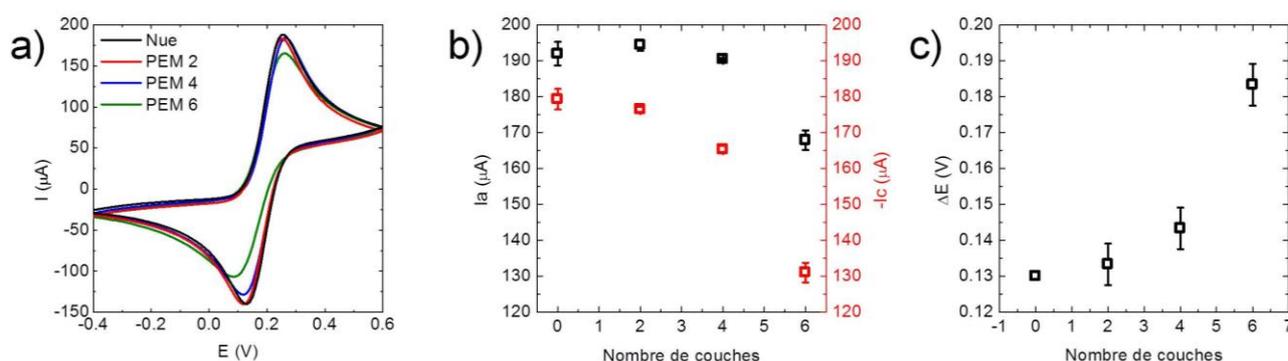


Figure 141. Expérience de voltamétrie cyclique du couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  réalisée sur des PEMn déposées par SC, représentative de l'ensemble des résultats obtenus. Sont présentés les voltamogrammes (a) ainsi que les intensités des pics d'oxydo-réduction (b) et la différence de potentiel entre ces pics (c).

Ces résultats sont reproductibles et répétables : peu de variations sont observées après deux bicouches (PAH-PSS), et les écarts types associés sont très faibles. En revanche après ajout d'une troisième bicouche, la diminution des intensités ainsi que l'augmentation de  $\Delta E$  deviennent significatives (Figure 142). Ces résultats suggèrent qu'après dépôt de PEMn par SC, le système est plus lent qu'initialement. Ceci est en accord avec la formation d'un film homogène et mince par SC (épaisseur de quelques nanomètres) qui freine, voire empêche, la cinétique de transfert de charges à la surface de l'électrode. Ce ralentissement des transferts lié à l'augmentation du coefficient de diffusion de l'espèce active, augmente avec l'épaisseur du film formé, et est en accord avec des études menées précédemment sur les réactions d'oxydo-réduction de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  au sein d'un film de polyélectrolytes [31,32].

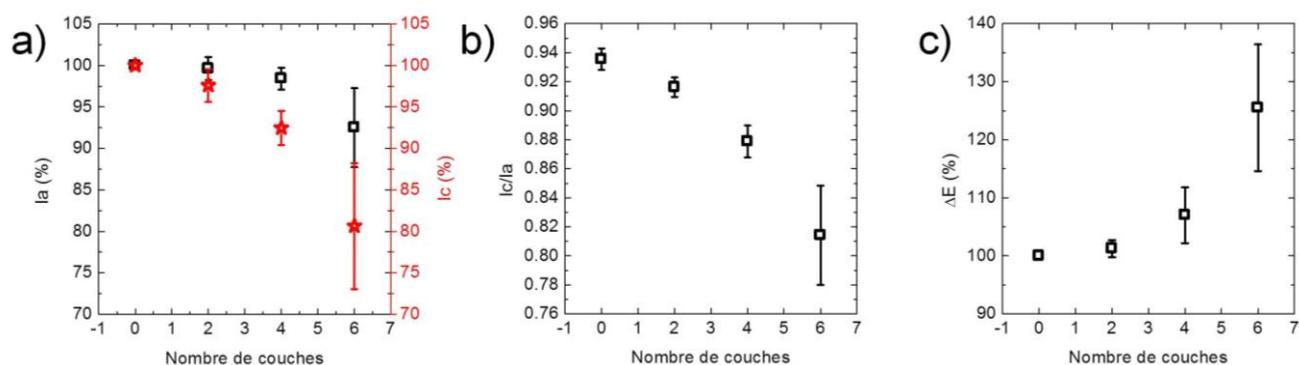


Figure 142. Répétabilité et reproductibilité des expériences de voltamétrie cyclique réalisées sur des PEMn déposées par SC. Influence du nombre de couches déposées sur (a) les intensités des pics d'oxydo-réduction, (b) le rapport de ces intensités et (c) la différence de potentiel entre ces pics. Les moyennes et les écarts types représentés sont issus de trois expériences indépendantes.

Dans notre cas, ce phénomène est, malgré tout, relativement faible, en raison de (i) la faible épaisseur de la PEMn, (ii) de l'absence de sel lors de sa construction et (iii) de l'interpénétration potentielle des chaînes de polyélectrolytes qui facilite le passage des charges entre sites voisins. Dans un esprit similaire, Laurent et Schlenoff ont montré que dans le cas de l'étude électrochimique d'espèces électroactives telles que le poly(butanyleviologen), il fallait au minimum quatre bicouches (PAH/PSS) pour conférer à l'espaceur un caractère isolant et empêcher la détection du signal de la couche électroactive [33].

Bien que la méthode de SC pour le dépôt des polyélectrolytes conduise à une réduction (toute relative) des intensités des pics d'oxydo-réduction, contrairement à la méthode LbL, nous avons privilégié le SC par souci de rapidité du processus de conception du biocapteur.

## 5.2 Immobilisation du biorécepteur

Sur la base des études ci-dessus nous avons choisi de travailler en utilisant la multicouche PEM 6 (couche finale de PSS), exposant ainsi une surface d'électrode chargée négativement. La seconde étape de fonctionnalisation consiste alors à immobiliser les NPs sur la PEM 6, afin (i) d'augmenter la surface efficace permettant d'accueillir les biorécepteurs et donc (ii) d'amplifier le signal de détection. L'approche considérée consiste à déposer les NPs puis à fixer les biorécepteurs (Ac) à leur surface (cf. Figure 130). Cette approche diffère donc de la méthode classique consistant à greffer les Ac aux NPs en solution puis à venir déposer le tout sur un substrat.

### 5.2.1 Dépôt d'un film de NPs positives sur une PEM 6

Les NPs choisies sont celles dont le diamètre a été jugé le plus inoffensif vis-à-vis d'*E. coli*, au cours du chapitre 4 : les  $\text{SiO}_2$ -NPs 100. Les sites de reconnaissance spécifique des Ac, appelés paratopes, sont situés sur la partie haute du Y ; il faut donc les laisser accessibles pour la partie détection des bactéries (Figure 143).

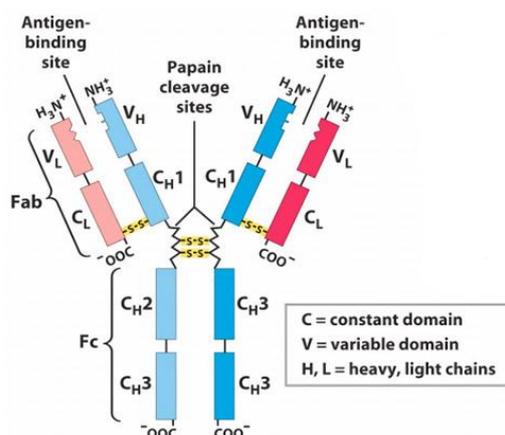


Figure 143. Structure schématisée d'un anticorps (<http://www.news-medical.net>).

Aussi, doit-on générer des interactions entre les NPs et l'extrémité du fragment cristallisable de l'Ac, partie basse du Y, terminé par des fonctions carboxylates. Le dépôt des Ac, qu'il se fasse par interactions électrostatiques ou par greffage covalent via une liaison peptidique  $R_2NH-COR_1$ , est d'autant plus favorisé que ces  $SiO_2$ -NPs 100 seront chargés positivement. C'est pourquoi elles ont été fonctionnalisées par un aminosilane afin de leur conférer des groupements amine en surface, selon le protocole décrit en chapitre 2 : il s'agit donc de  $SiO_2$ -NPs<sup>+</sup> 100.

### 5.2.1.1 Optimisation du protocole par microscopie

Comme précédemment, le protocole d'optimisation du dépôt des NPs a été réalisé sur du mica. De plus, afin d'obtenir une détection efficace, les Ac doivent être distribués de manière homogène, sans encombrement stérique, à la surface du transducteur. Aussi, semble-t-il optimal de le recouvrir par une monocouche de NPs, le compromis étant de bénéficier d'une large surface pour le greffage (*i.e.* un nombre de NPs important) sans pour autant atténuer significativement le signal électrochimique dès cette étape de fonctionnalisation.

Le SC a déjà montré son intérêt dans le dépôt et l'assemblage contrôlés de NPs [34,35]. Ainsi, et dans la continuité des études précédentes sur les PEM, cette méthode a également été utilisée pour le dépôt des NPs. Celles-ci sont déposées sur mica + PEM 6. Afin d'obtenir une caractérisation rapide des films formés, et considérant la limite de résolution de notre microscope optique, les premières observations d'optimisation des paramètres du SC ont été réalisées avec des  $SiO_2$ -NPs<sup>-</sup> 200. Comme pour les PEM, il ne s'agit pas d'une étude exhaustive sur l'influence du temps et de la vitesse de SC. Aussi, des temps de 20 et 60 s, et des vitesses de 200 et 1000 tours/min. ont été testés pour montrer une potentielle influence sur la structure du film formé (Figure 144).

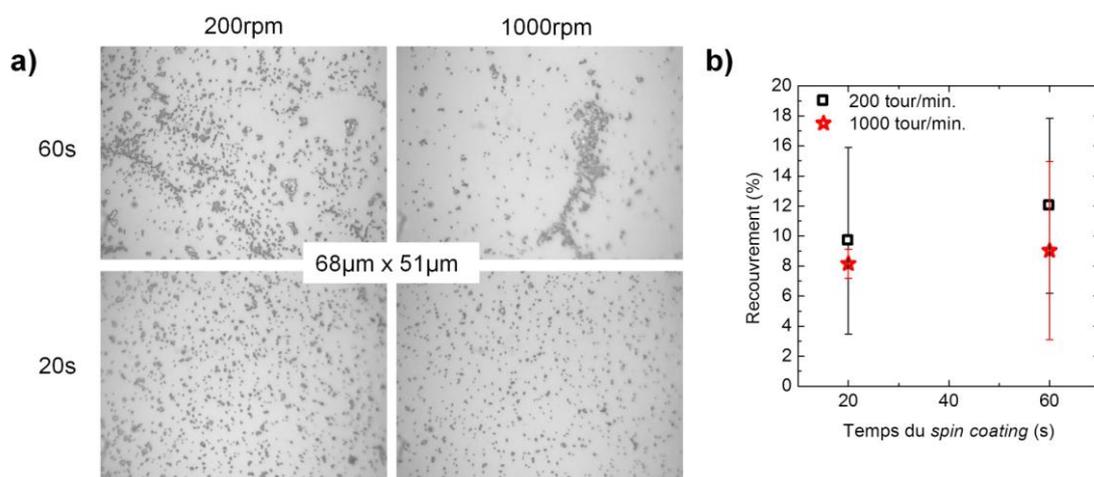


Figure 144. a) Images de microscopie optique montrant des dépôts de SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 200 ( $C = 1$  g/L) pour des paramètres de SC différents. b) Influence de ces paramètres sur l'estimation du taux de recouvrement du substrat par ces NPs (estimé grâce à un traitement des images par le logiciel Image J).

La Figure 144a montre qu'un temps prolongé de 60 s conduit à un dépôt hétérogène : des agrégats plus ou moins denses et compacts sont observés et coexistent avec des NPs qui semblent plus isolées. Une structure plus homogène est obtenue pour un temps de SC de 20 s : les NPs sont distribuées de façon éparse sur le substrat, les particules isolées étant majoritaires. Il est important de noter qu'en raison de la résolution du microscope, il est très probable que les « points » observés sur ces images, ici assimilés à des NPs isolées, soient, en réalité, de petits agrégats de NPs. Bien que le taux de recouvrement du substrat soit similaire quels que soient les paramètres utilisés (Figure 144b), les dépôts obtenus pour  $t = 20$  s semblent davantage en accord avec l'objectif fixé d'une monocouche.

La vitesse de 200 tours/min., moins brutale que 1000 tours/min., a été privilégiée pour l'utilisation future du capteur électrochimique. Ces paramètres optimisés, de nouvelles observations ont été réalisées avec les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100 déposées sur du mica + PEM 6 (20 s, 200 tours/min.), à des concentrations diverses (Figure 145). Sans surprise, l'augmentation de la concentration conduit à l'augmentation du taux de recouvrement du substrat ; un recouvrement optimal proche de la monocouche désirée, sans formation d'agrégats, est obtenu pour une concentration de 10 g/L.

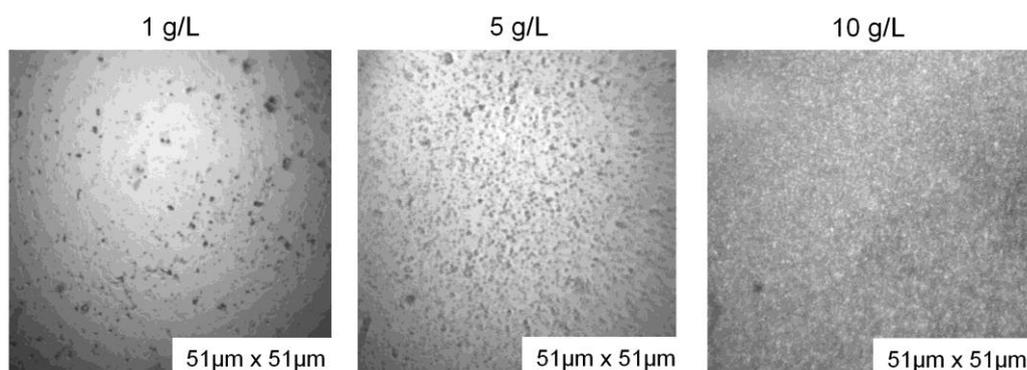


Figure 145. Images de microscopie optique montrant l'influence de la concentration en SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100 sur leur dépôt par SC (20 s, 200 tours/min.).

Ces paramètres ont donc été utilisés pour la fonctionnalisation du transducteur électrochimique, étudié ci-après.

### 5.2.1.2 Etude électrochimique

Comme précédemment, les voltammogrammes sont obtenus dans une solution de PBS 1x contenant du  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  à 10 mM, pour une vitesse de balayage de 100 mV/s. Les courbes d'oxydo-réduction obtenues après dépôt des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100 présentent la même allure que celles obtenues sur l'électrode d'or nue ou l'électrode fonctionnalisée par une PEM 6 (Figure 146a), et les intensités des pics d'oxydation et de réduction sont similaires à celles obtenues pour la PEM 6 (Figure 146b-c). Quant à la différence de potentiel, elle n'est également pas affectée par la présence de NPs (Figure 146d).

Considérant la quantité de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100 déposées (10 g/L) et donc le taux de recouvrement important attendu, une diminution de l'intensité des pics et une augmentation de la différence de potentiel associée, correspondant à un « ralentissement du système », auraient été cohérents. Or, les résultats, reproductibles et répétables, montrent que le dépôt d'une solution fortement concentrée de NPs, en surface de l'électrode, a peu d'influence sur la réponse électrochimique du couple redox, avec les mêmes caractéristiques électroniques, que celles qui surviennent à l'interface PEM 6 / solution.

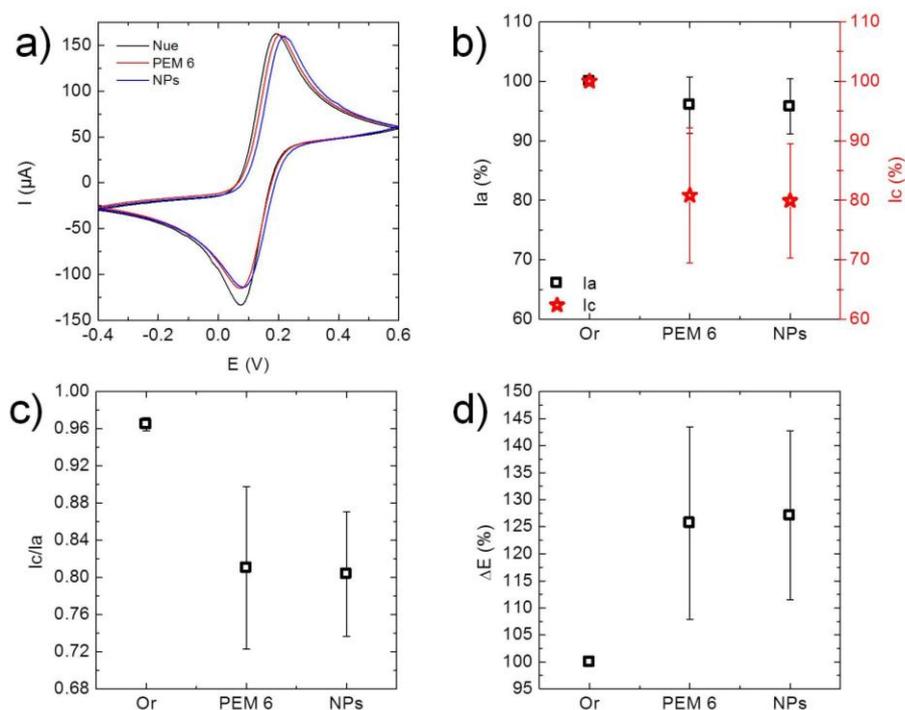


Figure 146. Expériences de voltamétrie cyclique réalisées sur des dépôts de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100 par SC. Les voltammogrammes issus d'une expérience représentative sont présentés en (a). (b-d) Données extraites (moyenne et écart type) des voltammogrammes obtenus pour quatre expériences indépendantes : influence du dépôt de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100 sur (b) les intensités des pics d'oxydo-réduction, (c) le rapport de ces intensités et (d) la différence de potentiel entre ces pics.

Une étude similaire menée avec des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> 200, chargées négativement, a montré, quant à elle, une légère diminution d'intensité des pics d'oxydo-réduction et, surtout, une augmentation significative de  $\Delta E$  (cf. Annexes – Chapitre 5 B). Ceci suggère que la charge surfacique du dépôt réalisé sur l'électrode influence la réponse électrochimique de l'espèce électroactive : les charges surfaciques positives, contrairement aux charges négatives, favorisent les transferts de charge, les espèces redox (Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-/3-</sup>) étant chargées négativement [36].

## 5.2.2 Dépôt du biorécepteur : NPs-Ac

Une fois les NPs fixées par interactions électrostatiques sur le transducteur (or + PEM 6), les Ac, *i.e.* les biorécepteurs, doivent maintenant être ajoutés en surface afin de procéder à la détection des bactéries *E. coli*.

Les Ac utilisés sont spécifiques aux antigènes (Ag) O présents sur les molécules de LPS de la membrane externe d'*E. coli*. Les Ag O sont présents chez la majorité des bactéries à Gram négatif ; ils sont constitués d'un grand nombre d'unités répétées d'oligosaccharides dont l'ordre, la nature et le nombre déterminent la diversité des Ag O. Aussi, les Ac utilisés ciblent-ils certaines unités spécifiques de la surface d'*E. coli*. Par ailleurs, ne connaissant pas la composition exacte des Ag O de notre souche d'*E. coli*, des Ac polyclonaux ont été privilégiés, qui cibleront donc différents épitopes de l'Ag O.

Nous avons, dans un premier temps, tenté un dépôt d'Ac en jouant sur les interactions électrostatiques entre les NPs et les Ac.

Par souci de simplicité de mise en œuvre du biocapteur, les Ac ont été déposés en excès à la surface des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100, sans chercher à optimiser leur concentration. Pour estimer la quantité d'Ac nécessaire, trois hypothèses ont été faites :

- une couverture optimale de l'électrode de travail par la monocouche de NPs, *i.e.* le nombre de NPs déposées est égal à :

$$N = \frac{S_{\text{électrode}}}{\pi R^2} \quad (46)$$

où  $S_{\text{électrode}}$  est la surface de l'électrode de travail et  $R$ , le rayon de la NP.

- une occupation de 45 nm<sup>2</sup> par anticorps ;
- la possibilité de n'immobiliser les Ac que sur la demi-sphère exhibée par les NPs à la surface du transducteur.

Cela conduit à déposer une goutte de 7  $\mu$ L d'Ac, concentrés à 0.05 mg/mL (excès) dans du PBS 1x, sur l'électrode de travail préalablement fonctionnalisée par une PEM 6 + NPs. La goutte est laissée au contact de la surface, à température ambiante, pendant 2 h, avant d'être rincée au PBS. Afin de bloquer l'ensemble des sites non occupés par les Ac, une goutte de solution contenant de la BSA, concentrée à 1 mg/mL, est ensuite déposée et laissée sur la surface pendant 30 min. sur l'électrode

puis rincée au PBS. Une fois ces étapes achevées, les mesures de voltamétrie cyclique sont effectuées.

Les voltamogrammes obtenus montrent que la présence d'Ac peut conduire à des résultats aléatoires *i.e.* : soit (i) à une légère augmentation du signal, associée à une diminution de  $\Delta E$  (Figure 147a), soit (ii) à une forte diminution du signal, associée à une augmentation de  $\Delta E$  (Figure 147b). Aussi, les données extraites des voltamogrammes, au cours de quatre expériences indépendantes, sont-elles présentées de façon décorrélée par expérience (Figure 147c-e). Les Ac présentant des groupements positifs et négatifs cette différence n'est pas surprenante. Toutefois, cela montre une certaine absence de reproductibilité lors des manipulations, bien que la répétabilité des mesures, sur une même électrode, soit, elle, assurée. En effet, les barres d'erreur, ici associées à trois mesures indépendantes sur la même électrode, sont relativement faibles et témoignent de la robustesse du dépôt, même après les rinçages successifs. En revanche, entre les différentes électrodes, le dépôt des Ac semble ne pas être parfaitement reproductible (Figure 147c-e).

La seconde configuration (expériences 3 et 4) de ces résultats est en accord avec des travaux précédents ayant montré une forte perturbation de l'accès de l'espèce électroactive à la surface d'une électrode d'or suite à l'immobilisation d'Ac [37].

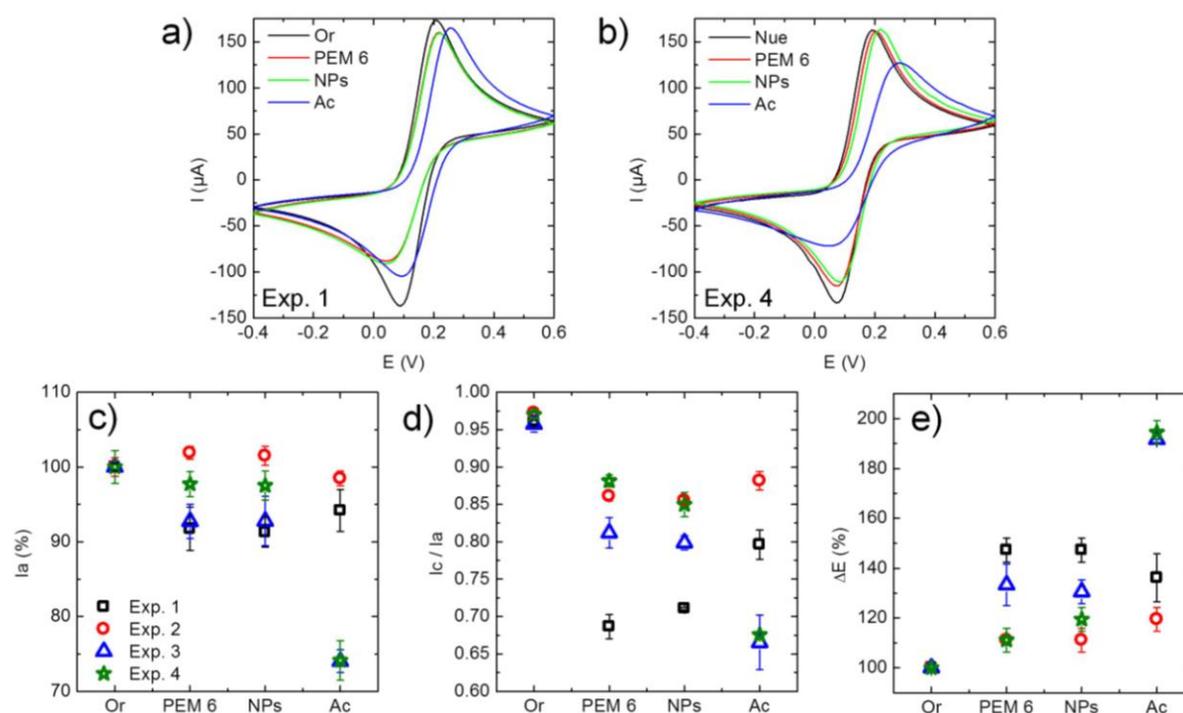


Figure 147. Expériences de voltamétrie cyclique du couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  réalisées sur des dépôts d'Ac. a-b) Voltamogrammes obtenus au cours de deux expériences indépendantes, montrant les résultats aléatoires observés lors du dépôt d'Ac à la surface du transducteur (Or + PEM 6 + NPs). Les données extraites sont représentées en découplant quatre expériences indépendantes. Influence du dépôt d'Ac sur (b) l'intensité du pic d'oxydation, (c) sur le rapport des intensités des pics d'oxydo-réduction et (d) sur la différence de potentiel entre ces pics. Les moyennes et les écarts types présentés sont issus de trois mesures indépendantes pour chaque dépôt.

Les groupements positifs, de type  $\text{NH}_3^+$ , sont majoritairement accessibles sur les paratopes de l'Ac, *i.e.* les parties permettant la détection de l'antigène (Ag) spécifique correspondant, tandis que les groupements négatifs,  $\text{COO}^-$ , sont majoritairement accessibles sur le fragment cristallisable de l'Ac (cf. Figure 143). En réalité, ces groupements positifs et négatifs sont présents sur l'ensemble des chaînes latérales de l'Ac, en raison de sa constitution par divers acides aminés. Or, il a été montré précédemment (pour les  $\text{SiO}_2$ -NPs) que la charge surfacique jouait un rôle dans la diminution ou l'augmentation du signal électrochimique. Aussi, les écarts de comportement observés lors des dépôts d'Ac pourraient s'expliquer par leurs orientations différentes à la surface du transducteur (Ac droit, renversé ou "couché"). Afin de confirmer ou d'infirmer une telle hypothèse, il serait intéressant de pouvoir s'assurer de l'orientation correcte des Ac à la surface du transducteur. Cela est possible grâce à un greffage covalent des Ac via un agent de couplage peptidique, de type EDC/NHS, qui permet d'activer les groupements acides carboxyliques du fragment cristallisable de l'Ac, et d'ainsi favoriser les liaisons avec les groupements  $\text{NH}_2$  des  $\text{SiO}_2$ -NPs<sup>+</sup> [38].

### 5.3 Détection des bactéries

Considérant les écarts de comportement des Ac observés entre les différentes expériences, les résultats de détection des bactéries *E. coli* seront également présentés, ci-après, par expérience. La détection consiste à déposer sur l'électrode de travail, préalablement fonctionnalisée (PEM 6 + NPs + Ac), des bactéries dont la concentration en suspension est connue. Par souci de lisibilité, les graphes seront, dans un premier temps, présentés avec les DO de bactéries et non les concentrations explicitées. La courbe d'étalonnage montrant la correspondance entre ces deux grandeurs est présentée, pour rappel, en Figure 148.

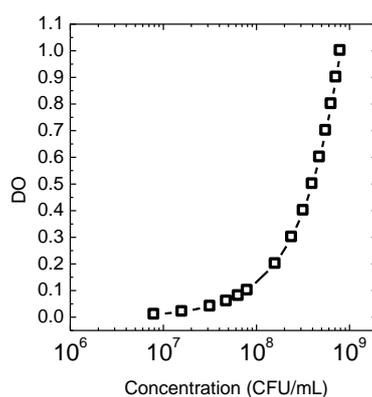


Figure 148. Courbe d'étalonnage indiquant l'équivalence entre la DO de la suspension bactérienne d'*E. coli* et sa concentration cellulaire.

Sur une même électrode, les bactéries sont déposées en concentrations allant des plus faibles aux plus élevées. Les mesures de voltamétrie cyclique sont ensuite réalisées après un rinçage au PBS.

### 5.3.1 Contrôle en absence d'anticorps

La détection des bactéries ne doit être due qu'aux événements de bio-reconnaissance, garantis par la spécificité Ac-Ag. Aussi, un contrôle est effectué en absence d'anticorps afin de s'assurer que les bactéries ne sont pas « détectées » par la PEM préalablement déposée. Les bactéries *E. coli* étant chargées négativement, leur fixation à la PEM 6, habituellement utilisée avant dépôt des NPs, est peu envisageable, aucune interaction électrostatique n'ayant lieu. En revanche, en absence de NPs, les Ac seront déposés sur une PEM 7, exhibant en surface une charge positive. Le contrôle sans Ac a donc été réalisé en déposant une couche supplémentaire de PAH sur la PEM 6 (= PEM 7). La Figure 149 montre que les variations induites par le dépôt de *E. coli*, par rapport aux étapes de fonctionnalisation précédentes, sont inférieures à 5 %. Elles sont incluses dans les incertitudes associées aux voltamogrammes réalisés pour l'or nue. Par conséquent, aucune détection de *E. coli* n'a eu lieu à la surface de la PEM 7, dans ces conditions, sans Ac et sans NPs.

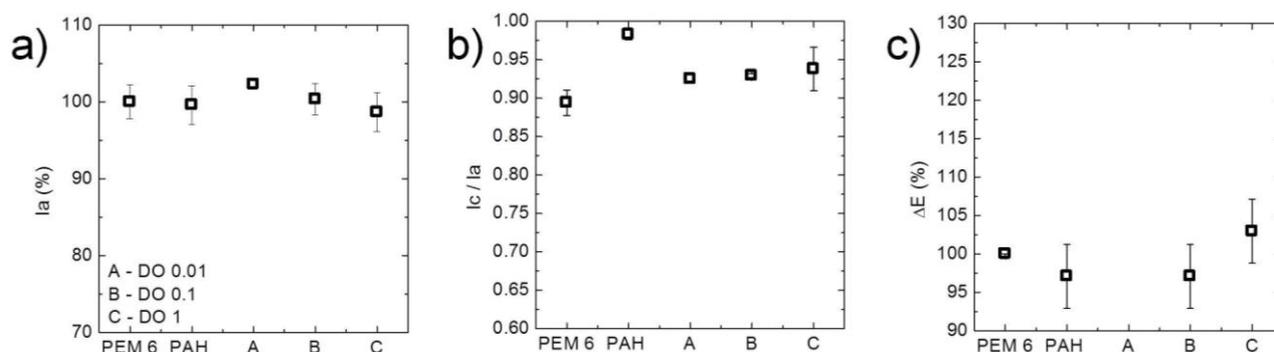


Figure 149. Expérience de voltamétrie cyclique montrant l'absence de détection de bactéries *E. coli* en absence d'anticorps. En atteste l'absence de modification du signal CV au niveau (a) de l'intensité du pic d'oxydation, (b) du rapport des intensités des pics d'oxydo-réduction et (c) de la différence de potentiel entre ces pics. Les moyennes et les écarts types représentés sont issus de trois mesures indépendantes.

Ceci confirme que, si détection il y a, par la suite, en présence d'Ac, elle ne sera induite que par les événements de bio-reconnaissance et non par la fixation des bactéries à la PEM.

### 5.3.2 Détection en présence de NPs

La Figure 150 présente les résultats de détection en présence de NPs et pour des temps d'incubation des bactéries de 15 min. à la surface de l'électrode. Suite au dépôt des Ac sur les SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100, les intensités des pics d'oxydo-réduction diminuent avec l'ajout de bactéries de plus en plus concentrées (Figure 150b-c). Le pic de réduction est plus affecté comme pour les étapes de fonctionnalisation précédentes que celui d'oxydation. Ces diminutions s'accompagnent d'une augmentation de la différence de potentiel (Figure 150d). Le transducteur présente donc une résistance d'autant plus importante aux transferts de charges que les bactéries sont concentrées à sa surface.

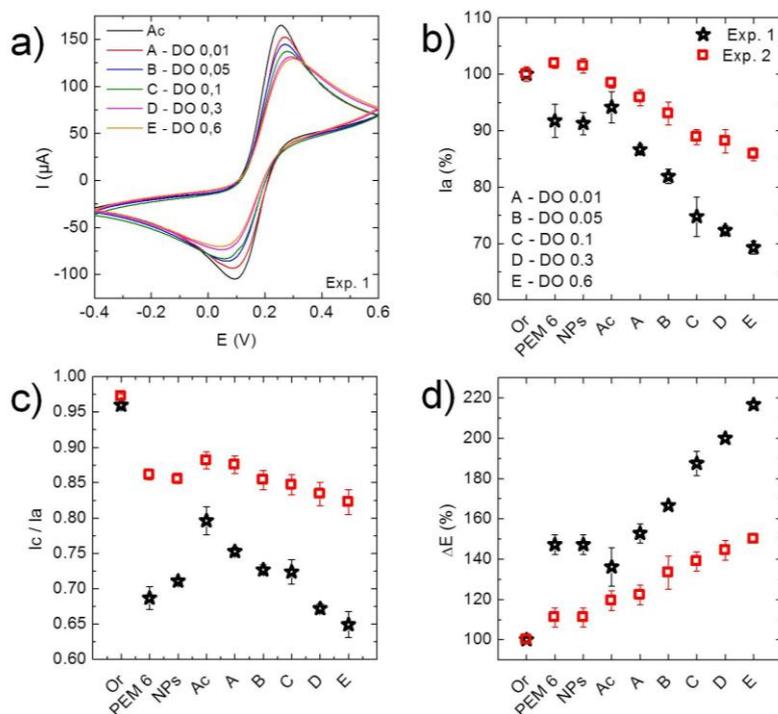


Figure 150. Expériences de voltamétrie cyclique pour la détection de bactéries *E. coli* après 15 min. d'incubation. a) Voltammogrammes obtenus lors d'une expérience représentative de la détection de *E. coli*, pour diverses DO, *i.e.* concentrations. Détection validée par les variations (b) d'intensité du pic d'oxydation, (c) du rapport des intensités des pics d'oxydo-réduction et (d) de la différence de potentiel entre ces pics. Sont représentées, de manière découplée, deux expériences indépendantes. Les moyennes et les écarts types représentés sont issus de trois mesures indépendantes.

Ces modifications suggèrent que la détection des bactéries a lieu dans la gamme de concentration testée :  $\text{DO} = [0.01 ; 0.60]$ . De plus, la diminution de  $I$  et l'augmentation de  $\Delta E$  dépendent linéairement de la densité optique de la suspension bactérienne, *i.e.* de la concentration cellulaire. Selon l'électrode utilisée, ces modifications sont plus ou moins importantes (comparer les expériences 1 et 2 en Figure 150).

Pour améliorer les performances de ce biocapteur, un temps d'incubation plus faible, 5 min., a été testé au cours d'une expérience présentée en Figure 151. Elle démontre la faisabilité de la détection dans un temps aussi court, des modifications du signal étant observées dès une valeur de DO de 0.01. Dans ce cadre, la détection est parfaitement visible grâce aux variations de la différence de potentiel  $\Delta E$  ( $> 20\%$  sur la gamme de DO testée). Les variations des intensités sont, elles, moins importantes ( $< 10\%$ ), bien que parfaitement linéaires. Toutefois, un temps de détection de 15 min. semble fournir des variations plus significatives et importantes des signaux de voltamétrie cyclique.

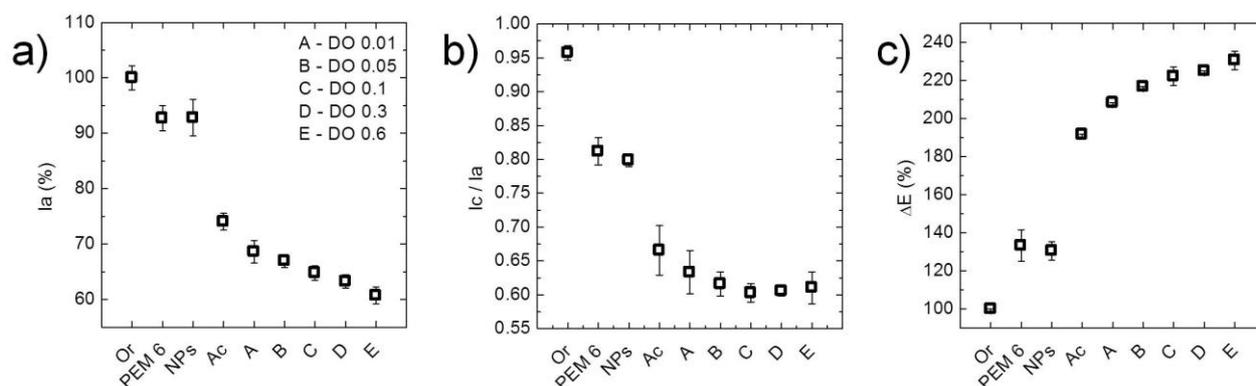


Figure 151. Expérience de voltamétrie cyclique pour la détection de bactéries *E. coli* après 5 min. d'incubation. Détection validée par les variations (a) d'intensité du pic d'oxydation, (b) du rapport des intensités des pics d'oxydo-réduction et (c) de la différence de potentiel entre ces pics. Les moyennes et les écarts types représentés sont issus de trois mesures indépendantes.

### 5.3.3 Les NPs sont-elles indispensables à la détection ?

Pour répondre à cette question, nous avons effectué une série de mesures dans les mêmes conditions mais sans NPs. En l'absence de NPs, le greffage d'Ac à la surface du transducteur permet, en théorie, de détecter les bactéries *E. coli*. Qu'en est-il des performances du biocapteur dans ce cas ?

En absence de NPs, le dépôt des Ac se fait sur la dernière couche de polyélectrolytes immobilisée sur l'électrode de travail. Celle-ci doit donc présenter un maximum de groupements positifs, notamment  $\text{NH}_3^+$ , afin de pouvoir fixer les Ac par des interactions électrostatiques. Une couche supplémentaire de PAH a donc été déposée sur la PEM 6. La même concentration d'Ac que celle appliquée en présence de NPs est utilisée : 0.05 mg/mL.

Les voltamogrammes obtenus montrent une diminution des intensités des pics d'oxydo-réduction pour certaines DO / concentrations de bactéries (Figure 152a). Ceci suggère qu'il peut y avoir détection des bactéries *E. coli*, en absence de NPs, ce qui est cohérent avec la présence d'Ac capables de les fixer au transducteur. Deux expériences indépendantes ont été menées (Figure 152b-d). Les résultats ne sont pas parfaitement reproductibles : (i) l'expérience 1 conduit, après une DO de 0.05, à une saturation du signal, l'ajout de bactérie n'induisant aucun changement d'intensité ou de différence de potentiel ; (ii) l'expérience 2, quant à elle, est plus difficile à interpréter, conduisant à une augmentation ou diminution du signal, comparé au dépôt précédent, suivant la concentration de bactérie fixée au transducteur. Par ailleurs, lors d'une expérience, trois mesures indépendantes sont réalisées dans trois solutions différentes. Entre chaque mesure, l'électrode fonctionnalisée est rincée au PBS. Les barres d'erreur associées à ces trois mesures, peuvent, pour certains dépôts, atteindre 10 % de variation, témoignant de signaux dont les intensités et la différence de potentiel varient significativement. Ceci suggère que la couche concernée (Ac ou bactéries) n'est pas parfaitement fixée.

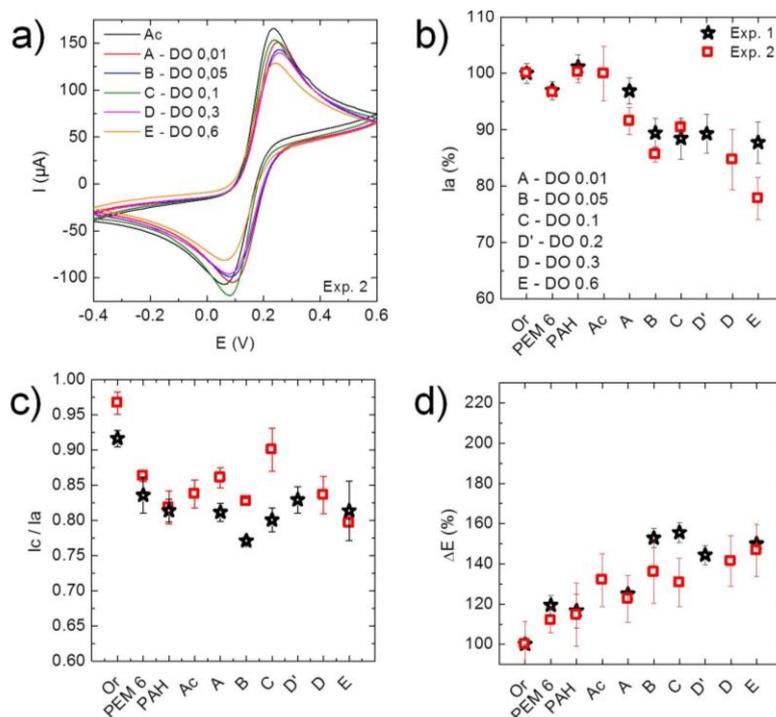


Figure 152. Expériences de voltamétrie cyclique pour la détection de bactéries *E. coli* après 15 min. d'incubation, en absence de NPs. a) Voltamogrammes obtenus lors d'une expérience représentative de la détection de bactéries sans NPs. Données extraites sur les variations (a) d'intensité du pic d'oxydation, (b) du rapport des intensités des pics d'oxydo-réduction et (c) de la différence de potentiel entre ces pics. Sont représentées, de manière découplée, deux expériences indépendantes. Les moyennes et les écarts types représentés sont issus de trois mesures indépendantes.

Les différences constatées entre les expériences menées avec et sans NPs sont probablement dues à l'état de surface du système accueillant les Ac : PAH ou  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$ . En présence de NPs, celles-ci étant en solution dans l'eau ultrapure ( $\text{pH} = 6.5$ ), les groupements  $\text{NH}_2$  sont majoritairement protonés, permettant une très forte interaction électrostatique avec le fragment cristallisable, *i.e.* les fonctions carboxylates, des Ac. En leur absence, le  $\text{pH}$  de la couche de PAH ayant été ajusté à 8, le ratio  $[\text{NH}_3^+]/[\text{NH}_2]$  est probablement insuffisant pour avoir majoritairement des fonctions amines protonées en surface. Aussi les Ac peuvent-ils se fixer de façon aléatoire à cette PEM 7, soit (i) de façon correctement orientée (paratopes en surface) soit (ii) de façon incorrecte (paratopes fixés à la PEM) ? Par ailleurs, le caractère plan de la couche de PAH, contrairement à la courbure présentée par les NPs, favorise, peut être, une orientation « couchée » des Ac à leur surface, en absence d'agent de liaison chimique.

### 5.3.4 Sensibilité et limite de détection du biocapteur

Afin de comparer la détection de *E. coli* avec ou sans NPs, les variations d'intensités des pics d'oxydo-réduction par rapport aux intensités obtenues sur l'électrode avant détection (Ac) sont déterminées :  $\Delta I = I(E. coli) - I(Ac)$ . Dans le cas du pic d'oxydation, ces variations sont négatives tandis que pour le pic de réduction, elles sont positives. Pour plus de clarté, les valeurs absolues de ces variations sont reportées Figure 153 .

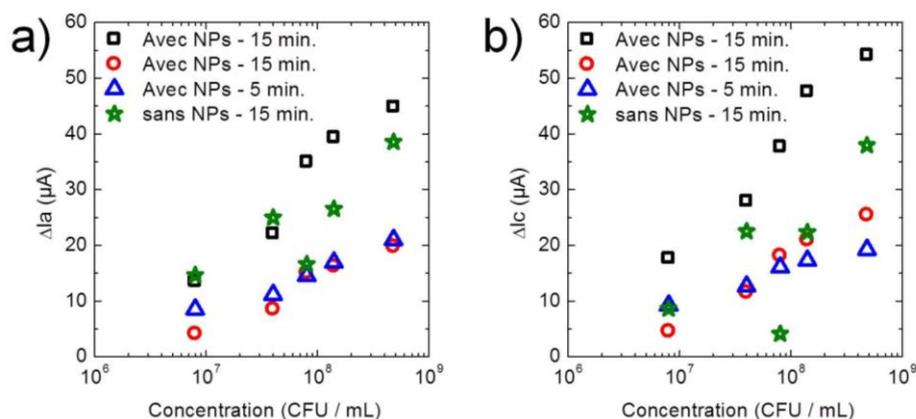


Figure 153. Estimation des variations d'intensité (a) du pic d'oxydation et (b) du pic de réduction par rapport aux intensités obtenues pour le dépôt d'Ac, en fonction de la concentration cellulaire. Les expériences menées avec ou sans NPs et pour deux temps de détection, 5 et 15 min. sont reportées.

L'absence de NPs conduit à des variations non linéaires des intensités des pics avec la concentration en analytes : une variation similaire est obtenue pour (i) 10<sup>7</sup> et 10<sup>8</sup> CFU/mL et (ii) 4.10<sup>7</sup> et 2.10<sup>8</sup> CFU/mL. Il est, ainsi, impossible de quantifier une détection de bactéries, à proprement parler. A l'inverse, la présence de NPs conduit à des variations linéaires qui permettent une estimation des variations induites par des concentrations distinctes de bactéries. Il est ainsi possible d'estimer la sensibilité et la limite de détection<sup>28</sup> (LOD) des biocapteurs conçus (Tableau 15). La sensibilité est égale à la pente de la régression linéaire, effectuée dans la gamme de travail, et la LOD est égale, en première approximation, à l'abscisse à l'origine.

Tableau 15. Performances des biocapteurs, intégrant des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>+</sup> 100, en termes de sensibilité, de limite de détection et de gamme de travail.

Temps de détection	15 min.	5 min.
Sensibilité (μA/CFU/mL)	13 - 22	6 - 9
LOD (CFU/mL)	1.5.10 <sup>6</sup> - 3.5.10 <sup>6</sup>	2.10 <sup>5</sup> - 1.10 <sup>6</sup>
Gamme (CFU/mL)	8.10 <sup>6</sup> - 5.10 <sup>8</sup>	8.10 <sup>6</sup> - 5.10 <sup>8</sup>

Par conséquent, il semble que, dans nos conditions expérimentales, la quantification de la détection de *E. coli* par un biocapteur dépourvu de NPs soit impossible. L'intégration de NPs montre alors tout son intérêt par (i) cette quantification qu'elle rend possible, par (ii) la large gamme de concentration cellulaire qu'elle permet de détecter et par (iii) les performances (sensibilité et LOD) qu'elle confère aux biocapteurs.

Dans la littérature, des LOD plus faibles, de l'ordre de la dizaine à la centaine de cellules / mL, ont été obtenues pour des capteurs électrochimiques intégrant des NPs magnétiques [39,40]. Toutefois, les temps de détection étaient alors de l'ordre d'une

<sup>28</sup> La LOD est la plus petite concentration d'analyte que le biocapteur peut détecter, sans méprise avec un potentiel bruit de fond.

heure. Une LOD plus proche des nôtres ( $\sim 10^5$  CFU/mL) a été obtenue par Varshney et Li, mais pour un temps de détection de 35 min. et grâce à des NPs magnétiques [41]. Les LOD, déterminées dans le cadre de nos expériences, sont relativement importantes : environ  $10^5 - 10^6$  CFU/mL. Ces concentrations sont élevées et ne répondent pas, encore, aux objectifs fixés d'une ultra-sensibilité du biocapteur. La gamme de concentration testée devrait être élargie afin de déterminer si ces LOD ne pourraient être ainsi améliorées. En effet, actuellement seules les concentrations supérieures à  $8.10^6$  CFU/mL ont été testées, des concentrations plus faibles conduiraient, sans doute, également, à des variations d'intensité et de différence de potentiel permettant d'affiner les LOD estimées. Par ailleurs, d'autres améliorations de nos systèmes restent à envisager qui pourraient également fortement diminuer les seuils de détection (cf. section 5.3.6). Malgré cela, nos premiers essais de biocapteurs intégrant des NPs sont encourageants.

### 5.3.5 Spécificité du biocapteur

Afin de valider la spécificité du biocapteur pour *E. coli*, des tests ont été effectués avec une souche de bactéries à Gram négatif différente, *Pseudomonas fluorescens*. Les Ac utilisés étant spécifiques à certaines unités spécifiques des Ag O des LPS de la OM d'*E. coli*, les bactéries *Pseudomonas* ne devraient pas engendrer de variations significatives du signal de voltamétrie cyclique, leurs Ag O présentant une composition différente de ceux d'*E. coli*.

La Figure 154 présente les résultats de deux expériences sur cette souche. Les intensités des pics d'oxydo-réduction avant et après introduction des bactéries ne varient que très peu, et ce quelles que soient les concentrations déposées de *Pseudomonas fluorescens*. De la même manière la différence de potentiel entre les pics d'oxydation et de réduction ne subit pas de variations significatives entre les mesures faites sur une surface recouverte d'Ac et la même surface exposée à la plus forte concentration de bactéries.

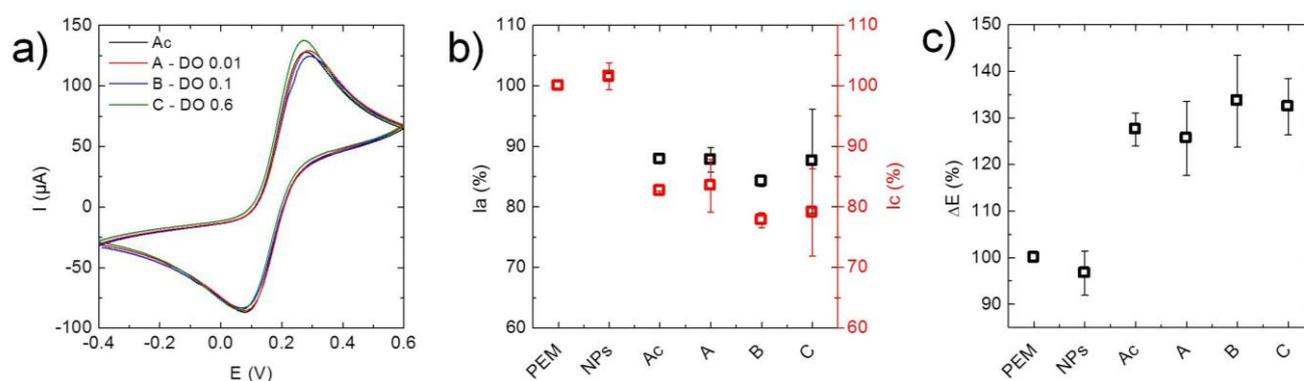


Figure 154. Expériences de voltamétrie cyclique sur le dépôt de *Pseudomonas fluorescens* ( $t = 15$  min.) à la surface de NPs greffées par des Ac spécifiques à *E. coli*. A) Voltamogrammes obtenus pour une expérience représentative de la non détection de *Pseudomonas fluorescens*. Spécificité du biocapteur validée par l'absence de variations significatives en termes (b) d'intensité des pics d'oxydo-réduction et (c) de la différence de potentiel entre ces pics. Les moyennes et les écarts types représentés sont issus de deux expériences indépendantes.

Les variations induites par le dépôt de *Pseudomonas fluorescens*, faiblement ou fortement concentrées (A-C), inférieures à 5 % du signal obtenu suite au dépôt d'Ac, suggèrent que le biocapteur ne les a pas détectées. Ces observations démontrent une certaine spécificité des biocapteurs conçus pour les bactéries *E. coli*.

Afin de déterminer la spécificité réelle du biocapteur, il serait intéressant d'évaluer sa réponse à la présence d'une bactérie proche d'*E. coli*, plus proche que ne l'est *Pseudomonas fluorescens*. Des espèces du genre *Salmonella* partagent de nombreux points communs avec *E. coli*, toutes deux étant des entérobactéries, mais présentent des Ag O différents ; elles feraient donc d'excellents candidats pour tester, plus rigoureusement, la spécificité de nos biocapteurs.

### 5.3.6 Un biocapteur en devenir

Cette étude, loin d'être complète, a montré (i) la faisabilité d'un biocapteur électrochimique, basé sur la voltamétrie cyclique, pour la détection de *E. coli* et (ii) l'apport indéniable des NPs pour sa sensibilité. La Figure 155 rappelle les voltamogrammes obtenus dans le cadre d'une expérience de détection de *E. coli* grâce au système NPs – Ac et montre les variations linéaires des intensités des pics d'oxydo-réduction lors de la détection de bactéries de plus en plus concentrées.

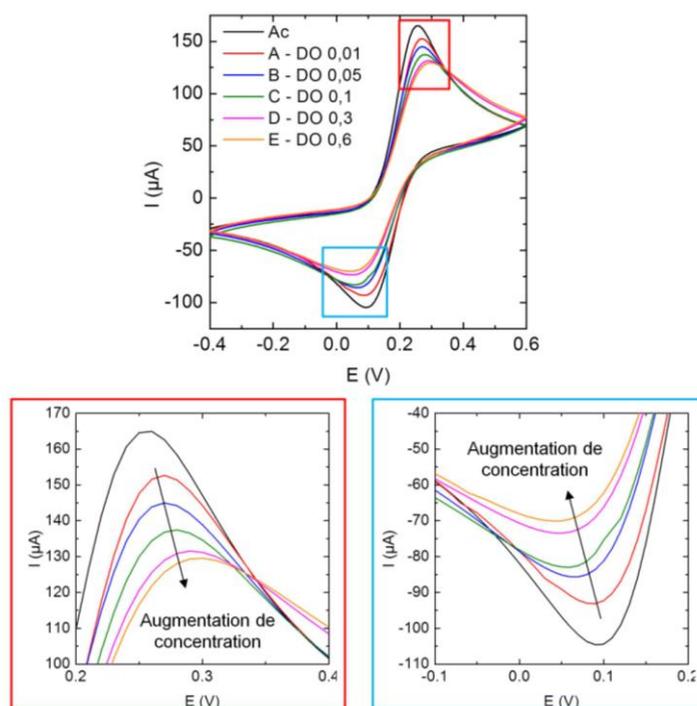


Figure 155. Voltamogrammes obtenus lors de la détection de *E. coli*, en diverses concentrations (ou DO), grâce au système NPs – Ac. Des grossissements au niveau des pics d'oxydation et de réduction sont également présentés.

Les expériences menées ont montré l'intérêt de regarder divers paramètres pour l'analyse des voltamogrammes cycliques : les intensités des pics d'oxydo-réduction ( $I_a$  et  $I_c$ ), le rapport de ces intensités et la différence de potentiel entre ces pics ( $\Delta E$ ). Chacun de ces paramètres peut être affecté selon le dépôt réalisé sur le transducteur,

induisant un ralentissement ou non du mouvement de charges. Toutefois, les intensités  $I_a$  et  $I_c$  paraissent être les paramètres les plus pertinents pour une analyse quantitative (variation linéaire avec la concentration cellulaire) et rapide (directement visibles et extraites) de la détection de bactéries.

Afin d'améliorer les performances de nos biocapteurs, de nombreuses expériences restent à effectuer :

- maîtriser l'orientation des Ac à la surface du transducteur, notamment par l'ajout d'un agent de couplage, tel EDC/NHS ;
- étudier l'influence de la concentration en Ac sur l'efficacité de la détection ;
- étudier l'influence du temps d'incubation des bactéries à la surface du transducteur sur les performances, en termes de rapidité de détection ;
- comparer l'efficacité (i) d'un biocapteur où les Ac sont greffés aux NPs, une fois celles-ci fixées au transducteur et (ii) celle d'un biocapteur où le système NPs-Ac est fixé « prêt » au transducteur, *i.e.* après le greffage des Ac aux NPs en suspension.
- Valider la spécificité des biocapteurs en les testant avec une bactérie du groupe des *Salmonella*.

L'ensemble de ces caractérisations permettrait d'atteindre l'objectif fixé d'un biocapteur pour *E. coli*, ultra-sensible, rapide et robuste.

---

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié et optimisé l'architecture d'un biocapteur électrochimique pour la détection de bactéries *E. coli*. Ce biocapteur se compose d'une électrode d'or commerciale fonctionnalisée successivement par (i) une multicouche de polyélectrolytes (PEM 6), (ii) une monocouche de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100 et (iii) des anticorps spécifiques à *E. coli*. L'ensemble de ces systèmes sont fixés électrostatiquement les uns aux autres.

La PEM a été étudiée par AFM, microbalance à quartz et voltamétrie cyclique. Nos résultats montrent que le dépôt par *spin coating* (45s, 100 tours/min) favorise un film mince et peu rugueux en comparaison d'un film obtenu par la méthode Layer by Layer. De plus, l'alternance de PAH (chargé positivement) et de PSS (chargé négativement) sur six couches permet l'interpénétration des chaînes de polyélectrolytes, et le confinement potentiel des espèces électroactives au sein du film formé. Cette PEM ne freine que légèrement le transfert des charges à la surface du transducteur et permet la fixation des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100.

Ces NPs, choisies pour leur caractère inerte vis-à-vis des bactéries *E. coli*, sont déposées par *spin coating* (20s, 200 tours/min) et forment, idéalement, une monocouche. En raison de leurs charges positives, elles ne modifient pas significativement le signal de voltamétrie cyclique obtenu suite au dépôt de la PEM. Le système « PEM 6 +NPs » a fait l'objet d'un travail d'optimisation par AFM sur un

substrat de mica, beaucoup moins rugueux que le transducteur. Or, il est difficile de penser que les résultats ainsi optimisés puissent être reproduits sur une électrode d'or extrêmement rugueuse. Toutefois, le « *proof of concept* » est ici démontré. La réalisation de nos propres électrodes, par exemple par évaporation, auraient, dans des temps plus longs, permis le contrôle, en épaisseur et en rugosité, de la couche d'or déposé sur le transducteur.

Les anticorps, déposés en excès à la surface des NPs, ont permis la détection effective des bactéries *E. coli*. Cette détection est interprétée grâce aux diminutions (en valeur absolue) des courants d'oxydoréduction, garantis par le couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  en solution, ainsi que par l'augmentation des écarts de potentiel associés aux pics d'oxydoréduction. L'ensemble de ces variations permettent de déterminer les performances du biocapteur. Des temps de détection, aussi courts que 5 et 15 min, ont permis d'atteindre (i) des limites de détection de l'ordre de  $10^5$ - $10^6$  CFU/mL et (ii) des sensibilités de l'ordre de  $10 \mu\text{A}/\text{CFU}/\text{mL}$ , et ce pour une gamme de détection comprise entre  $10^6$  et  $10^9$  CFU/mL. L'absence de NPs intégrées au sein de ce biocapteur conduit à l'indétermination de la concentration cellulaire détectée (détection non linéaire) et la saturation du système dès les hautes concentrations. L'apport des NPs a également été démontré en termes de spécificité : la bactérie *Pseudomonas fluorescens*, bien que très éloignée d'*E. coli*, n'a, en effet, pas été détectée par une telle architecture, ce qui constitue un premier pas vers un biocapteur spécifique.

## Bilan

Dans le cadre de ce chapitre, les résultats suivants ont été mis en évidence :

- ❖ Une multicouche de polyélectrolytes permet d'immobiliser des NPs :
  - ✓ Un film mince et peu rugueux, optimisé par *spin coating* : 45 s, 100 tours/min.,  $200 \text{ s}^{-2}$
- ❖ L'immobilisation du système NPs - biorécepteurs :
  - ✓  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100 immobilisées sur la PEM, en une monocouche, par *spin coating* : 20 s, 200 tours/min.,  $200 \text{ s}^{-2}$
  - ✓ Des Ac déposés sur les NPs :  $C = 0.05 \text{ mg/mL}$ ,  $t = 2 \text{ h}$
- ❖ Une détection d'*E. coli* amplifiée par la présence de NPs au sein du biocapteur :
  - ✓ Détection interprétée en termes (i) de diminution (en valeur absolue) des courants d'oxydoréduction et (ii) d'augmentation de l'écart de potentiel associé aux pics d'oxydoréduction
  - ✓ Gamme détectée :  $8.10^6 - 5.10^8 \text{ CFU/mL}$
  - ✓ LOD :  $2.10^5 - 3.5.10^6 \text{ CFU/mL}$
  - ✓ Spécificité partiellement validée par l'absence de détection de *Pseudomonas fluorescens*, une souche de bactéries à Gram négatif différente de *E. coli*.

## Bibliographie

- [1] McAdams ET, Jossinet J, Subramanian R, McCauley RGE. Characterization of gold electrodes in phosphate buffered saline solution by impedance and noise measurements for biological applications. Eng. Med. Biol. Soc. 2006 EMBS06 28th Annu. Int. Conf. IEEE, IEEE; 2006, p. 4594–7.
- [2] Gail E, Gos S, Kulzer R, Lorösch J, Rubo A, Sauer M, et al. Cyano Compounds, Inorganic. In: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, editor. Ullmanns Encycl. Ind. Chem., Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2011.
- [3] Kobayashi Y, Hoshi T, Anzai J. Glucose and lactate biosensors prepared by a layer-by-layer deposition of concanavalin A and mannose-labeled enzymes: Electrochemical response in the presence of electron mediators. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2001;49:755–7.
- [4] Hrapovic S, Liu Y, Male KB, Luong JHT. Electrochemical Biosensing Platforms Using Platinum Nanoparticles and Carbon Nanotubes. Anal Chem 2004;76:1083–8. doi:10.1021/ac035143t.
- [5] Yang M, Yang Y, Liu Y, Shen G, Yu R. Platinum nanoparticles-doped sol-gel/carbon nanotubes composite electrochemical sensors and biosensors. Biosens Bioelectron 2006;21:1125–31. doi:10.1016/j.bios.2005.04.009.
- [6] Hanania GI, Irvine DH, Eaton WA, George P. Thermodynamic aspects of the potassium hexacyano-ferrate (III)-(II) system. II. Reduction potential. J Phys Chem 1967;71:2022–30.
- [7] Bindra P, Gerischer H, Peter LM. The dependence of the rate of the  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  couple on ionic strength in concentrated solutions. J Electroanal Chem Interfacial Electrochem 1974;57:435–8. doi:10.1016/S0022-0728(74)80071-9.
- [8] Beriet C, Pletcher D. A microelectrode study of the mechanism and kinetics of the ferro/ferricyanide couple in aqueous media: The influence of the electrolyte and its concentration. Int J Devoted Asp Electrode Kinet Interfacial Struct Prop Electrolytes Colloid Biol Electrochem 1993;361:93–101. doi:10.1016/0022-0728(93)87042-T.
- [9] Kawiak J, Jędral T, Galus Z. A reconsideration of the kinetic data for the  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  system. J Electroanal Chem Interfacial Electrochem 1983;145:163–71. doi:10.1016/S0022-0728(83)80301-5.
- [10] Gammoudi I, Blanc L, Moroté F, Grauby-Heywang C, Boissière C, Kalfat R, et al. High sensitive mesoporous  $\text{TiO}_2$ -coated love wave device for heavy metal detection. Biosens Bioelectron 2014;57:162–70.
- [11] Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. Science 1997;277:1232. doi:10.1126/science.277.5330.1232.
- [12] Clark SL, Hammond PT. The Role of Secondary Interactions in Selective Electrostatic Multilayer Deposition. Langmuir 2000;16:10206–14. doi:10.1021/la000418a.

- [13] Lu H, Hu N. Loading Behavior of {Chitosan/Hyaluronic Acid}  $n$  Layer-by-Layer Assembly Films toward Myoglobin: An Electrochemical Study. *J Phys Chem B* 2006;110:23710–8. doi:10.1021/jp063550d.
- [14] Cho J, Char K, Hong J-D, Lee K-B. Fabrication of Highly Ordered Multilayer Films Using a Spin Self-Assembly Method. *Adv Mater* 2001;13:1076–8. doi:10.1002/1521-4095(200107)13:14<1076::AID-ADMA1076>3.0.CO;2-M.
- [15] Lefaux CJ, Zimberlin JA, Dobrynin AV, Mather PT. Polyelectrolyte spin assembly: Influence of ionic strength on the growth of multilayered thin films. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2004;42:3654–66. doi:10.1002/polb.20209.
- [16] Lee S-S, Lee K-B, Hong J-D. Evidence for Spin Coating Electrostatic Self-Assembly of Polyelectrolytes. *Langmuir* 2003;19:7592–6. doi:10.1021/la034263t.
- [17] Patel PA, Dobrynin AV, Mather PT. Combined Effect of Spin Speed and Ionic Strength on Polyelectrolyte Spin Assembly. *Langmuir* 2007;23:12589–97. doi:10.1021/la7020676.
- [18] Elzbieciak M, Kolasińska M, Zapotoczny S, Krastev R, Nowakowska M, Warszyński P. Nonlinear growth of multilayer films formed from weak polyelectrolytes. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp* 2009;343:89–95. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.01.034.
- [19] Guillaume-Gentil O, Semenov OV, Zisch AH, Zimmermann R, Vörös J, Ehrbar M. pH-controlled recovery of placenta-derived mesenchymal stem cell sheets. *Biomaterials* 2011;32:4376–84. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.058.
- [20] Cranford SW, Ortiz C, Buehler MJ. Mechanomutable properties of a PAA/PAH polyelectrolyte complex: rate dependence and ionization effects on tunable adhesion strength. *Soft Matter* 2010;6:4175. doi:10.1039/c0sm00095g.
- [21] An M, Hong J-D. Surface modification of hafnia with polyelectrolytes based on the spin-coating electrostatic self-assembly method. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp* 2009;348:301–4. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.07.009.
- [22] M V Voinova and M Rodahl and M Jonson and B Kasemo. Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach. *Phys Scr* 1999;59:391.
- [23] Deligöz H, Tieke B. QCM-D study of layer-by-layer assembly of polyelectrolyte blend films and their drug loading-release behavior. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp* 2014;441:725–36. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.10.033.
- [24] Liu G, Zhao J, Sun Q, Zhang G. Role of Chain Interpenetration in Layer-by-Layer Deposition of Polyelectrolytes. *J Phys Chem B* 2008;112:3333–8. doi:10.1021/jp710600f.
- [25] Lavalle P, Gergely C, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, et al. Comparison of the Structure of Polyelectrolyte Multilayer Films Exhibiting a Linear and an Exponential Growth Regime: An in Situ Atomic Force Microscopy Study. *Macromolecules* 2002;35:4458–65. doi:10.1021/ma0119833.
- [26] Poptoshev E, Schoeler B, Caruso F. Influence of Solvent Quality on the Growth of Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* 2004;20:829–34. doi:10.1021/la035485u.

- [27] Ruths J, Essler F, Decher G, Riegler H. Polyelectrolytes I: Polyanion/Polycation Multilayers at the Air/Monolayer/Water Interface as Elements for Quantitative Polymer Adsorption Studies and Preparation of Hetero-superlattices on Solid Surfaces †. *Langmuir* 2000;16:8871–8. doi:10.1021/la000257a.
- [28] Takita R, Okamura Y, Endo Y, Anzai J. Redox Properties of Ferricyanide Ion on Layer-by-Layer Thin Film-Coated Gold Electrodes; Effects of Type of Polycationic Components in the Film. *Electroanalysis* 2006;18:1627–30. doi:10.1002/elan.200603564.
- [29] Noguchi T, Anzai J. Redox Properties of the Ferricyanide Ion on Electrodes Coated with Layer-by-Layer Thin Films Composed of Polysaccharide and Poly(allylamine). *Langmuir* 2006;22:2870–5. doi:10.1021/la053226u.
- [30] Wang B, Anzai J. Redox Reactions of Ferricyanide Ions in Layer-by-Layer Deposited Polysaccharide Films: A Significant Effect of the Type of Polycation in the Films. *Langmuir* 2007;23:7378–84. doi:10.1021/la070119m.
- [31] Pardo-Yissar V, Katz E, Lioubashevski O, Willner I. Layered Polyelectrolyte Films on Au Electrodes: Characterization of Electron-Transfer Features at the Charged Polymer Interface and Application for Selective Redox Reactions. *Langmuir* 2001;17:1110–8. doi:10.1021/la000729l.
- [32] Harris JJ, Bruening ML. Electrochemical and in Situ Ellipsometric Investigation of the Permeability and Stability of Layered Polyelectrolyte Films. *Langmuir* 2000;16:2006–13. doi:10.1021/la990620h.
- [33] Laurent D, Schlenoff JB. Multilayer assemblies of redox polyelectrolytes. *Langmuir* 1997;13:1552–7.
- [34] Wang Q, Ye L, Wang L, Li P, Cao Y, Li Y. Rapid nanopatterning technique based on monolayer silica nanosphere close-packing by spin coating. *Sci China Technol Sci* 2016;59:1573–80. doi:10.1007/s11431-016-0316-2.
- [35] Shinde SS, Park S, Shin J. Spin synthesis of monolayer of SiO<sub>2</sub> thin films. *J Semicond* 2015;36:043002. doi:10.1088/1674-4926/36/4/043002.
- [36] Chirea M, Garc?a-Morales V, Manzanares JA, Pereira C, Gulaboski R, Silva F. Electrochemical Characterization of Polyelectrolyte/Gold Nanoparticle Multilayers Self-Assembled on Gold Electrodes. *J Phys Chem B* 2005;109:21808–17. doi:10.1021/jp0537815.
- [37] Wang M, Wang L, Wang G, Ji X, Bai Y, Li T, et al. Application of impedance spectroscopy for monitoring colloid Au-enhanced antibody immobilization and antibody–antigen reactions. *Biosens Bioelectron* 2004;19:575–82. doi:10.1016/S0956-5663(03)00252-5.
- [38] Jazayeri MH, Amani H, Pourfatollah AA, Pazoki-Toroudi H, Sedighimoghaddam B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sens Bio-Sens Res* 2016;9:17–22. doi:10.1016/j.sbsr.2016.04.002.
- [39] Settingington EB, Alocilja EC. Electrochemical Biosensor for Rapid and Sensitive Detection of Magnetically Extracted Bacterial Pathogens. *Biosensors* 2012;2:15–31. doi:10.3390/bios2010015.

- [40] Geng P, Zhang X, Teng Y, Fu Y, Xu L, Xu M, et al. A DNA sequence-specific electrochemical biosensor based on alginic acid-coated cobalt magnetic beads for the detection of *E. coli*. *Biosens Bioelectron* 2011;26:3325–30. doi:10.1016/j.bios.2011.01.007.
- [41] Varshney M, Li Y. Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle–antibody conjugates for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples. *Biosens Bioelectron* 2007;22:2408–14. doi:10.1016/j.bios.2006.08.030.

## Annexes – Chapitre 5

### A. Caractérisation électrochimique de l'électrode d'or nue

#### Des électrodes commerciales non parfaitement similaires

De nombreuses expériences de voltamétrie cyclique étant entreprises, pour les diverses étapes de fonctionnalisation, les vérifications de reproductibilité et répétabilité, il nous faut avant tout savoir si les électrodes peuvent être comparées entre elles, sans aucun post-traitement. Aussi, les réponses électrochimiques d'une dizaine d'électrodes d'or nues, en présence de PBS 1x contenant 10 mM de Fe(II), ont été enregistrées. Les voltamogrammes obtenus témoignent de la variabilité de ces électrodes (Figure 156) en termes de comportement électrochimique, probablement due à une surface de travail et à une rugosité différentes.

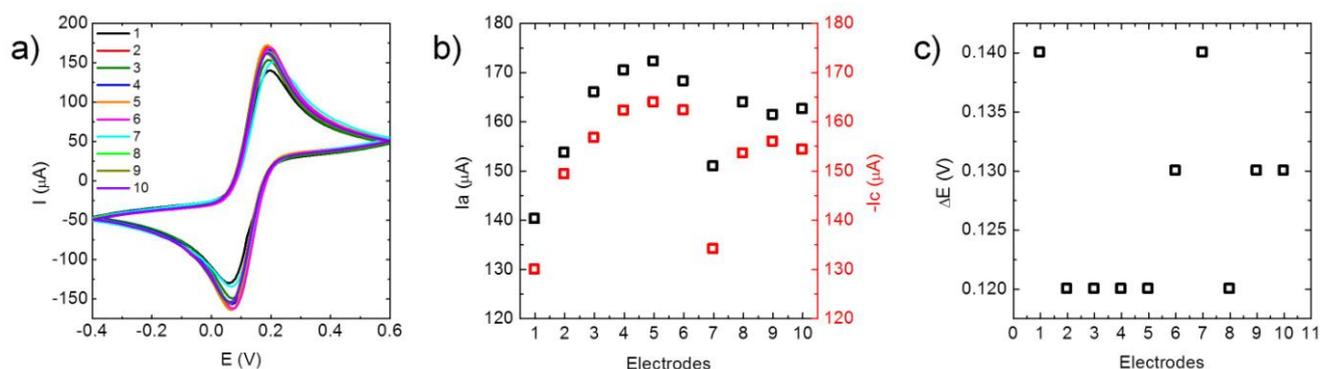


Figure 156. Comparaison du comportement électrochimique d'une dizaine d'électrodes d'or nues (Metrohm), en présence d'une même solution de PBS 1x contenant 10 mM de Fe(II). a) Voltamogrammes dont sont issus les (b) intensités des pics d'oxydo-réduction et (c) les écarts de potentiel entre ces pics.

Les électrodes présentent les caractéristiques suivantes :  $I_a = 161 \pm 10 \mu\text{A}$  ;  $I_c = 152 \pm 12 \mu\text{A}$  et  $\Delta E = 0.13 \pm 0.01 \text{ V}$ . Leur réponse peut donc varier de  $\pm 8\%$  par rapport à la moyenne, variation non négligeable étant donnés les potentiels changements attendus induits par les étapes de fonctionnalisation. Si, par exemple, nous considérons les intensités extrêmes des pics d'oxydation obtenues (1 *vs* 5), une variation de 25 % est obtenue en valeur absolue. En conséquence, comparer les valeurs absolues des courants et des potentiels d'oxydo-réduction pour diverses électrodes n'aurait pas de sens. C'est pourquoi, lorsque plusieurs expériences seront à confronter, les comparaisons se feront sur des valeurs relatives / normalisées au signal de l'électrode d'or nue initiale. Les variations constatées seront donc uniquement dues aux

processus de fonctionnalisation ou de détection, et non à la variabilité des réponses initiales d'électrodes commerciales.

### Le couple ferricyanure/ferrocyanure, un couple quasi-rapide

Contrairement à nombre d'articles, dans les conditions expérimentales mentionnées dans le manuscrit, le couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  est apparu comme un couple quasi-rapide. L'électrolyte utilisé, le PBS 1x, a été choisi car il est compatible à cette concentration avec la présence future d'anticorps et de bactéries. Cependant, les caractéristiques électrochimiques d'un couple oxydant / réducteur, dépendent de la nature de l'électrolyte. Aussi, nous avons testé ce couple dans des électrolytes différents :

- en faisant varier la concentration de l'électrolyte :  $C(\text{PBS}) = \{1x ; 10x\}$ ,
- en changeant l'électrolyte : NaCl 100 mM au lieu du PBS.

Les résultats sont présentés sur la Figure 157. La première chose à noter, quelque soit l'électrolyte support, est la dépendance linéaire des intensités des pics d'oxydo-réduction avec la racine carrée de la vitesse de balayage,  $v^{1/2}$ . Une dépendance linéaire est également constatée lors du changement de concentration de l'espèce électroactive (résultat non montré). Ceci est en accord avec la formule :

$$j_p = -(2,69 \times 10^5) n^{3/2} D_{Ox}^{1/2} v^{1/2} C_{Ox}^{Sol} \quad (47)$$

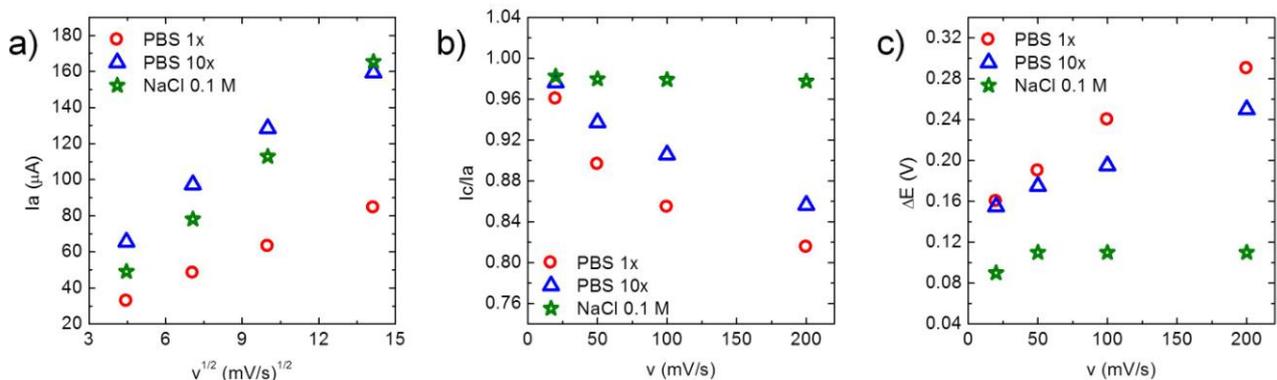


Figure 157. Influence de la vitesse de balayage sur les caractéristiques des voltamogrammes de l'électrode d'or nue plongée dans différents électrolytes contenant du Fe(II) à 6 mM : (a) intensité du pic d'oxydation, (b) rapport des intensités d'oxydo-réduction et (c) écart de potentiel entre les pics d'oxydo-réduction.

Par ailleurs, quelque soit la concentration en PBS : (i) le rapport  $I_c/I_a$  est inférieur à 1 quelle que soit la vitesse de balayage et (ii) la différence de potentiel varie avec la vitesse de balayage. Ceci est caractéristique d'un couple quasi-rapide, et non rapide. En revanche, lorsque le sel de fond NaCl seul, est concentré à 100 mM, le couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  semble retrouver les caractéristiques d'un couple rapide, comme attendu : (i) un rapport  $I_c/I_a$  très proche de 1, ne variant pas avec la vitesse de balayage et (ii)

un écart de potentiel constant qui ne dépend plus de la vitesse de balayage. Toutefois, la valeur de ce dernier (0.11 V) reste supérieure aux 59 mV théoriques attendus pour un échange monoélectronique.

Ainsi, considérant l'invariance des caractéristiques du couple quasi-rapide  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/4-$  parmi ces électrolytes et gardant pour objectif leur utilisation avec des anticorps et des bactéries, avons-nous adopté comme électrolyte support le PBS 1x contenant du  $\text{Fe}(\text{II})$  à 10 mM.

## B. Caractérisation électrochimique d'un dépôt de $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$ 200

Nous avons souhaité comparer le comportement en voltamétrie cyclique de NPs chargées positivement ( $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$  100) et négativement ( $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  200). Les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$ , utilisées, dans le cadre de la détection, présentent un signal électrochimique inchangé comparé à celui obtenu avec une PEM 6 (de charge de surface identique), en termes d'intensité et de potentiel. La Figure 158a présente les CV obtenus sur des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  200, concentrées à 5 g/L, et déposées par *spin coating* ( $t = 20$  s,  $\omega = 200$  tours/min.) dans les mêmes conditions que les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^+$ .

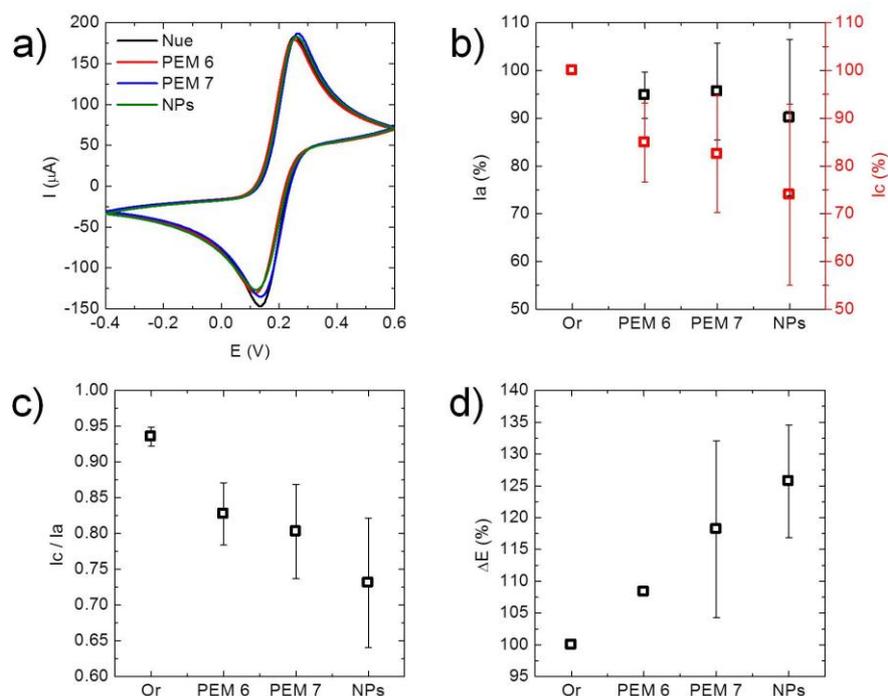


Figure 158. Expériences de voltamétrie cyclique réalisées sur des dépôts de  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  200 faits par SC. A) Voltamogrammes. Influence de ce dépôt sur (b) les intensités des pics d'oxydo-réduction, (c) le rapport de ces intensités et (d) la différence de potentiel entre ces pics. Les moyennes et les écarts types représentés sont issus de trois expériences indépendantes.

Une couche de PAH, chargée positivement, est ajoutée à la PEM 6 (obtention d'une PEM 7) afin d'immobiliser les NPs par interactions électrostatiques. Le pic d'oxydation

est peu modifié par la présence de NPs. En revanche l'intensité du pic de réduction diminue et la différence de potentiel entre ces deux pics augmente. Ceci témoigne d'un ralentissement du transfert de charge. Ceci est cohérent avec la présence d'ions  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ , chargés négativement comme les NPs déposées.

Ces modifications, relativement peu importantes ( $\approx 10\%$ ) dans le cadre de la méthode SC, sont très élevées lors du dépôt direct des  $\text{SiO}_2$ -NPs 200, par « *dip coating* » (Figure 159). Les NPs sont alors déposées sur l'électrode de travail, par séchage de la goutte. La méthode *dip coating* favorise un nombre extrêmement important de NPs adsorbées à la surface de la PEM ; les charges négatives en surface sont donc beaucoup plus nombreuses et ralentissent d'autant plus les échanges entre le transducteur et la solution contenant  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ .

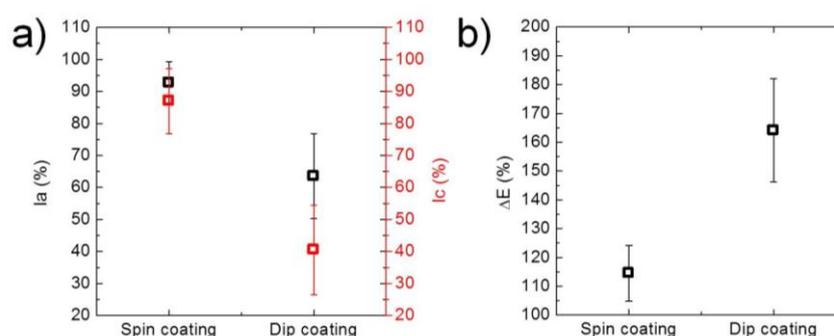


Figure 159. Influence de la méthode de dépôt des  $\text{SiO}_2$ -NPs 200 sur le signal de voltamétrie cyclique : (a) les intensités des pics d'oxydo-réduction et (b) la différence de potentiel associé à ces pics.



# Conclusions et perspectives

## Conclusions

Ces travaux, portant sur l'interaction NPs – bactéries, ont, dans un premier temps, mis en évidence les caractéristiques morphologique mais surtout membranaire de deux souches bactériennes. Ils démontrent, pour la première fois à notre connaissance, l'organisation et la structuration particulières des molécules de la membrane externe (OM) (essentiellement les LPS) de bactéries à Gram négatif, comme *E. coli*. Ces LPS présentent une séparation de phase, associée à un relief particulier (structure *ripples*), due à une conformation plus ou moins organisée et/ou rigide des molécules au sein de la membrane. Cette structuration est absente dans le cas de bactéries à Gram positif, comme *B. subtilis*, ne possédant pas de OM, et présentant, donc, une surface homogène, en termes de topographie et de propriétés mécaniques.

D'un point de vue fondamental, cette étude a également mis en évidence l'existence d'un diamètre critique,  $50 \text{ nm} < \Phi_c < 80 \text{ nm}$ , en deçà duquel les  $\text{SiO}_2$ -NPs acquièrent une activité antibactérienne. Concernant les bactéries *E. coli*, cette activité s'entend au sens de dégradations morphologiques (changement de morphologie) et membranaires (invaginations, désorganisation de la structure *ripples* de la OM), impliquant potentiellement la lyse cellulaire. L'étude a également démontré le rôle de la charge surfacique des  $\text{SiO}_2$ -NPs dans leurs interactions avec les bactéries. Contrairement aux NPs chargées négativement, les particules chargées positivement favorisent les attractions électrostatiques avec les bactéries et induisent, quelle que soit leur taille, des dégradations morphologiques et non membranaires, éventuellement associées à une lyse. Ces conclusions, en termes de toxicité des  $\text{SiO}_2$ -NPs selon leur taille et leur charge, sont indépendantes de la présence ou non d'une OM chez la bactérie. Toutefois, l'étude sur *B. subtilis* montre, qu'en absence de OM, aucune dégradation membranaire de type invagination n'est constatée, suggérant que les NPs affectent uniquement la OM de la bactérie. Malgré cela, la lyse cellulaire est observée pour des diamètres de  $\text{SiO}_2$ -NPs inférieurs à  $\Phi_c$ , démontrant que les phénomènes de toxicité associés à ces NPs impliquent une action plus profonde que celle sur la membrane. Par ailleurs, il est important de noter que les tests de viabilité, couramment utilisés dans le cadre d'études toxicologiques, n'ont pas été concluants dans le cadre de cette thèse. Ils induisent, en effet, des biais conséquents, dûs à l'agrégation ou l'isolement des bactéries (exposées ou non à des NPs), dont il faut tenir compte dans l'interprétation de l'interaction NPs - bactéries.

D'un point de vue appliqué, ces travaux de thèse ont permis la conception d'un biocapteur électrochimique pour la détection de bactéries *E. coli*. Ce biocapteur se compose d'un assemblage de différentes couches : (i) une multicouche de polyélectrolytes (PAH-PSS)<sub>3</sub>, garantissant la fixation électrostatique des NPs et (ii) des  $\text{SiO}_2$ -NPs<sup>+</sup> 100 auxquelles sont greffés des anticorps spécifiques à *E. coli*, garantissant

la détection bactériologique. Les SiO<sub>2</sub>-NPs 100 ont été choisies pour leur caractère inerte / inoffensif vis-à-vis d'*E. coli*, précédemment démontré lors de l'étude fondamentale. L'usage des dites NPs a permis une détection améliorée, en termes de sensibilité et de gamme de concentration cellulaire détectable (sans saturation), comparé à un biocapteur classique, uniquement basé sur la reconnaissance d'*E. coli* par anticorps. Une gamme de concentration allant de 8.10<sup>6</sup> à 5.10<sup>8</sup> CFU/mL a pu être détectée en 15 min. avec une limite de détection de l'ordre de 10<sup>6</sup> CFU/mL. Enfin, la spécificité du biocapteur pour la détection de *E. coli* a été validée par son absence de détection en présence d'une autre souche bactérienne (*Pseudomonas fluorescens*).

## Perspectives

Ces travaux de thèse ont permis de répondre à un certain nombre de problèmes, tant fondamentaux, concernant la toxicité de NPs envers les bactéries, qu'appliqués, concernant la conception d'un biocapteur électrochimique. Toutefois, nombre de questions restent encore non résolues. Dans le cadre de la première étude, il serait notamment intéressant de déterminer l'influence de la concentration et du temps d'exposition des NPs sur leur activité potentiellement antibactérienne. Ce travail, partiellement entrepris au cours de cette thèse, permettrait, par exemple, de fixer certaines normes pour les émissions industrielles de NPs ou leur intégration dans les produits de la vie quotidienne. De plus, des dégradations morphologiques et membranaires ayant été observées pour certaines NPs, il serait opportun d'étudier leurs effets sur les propriétés visco-élastiques et adhésives des bactéries. Il est, en effet, envisageable de penser que de telles dégradations sont liées à une modification de ces propriétés mécaniques. L'AFM est un outil particulièrement bien adapté à ces thématiques, permettant à la fois l'imagerie et la spectroscopie de force des échantillons. Dans cette perspective, une étude sur des courbes de force, renseignant sur les propriétés de rigidité et d'adhésion, a débuté en collaboration avec JPK Instruments. Elle a déjà montré des comportements significativement différents de la raideur d'*E. coli* en présence ou non de NPs, et ce quel que soit le diamètre des NPs. Enfin, une étude approfondie en cryo-microscopie et/ou en microscopie confocale de fluorescence (en marquant certains constituants cellulaires) permettrait de répondre à la question essentielle de la pénétration ou non des NPs au sein de la cellule bactérienne, à l'origine ou non des dommages observés, notamment de la lyse cellulaire. L'ensemble de ces études complémentaires permettrait d'explicitier et de comprendre fondamentalement les interactions entre NPs et bactéries.

Dans le cadre de la seconde étude, des protocoles d'optimisation sont encore nécessaires afin de parvenir à une détection « record » des bactéries *E. coli*, objectif visé par nombre de travaux sur la conception de biocapteurs. Une telle amélioration est notamment envisagée par la conception d'électrodes « *home-made* » sérigraphiées, aux dimensions micrométriques contrôlées. Nous avons, en effet, noté des variations, pouvant atteindre 10 %, en termes d'intensité, entre les différentes électrodes commerciales utilisées au cours de ces travaux. Ces variations sont potentiellement

dues à des variations de la dimension des électrodes, mais également à leur revêtement. Dans l'idée d'une conception « *home-made* », il est également envisageable de déposer sur l'électrode de travail, par évaporation, un revêtement d'or dont la rugosité et l'épaisseur seraient parfaitement maîtrisées. Ainsi, la fonctionnalisation du transducteur serait parfaitement similaire à celle obtenue par AFM, dans le cadre des études d'optimisation réalisées sur mica.



---

# Annexes

## Sommaire

---

A.	Les monocouches de LPS, un modèle de la membrane externe d' <i>E. coli</i> .....	230
A.1	Motivations .....	230
A.2	Les techniques de Langmuir (- Blodgett) .....	231
A.3	Etude des monocouches de LPS .....	232
A.3.1	Etude à l'interface air / eau.....	232
A.3.2	Etude par AFM des films supportés .....	234
A.4	Discussion.....	238
A.4.1	L'organisation bi-phasique des molécules de LPS .....	238
A.4.2	La structure <i>ripples</i> d' <i>E. coli</i> , reflet de l'organisation des LPS.....	239
B.	Etude nanomécanique de l'interaction NPs / <i>E. coli</i> .....	241
B.1	Une caractérisation en milieu liquide.....	241
B.2	Module élastique d' <i>E. coli</i> .....	242
B.3	Effet des SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>-</sup> sur l'élasticité d' <i>E. coli</i> .....	246
	Bibliographie.....	252
C.	Publications.....	255

---

# A. Les monocouches de LPS, un modèle de la membrane externe d'*E. coli*

## A.1 Motivations

La séparation de phase, associée à un relief spécifique, observée à la surface de la bactérie Gram négative *E. coli* a fait l'objet d'une attention particulière au cours de ces travaux de thèse. N'étant pas observée sur les bactéries à Gram positif, *B. subtilis*, elle a été attribuée à l'organisation des molécules de la membrane externe (OM) d'*E. coli*, plus particulièrement aux lipopolysaccharides (LPS), constituants majoritaires de cette OM [1]. Aussi, avons-nous souhaité étudier ces LPS seuls afin de confirmer cette hypothèse.

Les LPS sont des molécules amphiphiles, composées de trois parties (Figure 160) :

- le lipide A, pôle hydrophobe, permet d'ancrer la molécule dans la bicouche phospholipidique de la membrane externe ;
- le noyau polysaccharidique, enchaînement de monosaccharides, contient des groupes phosphates qui confèrent, avec ceux du lipide A, une charge négative à la molécule ;
- l'antigène O, enchaînement de molécules glucidiques, confère la spécificité antigénique à la molécule.

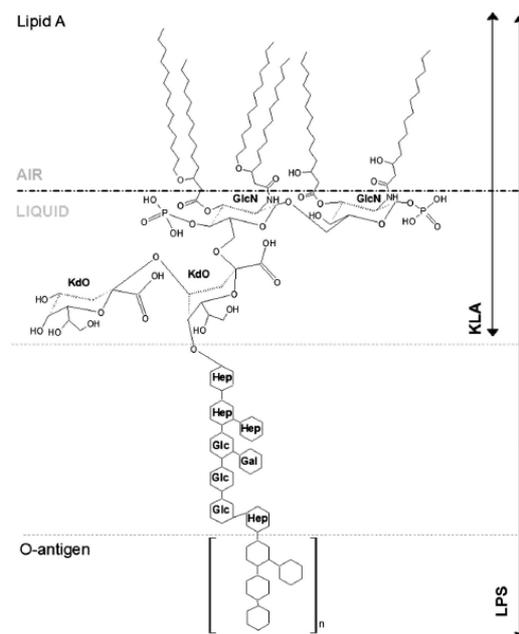


Figure 160. Schéma représentatif de la structure d'une molécule de LPS et son orientation à l'interface air / eau [2].

Cette étude s'est concentrée sur la réalisation d'un modèle membranaire constitué d'une monocouche de LPS à l'interface air / eau (monocouche de Langmuir) et sur son transfert sur un substrat plan, le mica (film de Langmuir-Blodgett). Ces méthodes sont particulièrement adaptées à l'étude de molécules biologiques amphiphiles, pour tester

l'influence des conditions environnementales sur leur comportement et comprendre, sur un modèle membranaire simplifié, les interactions qui existent entre ces molécules et de potentiels hôtes [3–5]. Par ailleurs, la microscopie à force atomique (AFM) est un outil pertinent pour caractériser à l'échelle du nanomètre, ces modèles membranaires simplifiés, après leur transfert, d'un point de vue à la fois morphologique et mécanique [6–8].

## A.2 Les techniques de Langmuir (- Blodgett)

Expérimentalement, les monocouches de Langmuir (ici de LPS) sont formées à l'interface air / eau (Figure 161a). Une solution contenant les molécules à étudier, solubilisées dans un mélange de solvants organiques adaptés, est déposée à la surface de la sous-phase aqueuse, remplissant une cuve en téflon, dite cuve de Langmuir. Après évaporation des solvants, une compression est exercée à l'aide de barrières placées à la surface, forçant les molécules à se regrouper et s'organiser en une monocouche : les groupes hydrophiles sont en contact avec la solution aqueuse tandis que les chaînes hydrophobes sont en contact avec l'air.

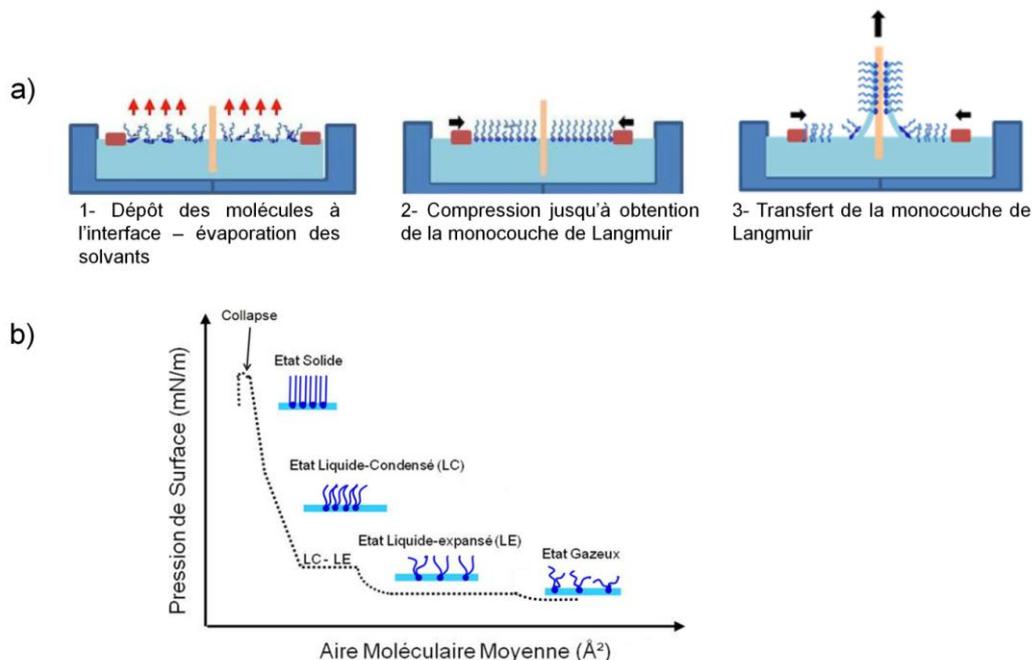


Figure 161. a) Schémas illustrant la formation et le transfert d'une monocouche de Langmuir. b) Isotherme illustrant le comportement « théorique » d'une monocouche lipidique, transitant par différentes organisations et phases.

Au cours de la compression, l'aire moléculaire moyenne occupée par les lipides,  $AMM$ , et la pression de surface,  $\pi$ , sont suivies. L' $AMM$  est définie comme le rapport entre la surface occupée par les lipides,  $S$ , et le nombre de lipides,  $N$  :  $AMM = \frac{S}{N}$ . La pression de surface  $\pi$ , quant à elle, est définie comme la variation de tension superficielle  $\gamma$  de l'interface :  $\pi = \gamma_0 - \gamma$  où  $\gamma_0$  est la tension superficielle de l'eau pure ( $\gamma_0 = 72 \text{ mN/m}$  à température ambiante).

La compression augmentant, la tension de surface diminue du fait d'un film monomoléculaire de plus en plus dense, et donc  $\pi$  augmente. Dans le même temps, l'AMM diminue. La courbe  $\pi = f(\text{AMM})$  est appelée isotherme de compression car la température, facteur pouvant impacter fortement le comportement des molécules, est maintenue constante. Cet isotherme permet de définir les différentes phases par lesquelles la monocouche est susceptible de transiter au cours de la compression (Figure 161b) :

- la phase gazeuse en tout début de compression : les molécules sont isolées et sans interaction mutuelle du fait de la faible densité des molécules ;
- la phase liquide expansé (LE) : les molécules se redressent mais les chaînes sont désordonnées et il existe peu d'interaction entre les molécules ;
- la phase liquide condensé (LC) : les chaînes sont étirées et ordonnées et les interactions importantes ;
- la phase solide caractérisée par le fait que l'AMM corresponde approximativement à la section droite de la molécule ;
- le collapse (rupture de la monocouche et formation irréversible d'empilements).

Un fois la monocouche formée à l'interface, il est possible de la déposer sur un support plan, par un transfert de Langmuir-Blodgett (LB), transfert réalisé à une pression fixe (Figure 161a). Le dispositif expérimental est le même que précédemment avec l'ajout perpendiculairement à la surface de la cuve, et avant étalement, d'une barrette de mica reliée à un moteur permettant son immersion ou son émergence à une vitesse contrôlée. Lors de l'émergence de la barrette de mica, la pression de surface est maintenue constante (afin de maintenir constante la cohésion moléculaire du début à la fin du prélèvement) en ajustant de manière continue la surface entre les barrières de compression. Une partie des lipides est ainsi transférée sous la forme d'une monocouche organisée sur les deux faces du mica avec une fine couche d'eau (de l'épaisseur de l'ordre d'une dizaine d'ångströms) emprisonnée entre le support et la monocouche.

## A.3 Etude des monocouches de LPS

Les LPS ont été achetés chez Sigma Aldrich sous forme lyophilisée. Ils sont obtenus par extraction au phénol à partir d'une souche bactérienne différente de la nôtre. Ils sont utilisés, sans purification supplémentaire, et solubilisés dans un mélange de solvants : chloroforme-éthanol (9:1 en volume) à une concentration finale de 0.5 mg/mL.

### A.3.1 Etude à l'interface air / eau

La Figure 162a présente l'isotherme de compression d'une monocouche de LPS. Une augmentation de la pression de surface est observée à partir d'une AMM de  $120 \text{ \AA}^2$ . Cette pression augmente régulièrement avec la compression jusqu'à l'apparition d'une rupture de pente aux alentours de  $22 \text{ mN/m}$  pour une AMM d'environ  $65 \text{ \AA}^2$ . Cette rupture pourrait être due (i) à une transition entre une phase fluide et une phase

condensée, (ii) à un changement d'orientation des molécules au sein de la monocouche ou (iii) à une solubilisation partielle des molécules de LPS.

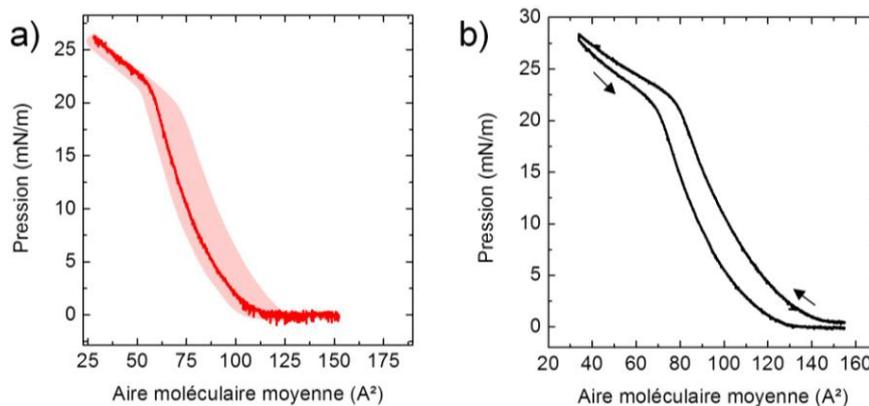


Figure 162. Isothermes de compression d'une monocouche de LPS ( $C = 0.5 \text{ mg/mL}$ ) déposée à l'interface air / eau. a) Isotherme représentative (moyennée) de l'ensemble des expériences réalisées, associée à la gamme d'AMM dans laquelle elle peut varier (zone rouge). b) Isotherme de compression puis décompression de la monocouche de LPS.

Par ailleurs, les LPS présentent un comportement différent entre leur compression et leur décompression (Figure 162b). Les isothermes ne se superposent pas et forment une hystérèse : un décalage vers les AMM plus faibles est noté lors de la décompression. Ceci suggère que ces molécules s'organisent de manière différente, pour une pression de surface donnée, lorsqu'elles sont décomprimées, et ne retournent pas à leur état initial à cette pression.

Enfin, des variations ont été relevées, en termes d'AMM, sur les différentes isothermes réalisées au cours de différentes périodes, et sur des solutions de LPS indépendantes (Figure 162a). Ces variations pourraient s'expliquer par l'inhomogénéité des dites solutions. En effet, lors de la solubilisation des LPS dans un mélange chloroforme – éthanol (9:1 en volume), la solution présente un aspect « floconneux », des agrégats de poudre ne s'étant pas parfaitement dissous. Il est ainsi probable que la concentration annoncée de  $0.5 \text{ mg/mL}$  (et donc le nombre de molécules de LPS déposées à l'interface) ne soit pas parfaitement défini, impliquant un calcul des AMM erroné au cours de la compression. Afin d'améliorer la solubilité des LPS, diverses solutions ont été réalisées (i) en modifiant le rapport volumique chloroforme/éthanol, (ii) en introduisant du méthanol à la place de l'éthanol ou (iii) en introduisant une faible quantité d'eau ou de diméthylsulfoxyde (DMSO). Certaines solutions ont également été soumises à sonication. Toutefois, aucune méthode n'a garanti une meilleure solubilité que celle obtenue dans le mélange initial de chloroforme / éthanol (9:1 en volume), certaines n'ont même donné aucune isotherme.

### A.3.2 Etude par AFM des films supportés

Afin de vérifier l'hypothèse d'une potentielle transition de phase, la monocouche de LPS a été transférée sur du mica à une pression constante de 25 mN/m. Cette pression est cohérente avec la gamme de pression supposée au sein d'une membrane cellulaire, et est suffisamment élevée pour maintenir la cohésion des molécules lors du transfert. De plus, elle se situe au-delà de la pression de transition, estimée à environ 22 mN/m. La courbe de transfert, appelée courbe isobare, témoigne des variations de l'AMM au cours du temps (Figure 163).

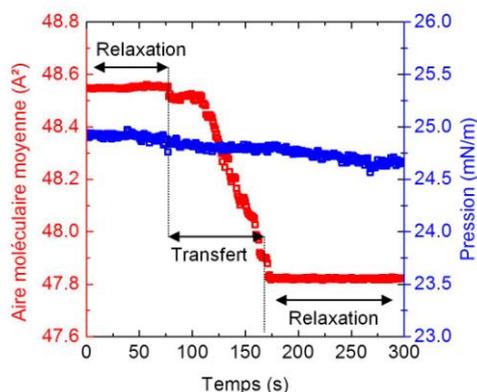


Figure 163. Courbes de transfert de la monocouche de LPS sur du mica, à une pression de 25 mN/m : maintien de la pression de surface et diminution de l'AMM.

Elle se décompose en trois parties :

- une diminution relativement faible de l'AMM, liée à la «relaxation» de la monocouche, *i.e.* à la réorganisation des lipides après l'arrêt de la compression ;
- une diminution importante de l'AMM, linéaire avec le temps (vitesse de transfert fixe : 2 mm/min.) alors que la pression est maintenue constante, correspondant au transfert effectif de la monocouche ;
- une stabilisation de l'AMM, une fois le transfert terminé.

Cette courbe de transfert confirme le transfert de la monocouche de LPS sur l'ensemble de la surface. La monocouche supportée a été, ensuite, caractérisée par AFM en mode *tapping*. La Figure 164 montre que le film n'est pas homogène : des domaines (zones claires), de forme et taille variables, sont répartis aléatoirement sur l'ensemble des zones imagées. Des domaines filiformes, allongés, ont été observés (Figure 164a) mais la majorité présente une forme plus ellipsoïdale dont l'axe principal varie entre 0.3 et 1  $\mu\text{m}$  de long (Figure 164b-c). Quelle que soit la forme de ces domaines, ils possèdent une hauteur constante,  $\Delta H$ , de  $6 \pm 1$  nm (Figure 164d). Par ailleurs, les zones environnant ces domaines présentent des hauteurs moindres (zones plus sombres). Elles ne présentent, de plus, aucun contraste topographique, à grande échelle, et sont donc apparemment homogènes. Toutefois, à échelle plus locale, leur rugosité de surface se révèle supérieure à celle du mica (Figure 164e), des agrégats couvrant l'ensemble de ces zones environnant les domaines, suggérant la présence d'un film de LPS, même dans ces zones. Ces observations confirment la présence d'un dépôt de LPS sur l'ensemble de

la surface et suggère que les LPS s'organisent en deux phases distinctes, en accord avec les isothermes : (i) une phase constituée des domaines hauts, plus condensée, que la seconde phase constituée du film environnant moins organisée.

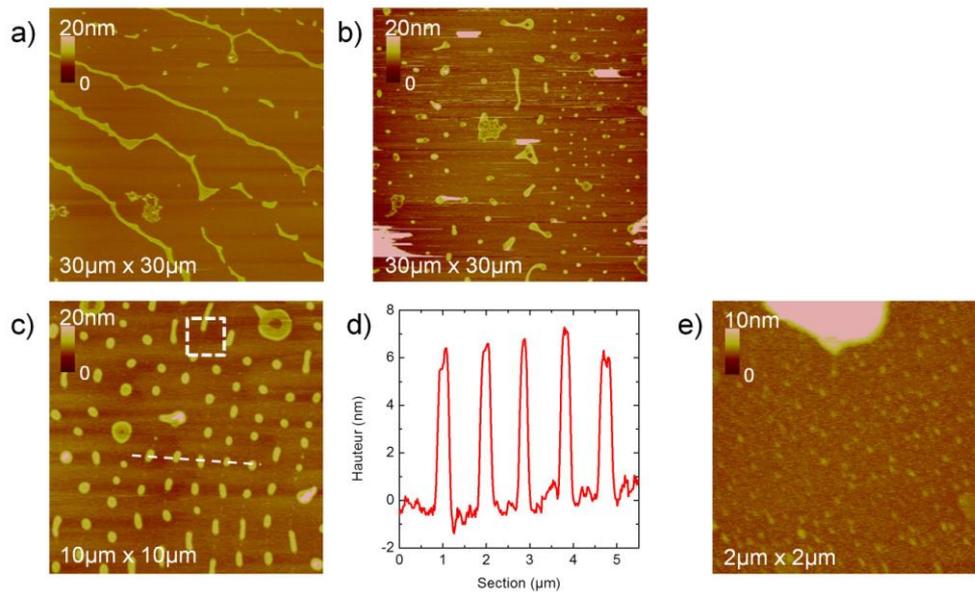


Figure 164. Images AFM de hauteur montrant l'organisation, à grande échelle, des molécules de LPS au sein d'une monocouche. a-c) Des domaines en phase condensée, de forme et taille variables, sont aléatoirement distribués. d) Profil de hauteur réalisé sur des domaines en phase condensée, selon le trait en pointillés sur l'image (c). e) Grossissement montrant l'inhomogénéité de la phase environnant les domaines : il s'agit probablement d'une phase lipidique fluide.

Lorsqu'un grossissement est effectué sur les domaines, les images montrent des bords aux caractéristiques différentes (i) du domaine et (ii) de la phase environnante (Figure 165, flèches).

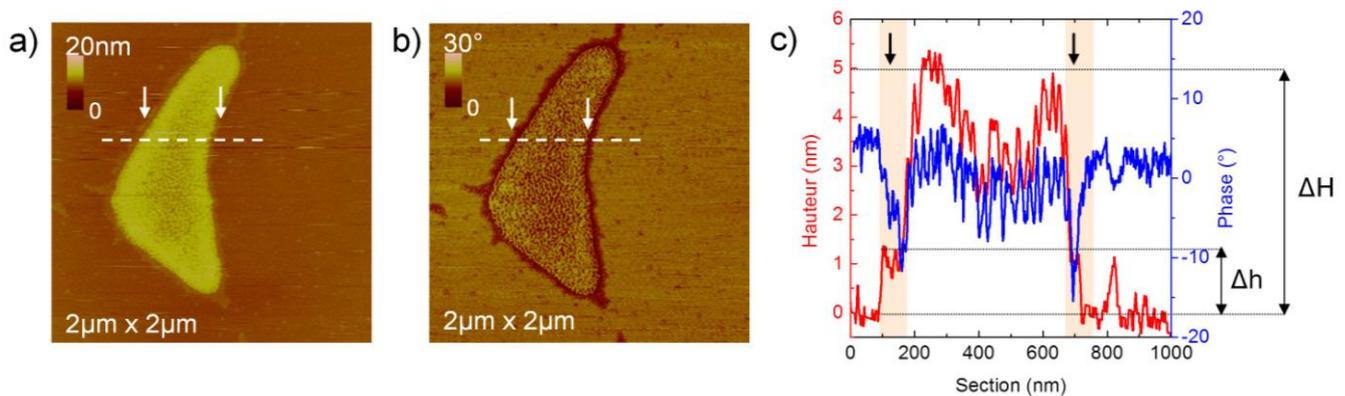


Figure 165. Images AFM (a) de hauteur et (b) de phase montrant un contraste topographique et de phase entre les différentes zones du film de LPS. c) Profils de hauteur et de phase, effectués selon les traits pointillés en (a-b).

En effet, l'image de topographie montre un contour du domaine plus sombre que ce dernier mais plus clair que la phase environnante : le contour possède donc une hauteur intermédiaire entre ces deux zones. D'autre part, l'image de phase montre un contour du domaine au contraste de phase plus sombre que l'ensemble des zones balayées. Un profil réalisé en travers du domaine montre que ses bords présentent une hauteur,  $\Delta h$ , d'environ 1 nm au dessus du milieu environnant, et une phase inférieure

(Figure 165c). Ils sont donc plus « mous » et probablement constitués de molécules moins organisées que leurs voisins du domaine et de la phase environnante plus fluide.

Par ailleurs, les zones environnantes présentent, à première vue, un contraste de phase similaire à celui des domaines (Figure 165b-c). Toutefois, à l'échelle du micron (voire nanométrique), ces zones ont un contraste de phase moins clair que les domaines, suggérant une organisation moins condensée et plus fluide (Figure 166b). De plus, ces zones sont constituées de petits agrégats (cf. Figure 164e et Figure 166) qui leur confèrent une hétérogénéité en contraste de phase (Figure 166b). En effet, ces agrégats peuvent avoir une phase soit (i) légèrement supérieure à l'ensemble de la zone environnante (agrégat 1) soit (ii) très inférieure (agrégat 2). On note également qu'au sein de l'agrégat 2, certaines zones sont plus répulsives tandis que l'agrégat 1 est, quant à lui, entouré d'une zone plus dissipative. Par conséquent, au sein de la phase environnant les domaines, certains groupements de molécules semblent avoir des organisations et / ou compositions différentes.

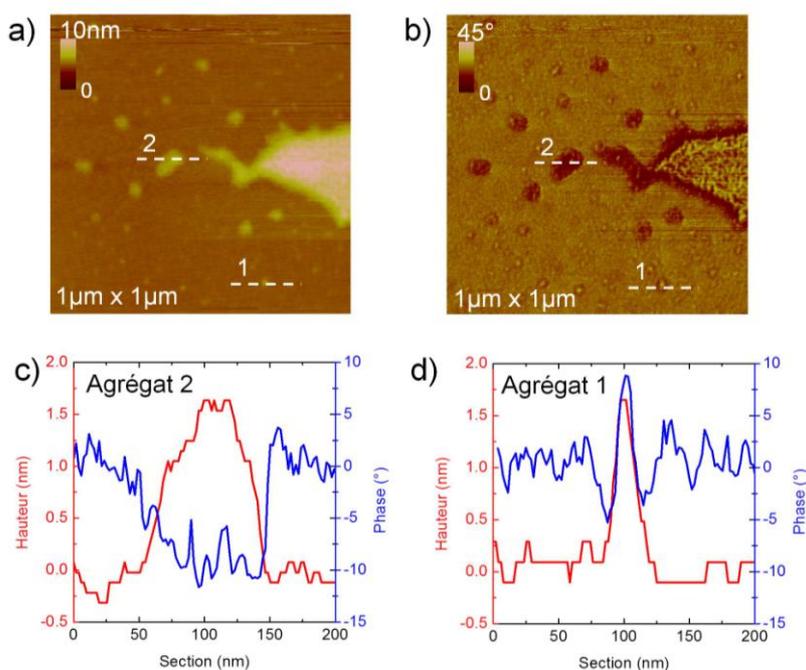


Figure 166. Images AFM (a) de hauteur et (b) de phase montrant la présence d'agrégats hétérogènes au sein de la zone environnant les domaines. c-d) Profils de hauteur et de phase, effectués selon les traits pointillés en (a-b) sur les agrégats 1 et 2.

La Figure 167 reprend une caractérisation AFM du film de LPS montrant la coexistence d'un domaine et d'une zone environnante composée de divers agrégats. Les profils de hauteurs et de phase montrent que (i) certains agrégats présentent la même hauteur et le même contraste de phase que les bords du domaine (Figure 167b) tandis que d'autres présentent la même hauteur que les bords du domaine mais un contraste de phase plus proche de celui du domaine (Figure 167a). Ces observations nous conduisent à émettre l'hypothèse d'une composition hétérogène, en termes d'organisation et d'hydratation, du film de LPS (Figure 167c). Par soucis de simplicité et de clarté, sont uniquement représentées les têtes hydrophiles, correspondant à

l'enchaînement des oligosaccharides et Ag O, et les queues carbonnées, correspondant au lipide A, des molécules de LPS (cf. Figure 160). Ainsi, à l'échelle micrométrique, l'organisation du film de LPS peut être vue de la manière suivante :

- des domaines hauts, assimilable à une phase condensée constituée de molécules « droites » et organisées ;
- un film moins élevé environnant, réparti sur l'ensemble du dépôt de LPS, assimilable à une phase plus fluide, due à une orientation « couchée » des molécules ;
- des frontières (bords) entre ces deux phases, probablement constituées de molécules aux orientations intermédiaires, et dont l'organisation est beaucoup plus fluide que l'ensemble du film. En effet, en raison de l'orientation et de l'organisation des molécules, leur état d'hydratation peut varier et conduire à une fluidité plus importante de certaines zones du film.

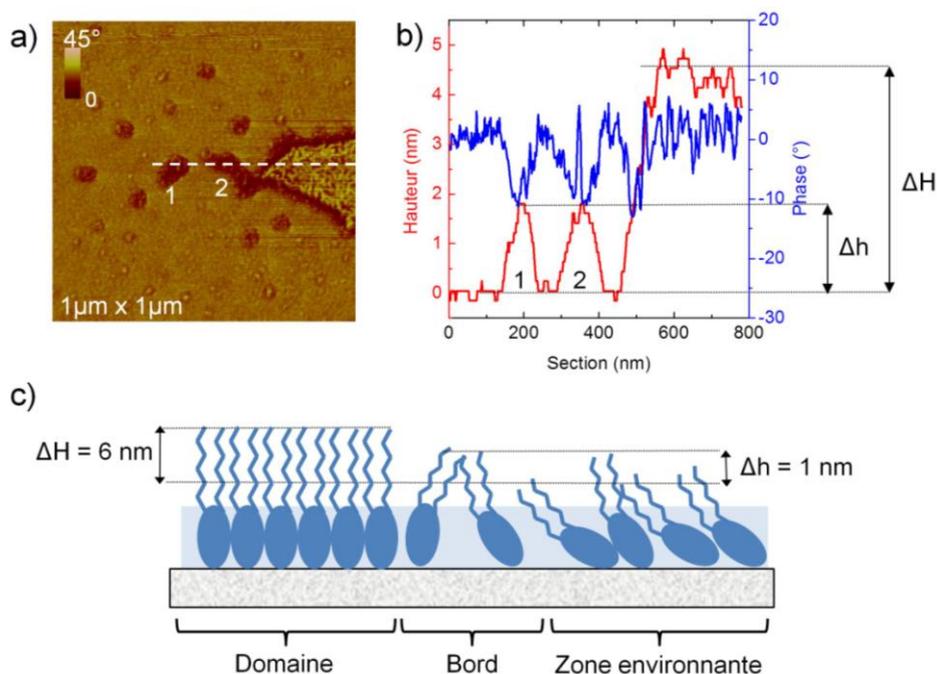


Figure 167. a) Images AFM de phase montrant l'hétérogénéité du film de LPS transféré sur mica. b) Profils de hauteur et de phase, effectués selon les traits pointillés en (a). c) Schéma simplifié de la composition hypothétique du film de LPS : les domaines sont plus organisés et condensés que la phase environnante probablement constituée de molécules de LPS davantage « couchées », la frontière entre ces deux phases (les bords du domaine) présentant des orientations intermédiaires.

Enfin, à l'échelle submicrométrique, les domaines ne sont pas parfaitement homogène comme le laissait penser les balayages plus larges de la surface : ils présentent des contrastes, topographique et de phase, particuliers (Figure 165). Aussi, les molécules de LPS constituant ces domaines possèdent probablement une structuration spécifique, intrinsèque. Afin de l'observer, un grossissement plus important est effectué qui montre la coexistence de zones plus ou moins sombres, tant

en topographie qu'en phase, donc la coexistence de zones plus ou moins hautes associées à des contrastes de phase différents (**Error! Reference source not found.**).

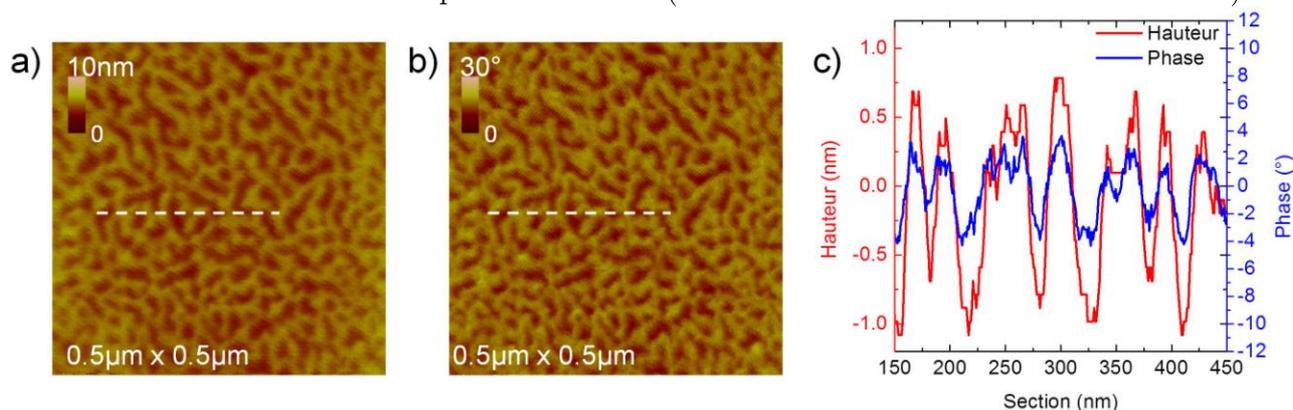


Figure 168. Structures observées au sein des domaines condensés de LPS (a) en topographie et (b) en phase. c) Profils correspondants aux traits pointillés des images (a-b).

Les zones les plus hautes présentent les phases les plus élevées et sont donc plus organisées ou rigides. À l'inverse, les zones les plus basses présentent les phases les plus faibles et sont donc plus désorganisées ou « molles ». Ces observations suggèrent que les domaines ne présentent pas uniquement une phase condensée où les molécules de LPS seraient parfaitement droites, comme suggéré en Figure 165d. Ils se distinguent par une composition plus hétérogène des molécules en leur sein.

## A.4 Discussion

### A.4.1 L'organisation bi-phasique des molécules de LPS

Les isothermes de compression suggèrent la coexistence de deux organisations pour les molécules de LPS, une phase fluide et une phase plus condensée, illustrées par l'existence d'un palier. Un tel palier n'a que peu été observé dans la littérature dans le cas des LPS [9], la majorité des travaux notant une augmentation régulière de la pression avec la compression de la monocouche [10–13]. Cette différence s'explique probablement par des LPS de nature différente ou des solvants et des sous-phases différentes pouvant modifier l'état d'agrégation initial des molécules à l'étalement. En effet, Roes *et al.* ont notamment montré l'importance de la présence ou non du noyau polysaccharide dans le comportement de la monocouche [13] tandis que Jeworrek *et al.* ont souligné l'influence de la présence de cations dans la rigidification de la monocouche [12]. Malgré ces allures différentes d'isothermes, l'ensemble des travaux cités note la coexistence d'une phase condensée au sein d'une phase plus fluide pour les LPS.

Par contre, il est envisageable que la nature de la transition soit plus compliquée qu'une « simple » transition de type liquide expansé - liquide condensé. Abraham *et al.* soulignent, en effet, le comportement de type polymérique des monocouches de LPS à l'interface air / eau, lié au fait que la partie saccharidique est probablement adsorbée à l'interface sans se solubiliser dans la sous-phase aqueuse [9]. Il semble également que

l'angle d'inclinaison des chaînes hydrophobes dans la monocouche joue un rôle dans cette transition : les molécules caractérisées par une inclinaison importante présentent une transition plus prononcée, la compression induisant une réorientation de ces molécules et une organisation plus compacte [11].

Enfin, la coexistence de deux phases lipidiques est confirmée par les résultats obtenus par AFM, qui mettent en évidence des domaines en phase condensée, de quelques nanomètres de haut, distribués au sein d'une phase plus fluide. Ces résultats sont en accord avec les observations de Derde *et al.* [2].

#### A.4.2 La structure *ripples* d'*E. coli*, reflet de l'organisation des LPS

Les domaines observés sur les monocouches de LPS ont révélé une structuration interne, jusqu'alors non mentionnée dans les diverses publications. Cette structure alterne des zones surélevées, organisées et rigides avec des zones un peu moins élevées, plus désorganisées et « molles ». Elle présente de fortes similitudes avec celle observée sur la bactérie *E. coli*, tout au moins d'un point de vue qualitatif (Figure 169). Bien que les zones structurées / rigides (zones claires) soient plus fines dans le cas des LPS seuls que pour *E. coli*, ceci suggère que l'hypothèse initiale de l'organisation en *ripples* et *inter-ripples* de la bactérie est effectivement due, essentiellement, aux LPS de sa membrane externe.

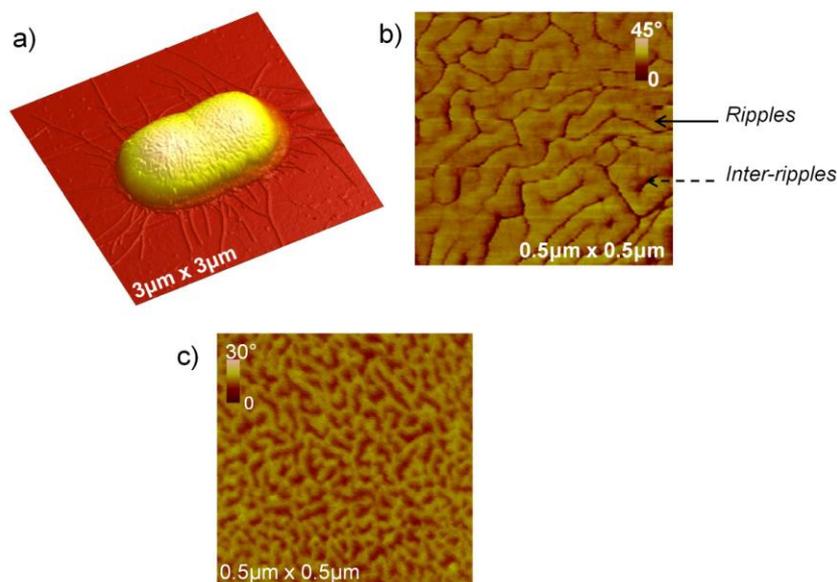


Figure 169. Comparaison entre la structure *ripples* observée sur une bactérie *E. coli* (a-b) et la structure des domaines condensés au sein d'une monocouche de LPS (c).

Toutefois, sur l'ensemble de la monocouche, l'organisation est hétérogène : des domaines condensés sont séparés par une phase plus fluide relativement large. Ceci n'est pas le cas de la structure en surface de *E. coli* qui est homogène, similaire à celle des domaines condensés de la monocouche de LPS. Cette différence pourrait être due à (i) une pression de transfert insuffisante, impliquant une disparité de comportement des LPS, ou plus probablement (ii) à l'absence, au sein de ce modèle membranaire

simplifié, de systèmes (protéines et peptidoglycane notamment) influençant potentiellement l'organisation des LPS dans la membrane externe.

Cette étude sur les monocouches montre que les LPS jouent effectivement un rôle dans la structure surfacique d'*E. coli*. La bactérie étant un système complexe, il n'est, en revanche, pas exclu que d'autres molécules participent à cette organisation de paire avec les LPS, ce qui n'est pas investigué ici, de par la simplicité du modèle.

## B. Etude nanomécanique de l'interaction NPs / *E. coli*

### B.1 Une caractérisation en milieu liquide

A l'air, l'étude quantitative du module élastique des bactéries *E. coli* et de son évolution en fonction de l'interaction avec les NPs n'a pu être obtenue étant donné la raideur relativement importante des leviers *tapping* utilisés. Aussi, avons-nous effectué une étude de ces propriétés mécaniques, avec des leviers contact plus souples, en milieu liquide (eau ultrapure), milieu qui s'approche, par ailleurs, du milieu naturel d'une bactérie.

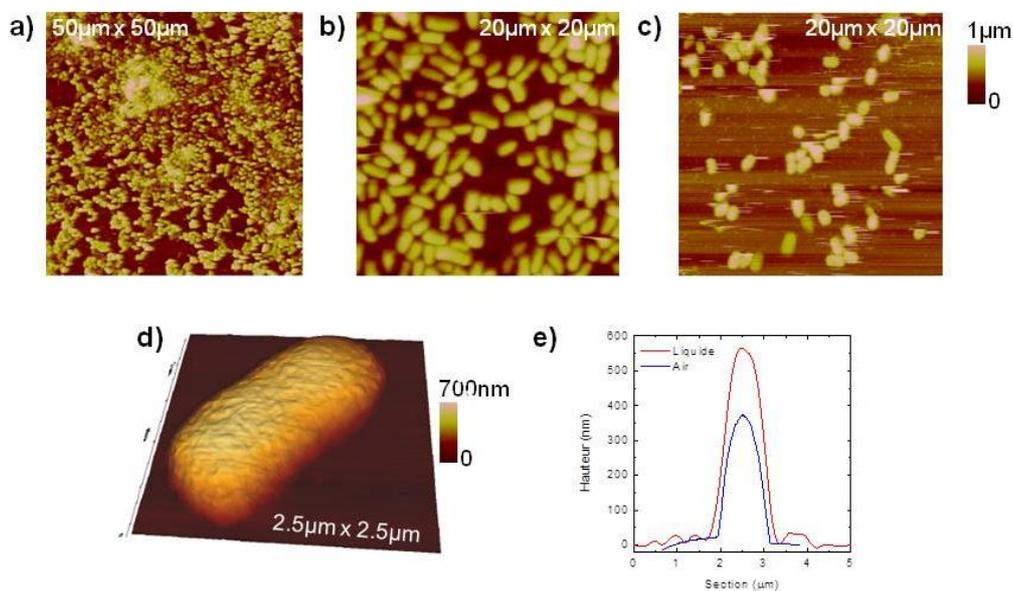


Figure 170. Caractérisation des bactéries *E. coli* par AFM en milieu liquide (eau ultrapure). Images de topographie montrant un biofilm dense avant rinçage (a-b) ou plus éparse après rinçage (c). d) Image 3D montrant la forme en bâtonnet habituelle d'*E. coli*<sup>29</sup>. e) Profil de hauteur de la bactérie présentée en (d) et, en rappel, un profil de bactérie observée à l'air.

Les bactéries sont prélevées dans une boîte de Pétri fraîchement préparée, suspendues dans de l'eau ultrapure afin d'atteindre une DO de 1. Elles sont ensuite immobilisées sur un substrat de mica grâce à une PEM dont l'optimisation de dépôt est présentée dans le chapitre 5. En milieu liquide, les bactéries *E. coli* conservent une forme en bâtonnet et les longueurs et largeurs estimées à l'air (Figure 170). Des biofilms plus denses que ceux obtenus à l'air, en raison de l'immobilisation des bactéries, peuvent être observés (Figure 170a-b). Il est toutefois possible de trouver des cellules isolées sur lesquelles est réalisée la caractérisation morphologique (Figure 170c-d). Les bactéries n'étant pas déshydratées, leur hauteur est plus importante que celle des bactéries obtenue par imagerie à l'air : en moyenne entre 500 et 600 nm,

<sup>29</sup> Cette image a été obtenue au cours d'expériences réalisées chez JPK Instruments, entreprise d'instrumentation AFM avec laquelle l'équipe Biophyna collabore.

correspondant environ au double de la hauteur estimée pour *E. coli* observée à l'air (Figure 170e). Dans ce milieu liquide, la structure *ripples* tend à disparaître au profit d'un aspect, certes encore rugueux et irrégulier, mais beaucoup plus homogène de la surface (Figure 170d). Ce phénomène pourrait être dû à (i) l'environnement liquide qui écranter certaines interactions entre la sonde et l'échantillon ou (ii) à l'état d'hydratation de la membrane externe qui permettrait une extension plus ou moins importante des chaînes de LPS. Ces dernières, quand elles sont hydratées, se comportent de manière différente et sont sans doute moins bien organisées qu'à l'air, où, par effet de déshydratation, elles se condensent.

## B.2 Module élastique d'*E. coli*

Cette étude morphologique, avec l'AFM en milieu liquide, n'est que très partielle car le but est, ici, d'étudier l'évolution des propriétés mécaniques d'*E. coli* dans un environnement naturel (liquide). Cette caractérisation nanomécanique s'entend au sens de la détermination du module élastique via des courbes de force (cf. chapitre 2), réalisées en mode contact en milieu liquide. Les CF en approche sur *E. coli* possèdent, comme attendu, l'allure caractéristique d'un échantillon mou (Figure 171) :

- une ligne de base, *i.e.* une déflexion nulle (I), loin de la surface de l'échantillon et donc en absence d'interaction ;
- une déflexion vers le haut (II), à l'approche de la surface, due aux interactions répulsives entre la sonde ( $k = 0,12$  N/m) et l'échantillon et à l'indentation de ce dernier. L'absence d'une instabilité (déflexion « négative » vers le bas) est liée à l'écrantage des interactions attractives par le milieu liquide. L'aspect non linéaire est, quant à lui, lié à une déflexion moins importante du levier que le déplacement de la céramique piézoélectrique, et est signe d'une indentation de l'échantillon (par conséquent, mou) par la pointe ;
- une partie linéaire (III), due à la déflexion du levier consécutive aux interactions répulsives entre la sonde et l'échantillon.

Qualitativement, les CF réalisées en diverses zones de la bactérie montrent des comportements très similaires, significatifs de l'homogénéité de sa réponse nanomécanique à différents niveaux de la bactérie (Figure 171a). De la même manière, des CF ont été réalisées sur divers échantillons d'*E. coli*, en sondant différentes zones. Quelques exemples montrant l'homogénéité globale de la réponse sont reportés Figure 171b. Par ailleurs, cette réponse est très différente de celle du substrat plus rigide (CF noire) pour laquelle il n'y a aucune indentation de l'échantillon par la pointe.

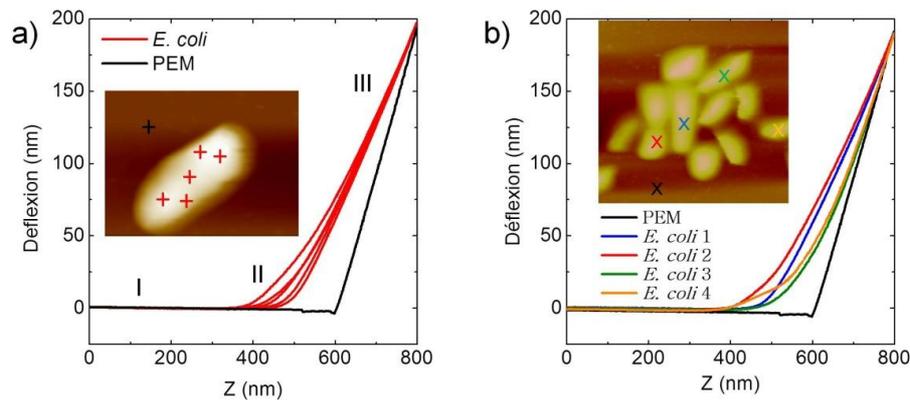


Figure 171. Caractérisation nanomécanique de bactéries *E. coli* immobilisées sur une PEM grâce à l'exploitation des CF, réalisées en milieu liquide. a) CF réalisées en divers endroits d'une même bactérie, (en insert). b) CF réalisées sur différentes bactéries d'une même zone, pointées en insert. Les CF réalisées sur le substrat (PEM) sont indiquées en noir.

Des mesures quantitatives de la rigidité des bactéries peuvent être obtenues en ajustant les CF par le modèle de Hertz [14] (Figure 172). Ce modèle donne accès au module élastique,  $E$ , de l'échantillon lorsque celui-ci est indenté par un système dont la géométrie est connue. Dans le cas d'une pointe AFM conique d'angle d'ouverture,  $\theta$ , la force d'indentation,  $F$ , dépend de la déformation,  $\delta$ , de l'échantillon suivant la loi :

$$F = \frac{2 E \tan\theta}{\pi(1 - \nu^2)} \delta^2 \quad (48)$$

Où  $\nu$  est le coefficient de Poisson (= 0.5 dans nos conditions).

En pratique, connaissant la raideur du levier et à l'aide d'une routine Matlab, développée pour cette analyse, nous pouvons traduire les CF de la déflexion,  $d$ , en fonction de la distance pointe – échantillon,  $z$  (Figure 172a), en une courbe exprimant la force d'indentation en fonction de la déformation (Figure 172b). Ces deux paramètres sont calculés selon les relations suivantes :

$$\delta = \begin{cases} 0 & z \leq z_0 \\ (z - z_0) - (d - d_0) & z \geq z_0 \end{cases} \quad (49)$$

$$F = \begin{cases} 0 & z \leq z_0 \\ k (d - d_0) & z \geq z_0 \end{cases} \quad (50)$$

Où  $(z_0, d_0)$  sont les coordonnées du point de contact.

Une fois la courbe  $F=f(\delta)$  obtenue, le module élastique de l'échantillon est calculé en ajustant cette courbe avec la formule (1) (Figure 172c). De manière générale, on estime qu'au-delà de 10 % de l'épaisseur de l'échantillon (en l'occurrence, la hauteur de la bactérie), la mesure est affectée par la rigidité du substrat. Aussi, les ajustements réalisés au cours de ce travail sont-ils effectués sur 70 nm au maximum, bien que, sur certains échantillons, l'ajustement puisse également convenir sur une plus grande distance.

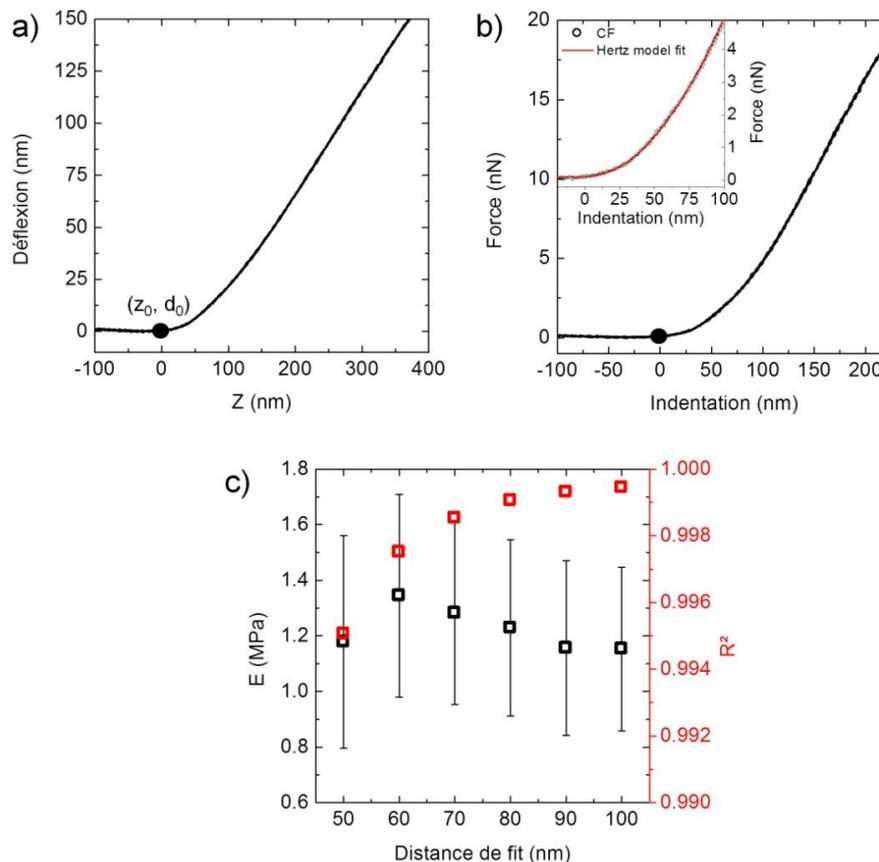


Figure 172. Les CF et leur analyse par une procédure Matlab d'extraction du module élastique. a) CF brute, réalisée sur *E. coli*, exprimant la déflexion en fonction de la distance pointe – échantillon.  $(z_0, d_0)$  est le point de contact déterminé ; la CF a été traduite afin que celui-ci soit à l'origine (0,0). b) Courbe exprimant la force en fonction de l'indentation calculée à partir de (a) et montrant en insert l'ajustement de la courbe par le modèle de Hertz. c) Extraction du module élastique de la bactérie en fonction de la distance d'ajustement (autour de la valeur critique de 10 %) et coefficient de corrélation correspondant.

Pour éviter tout artefact lié à un problème de courbure, qui viendrait interférer dans l'estimation de l'élasticité, nous ne considérerons que les CF effectuées au niveau de la région centrale de la bactérie *E. coli*. La Figure 173 présente les résultats obtenus sur quatre échantillons indépendants. Pour chaque échantillon, une pointe neuve, mais de mêmes caractéristiques (levier triangulaire, pointe conique,  $k = 0,12 \text{ N/m}$ ), est utilisée pour réaliser une dizaine de CF en diverses zones ou bactéries de l'échantillon.

Au sein d'un même échantillon, une grande dispersité est observée, le module élastique pouvant varier d'un ordre de grandeur. Cette dispersité est également constatée entre les divers échantillons (comparer échantillon 1 aux autres) et témoigne certainement du comportement mécanique intrinsèque des bactéries, potentiellement influencé par leur état physiologique ou leur adhésion sur le substrat. Toutefois, il est raisonnable de penser que des statistiques plus exhaustives, qui ne font pas l'objet de cette annexe, mèneraient à une réduction de ces fluctuations. Malgré cela, il est possible d'estimer un module élastique moyen pour *E. coli* de 1.7 MPa.

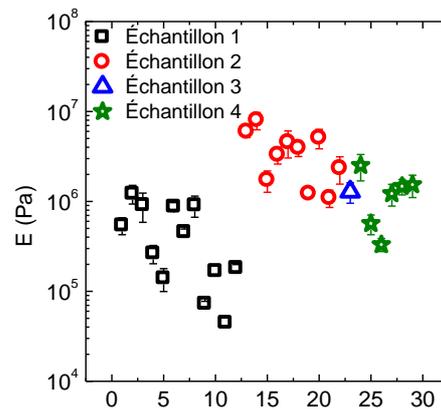


Figure 173. Module d'élasticité d'*E. coli* calculé à partir de CF (une CF, correspondant à un module élastique, est représentée par un point) réalisées sur quatre échantillons indépendants.

La littérature estime, généralement la raideur de l'échantillon,  $k_{ech}$ , liée au module élastique,  $E$ , par la relation :

$$k_{ech} = E \frac{4}{\pi} \delta \tan(\theta) \quad (51)$$

Dans notre étude, la raideur moyenne estimée est de 0.07 N/m ( $\delta = 70$  nm). Ce résultat est en bon accord avec des études précédemment menées sur *E. coli* (Tableau 16).

Tableau 16. Comparaison des constantes de raideur associées à *E. coli* dans la littérature.

Fixation	Solvant	$k_{ech}$ (N/m)	Référence
Poly-L-lysine	Eau	$0,04 \pm 0,01$	[15]
Glutaraldéhyde	Milieu tampon	0,194	[16]
Glutaraldéhyde	Milieu tampon	$0,23 \pm 0,01$	[17]
EDC/NHS <sup>30</sup>	Milieu tampon	$0,10 \pm 0,01$	[17]
EDC/NHS	Milieu tampon Tris	$0,044 \pm 0,014$	[18]
Glutaraldéhyde	Milieu tampon Tris	$0,13 \pm 0,01$	[18]

Les différences constatées par rapport à nos expériences peuvent être dues à :

- une méthode de fixation des bactéries différente : elle conduit à des forces d'adhésion différentes et donc un comportement de la bactérie différent vis-à-vis de la sonde [19];
- un solvant différent : la raideur est d'autant plus élevée que la pression osmotique est grande [20,21].

### B.3 Effet des SiO<sub>2</sub>-NPs<sup>-</sup> sur l'élasticité d'*E. coli*

<sup>30</sup> EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide, NHS : N-hydroxysuccinimide

Au cours de cette thèse, et via une étude morphologique de la bactérie, un diamètre critique de NPs a été mis en exergue pour la toxicité des  $\text{SiO}_2$ -NPs envers *E. coli* :  $50 \text{ nm} < \Phi_c < 80 \text{ nm}$  (cf. chapitre 4). En deçà de  $\Phi_c$ , la toxicité s'est traduite par des dommages morphologiques et membranaires, absents pour les NPs jugées inoffensives au-delà de  $\Phi_c$ . Aussi avons-nous décidé d'étudier les cas extrêmes des  $\text{SiO}_2$ -NPs 4 (*a priori* toxiques) et des  $\text{SiO}_2$ -NPs 100 (*a priori* inoffensives) en interaction avec *E. coli* d'un point de vue nanomécanique.

Comme pour les expériences témoins, les bactéries sont prélevées sur une boîte de Pétri fraîchement préparée, suspendues dans de l'eau ultrapure pour atteindre une DO de 1. Elles sont alors incubées avec une solution de NPs, concentrées à 1 g/L, pendant 2h, avant d'être immobilisées à la surface d'une PEM pour l'étude AFM.

### $\Phi > \Phi_c$ : cas des $\text{SiO}_2$ -NPs 100

Dans le cas de l'interaction entre  $\text{SiO}_2$ -NPs 100 et *E. coli*, la majorité des CF présente une allure similaire à celle de *E. coli* seules : après contact avec l'échantillon, la CF présente une zone non linéaire suivie par une partie linéaire (Figure 174a).

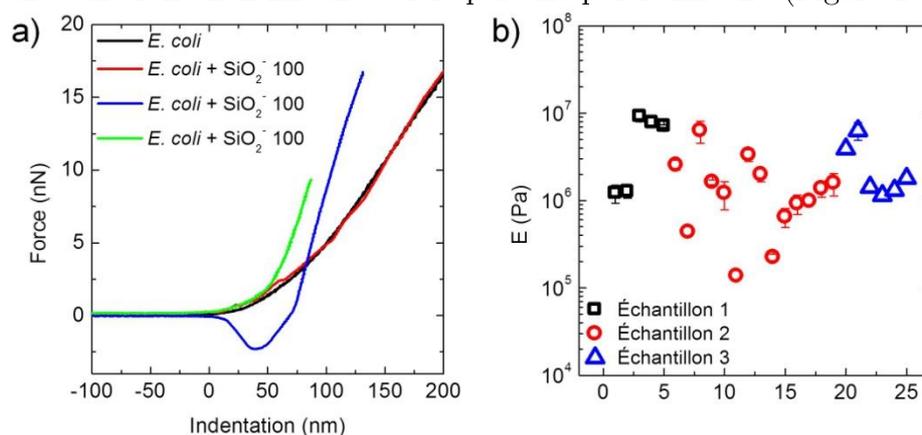


Figure 174. Analyse de l'interaction  $\text{SiO}_2$ -NPs 100 / *E. coli*. a) CF représentatives des différents cas de figure obtenus. b) Module d'élasticité calculé à partir de CF réalisées sur trois échantillons indépendants.

La zone non linéaire, témoignant de l'indentation de la bactérie, peut être parfaitement similaire à celle de *E. coli* (courbe rouge) ou de pente plus ou moins importante (courbe verte) ; il en est de même pour la partie linéaire où se mêle élasticité de l'échantillon et rigidité du substrat. Par ailleurs, sur une minorité de CF, une allure toute autre a été observée : la partie linéaire est précédée par un saut de force qui reflète une adhésion certaine de l'échantillon. Un tel saut n'a pas été observé sur les CF réalisées sur des échantillons de NPs seules et est, en conséquence, une signature de leurs interactions avec *E. coli*. Du fait de ce saut, ces CF n'ont pu être traitées par notre programme Matlab. Ce dernier appliqué à l'ensemble des autres CF a permis d'extraire le module d'élasticité des bactéries (Figure 174b). Comme pour *E. coli*, une dispersité est observée au sein d'un même échantillon et aussi entre les échantillons indépendants. Toutefois, le module élastique moyen estimé de 3.2 MPa

suggère une relative rigidification des bactéries quand elles sont traitées par les SiO<sub>2</sub>-NPs 100.

### $\Phi < \Phi_c$ : cas des SiO<sub>2</sub>-NPs 4

Dans le cas de l'interaction entre SiO<sub>2</sub>-NPs 4 et *E. coli*, trois comportements ont pu être observés :

- (a) les CF présentent une allure caractéristique d'un échantillon mou, comme celles obtenues sur *E. coli* ;
- (b) les CF présentent une zone non linéaire et une partie linéaire, séparées par un palier où la déflexion est nulle (i.e. la force constante) ;
- (c) les CF sont similaires à celles obtenues sur le substrat (PEM).

Dans le cas (a), les CF présentent une allure similaire à celle des CF réalisées sur *E. coli*, avec des indentations plus ou moins importantes (Figure 175a). Dans cette configuration, le module élastique des bactéries est déterminé et présenté en Figure 175b. Comme précédemment, malgré une dispersité relativement importante, nous déterminons un module moyen de 3.8 MPa sur l'ensemble des CF réalisées, et un module moyen de 0.6 MPa si l'on retire les points jugés « extrêmes » (zone bleue, Figure 175b).

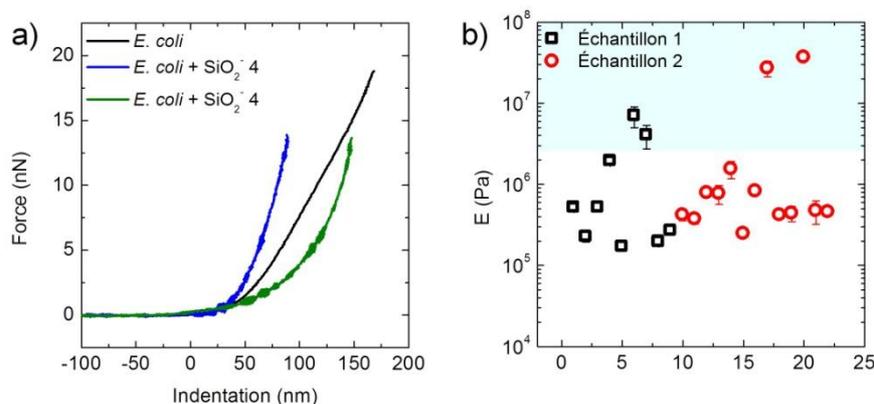


Figure 175. Analyse de l'interaction SiO<sub>2</sub>-NPs 4 / *E. coli*. a) CF représentatives des différents cas de figure obtenus. b) Module d'élasticité calculé à partir de CF réalisées sur deux échantillons indépendants.

L'indentation plus ou moins importante, observée sur ces CF, peut être associée à des morphologies de bactéries différentes. En effet, nous avons montré, au cours du chapitre 4, que les SiO<sub>2</sub>-NPs 4 pouvaient induire une transition morphologique et des dommages membranaires, menant à terme à la lyse cellulaire. Certaines bactéries, en présence de SiO<sub>2</sub>-NPs 4, présentent donc un affaissement comparé à la morphologie attendue d'*E. coli* saine. En effet, des CF ont été réalisées sur deux bactéries dans deux états différents (Figure 176a-b): la bactérie 1 présente un profil affaissé suggérant une bactérie dégradée tandis que la bactérie 2 présente un profil cohérent avec l'état sain d'une bactérie. Pour les bactéries affaissées, l'altération de leur intégrité membranaire ne fait aucun doute, et est en accord avec les CF obtenues. La CF de la bactérie 2

indique une rigidité plus importante que celle de la bactérie 1 (Figure 176c) : la première possède un module élastique de 7 MPa et la seconde un module de 0.4 MPa.

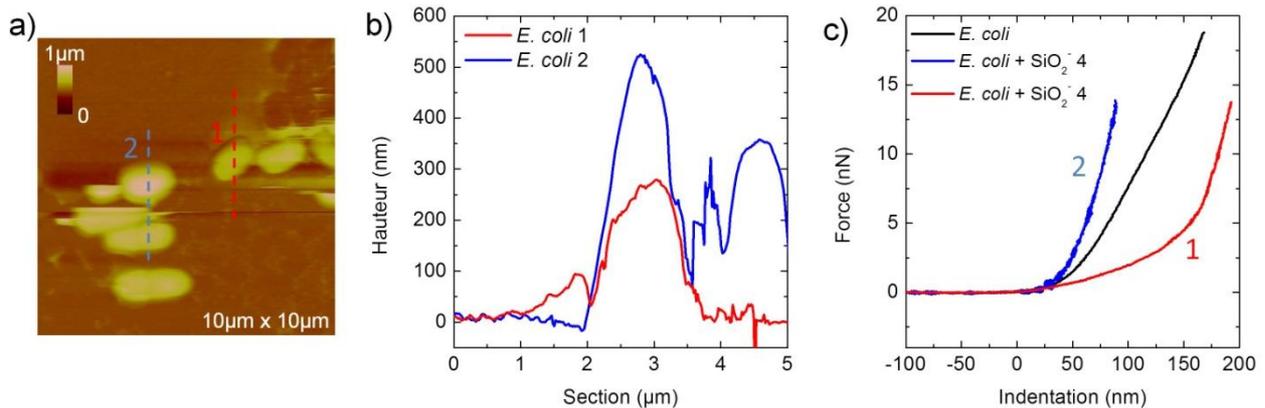


Figure 176. a) Image AFM de hauteur, réalisée en milieu liquide, d'un échantillon de bactéries *E. coli* traitées par des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-4$ . b) Profils de hauteur des deux bactéries évoquées en (a). c) CF réalisées sur ces deux bactéries et, en rappel, une CF réalisé sur un échantillon contrôle d'*E. coli*.

Par ailleurs, le cas (b) n'a été que très peu observé, mais soulève, toutefois, un effet intéressant. La CF présente une allure en trois temps : (A) une zone non linéaire, caractéristique d'un échantillon mou, (B) un palier de force constante sur quelques dizaines de nanomètres puis (C) une partie linéaire (Figure 177a). Cette CF est associée à une bactérie présentant un profil de hauteur inférieur à celui d'une bactérie saine non traitée, mais similaire à celui évoqué pour la bactérie 1 de la Figure 176.

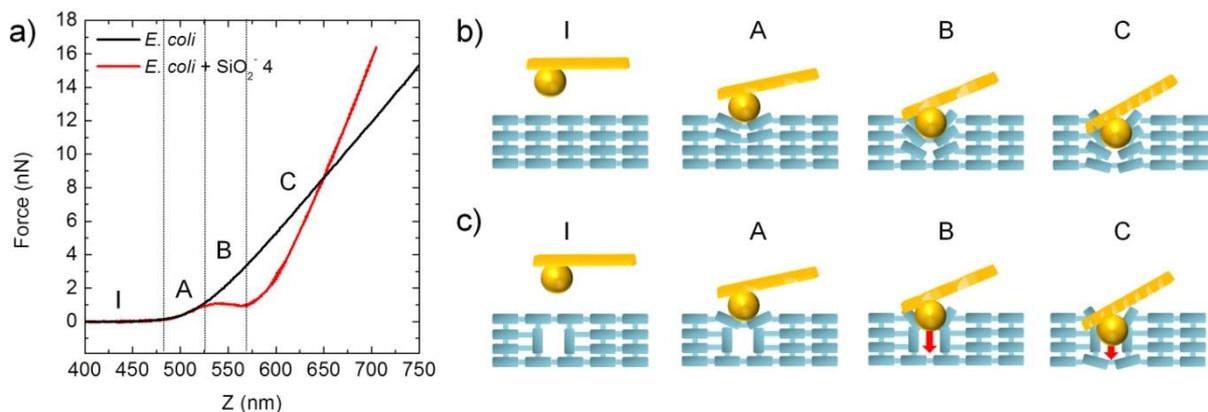


Figure 177. a) Comparaison d'une CF réalisée sur une bactérie saine et traitée par des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-4$ . Schémas illustrant le comportement de la sonde AFM en interaction avec la bactérie (b) contrôle et (c) traitée par des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-4$ , suivant les différentes zones indiquées en (a). De façon très schématique, la bactérie est représentée par un réseau de molécules (l'ensemble pouvant représenter la OM, le peptidoglycane et la membrane plasmique), possédant une organisation donnée (couche bleue en b) conférant une élasticité certaine à la bactérie. L'exposition aux  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-4$  engendre des défauts au niveau de cette structure qui la fragilisent (c) : la sonde indente, dans un premier temps, l'échantillon puis glisse au sein du défaut formé (flèche rouge).

Dans le cas d'une bactérie saine, non traitée, la CF ne présente pas de palier mais une partie non linéaire, correspondant à l'indentation de l'échantillon et à son comportement élastique, puis une partie linéaire, correspondant aux interactions répulsives avec la sonde (Figure 177a-b). Dans la configuration (b), le palier pourrait

s'expliquer par l'effet des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-4$  sur l'organisation de l'enveloppe bactérienne, et sa potentielle dégradation voire destruction. En effet, la sonde indente, dans un premier temps, la bactérie dont le comportement est élastique (A), puis rencontre une structure au sein de l'enveloppe bactérienne où elle semble glisser (pénétrer sans aucune résistance), l'indentation étant alors quasi-nulle (B) ; franchie cette structure, on retrouve le caractère élastique de la bactérie, couplé aux propriétés du substrat (C) (Figure 177c). Ce palier pourrait ainsi confirmer que les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-4$  induisent une modification structurelle de l'enveloppe bactérienne, voire de la membrane plasmique, précédemment évoquée au chapitre 4 (transition dans l'organisation des LPS et invaginations membranaires).

Enfin, au cours du traitement d'*E. coli* par les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-4$ , certaines zones de l'échantillon ont montré, non pas le film bactérien habituel, mais une sorte de film plus ou moins épais et relativement homogène (Figure 178a).

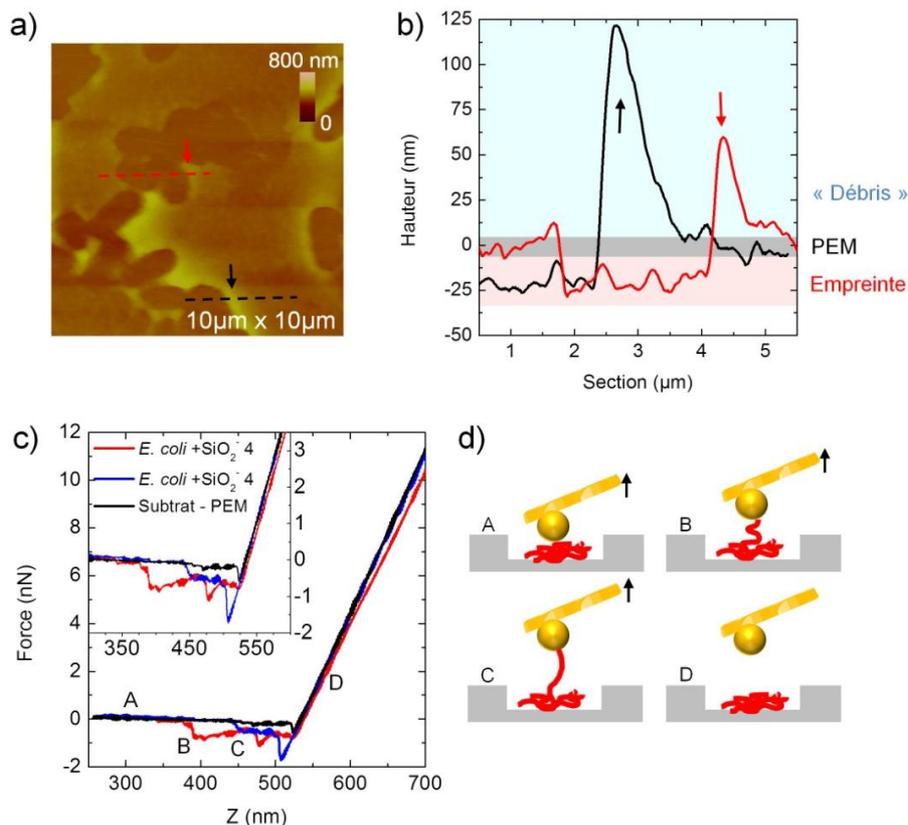


Figure 178. a) Image AFM du traitement d'*E. coli* par les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-4$ , montrant une zone dépourvue de cellules saines : seules des « empreintes » subsistent. b) Profils de hauteur de deux « empreintes » indiquées en (a) montrant une accumulation de matière plus importante sur les bords. c) CF réalisées sur ces « empreintes » témoignant de la sensibilité de la pointe au substrat (partie linéaire) mais également à des phénomènes d'adhésion de matière sur la pointe. d) Schéma expliquant les sauts d'adhésion observés sur les CF par la présence au sein de « l'empreinte » de débris.

Son épaisseur varie entre quelques dizaines de nanomètres jusqu'à une centaine environ, notamment au niveau des bordures du film (Figure 178b). Ce film sera, par la suite, appelé des « empreintes » bactériennes. Etant données les profils des bordures, il est donc peu probable qu'il s'agisse d'agrégats de NPs ou de polyélectrolytes

constituant la multicouche substrat, qui seraient présents sur l'ensemble de la zone imagée. En revanche, considérant la toxicité attendue des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  4, il est possible qu'il s'agisse de débris issus de la lyse cellulaire, les « empreintes » contenant également, ou non, certains débris en moindre quantité (sinon ils seraient également visibles).

Les CF, en retrait, réalisées au niveau de ces « empreintes » correspondent au cas (c) (Figure 178c). Elles présentent une ligne de base (déflexion quasi nulle) suivie d'une partie purement linéaire dont la pente est proche de 1, comme pour la PEM. Toutefois des différences émergent au niveau de la ligne de base : contrairement au substrat, les CF présentent des sauts de force, plus ou moins importants et nombreux, qui témoignent de la présence d'une structure autre que celle de la multicouche de polyélectrolytes, engendrant une certaine adhésion attirant la pointe malgré l'éloignement de l'échantillon (Figure 178d). De telles caractéristiques tendraient à suggérer la présence de débris cellulaires réticulés au sein de ces « empreintes ».

### Influence des $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$ sur l'élasticité d'*E. coli*

L'ensemble des résultats obtenus sur *E. coli* traitées ou non par des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  est regroupé en Figure 179. Comme nous l'avons vu précédemment, la distribution des modules élastiques obtenue dans les trois cas est relativement dispersée.

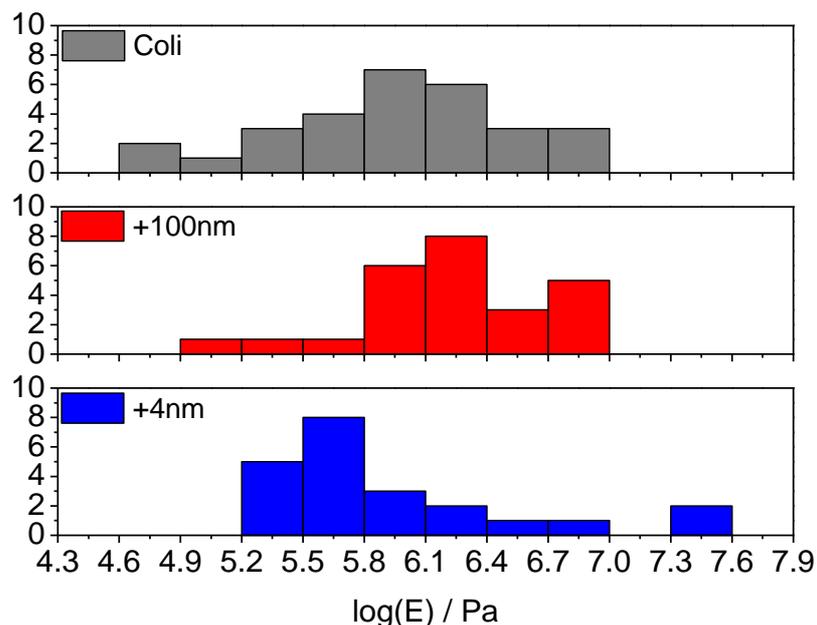


Figure 179. Distributions des modules élastiques des bactéries *E. coli* seules et traitées par des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  4 et des  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  100.

Toutefois cette représentation montre que les modules estimés pour *E. coli* sont équi-répartis autour d'une valeur centrale de l'ordre de 0.9 MPa. Le traitement d'*E. coli* par les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$ , quel que soit leur diamètre, conduit à un déséquilibre de cette répartition : (i) les bactéries traitées par les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  100 ont un module proche de cette valeur centrale bien que la répartition soit en faveur de valeurs supérieures tandis que (ii) celles traitées par les  $\text{SiO}_2\text{-NPs}^-$  4 ont un module, majoritairement, inférieur.

Malgré ces tendances, les statistiques ne sont pas suffisamment poussées, à ce jour, pour dégager une « loi » pour valider la rigidification ou la relaxation des bactéries suite à leur traitement par diverses NPs.

## Bibliographie

- [1] Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 2003;338:2431–47. doi:10.1016/j.carres.2003.07.010.
- [2] Derde M, Nau F, Lechevalier V, Guérin-Dubiard C, Paboeuf G, Jan S, et al. Native lysozyme and dry-heated lysozyme interactions with membrane lipid monolayers: Lateral reorganization of LPS monolayer, model of the *Escherichia coli* outer membrane. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2015;1848:174–83. doi:10.1016/j.bbamem.2014.10.026.
- [3] Stefaniu C, Brezesinski G, Méhwald H. Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* 2014;208:197–213. doi:10.1016/j.cis.2014.02.013.
- [4] Grauby-Heywang C, Moroté F, Mathélié-Guinlet M, Gammoudi I, Faye NR, Cohen-Bouhacina T. Influence of oxidized lipids on palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine organization, contribution of Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films. *Chem Phys Lipids* 2016;200:74–82. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.07.001.
- [5] Deleu M, Crowet J-M, Nasir MN, Lins L. Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2014;1838:3171–90. doi:10.1016/j.bbamem.2014.08.023.
- [6] Goksu EI, Vanegas JM, Blanchette CD, Lin W-C, Longo ML. AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2009;1788:254–66. doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.021.
- [7] Garcia-Manyes S, Domènech Oscar, Sanz F, Montero MT, Hernandez-Borrell J. Atomic force microscopy and force spectroscopy study of Langmuir-Blodgett films formed by heteroacid phospholipids of biological interest. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2007;1768:1190–8. doi:10.1016/j.bbamem.2007.02.004.
- [8] Faye N rokhaya. Study by atomic force microscopy and fluorescence microscopy of the interaction of silica nanoparticles with supported lipid films. Université de Bordeaux, 2014.
- [9] Abraham T, Schooling SR, Beveridge TJ, Katsaras J. Monolayer Film Behavior of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* at the Air/Water Interface. *Biomacromolecules* 2008;9:2799–804. doi:10.1021/bm800562r.
- [10] Michel JP, Wang YX, Dé E, Fontaine P, Goldmann M, Rosilio V. Charge and aggregation pattern govern the interaction of plasticins with LPS monolayers mimicking the external leaflet of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2015;1848:2967–79. doi:10.1016/j.bbamem.2015.09.005.
- [11] Le Brun AP, Clifton LA, Halbert CE, Lin B, Meron M, Holden PJ, et al. Structural Characterization of a Model Gram-Negative Bacterial Surface Using

- Lipopolysaccharides from Rough Strains of *Escherichia coli*. *Biomacromolecules* 2013;14:2014–22. doi:10.1021/bm400356m.
- [12] Jeworrek C, Evers F, Howe J, Brandenburg K, Tolan M, Winter R. Effects of Specific versus Nonspecific Ionic Interactions on the Structure and Lateral Organization of Lipopolysaccharides. *Biophys J* 2011;100:2169–77. doi:10.1016/j.bpj.2011.03.019.
- [13] Roes S, Seydel U, Gutschmann T. Probing the Properties of Lipopolysaccharide Monolayers and Their Interaction with the Antimicrobial Peptide Polymyxin B by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 2005;21:6970–8. doi:10.1021/la048218c.
- [14] Thomas G, Burnham NA, Camesano TA, Wen Q. Measuring the Mechanical Properties of Living Cells Using Atomic Force Microscopy. *J Vis Exp* 2013. doi:10.3791/50497.
- [15] Vadillo-Rodriguez V, Schooling SR, Dutcher JR. In Situ Characterization of Differences in the Viscoelastic Response of Individual Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cells. *J Bacteriol* 2009;191:5518–25. doi:10.1128/JB.00528-09.
- [16] Sullivan CJ, Venkataraman S, Retterer ST, Allison DP, Doktycz MJ. Comparison of the indentation and elasticity of *E. coli* and its spheroplasts by AFM. *Ultramicroscopy* 2007;107:934–42. doi:10.1016/j.ultramic.2007.04.017.
- [17] Volle CB, Ferguson MA, Aidala KE, Spain EM, Núñez ME. Spring constants and adhesive properties of native bacterial biofilm cells measured by atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008;67:32–40. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.07.021.
- [18] Velegol SB, Logan BE. Contributions of Bacterial Surface Polymers, Electrostatics, and Cell Elasticity to the Shape of AFM Force Curves. *Langmuir* 2002;18:5256–62. doi:10.1021/la011818g.
- [19] Méndez-Vilas A, Gallardo-Moreno AM, González-Martín ML. Atomic Force Microscopy of Mechanically Trapped Bacterial Cells. *Microsc Microanal* 2007;13:55–64. doi:10.1017/S1431927607070043.
- [20] Arnoldi M, Fritz M, Bäuerlein E, Radmacher M, Sackmann E, Boulbitch A. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys Rev E* 2000;62:1034.
- [21] Gaboriaud F, Bailet S, Dague E, Jorand F. Surface Structure and Nanomechanical Properties of *Shewanella putrefaciens* Bacteria at Two pH values (4 and 10) Determined by Atomic Force Microscopy. *J Bacteriol* 2005;187:3864–8. doi:10.1128/JB.187.11.3864-3868.2005.



## C. Publications

Les travaux portant sur l'influence de la taille et de la charge des SiO<sub>2</sub>-NPs sur *E. coli* ont fait l'objet d'un article, publié en 2017 dans la revue *Advances in Colloids and Interface Science* : « *Probing the threshold of membrane damage and cytotoxicity effects induced by silica nanoparticles in Escherichia coli bacteria* ».

Les travaux portant sur l'étude du vieillissement du biofilm bactérien de *E. coli* ont été publiés en 2016 dans la revue *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* : « *Morphological and nanostructural surface changes in Escherichia coli over time, monitored by atomic force microscopy* ».

Les travaux préliminaires sur la conception du biocapteur, présentés au cours du congrès Eurosensors 2016, ont fait l'objet d'un *proceeding* dans *Procedia Engineering* : « *Silica Nanoparticles Assisted Electrochemical Biosensor for the Detection and Degradation of Escherichia Coli Bacteria* ».

Des travaux antérieurs, portant sur l'étude de monocouches lipidiques, ont fait l'objet d'un article, publié en 2016 dans la revue *Chemistry and physics of lipids* : « *Influence of oxidized lipids on palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine organization, contribution of Langmuir monolayers and Langmuir–Blodgett films* ».